

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

**EFEITO DO OXYRESVERATROL EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA**

**HUMANO E SUA ASSOCIAÇÃO COM OS QUIMIOTERÁPICOS**

**DOXORRUBICINA E MELFALANO**

Carlos Luan Alves Passos

Rio de Janeiro

2020



**EFEITO DO OXYRESVERATROL EM CÉLULAS DE CÂNCER HUMANO E  
SUA ASSOCIAÇÃO COM OS QUIMIOTERÁPICOS DOXORRUBICINA E  
MELFALANO.**

**Carlos Luan Alves Passos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição, do Instituto de Nutrição Josué de Castro, como requisito para obtenção do título de mestre em Nutrição Humana.

**Orientadores:**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eliane Fialho de Oliveira

Dr. Christian Ferreira

Rio de Janeiro

Fevereiro/2020

## FICHA CATALOGRÁFICA

AP289e Alves Passos, Carlos Luan  
EFEITO DO OXYRESVERATROL EM CÉLULAS DE CÂNCER DE  
MAMA HUMANO E SUA ASSOCIAÇÃO COM OS QUIMIOTERÁPICOS  
DOXORRUBICINA E MELFALANO / Carlos Luan Alves  
Passos. -- Rio de Janeiro, 2020.  
103 f.

Orientadora: Eliane Fialho de Oliveira.  
Coorientadora: Christian Ferreira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do  
Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de  
Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2020.

1. câncer de mama. 2. oxyresveratrol. 3.  
polydatin. 4. doxorubicina. 5. melfalano. I.  
Fialho de Oliveira, Eliane , orient. II. Ferreira,  
Christian, coorient. III. Título.

**EFEITO DO OXYRESVERATROL EM CÉLULAS DE CÂNCER HUMANO E  
SUA ASSOCIAÇÃO COM OS QUIMIOTERÁPICOS DOXORRUBICINA E  
MELFALANO.**

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO 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 PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM NUTRIÇÃO HUMANA.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Prof.<sup>a</sup> Eliane Fialho de Oliveira (Titular)**  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

**Prof.<sup>a</sup> Anna Paola Trindade Rocha Pierucci (Titular/Interno)**  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

**Prof.<sup>a</sup> Adriana Passos Oliveira (Titular/Externo)**  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

**Prof. Felipe Leite de Oliveira (Titular/Revisor)**  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

**Prof.<sup>a</sup> Mariana Costa Monteiro (Suplente/Interno)**  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

**Prof. Julio Beltrame Daleprane (Suplente/Externo)**  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Fevereiro/2020

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Alimentos Funcionais (LABAFs), do Instituto de Nutrição Josué de Castro e no Centro Nacional de Bioimagem (CENABIO), ambos localizados no Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Eliane Fialho de Oliveira e do Dr. Christian Ferreira. O projeto contou com a colaboração do Prof. Jerson Lima Silva e Prof. Marcos Henrique Ferreira Sorgine, ambos do Instituto de Bioquímica Médica IBqM, UFRJ, na vigência de auxílios financeiros concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

**Dedico este trabalho a minha família pelo  
imenso incentivo e apoio.**

## **AGRADECIMENTOS**

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar a bom porto sem o precioso apoio de várias pessoas.

Em primeiro lugar, agradeço a minha orientadora Lili, por me aceitar de braços abertos no laboratório e ter acreditado no meu potencial, permitindo que eu pudesse pensar e desenvolver meu senso crítico. Muito obrigado por tudo!

Ao meu coorientador Chris, que desde o início da minha vida acadêmica, lá em 2012, ainda no curso de Biomedicina, enxergou em mim um potencial pesquisador. Agradeço por todos esses anos de amizade, aprendizados, discussões de artigos/experimentos e por ter passado os perrengues da farmácia sempre me motivando. Agradeço também pelas caronas que me salvaram todos esses anos.

Gratidão em especial a Prof.<sup>a</sup> Mariana Monteiro, que sem ela eu não teria condições de participar da seleção do mestrado, obrigado por acreditar no meu potencial.

Ao Prof. Jerson Lima Silva e ao Prof. Marcos Henrique Ferreira Sorgine que colaboraram com este trabalho, disponibilizando reagentes, equipamentos e instalações dos laboratórios.

À Prof.<sup>a</sup> Denise Bouts, pela amizade, discussões de protocolos e experimentos. Por lembrar a importância do consumo de frutas, sempre me dando uma banana orgânica ou uma tangerina (rsrsrs). Obrigado pelo carinho!

À Iris Leite, que me mostrou o verdadeiro significado de coragem, mesmo passando por dificuldades, nunca perdeu o bom humor, sempre com conversas divertidas e desabafos, cara eu sou muito seu fã!!! Obrigado pelos docinhos que alegraram as minhas tardes.

As alunas de IC Anna, Águida, Carol, Cristiane, Nathalia, Gleiciane, Karina e Rebeca que pude acompanhar o crescimento profissional durante os anos. Desejo o melhor a vocês!

Aos professores Maria Lucia, Ana Luísa e Marcelo pelas palavras de incentivo.

A todos os amigos do LABAFs, Julia, Luciana, Patrícia, Kim e Bia.

As técnicas Alice e Eliete do Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses pela amizade de anos.

Muito obrigado a todos os amigos do CENABIO, em especial a Ruana e a Thaís pelo agradável convívio, pelo apoio e pelos papos na sala de cultura.

Agradeço também a participação grandiosa da comissão avaliadora desta dissertação de mestrado que foi extremamente solícita em aceitar o convite para a minha defesa.

Aos meus pais Neuza e Carlos, pelo amor e carinho por acreditarem sempre nos meus sonhos.

Aos meus segundos pais Anilda, Waldir e toda família Ferreira, obrigado por permitir que eu fizesse parte de suas vidas.

Aos meus avos Inery e Geraldo que sempre foram o meu porto seguro, sempre me incentivando a estudar e a correr atrás dos meus objetivos. Saudades!

Aos meus familiares, tia Graça, tio Clovis, tia Conceição, tio Orivaldo, Emilly e a todos da família Passos. Em especial a minha prima Inery, prima se estou onde estou agradeço a você, por ser a inspiração da minha vida.

Agradeço a Deus e a todos os amigos que direta ou indiretamente me acompanharam, me inspiraram e iluminaram o caminho para que tudo ocorresse da melhor forma possível. Obrigado!

“A ciência nunca resolve um problema sem criar  
pelo menos outros dez.”

**George B. Shaw**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

**Figura 1.** Fases da carcinogênese.

**Figura 2.** Os dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 no Brasil.

**Figura 3.** Fotomicrografia representativa das células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231.

**Figura 4.** Estrutura química da Doxorrubicina.

**Figura 5.** Estrutura química do Melfalano.

**Figura 6.** Aplicação de produtos naturais no câncer nas vias de morte por apoptose.

**Figura 7.** Estrutura química do Polydatin.

**Figura 8.** Estrutura química do Oxyreveratrol.

**Tabela 1.** Classificação molecular dos tumores de mama.

## LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
Caspases	Cisteinil-aspartato proteases
Cdc25A	do inglês, <i>Cell division cycle 25A</i>
CDK	do inglês, <i>Ciclin dependent kinases</i>
CI	Índice de combinação
CK5	Citoceratina 5
COX-2	ciclooxygenase-2
ECL	do inglês <i>Enhanced chemiluminescence</i>
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
D-MEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
DMEM F-12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
DOX	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
G1	do inglês, Gap phase 1
G2	do inglês, Gap phase 2
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GLUT4	Transportador de glicose 4
HER2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico

HepG2	Células humanas de câncer hepático
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória para 50 % da população
INCA	Instituto Nacional de Câncer
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IS	Índice de seletividade
M	Mitose
MCF-7	Células humanas de adenocarcinoma de mama
MCF-10A	Células epiteliais de mama humano não tumorigênica
MDA-MB-231	Células humanas de adenocarcinoma de mama metastático
MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
MEL	Melfalano
NaCl	Cloreto de sódio
NF-κB	do inglês, <i>Factor nuclear kappa B</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXY	Oxyresveratrol
PARP	Poli-ADP-ribose polimerase
PBS	Tampão fosfato salino
PFK	Fosfofrutoquinase
PI	Iodeto de propídio, do inglês <i>Propidium iodide</i>

POLY	Polydatin
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
RE	Receptor de estrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RP	Receptor de progesterona
SFB	Soro fetal bovino
SKOV3	Células humanas de carcinoma ovariano
tBPH	terc-butil-hidroperóxido
TTN	Tumores triplo-negativos
UFC	Unidade Formadora de Colônia
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

## **Apresentação**

A presente dissertação foi elaborada no modelo de artigo científico no qual segue os tópicos de introdução, objetivo geral, objetivos específicos, material e métodos, conclusão e referências bibliográficas. Os resultados obtidos e a discussão estão apresentados no manuscrito que será submetido para a revista *Journal of Natural Products* (**anexo 1**).

## **Sumário**

<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1    O câncer .....	1
1.2    Cenário mundial e nacional do câncer de mama .....	3
1.3    As células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 e suas classificações moleculares .....	4
1.4    Tratamento do câncer de mama .....	7
1.4.1    Doxorrubicina .....	8
1.4.2    Melfalano .....	9
1.5    Câncer de mama e os produtos de origem natural .....	10
1.5.1    Polydatin .....	14
1.5.2    Oxyresveratrol.....	15
1.6    Associação de quimioterápicos antineoplásicos com produtos naturais .....	17
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>19</b>
2.1    Objetivo geral .....	19
2.2    Objetivos específicos .....	19
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>20</b>
3.1    Reagentes .....	20
3.2    Linhagens celulares .....	20
3.3    Compostos bioativos e quimioterápicos .....	21
3.4    Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT (3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromide).....	21
3.5    Determinação do IC <sub>50</sub> .....	22
3.6    Índice de combinação (CI) .....	22
3.7    Análise isobolográfica .....	22
3.8    Índice de seletividade (IS) .....	22
3.9    Análise morfológica .....	23
3.10    Teste de unidade formadora de colônia (UFC) .....	23
3.11    Produção de espécies reativas de oxigênio .....	23
3.12    Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) .....	24
3.13    Análise do ciclo celular .....	24
3.14    Identificação de morte celular .....	24
3.15    Avaliação de células apoptóticas por coloração com DAPI .....	25

3.16	Imunocitoquímica.....	25
3.17	Reação de Polimerase em Cadeia em tempo real (RT-qPCR).....	26
3.18	Análise estatística.....	26
<b>4.</b>	<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>27</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>27</b>
<b>6.</b>	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>28</b>
<b>ANEXO A</b>		<b>44</b>
<b>ANEXO B</b>		<b>85</b>

## **Resumo**

O câncer de mama é o segundo tipo mais comum de câncer e o responsável pela maioria das mortes de mulheres no mundo. A quimioterapia com o uso de antineoplásicos como a Doxorrubicina (DOX) e Melfalano (MEL) é utilizada no tratamento do cancer de mama, entretanto, esse tipo de terapia não atua apenas nas células tumorais, mas também nas células saudáveis, resultando nos efeitos colaterais conhecidos. Sabe-se que os produtos naturais podem atuar impedindo o processo de formação do tumor, além de apresentarem toxicidade reduzida quando comparados a terapia convencional. Os polifenóis Polydatin (POLY), encontrado na uva, e o Oxyresveratrol (OXY), encontrado na amora, apresentam vários efeitos biológicos descritos, entretanto, seus mecanismos de ação no câncer de mama não estão completamente elucidados. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito dos polifenóis POLY e OXY e dos quimioterápicos DOX e MEL, isolados e associados em culturas de células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231. Nas células não tumorais MCF-10A, POLY e OXY não apresentaram efeito citotóxico e POLY não apresentou efeito citotóxico em células tumorais. Além disso, nossos resultados mostraram que OXY, DOX e MEL apresentaram citotoxicidade na linhagem MCF-7 com IC<sub>50</sub> de 164,10 µM, 22,60 µM e 155,50 µM, e para a linhagem MDA-MB-231 IC<sub>50</sub> de 287,08 µM, 32,55 µM e 240,26 µM, respectivamente, com alterações morfológicas observadas na microscopia de campo claro após 24 horas de tratamento. A associação de OXY, DOX e MEL reduziu a viabilidade celular de maneira dose dependente, com redução de 4,0 e 5,0 vezes as concentrações de DOX e MEL na linhagem MCF-7, respectivamente, e 16 vezes as concentrações de DOX e MEL na linhagem MDA-MB-231. O OXY, DOX, MEL, OXY + DOX e OXY + MEL alteraram a produção de espécies reativas de oxigênio e também o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) nas células de câncer de mama. As associações OXY, DOX e MEL foram capazes de alterar o ciclo celular, DOX e OXY + DOX levam as células à necrose, além disso, o OXY foi capaz de levar as células à apoptose e à regulação positiva da caspase-3 nas células MDA-MB-231. Em resumo, nossos resultados demonstraram o efeito anti-câncer de mama *in vitro* do OXY e suas associações com agentes quimioterápicos, e não apresentou efeito tóxico em células não-tumorais, sugerindo esse composto bioativo como um promissor candidato para ensaios clínicos.

## ABSTRACT

Breast cancer is the second most common type of cancer and the one responsible for most deaths in women in the world. Chemotherapy with the use of antineoplastic agents such as Doxorubicin (DOX) and Melfalan (MEL) is used in the treatment of breast cancer, however, this type of therapy acts not only on tumor cells, but also on healthy cells, resulting in side effects known. It is known that natural products can act by preventing the tumor formation process, in addition to presenting reduced toxicity when compared to conventional therapy. The polyphenols Polydatin (POLY) found in the grape and the Oxyresveratrol (OXY) found in blackberry have several biological effects described, however, their mechanisms of action in breast cancer are not completely elucidated. The aim of this study was to investigate the effect of POLY, OXY and chemotherapy drugs Doxorubicin (DOX) and Melphalan (MEL), isolated and associated in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell cultures. In MCF-10A cells, a non-tumor cells, POLY and OXY showed no cytotoxicity effects and POLY does not present cytotoxic effect in tumor cells. Besides, our results showed that OXY, DOX and MEL presented cytotoxicity in MCF-7 with IC<sub>50</sub> of 164.10 µM, 22.60 µM and 155.50 µM, and for MDA-MB-231 287.08 µM, 32.55 µM and 240.26 µM, respectively, after 24 hours of treatment and with morphological changes observed from light microscopy. The association of OXY, DOX and MEL reduced the cell viability in a dose-dependent manner with decrease of 4.0- and 5.0-fold the concentrations of DOX and MEL in MCF-7, respectively, and 16-fold the concentrations of DOX and MEL in MDA-MB-231. The OXY, DOX, MEL, OXY + DOX and OXY + MEL alter the reactive oxygen species production and also ΔΨm in breast cancer cells. The OXY, DOX or MEL, and associations were able to alter the cell cycle, DOX and OXY + DOX leads the cells to necrosis, besides OXY was able to lead the cells to apoptosis and upregulate caspase-3 in MDA-MB-231 cells. In summary, our results demonstrated the *in vitro* anti-breast cancer effect of OXY and its associations with chemotherapeutic agents, however not in non-tumor cells, suggesting that this bioactive compound may be considered as a promising candidate for clinical trials.

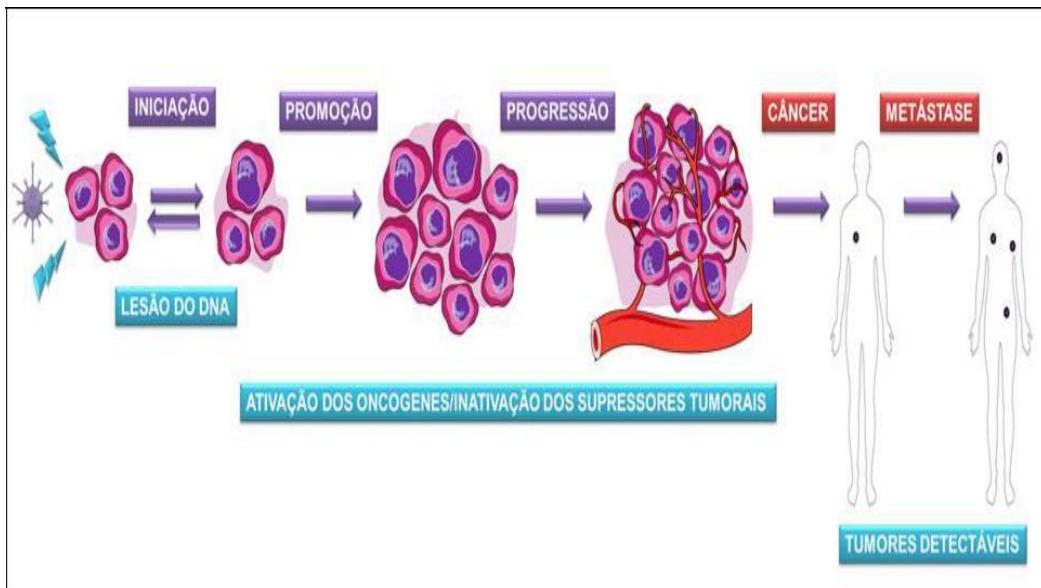
## **1. Introdução**

### **1.1 O câncer**

A palavra câncer foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates (460 a 377 a.C.), de origem grega, *Karkinos*, significa caranguejo, devido à comparação com o seu modo de desenvolvimento infiltrante, aderindo à areia, sendo difícil a sua remoção. No entanto, os primeiros relatos da doença são descritos em antigos manuscritos egípcios, escritos entre 1500 e 1600 anos a.C. Dentre os achados históricos, o papiro de Smith, escrito possivelmente por Imhotep, o médico arquiteto que projetou e construiu a pirâmide de degraus em Sakkara no século 30 a.C. contém as primeiras referências ao câncer de mama, advertindo que quando esses tumores de peito são frios ao tocar, inchados e se espalham, nenhum tratamento seria bem sucedido (Faguet *et al.*, 2015).

Atualmente, sabe-se que o câncer é um conjunto de mais de 100 doenças que possuem em comum o crescimento rápido e invasivo de células com mutações em seu genoma. As alterações genéticas que promovem o desenvolvimento tumoral ocorrem em duas classes de genes que regulam a célula, os proto-oncogenes, que promovem o crescimento e os genes supressores de tumor, que inibem o crescimento celular. 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 *et al.*, 2010). Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2020).

O processo da carcinogênese (**Figura 1**) acontece de forma lenta e gradativa, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa se prolifere e dê origem a um tumor visível. Este processo envolve uma série de mudanças genéticas e epigenéticas em níveis morfológicos, celulares e moleculares, podendo ser dividida em três estágios principais: iniciação, promoção e progressão tumoral (INCA, 2020; Vincent & Gatenby, 2008; Pitot, 2007).



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

A etapa de iniciação é caracterizada por alterações genéticas estruturais irreversíveis, que ocorrem no DNA da célula a partir da exposição a agentes mutagênicos, tais como, agentes físicos (ex. radiações ionizantes e luz ultravioleta), biológicos (ex. vírus) ou químicos (ex. hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e nitrosamina). Em geral, é necessária a exposição repetida aos carcinógenos para que haja o desenvolvimento tumoral (Dayem *et al.*, 2016; Béliceau & Gingras, 2007).

A etapa de promoção está relacionada à proliferação de células que foram iniciadas e sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. É considerada uma etapa reversível da tumorigênese, pois a suspensão do contato com os agentes promotores, muitas vezes interrompe o processo nesse estágio. Nesta fase originam-se as células pré-cancerosas (Dayem *et al.*, 2016; Vincent & Gatenby, 2008; Béliceau & Gingras, 2007).

A etapa de progressão tumoral é o estágio final na qual as células se transformam gradualmente para o estado maligno. Nesta fase, as células alteradas se multiplicam descontroladamente e de forma irreversível. A metástase e a invasividade fazem parte deste estágio e com o câncer instalado, surgem às primeiras manifestações clínicas da doença e representam mais de 90 % das mortes por câncer (Dayem *et al.*, 2016; Vincent & Gatenby, 2008; Perret & Crépin, 2008; Steeg, 2006).

## 1.2 Cenário mundial e nacional do câncer de mama

O câncer é um problema de saúde pública mundial, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), pois representa uma das principais causas de morte no mundo. Para o ano de 2040 são estimados 29.5 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo, 17 milhões de mortes pela doença e 75 milhões vivendo com esta enfermidade, com dados apontando para uma maior incidência dos casos em países de baixa e média rendas (OMS, 2020). O câncer de mama no mundo é a maior causa de morte por câncer em mulheres com cerca de 2,1 milhões de casos novos e 627 mil óbitos pela doença (Bray *et al.*, 2018).

No Brasil, estima-se para o biênio 2020-2022, a ocorrência de 625 mil novos casos, sendo o câncer de mama o mais incidente em mulheres com 66.280 mil casos, com um risco estimado de 61.61 casos a cada 100 mil mulheres (**Figura 2**).

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*						
Localização Primária	Casos	%		Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mama feminina	66.280	29,7%
Côlon e reto	20.520	9,1%		Côlon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%		Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%		Traqueia,brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%		Gândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%		Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%		Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%		Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%		Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%		Sistema nervoso central	5.220	2,3%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

**Figura 2.** Os dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 no Brasil. Fonte: INCA, 2020.

De acordo com os Estados brasileiros, o câncer de mama é mais frequente em mulheres das Regiões Sul com 71.16/100 mil, Sudeste com 81.06/100 mil, seguidas das regiões Centro-Oeste com 45.27/100 mil e o Nordeste com 44.29/100 mil habitantes. Na Região Norte, é o segundo tumor mais incidente com 21.34 casos para cada 100 mil habitantes. A neoplasia de mama tem como característica a maior incidência e mortalidade na população feminina, porém, também acomete homens, representando 1,2% do total dos casos.

No ano de 2017, foram contabilizados cerca de 16.927 óbitos, sendo 16.724 mulheres e 203 homens. Sendo o câncer de próstata o mais incidente na população masculina (INCA, 2017).

### **1.3 As células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 e suas classificações moleculares**

A classificação clínica do câncer de mama é baseada nos diferentes perfis de expressão gênica, possibilitando a identificação de subtipos moleculares distintos (**Tabela 1**). Os tumores luminais possuem similaridade com as células mamárias normais, que ficam em contato direto com o lúmen dos ductos mamários. O subtipo luminal A, são positivos para receptor de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (RP), além de apresentarem baixo grau histológico (Sotiriou *et al.*, 2003; Russnes *et al.*, 2017).

Os subtipos luminal B, exibem RE, RP e fator de crescimento epidermal do tipo 2 (HER2) positivos, embora sejam expressos em baixos níveis, esses tumores apresentam um alto índice de proliferação celular, conferindo um pior prognóstico em relação aos tumores luminais A (Ades *et al.*, 2014).

O subtipo HER2 + possui elevada expressão da oncoproteína HER2, porém apresenta negatividade para receptores hormonais. Os pacientes com diagnóstico primário de carcinoma mamário com expressão de HER2 possuem um pior prognóstico em relação a pacientes que não apresentam essa amplificação gênica (Cirqueira *et al.*, 2011; Arteaga *et al.*, 2011).

Entre os tumores triplo-negativos (TTN), 80 a 90% se enquadram no subtipo molecular *basal-Like*, esses possuem baixa expressão do gene BRCA1 e alta expressão de citoceratina 5 (CK5) e receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Essas características nos genes expressos demonstram um prognóstico mais reservado, associado a menor sobrevida dos pacientes (Yadav *et al.*, 2015; Cirqueira *et al.*, 2011; Arteaga *et al.*, 2011).

O subtipo *claudin-low*, é caracterizado por uma baixa expressão de proteínas claudinas 3, 4 e 7 e Ki67, em conjunto com o aumento de marcadores relacionados à transição epitelial-mesenquimal, o que pode favorecer o potencial invasivo dessas células.

Apresentam uma baixa ou ausente expressão de marcadores de diferenciação luminal e moderada expressão de genes de proliferação. É normalmente um carcinoma do tipo ductal invasor com alta frequência de diferenciação metaplásica e medular, seu imunofenótipo triplo negativo (TNBC, do inglês *triple negative breast cancer*) ER-, EP- e HER2-, é relacionado ao mau prognóstico (Cirqueira *et al.*, 2011; Holliday & Speirs, 2011).

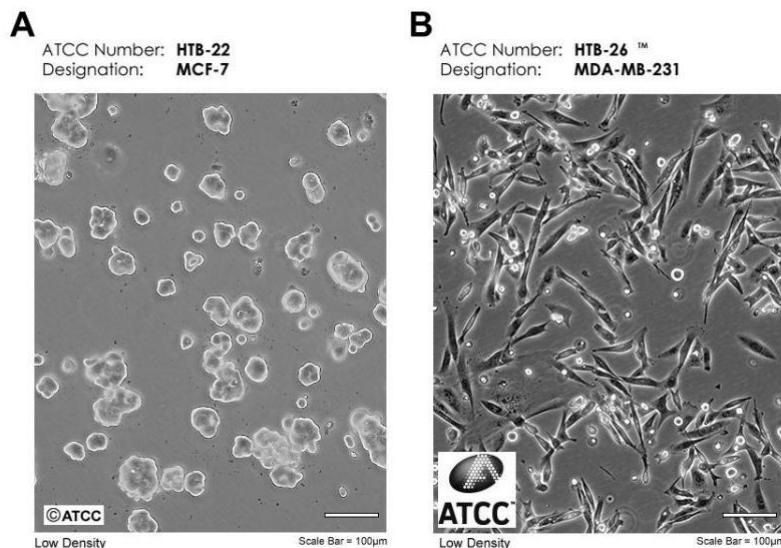
**Tabela 1. Classificação molecular dos tumores de mama.**

SUBTIPO MOLECULAR	STATUS DO RECEPTOR
Luminal A	RE+ e/ou RP+; HER2-
Luminal B	RE+ e/ou RP+; HER2+
HER2+	RE-; RP-; HER2+
Basal-Like	RE-; RP-; HER2-; CK5+ e/ou EGFR+
Triplo Negativo ou Claudin-low	RE-; RP-; HER2-; CK5- e/ou EGFR-
Indeterminados	Sem padrão molecular definido

**Fonte:** Adaptado de: Russnes *et al.*, 2017; Cirqueira *et al.*, 2011.

No presente estudo, foram utilizadas duas linhagens distintas, a MCF-7, pertencente ao subtipo luminal A (**Figura 3A**), originalmente isolada pelo Dr. Soule e colaboradores no *Michigan Cancer Foundation-7* em 1970. Derivada de um derrame pleural de uma paciente de 69 anos diagnosticada com carcinoma de mama metastático, essa linhagem possui características de epitélio mamário diferenciado. São células que possuem receptores de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (RP) (Soule *et al.*, 1973; Scherbakov *et al.*, 2019; Siddiqi *et al.*, 2008; Cirqueira *et al.*, 2011). A linhagem celular MDA-MB-231 (**Figura 3B**), integrante do subtipo *claudin-low*, originalmente isolada pela Dra. Cailleau e colaboradores no *M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute* a partir de um derrame pleural de uma paciente de 51 anos diagnosticada com adenocarcinoma mamário metastático. São células com fenótipo triplo-negativo (do inglês *triple-negative breast cancer*, TNBC) altamente agressivas, altamente invasivas e

pouco diferenciadas, pois não expressam ER, RP e receptor do fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2 (HER-2) (Prat *et al.*, 2010; Cailleau *et al.*, 1978; Chavez *et al.*, 2010).



**Figura 3** - Fotomicrografia representativa das células de câncer de mama MCF-7 (**A**) e MDA-MB-231 (**B**). Fonte: ATCC, 2019a; ATCC, 2019b.

Essa heterogeneidade molecular confere aos tumores diferentes prognósticos e respostas às terapias. Por exemplo, tumores luminais A possuem similaridade com células mamárias normais, que ficam em contato direto com o lúmen dos ductos mamários e devido as suas características, é responsiva a quimioterapia com inibidores de aromatases e ao tamoxifeno, além de terapias alvo específicas, como a hormonioterapia. Este subtipo corresponde cerca de 60% dos casos de carcinoma mamário, além de representar um melhor prognóstico com relação à cura e sobrevivência geral da doença (Sotiriou *et al.*, 2003).

O subtipo TNBC, é caracterizado por uma baixa expressão de proteínas claudinas, além de marcadores aumentados relacionados à transição epitelial-mesenquimal, o que favorece o potencial metastático dessas células. O imunofenótipo triplo negativo é relacionado ao mau prognóstico, e até o presente momento não foi definida intervenção terapêutica específica para este tipo de tumor (Cirqueira *et al.*, 2011; Holliday & Speirs, 2011; Tang *et al.*, 2016).

## **1.4 Tratamento do câncer de mama**

O câncer de mama é altamente heterogêneo, englobando distintos perfis fenotípicos e morfológicos, e, portanto, possuindo comportamento clínico diferenciado. De acordo com INCA (2020), para o tratamento do câncer de mama, é levado em consideração essas características morfológicas e moleculares, o estadiamento da doença, bem como as condições gerais da paciente, como idade, comorbidades e status menopausal. Heng e colaboradores (2019) demonstraram que mulheres com elevada massa corporal, diagnosticadas com tumor de mama pós-menopausa, possuem maior expressão das vias de proliferação celular em tumores ER<sup>+</sup>, além do aumento das vias de inflamação pela indução de interferon- γ dos tecidos adjacentes ao tumor (INCA, 2020; Heng *et al.*, 2019).

As modalidades de tratamento para o câncer de mama podem ser divididas em local, que consiste em cirurgia e radioterapia, e sistêmica, que inclui a quimioterapia, hormonioterapia, terapia alvo-específica e a imunoterapia. Tendo como objetivo erradicar o tumor, os tratamentos são realizados normalmente por meio da terapia combinada, onde é associado mais de uma modalidade terapêutica. Sabe-se que a radioterapia reduz o risco de recorrência em câncer invasivo e não invasivo em 70% e 60%, respectivamente, sendo eficaz quando o tumor ainda não sofreu metástase, porém, quando há o desenvolvimento de sítios metastáticos, é indicada a necessidade de uma abordagem sistêmica, como a quimioterapia (Maughan *et al.*, 2010; Castaneda & Strasser, 2017; Bale *et al.*, 2019).

A conduta terapêutica realizada no tratamento do câncer de mama varia de acordo com os marcadores moleculares, onde são identificados os padrões neoplásicos da célula tumoral. Após a identificação dos biomarcadores específicos, passa-se a utilizar classes terapêuticas direcionadas as células, tornando a terapia mais eficiente e com menos efeitos colaterais (Feitelson *et al.*, 2015).

O tratamento quimioterápico pode ser a primeira modalidade utilizada no tumor primário de mama de grande porte (acima de 3 cm), localmente avançado, e é realizada com a combinação de fármacos de diferentes classes, aumentando os alvos moleculares e reduzindo o aparecimento de resistência, podendo ser classificada como neoadjuvante ou adjuvante (ONCOGUIA, 2015; Harmer, 2008).

A quimioterapia neoadjuvante é comumente empregada no carcinoma de mama operável e localmente avançado. É administrada antes da cirurgia para tentar reduzir o tamanho do tumor de modo que ele possa ser retirado com uma cirurgia menos extensa.

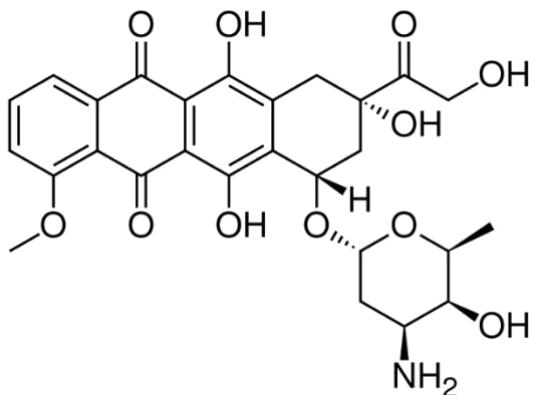
Além disso, a administração de quimioterápicos antineoplásicos antes da remoção do tumor prevê se este, responderá de maneira eficiente ao tratamento. Já a quimioterapia adjuvante é geralmente oferecida após a cirurgia, e visa à redução dos riscos de recidivas do câncer e melhorar as chances de sobrevida da doença (ONCOGUIA, 2015; Angelucci *et al.*, 2013; Jolly *et al.*, 2016).

Os quimioterápicos antineoplásicos são administrados em ciclos, que na sua maioria duram algumas semanas e entre os ciclos faz-se necessário um espaço de descanso, permitindo que o organismo possa se recuperar. Entretanto, esse tipo de terapia não atua apenas nas células cancerosas, mas também nas células saudáveis do paciente, e este processo resulta nos conhecidos efeitos colaterais para estes medicamentos. Além disso, os medicamentos utilizados atuam apenas na erradicação e no controle primário do tumor, não tendo ação específica na metástase tumoral (ONCOGUIA, 2015; Mccoy, 2003; Perret & Crépin, 2008).

Os agentes químicos mais utilizados no tratamento do câncer de mama são as antraciclinas, como a doxorrubicina e epirrubicina, os taxanos como o paclitaxel e docetaxel, 5-fluorouracilo, ciclofosfamida, carboplatina e melfalano. Recentemente, foi aprovado para o tratamento do câncer de mama triplo negativo metastático o uso de anticorpos monoclonais inibidores de PARP (anti-PDL-1) (Harmer, 2008; Rothbarth *et al.*, 2002; Azim *et al.*, 2020).

#### 1.4.1 Doxorrubicina

A pesquisa por compostos anticâncer a partir de microrganismos começou ainda nos anos 50. A doxorrubicina (DOX, (8S, 10S)-10-(4-amino-5-hidroxi-6-metil-tetra-hidro-2H-piran-2-iloxi)-6,8,11-tri-hidroxi-8-(2-hidroxiacetil)-1-metoxi-7,8,9,10-tetra hidrotetraceno-5,12-diona) (**Figura 4**), é um quimioterápico da família das antraciclinas desenvolvido na década de 70 a partir do metabólito produzido pela bactéria *Streptomyces peucetius* var caesius (Arcamone *et al.*, 2000; Rivankar, 2014).



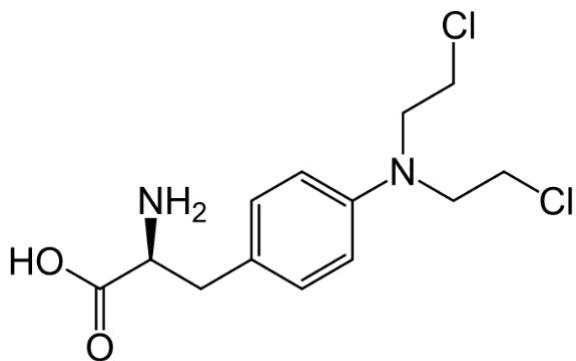
**Figura 4.** Estrutura química da Doxorrubicina.

O efeito citotóxico da DOX acontece ao intercalar-se com o DNA, pela inibição da enzima topoisomerase II, a qual impede a replicação do DNA deflagrando mecanismos de morte celular. Além disso, a DOX possui a capacidade de formar radicais livres por interação com Fe III e alteração da regulação do óxido nítrico, gerando um estresse oxidativo na célula e levando a danos no DNA e ativação de mecanismos apoptóticos, como a via de interação da proteína p53 e DNA, e a ativação da sinalização intrínseca de caspase 3 e citocromo c (Rivankar, 2014; Berthiaume & Wallace, 2007; Thorn *et al.*, 2011).

A DOX é considerada um dos principais quimioterápicos utilizados na prática clínica, sendo utilizada no tratamento do câncer de bexiga, mama, estômago, pulmão, ovários, tireóide, sarcoma de tecidos moles, mieloma múltiplo e linfoma de Hodgkin, porém sua utilização é limitada devido aos efeitos colaterais observados, como cardiotoxicidade, mielossupressão, nefrotoxicidade, dentre outros (Rivankar, 2014; Renu *et al.*, 2018).

#### 1.4.2 Melfalano

O melfalano (MEL, Ácido 4- [bis (2-cloroetil) amino]-L-fenilalanina ou (2S)-2-amino-3-[4-[bis (2-cloroetil) amino] fenil] propanóico) (**Figura 5**), foi sintetizado pela primeira vez em 1953, é uma fenilalanina derivada da mostarda nitrogenada, sendo utilizado geralmente em combinação com outros agentes antineoplásicos na terapia do câncer. Inicialmente, o MEL era utilizado no tratamento do mieloma múltiplo, porém se mostrou eficaz também no câncer de mama e ovário (Rothbarth *et al.*, 2002).



**Figura 5.** Estrutura química do Melfalano.

O MEL, como todas as mostardas nitrogenadas, atua como um agente alquilante inespecífico do DNA, causando modificações e inibindo a síntese de DNA, RNA e proteínas. As ligações covalentes causadas pelo MEL deformam a dupla fita do DNA, interferindo nas funções das polimerases acarretando a morte celular programada (Polavarapu *et al.*, 2012).

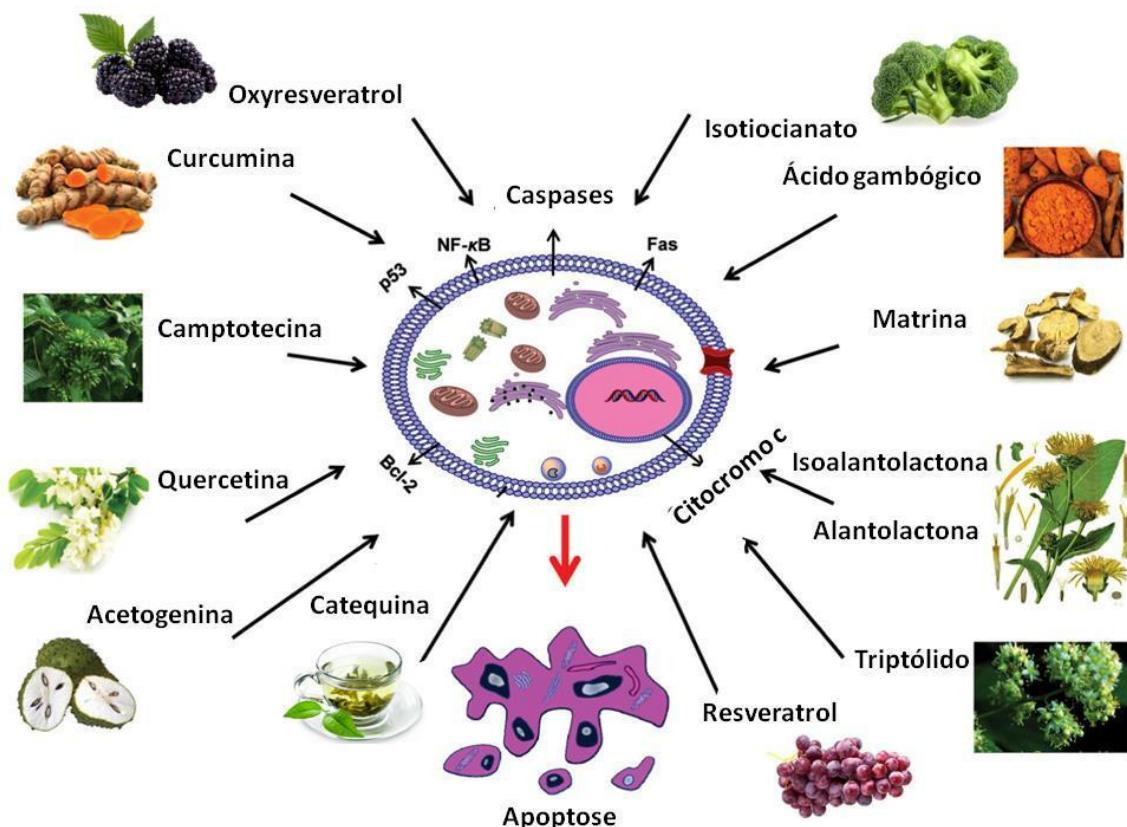
O primeiro relato da terapia com MEL no tratamento do mieloma é de 1958, desde então, sua aplicação terapêutica vem sendo utilizada. Porém, devido a sua toxicidade elevada para qualquer tecido de rápida proliferação, são observadas reações adversas, principalmente efeitos hematológicos como a leucopenia, trombocitopenia e anemia. Para contornar a alta toxicidade, um pró-fármaco derivado do MEL, o Melflufen, foi recentemente desenvolvido e atualmente está sob avaliação clínica (Rothbarth *et al.*, 2002; Shapiro & Recht, 2000; Esma *et al.*, 2017).

## 1.5 Câncer de mama e os produtos de origem natural

Dentre todas as fontes naturais, as plantas apresentam a mais significativa contribuição na descoberta de novos compostos. Devido à capacidade de manutenção da sobrevivência frente as adversidades do meio ambiente, as plantas desenvolvem substâncias essenciais, fornecendo compostos bioativos, despertando o interesse de pesquisadores e da indústria farmacêutica na obtenção de novos medicamentos (Souza *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2020).

A pesquisa de produtos naturais no campo da oncologia apresentou avanços nos últimos anos, proporcionando a descoberta de diversas substâncias antineoplásicas que foram empregadas no tratamento do câncer (**Figura 6**) (Costa-Lotufo *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2018). De acordo com Cragg & Newman (2000), dos 140 agentes antitumorais

disponíveis no mercado desde a década de 40, mais de 60% foram oriundos de compostos naturais.



**Figura 6.** Aplicação de produtos naturais no câncer nas vias de morte por apoptose. (Adaptado de Wang e colaboradores, 2018).

Dentre esses quimioterápicos antineoplásicos obtidos a partir de produtos naturais, destacam-se o paclitaxel, isolado inicialmente da casca da árvore teixo (*Taxus baccata L.* e *Taxus brevifolia Nutt.*). Este quimioterápico atua como precursor da classe de agentes estabilizantes dos microtúbulos e sua ação promove a polimerização da tubulina acarretando o bloqueio do ciclo celular na fase G2 e mitose, impedindo a divisão celular e a proliferação das células neoplásicas (Zasadil *et al.*, 2014).

São diversos os alvos moleculares no câncer de mama descritos para os compostos obtidos de origem natural. O resveratrol é um polifenol presente principalmente nas sementes de uvas, na película das uvas pretas e no vinho tinto (Pirola & Fröjdö, 2008), e apresenta importante papel na regulação de múltiplas vias de transdução de sinal envolvidas em todas as fases da carcinogênese (Ferraz da Costa *et al.*, 2017).

Estudos demonstram os efeitos antiproliferativo e antitumorais do resveratrol no câncer de mama. Gomez e colaboradores (2013) demonstraram que o resveratrol inibe a atividade da fosfofrutoquinase-1 (PFK), interrompendo o metabolismo da glicose e reduzindo a viabilidade das células de câncer de mama MCF-7. Wu e colaboradores (2019) verificaram que o resveratrol possui citotoxicidade mais significativa nas linhagens de câncer, além de alterar os genes que regulam o ciclo celular e induzir apoptose em células de câncer de mama 4T1. Lee e colaboradores (2012), descrevem que após o tratamento de 21 dias de camundongos com metástase, o resveratrol foi capaz de reduzir o tamanho do tumor, além de reduzir a migração, invasão e a atividade da metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9).

Em ensaio clínico, Zhu e colaboradores (2012) demonstraram o papel quimiopreventivo do resveratrol, após a administração de 50 mg do composto bioativo por 12 semanas, em mulheres com alto risco de desenvolver câncer de mama, pois ocorreu redução da metilação do gene de supressão tumoral RASSF-1 e da expressão de prostaglandina PGE<sub>2</sub> na mama, responsável pela proliferação celular. Gomes e colaboradores (2019) descreveram o papel do resveratrol na síntese de lipídios em células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231. Os dados demonstraram um aumento de ácidos graxos após 24 horas de tratamento com resveratrol, além do aumento da expressão de proteínas flotilina-1 e flotilina-2 nos *lipid rafts* (microdomínios lipídicos de membrana). Além disso, resveratrol foi capaz de modular enzimas envolvidas no metabolismo lipídico nas mesmas linhagens celulares de mama descritas anteriormente (Gomes *et al.*, 2020).

O alcalóide piperina é o principal constituinte químico da *Piper nigrum* (pimenta-do-reino), a qual tem uso bastante difundido na medicina popular indiana, além de ser amplamente utilizada no Brasil como condimento (Semler & Gross, 1988). Em células de câncer cervical (KB-ChR-8-5) e de cólon (SW480) resistentes a fármacos, a piperina potencializou a inibição da glicoproteína P (P-gp), que é um transportador de medicamentos que implica no desenvolvimento da resistência de células aos tratamentos quimioterápicos, portanto, quando coadministrada com alguns quimioterápicos como a vincristina ou paclitaxel, a piperina pode reverter a resistência a esses medicamentos em células tumorais que superexpressam a P-gp (Syed *et al.*, 2017).

No câncer de mama, Greenshields e colaboradores (2015), descrevem que a piperina inibe o crescimento de células de câncer de mama triplo negativas e células

hormônio positivas, alterando o ciclo celular e induzindo essas células à morte por apoptose. Do e colaboradores (2013) demonstram que a piperina é capaz de induzir apoptose através da ativação da caspase-3 e da clivagem de proteína Poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), além de inibir o gene HER2 a nível transcripcional e suprimir a expressão de MMP-9.

A crisina é uma flavona encontrada em diferentes frutas como o maracujá (*Passiflora caerulea*), mel e própolis (Mani & Natesan, 2018). Estudos têm demonstrado o papel da crisina no câncer de mama. Lirdprapamongkol e colaboradores (2013) descreveram que a crisina inibe a sobrevivência *in vitro* das células 4T1 de câncer de mama murino em hipóxia, inibindo a ativação da proteína STAT3 e a expressão do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), além de reduzir o crescimento metastático em modelo de metástase espontânea *in vivo*. Hong e colaboradores (2010) demonstraram que a crisina inibe o crescimento de células de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231. Além disso, esse composto bioativo é capaz de suprimir a migração e a invasão de células MDA-MB-231 via inibição de PI3K/Akt e consequentemente reduzir a expressão de MMP-10 (Yang *et al.*, 2014).

A quercetina é o flavonol encontrado, em maiores concentrações na cebola e na maçã (Huber *et al.*, 2008). No câncer de mama, Jia e colaboradores (2018) demonstraram que a quercetina reduz a expressão de MMP-3, MMP-9 e VEGF em células MCF-7 e MDA-MB-231, exercendo efeito inibitório sobre a mobilidade celular. A quercetina também inibiu a metástase e a glicólise tumoral *in vivo*, além de induzir autofagia pela inibição da fosforilação de AKT.

A curcumina é um composto fenólico lipofílico extraído do rizoma da cúrcuma, e é utilizado em preparações medicinais e como corante alimentar. A curcumina exerce efeitos anticancerígenos, principalmente por ativar vias de apoptose e inibir angiogênese e metástase. A curcumina tem como alvo vias de sinalização associadas à terapia do câncer, incluindo vias mediadas por p53, Ras e fosfatidilinositol-3-quinase (Giordano & Tommonaro, 2019). Hu e colaboradores (2018) demonstraram que a curcumina inibe a proliferação de várias linhagens de células de câncer de mama, induzindo a parada do ciclo dessas células mediada pela redução da expressão de CDC25 e CDC2 e pelo aumento da expressão de P21. A curcumina também induziu a apoptose celular via

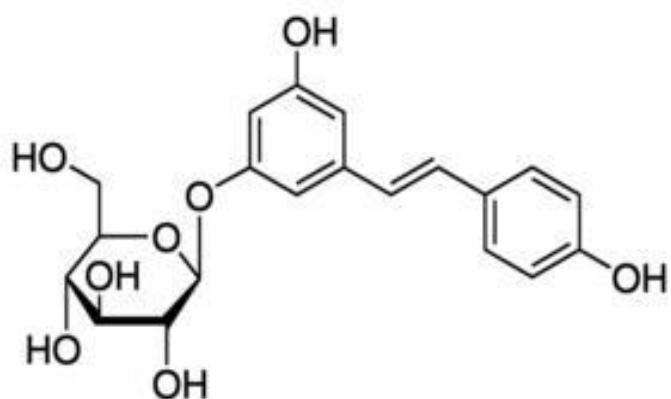
inibição da fosforilação Akt/mTOR, redução da expressão de BCL-2, aumento de BAX e clivagem de caspase 3.

Considerando que menos de 10% do total de espécies de plantas tiveram algum tipo de estudo fitoquímico ou de atividades biológicas, as fontes naturais ainda estão disponíveis e oferecem as melhores possibilidades de descobertas de novas substâncias de interesse terapêutico.

### 1.5.1 Polydatin

Os polifenóis compreendem a maior classe de fitoquímicos presentes nos vegetais e são considerados produtos do metabolismo secundário das plantas. O teor de polifenol está associado ao sistema de defesa das plantas contra patógenos e a radiação UV, e confere aroma, cor e adstringência em vários alimentos (Manach *et al.*, 2004; Croft, 1998).

O Polydatin (POLY, *Piceid*, 3,40,5-tri-hidroxiestilbeno-3-b-D-glucosídeo) (Figura 7), é um derivado glicosídeo do Resveratrol. Encontrado em grandes quantidades na raiz e rizoma da *Polygonum cuspidatum*, também está presente na uva, vinho tinto, amendoim e chocolate (Vastano *et al.*, 2000; Du *et al.*, 2013).



**Figura 7.** Estrutura química do Polydatin.

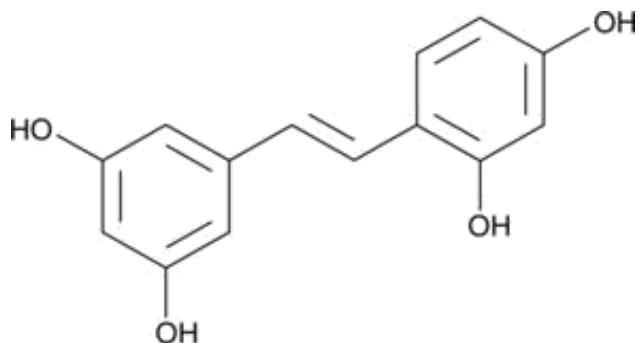
Estudos anteriores demonstram que o fitoquímico POLY possui diversos efeitos biológicos. Jin e colaboradores (2019) descreveram que o POLY inibe a proliferação celular, além de induzir apoptose em linhagem de células de câncer colorretal CRC. O

mesmo trabalho demonstrou que o POLY reduz o crescimento tumoral *in vivo* pela regulação do gene miR-382. Pan e colaboradores (2017) relataram que o POLY induziu apoptose em células de câncer de cólon HeLa e este mecanismo estaria associado a inibição das vias de sinalização e expressão das proteínas PI3K/AKT/mTOR.

No câncer de mama, Su e colaboradores (2013) relataram que o POLY possui efeito citotóxico na concentração de 50 µM nas células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, com alteração do ciclo celular e indução de apoptose. Além disso, o estudo demonstrou que o POLY apresentou uma atividade anticâncer de mama menor quando comparado com o resveratrol, provavelmente pela baixa absorção do POLY comparada ao resveratrol. Zhang e colaboradores (2019) demonstraram que a combinação de POLY com 2-desoxi-D-glicose, radiofármaco usado no tratamento do câncer, foi capaz de inibir a proliferação, migração e invasão celular, além de induzir apoptose em células de câncer de mama MCF-7 e 4T1, via inibição das proteínas PI3K/AKT. O POLY também apresenta atividade antiparasitária, anti-inflamatória e antioxidante (Passos *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2019; Du *et al.*, 2013)

### 1.5.2 Oxyresveratrol

O Oxyresveratrol (OXY, trans-2, 3', 4, 5'-tetrahidroxistilbeno) (**Figura 7**), é um polifenol, derivado estruturalmente do resveratrol, encontrado na raiz, caule, folhas e frutos de diversas espécies, dentre elas, *Morus nigra* L., *Morus alba* L., *Morus australis*, *Morus macroura*, *Cudrania cochinchinensis*, *Glycosmis pentaphylla*, *Artocarpus xanthocarpus*, *Artocarpus nitidus* subsp. *lingnanensis*, *Artocarpus heterophyllus*, *Artocarpus gomezianus*, *Gnetum hainanense*, *Smilax china* e *Cocos nucifera* L. (Abbas *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2012; Syah *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2015; Ti *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2017).



**Figura 7.** Estrutura química do Oxyresveratrol.

Estudos vêm demonstrando a ação do OXY em diversas patologias. Liu e colaboradores (2018) demonstraram que o oxyresveratrol impede o crescimento celular de linhagens de hepatocarcinoma e inibe o processo de metástase e a angiogênese em camundongos kunming. Choi e colaboradores (2015) demonstraram que o OXY tem efeito protetor contra o estresse oxidativo provocado pelo terc-butil-hidroperóxido (tBPH) em linhagem de célula derivada de hepatócitos humanos (HepG2), assim como na lesão hepática aguda provocada por CCl<sub>4</sub> em camundongos C57BL/6. Rahman e colaboradores (2017) descreveram que o OXY induz morte por autofagia em células de neuroblastoma e esse efeito foi devido a mudança nos níveis de p38, MAPK e PI3K/AKT/mTOR.

O OXY também apresenta efeito fotoprotetor sobre os queratinócitos epidérmicos humanos, através da diminuição das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS/RNS) e dos níveis de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina e dímeros de pirimidina ciclobutano após radiação UVA (Hu, Chen e Wang, 2015).

Chung e colaboradores (2003), descreveram o efeito anti-inflamatório do OXY em macrófagos (RAW 264,7) e o composto foi capaz de inibir o aumento da expressão do óxido nítrico sintase induzida (iNOS) estimulada por LPS, além de inibir a translocação de NF-κB e ciclooxygenase-2 (COX-2).

Recentemente, vem sendo demonstrado alvos moleculares em células de câncer de mama tratados com OXY. van den Brand e colaboradores (2019), descreveram que o OXY é capaz de reduzir a viabilidade e a migração de células de câncer de mama MCF-7. Sunilkumar e colaboradores (2019) demonstraram pela primeira vez, o efeito citotóxico do OXY em células triplo negativa de câncer de mama MDA-MB-231, a morte celular mediada pelo OXY resultou na alteração do ciclo celular na fase sub-G1, fragmentação do DNA, externalização de fosfatidilserina e clivagem da PARP, indicando morte por

apoptose. Além disso, o mesmo estudo demonstrou que o OXY induziu a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), causando uma despolarização da membrana mitocondrial, resultando na translocação do fator indutor de apoptose (AIF) para o núcleo da célula.

Matencio e colaboradores (2020) criaram uma estrutura de nano esponja à base de ciclodextrina contendo OXY, esse complexo foi capaz de aumentar a biodisponibilidade deste fitoquímico, tendo maior inibição da viabilidade das células de câncer de próstata (PC-3) e em linhagens de células de câncer de cólon (HT-29 e HCT-116), quando comparados com o composto livre.

O OXY apresenta também efeitos antiparasitário, bactericida e antiviral (Passos *et al.*, 2015; Joug *et al.*, 2016; Sasivimolphan *et al.*, 2009), além de induzir a perda do peso corporal e restaurar os níveis normais de glicose e insulina pela regulação positiva da expressão de transportador de glicose (GLUT4) em camundongos C57BL/6 obesos alimentados com dieta rica em gordura (Tan *et al.*, 2017).

## **1.6 Associação de quimioterápicos antineoplásicos com produtos naturais**

A utilização de fitoquímicos em combinação com agentes quimioterápicos tem demonstrado ser uma abordagem atual para superar quimiorresistência e sensibilizar as células de câncer a apoptose ou parada do crescimento, como verificado por nosso grupo de pesquisa (Casanova *et al.*, 2012), enquanto minimiza os efeitos colaterais resultantes da terapia convencional, uma vez que permite a redução das concentrações destes medicamentos, diminuindo assim seus efeitos colaterais, e com isso melhorando a qualidade de vida (Abdel-Azeem *et al.*, 2013).

A terapia de combinação pode ser uma alternativa para os estudos de atividade anticâncer de mama de produtos naturais em associação com fármacos utilizados na quimioterapia do câncer. Cipolletti e colaboradores (2019) descreveram que o resveratrol potencializa o efeito proapoptótico do paclitaxel em células de câncer de mama MCF-7, T47D e MDA-MB-231, devido ao aumento da clivagem de PARP-1. Rai e colaboradores (2016) relatam que o tratamento combinado de resveratrol e doxorrubicina foi capaz de reduzir o volume do tumor no modelo animal de carcinoma ascítico, além de inibir a resposta inflamatória e induzir apoptose em células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231. Liu e colaboradores (2016) demonstraram que o pré-tratamento do resveratrol em cardiomiócitos H9c2, foi capaz de inibir o efeito cardiotóxico da doxorrubicina,

demonstrando a diminuição dos efeitos tóxicos do quimioterápico quando associado a um fitoquímico. Pal e colaboradores (2016) relataram um efeito sinérgico entre a piperina e o paclitaxel em células de adenocarcinoma de ovário SKOV3, os resultados demonstraram que a associação aumentou o acúmulo de ROS, além de interferir no ciclo celular e induzir a morte por apoptose. Calaf e colaboradores (2018) demonstraram que a curcumina associada ao paclitaxel é capaz de induzir apoptose e necrose em células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231.

Singh e colaboradores (2009), afirmaram que com as novas descobertas relacionadas aos efeitos das drogas e dos fitoquímicos, torna-se mais aparente que a terapia com a combinação de dois ou mais compostos pode apresentar efeitos benéficos mais significativos no tratamento do câncer. E concluiu que a citotoxicidade em células de câncer de mama aumenta, quando tratadas com a combinação de resveratrol e ciclofosfamida.

Em estudo clínico de fase I, foi demonstrado que a combinação de 8.000 mg/dia de curcumina por via oral e 100 mg/m<sup>2</sup> de docetaxel por via intravenosa administrados a cada 3 semanas durante 6 ciclos de tratamento, seria capaz de reduzir os níveis de VEGF em pacientes com câncer de mama metastático, além de não apresentar toxicidade hematológica (Bayet-Robert *et al.*, 2010). Pastorelli e colaboradores (2018) descreveram em estudo clínico de fase II que a associação de 2.000 mg/dia de curcumina por via oral e 10 mg/m<sup>2</sup> do quimioterápico antineoplásico gemcitabina por via intravenosa, durante 28 dias, em pacientes com câncer de pâncreas localmente avançado ou metastático, obteve uma taxa de controle da doença de 61,3 % e uma sobrevida dos pacientes de 10,2 meses, além de reduzir a toxicidade hematológica e a neurotoxicidade.

O câncer de mama é o tipo de neoplasia com maior incidência entre as mulheres, e as terapias disponíveis para o tratamento, além de muito invasivas, produzem efeitos colaterais que contribuem para debilidade do paciente. Os produtos naturais são fontes ricas de diferentes classes de moléculas bioativas, e o uso desses fitoquímicos em combinação com agentes quimioterápicos podem ser uma nova estratégia de terapia contra estes tipos de tumores. Dessa forma, torna-se importante elucidar os efeitos e mecanismos bioquímicos da associação de fitoquímicos, como o OXY, com quimioterápicos como a DOX e MEL em células de câncer de mama.

## **2. Objetivos**

### **2.1    Objetivo geral**

- Investigar o efeito dos fitoquímicos polydatin e oxyresveratrol, e dos quimioterápicos doxorrubicina e melfalano, isolados e combinados no modelo *in vitro* do câncer de mama humano.

### **2.2    Objetivos específicos**

- Estudar *in vitro* os possíveis efeitos citotóxicos dos compostos polydatin, oxyresveratrol e dos quimioterápicos doxorrubicina e melfalano, isolados e combinados em diferentes linhagens de câncer de mama humano (MCF-7 e MDA-MB 231) e em linhagem de células não tumorais de mama humano (MCF10A);
- Definir as concentrações inibitórias para 50% da população de células ( $IC_{50}$ ) do polydatin, oxyresveratrol, doxorrubicina, melfalano e das associações;
- Caracterizar ações sinérgicas, aditivas ou antagônicas dos polifenóis, em associação com doxorrubicina ou melfalano, através de análise isobolográfica e cálculo do índice de combinação;
- Verificar a morfologia e a proliferação das células MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com os compostos isolados ou combinados;
- Avaliar o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) e a produção de espécies reativas de oxigênio nas células MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com os compostos isolados ou combinados;
- Analisar as possíveis alterações no ciclo celular, tipo de morte celular e as vias de sinalização relacionadas em células MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com os compostos isolados ou combinados.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 Reagentes**

Os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. Dimetilsulfóxido (DMSO), iodeto de propídio (PI), RNase A e brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio (MTT) Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); Antibióticos penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); Meio de cultura celular DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) e soro fetal bovino (SFB) (Gibco, EUA); Corante cristal de violeta (VETEC, Brasil); Kit de detecção de apoptose (eBioscience). Anticorpo secundário fluorescente (Alexa 647) (ThermoFisher, EUA); Anticorpo anti-caspase 3 (#9662) (Cell Signaling Technology, CA, EUA). *Primers* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), com as seguintes sequências:

Proteína	Forward	Reverse
Caspase 3	GCTGGATGCCGTCTAGAGTC	ATGTGTGGATGATGCTGCCA
BAX	CATGTTTCTGACGGCAACTTC	AGGGCCTTGAGCACCAAGTT
BCL-2	TTCGATCAGGAAGGCTAGAGTT	TCGGTCTCCTAAAAGCAG GC
GAPDH	CATGGGAAGGTGAAGGTCGA	TTGGCTCCCCCTGCAAATGAG

#### **3.2 Linhagens celulares**

As linhagens de células epiteliais de câncer de mama humano MCF-7 e MDA-MB-231 foram obtidas da ATCC (*American Type Culture Collection*). 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, 5 µg/L de insulina bovina, 100 unidades/mL de penicilina G e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina. A linhagem de célula não tumoral de mama humano MCF-10A foi mantida em meio DMEM F-12, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 µg/mL de insulina, 20 ng/mL de fator de crescimento epidermal humano e 0,5 µg/mL de

hidrocortisona. Todas as linhagens foram mantidas em estufa a 37°C em uma atmosfera umidificada de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.3 Compostos bioativos e quimioterápicos**

Os compostos POLY (polydatin), OXY (oxyresveratrol) e o quimioterápico MEL (melfalano) foram adquiridos comercialmente pela empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O quimioterápico DOX (doxorrubicina) foi adquirido em parceria com o Instituto Nacional de Câncer (INCA). As substâncias foram utilizadas dissolvidas em DMSO ou em água de reconstituição, de acordo com o fabricante.

### **3.4 Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT (3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromide)**

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução do MTT adaptado de Mossman (1983). Inicialmente, as linhagens de células MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A foram plaqueadas em placas de 24 poços ( $5 \times 10^4$ ) e após alcançarem 70-80% de confluência, as células foram tratadas com diferentes concentrações (25, 50, 100, 200 e 300 µM) de POLY e OXY, (0.5, 1, 2, 25, 50 e 100 µM) de DOX e (50, 100, 150, 200 e 400 µM) de MEL ou DMSO a 1% no período de 24 horas.

Após o tratamento, o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS a 37°C. Em seguida, foi adicionado 0,5 mg/mL de MTT (*3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide*), diluído em tampão fosfato salino (PBS). As placas foram mantidas na estufa à 37°C por 3 horas. Após o período de incubação, a solução de MTT foi retirada e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em isopropanol ácido a 0,04 M. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas (*SpectraMax® Paradigm® Multi-Mode Microplate Reader*) em absorbância de 570 nm e os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle não tratado (Mossman, 1983).

### **3.5 Determinação do IC<sub>50</sub>**

O cálculo do IC<sub>50</sub> (concentração do composto que inibe o crescimento das linhagens celulares em 50%) foi realizado a partir de uma curva de concentração, e os valores foram calculados utilizando a curva de regressão sigmoidal do software GraphPad Prism 6.0.

### **3.6 Índice de combinação (CI)**

O índice de combinação (CI) foi calculado de acordo com a equação CI = D1/(Dx)<sub>1</sub> + D2/(Dx)<sub>2</sub>, onde D1 e D2 são as concentrações dos compostos na associação que inibir 50 % da população, e (Dx)<sub>1</sub> e (Dx)<sub>2</sub> são os valores do IC<sub>50</sub> dos compostos sozinhos, como descrito por Chou (2006). O CI calculado será comparado com os valores de referência descritos por Chou (2006), como um método semi-quantitativo para descrever a intensidade do sinergismo, aditividade ou antagonismo entre os compostos.

### **3.7 Análise isobolográfica**

A associação entre os quimioterápicos com o composto bioativo foi analisada utilizando-se o isobograma de acordo com o método descrito por Tallarida (2000). Os valores do IC<sub>50</sub> dos compostos foram utilizados para construir o isobograma. Os valores de IC<sub>50</sub> do composto bioativo testado foram plotados no eixo-x e os valores de IC<sub>50</sub> dos quimioterápicos foram plotados no eixo-y. A linha conectando os dois pontos é chamada de linha de aditividade. Combinações antagônicas apresentam pontos acima desta linha, e as combinações sinérgicas apresentam pontos abaixo desta linha.

### **3.8 Índice de seletividade (IS)**

O cálculo do índice de seletividade (IS) foi realizado a partir da divisão entre os valores de IC<sub>50</sub> dos compostos tratados na linhagem celular não tumoral (MCF-10A) e o IC<sub>50</sub> dos compostos tratados nas linhagens tumorais (MCF-7/MDA-MB-231). De acordo com Zingue *et al.* (2016), um resultado com o índice de seletividade > 1.0

indica que a substância utilizada foi mais ativa nas linhagens tumorais do que na linhagem não tumoral.

### **3.9 Análise morfológica**

Para a análise morfológica, foram plaqueadas em placas de 24 poços ( $10^5$ ) de células em volume final de 500  $\mu\text{L}$ . Após atingirem 70-80% de confluência as células foram incubadas com os respectivos IC<sub>50</sub> dos compostos isolados e as associações por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram lavadas com PBS e fixadas com metanol 100% durante 1 minuto. A morfologia celular foi avaliada com auxílio de um microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100) (Tolosa *et al.*, 2003).

### **3.10 Teste de unidade formadora de colônia (UFC)**

As linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 24 poços ( $5 \times 10^4$ ) e após alcançarem 70-80% de confluência, as células foram tratadas com os respectivos IC<sub>50</sub> dos compostos isolados e associados durante 24 horas. Após o período de incubação, o meio contendo os compostos foram substituídos a cada 3 dias. Após 18 dias, as colônias formadas foram fixadas com paraformaldeído a 4% (Sigma, St. Louis, EUA) em PBS contendo 4% de sacarose durante 20 minutos. Posteriormente, as células foram coradas com 0,005% de cristal de violeta *overnight* à temperatura ambiente e após este período as células foram lavadas 5 vezes com PBS durante 5 minutos. Para a quantificação das colônias, foi levada em consideração a formação de 50 células/colônia, contadas utilizando um microscópio óptico invertido (Guimarães *et al.*, 2017).

### **3.11 Produção de espécies reativas de oxigênio**

As linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 24 poços ( $1 \times 10^6$ ) em volume final de 500  $\mu\text{L}$ . Após atingirem 70-80% de confluência, as células foram tratadas com os valores de IC<sub>50</sub> de OXY, DOX, MEL e suas associações por 3 horas. Posteriormente, as células foram coletadas, lavadas com PBS e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos. Em seguida, foram ressuspensas em solução de 10  $\mu\text{M}$  da sonda 2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) por 30 minutos, no escuro a 37°C.

Os resultados foram obtidos utilizando um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton and Dickson) e analisados utilizando o programa CellQuest (Omata *et al.*, 2006).

### **3.12 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )**

A avaliação do  $\Delta\Psi_m$  foi realizada pelo kit mitochondria staining (Sigma-Aldrich). Este corante acumula-se na matriz mitocondrial e sob a influência de  $\Delta\Psi_m$  aumenta a sua forma monomérica em células não viáveis ou apoptóticas (Salvioli *et. al.*, 1997). As células ( $1 \times 10^6$ ) em volume final de 500  $\mu\text{L}$  foram plaqueadas em placas de 24 poços e posteriormente tratadas com o respectivo IC<sub>50</sub> dos compostos isolados e associados. Após o período de incubação, as células foram incubadas com a solução de JC-1 a 10  $\mu\text{g/mL}$  por 7 minutos a 26°C. Os resultados foram obtidos utilizando citômetro FACScalibur (Becton and Dickson) e analisados utilizando o software CellQuest.

### **3.13 Análise do ciclo celular**

As diferentes linhagens de células de câncer de mama foram incubadas na presença ou não dos compostos isolados e associados (seus respectivos IC<sub>50</sub>). Após o período de tratamento,  $5 \times 10^5$  células foram coletadas, lavadas e fixadas (30% PBS/70% metanol) por 1 hora à 4°C e incubadas em PBS contendo Triton X-100 0,1%, 50  $\mu\text{g/mL}$  de iodeto de propídio e 1 mg/mL de RNase A. Após 30 minutos de incubação à 37°C no escuro, 10.000 eventos foram coletados em FACScalibur (Becton and Dickson) e analisados com o software CellQuest, onde o percentual de células em cada fase do ciclo celular foram quantificadas (Pozo-Guisado *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2014).

### **3.14 Identificação de morte celular**

A caracterização de morte celular foi investigada pela marcação com iodeto de propídio (PI) e Anexina-V adaptado de Passos e colaboradores (2015). As células ( $1 \times 10^6$ ) em volume final de 500  $\mu\text{L}$  foram plaqueadas em placas de 24 poços e, posteriormente foi realizado o tratamento com os respectivos IC<sub>50</sub> dos compostos isolados e associados durante 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 2.000 rpm por 15 minutos a 4°C, e posteriormente

foram incubadas com tampão de Anexina-V (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4). Em seguida, as células foram incubadas com Anexina-V FITC e PI durante 30 minutos na ausência de luz a 20°C. Os resultados foram obtidos utilizando citômetro FACScalibur (Becton and Dickson) e analisados utilizando o software CellQuest.

### **3.15 Avaliação de células apoptóticas por coloração com DAPI**

As células ( $1 \times 10^6$ ) em volume final de 500 µL foram plaqueadas em placas de 24 poços e, posteriormente foi realizado o tratamento com os respectivos IC<sub>50</sub> dos compostos isolados e associados durante 24 horas. Em seguida, as células foram fixadas com 70% de metanol/PBS por 1 hora e depois permeabilizadas com Triton X-100 (0,5% em PBS) por 25 minutos. As células foram coradas usando 10 µg/mL de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) em PBS durante 7 minutos no escuro. Os resultados foram obtidos utilizando citômetro FACScalibur (Becton and Dickson) e analisados utilizando o software CellQuest.

### **3.16 Imunocitoquímica**

As células ( $1 \times 10^6$ ) em volume final de 500 µL foram plaqueadas em placas de 24 poços e, posteriormente foi realizado o tratamento com os respectivos IC<sub>50</sub> dos compostos isolados e associados durante 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4%, BSA a 0,3% e Triton X-100 a 0,5% por 20 minutos e permeabilizadas com Triton X-100 (0,5% em PBS) por 25 minutos. As células foram lavadas com PBS 3 vezes e o anticorpo primário anti-caspase-3 foi adicionado e incubado no escuro por aproximadamente 1 hora. As células foram lavadas em PBS e o anticorpo secundário fluorescente (Alexa 647, TermoFisher) foi adicionado e incubado no escuro por aproximadamente 1 hora. Os resultados foram obtidos utilizando citômetro FACScalibur (Becton and Dickson) e analisados utilizando o software CellQuest.

### **3.17 Reação de Polimerase em Cadeia em tempo real (RT-qPCR)**

Para realizar as reações de PCR foi utilizada a enzima Taq DNA Polimerase (*Phoneutria*). As misturas de reação para PCR foram 2 µL de tampão específico para Taq DNA Polimerase, 0,4 µL de *dNTP* (10 mM), 0,4 µL do iniciador senso (10 µM), 0,4 µL do iniciador anti-senso (10 µM), 0,2 µL da enzima Taq DNA Polimerase (5 U/µL), 1 µL da amostra de cDNA e 14,6 µL de água, formando um volume final de 20 µL. As amostras foram levadas ao termociclador (*Applied Biosystems*) e as sequências dos iniciadores utilizados para amplificação nas reações de PCR foram determinadas. O gene da GAPDH foi utilizado como controle positivo (Gomes *et al.*, 2019).

### **3.18 Análise estatística**

Os dados foram analisados pelo teste t de Student para comparação de dois grupos ou análise de variância (one-way ANOVA) para mais de dois grupos. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 6.0. O valor de *P* foi considerado significante quando menor ou igual a 0.05.

#### **4. Resultados e Discussão**

Os resultados obtidos nesta dissertação estão apresentados em modelo de artigo a ser submetido para a revista *Journal of Natural Products* (**Anexo A**).

#### **5. Conclusão**

- Por meio dos resultados obtidos nesta dissertação, é possível concluir que, o composto bioativo POLY não apresentou efeitos citotóxicos nas células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231. No entanto, o OXY e os quimioterápicos DOX e MEL, isoladamente, apresentaram efeito sobre as linhagens tumorais estudadas. O OXY apresentou um efeito mais seletivo para as linhagens tumorais de mama do que para a linhagem não tumoral com índice de seletividade para MDA-MB-231 e MCF-7 de 1.83 e 1.05, respectivamente.
- A associação dos compostos OXY + DOX e OXY + MEL, apresentaram resultados satisfatórios, uma vez que a combinação com o OXY reduziu em até 16 vezes as concentrações dos quimioterápicos, sem que os mesmos perdessem seus efeitos citotóxicos.
- Nas linhagens de células de câncer de mama, os compostos isolados e combinados induziram a alteração da morfologia característica, com redução significativa de tamanho e número de células, houve a redução da produção clonogênica, além de alterar a produção de espécies reativas de oxigênio, potencial de membrana mitocondrial e ciclo celular.
- Na linhagem celular MDA-MB-231, o OXY e a associação OXY + MEL foram capazes de induzir morte por apoptose pela marcação de Anexina-V e OXY + DOX induzir morte por necrose pela marcação de PI. Além disso, OXY e OXY + DOX aumentaram a expressão de caspase-3.

## 6. Referências Bibliográficas

- ABBAS, G. M., ABDEL, BAR, F. M., BARAKA, H. N., GOHAR, A. A., LAHLOUB, M. F. A new antioxidant stilbene and other constituents from the stem bark of *Morus nigra* L. **Natural Products Research**, v. 28, p. 952-9, 2014.
- ABDEL-AZEEM, A. S., HEGAZY, A. M., IBRAHIM, K. S., FARRAG, A. R., EL-SAYED, E. M. Hepatoprotective, antioxidant, and ameliorative effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and vitamin E in acetaminophen treated rats. **Journal of Dietary Supplements**, v. 10, p. 195-209, 2013.
- ADES, F., ZARDAVAS, D., BOZOVIC-SPASOJEVIC, I., PUGLIANO, L., FUMAGALLI, D., DE AZAMBUJA, E., VIALE, G., SOTIRIOU, C., PICCART, M. Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, p. 2794-803, 2014.
- ANGELUCCI, D., TINARI, N., GRASSADONIA, A., CIANCHETTI, E., AUSILICEFARO, G., IEZZI, L., ZILLI, M., GROSSI, S., URSINI, L. A., SCOGNAMIGLIO, M. T., CASTRILLI, G., DE TURSI, M., NOCCIOLI, P., CIOFFI, P., IACOBELLI, S., NATOLI, C. Long-term outcome of neoadjuvant systemic therapy for locally advanced breast cancer in routine clinical practice. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 2, p. 269-80, 2013.
- ARCAMONE, F., CASSINELLI, G., FANTINI, G., GREIN, A., OREZZI, P., POL, C., SPALLA, C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 67, p. 704-13, 1969.
- ARTEAGA, C. L., SLIWOWSKI, M. X., OSBORNE, C. K., PEREZ, E. A., PUGLISI, F., GIANNI, L. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 1, p. 16-32, 2011.
- ATCC - American Type Culture Collection, 2017a. Disponível em: <<https://www.atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx#characteristics>>. Acesso em 13 de janeiro de 2020.

ATCC - American Type Culture Collection, 2017b. Disponível em: <<https://www.atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx#characteristics>>. Acesso em 13 de janeiro de 2020.

AZIM, H.A., GHOSN, M., OUALLA, K., KASSEM, L. Personalized treatment in metastatic triple-negative breast cancer: The outlook in 2020. **The Breast Journal**, v. 26, p. 69-80, 2020.

BALE, R., PUTZER, D., SCHULLIAN, P. Local Treatment of breast cancer liver metastasis. **Cancers (Basel)**, v. 11, p. E1341, 2019.

BAYET-ROBERT, M., KWIATKOWSKI, F., LEHEURTEUR, M., GACHON, F., PLANCHAT, E., ABRIAL, C., MOURET-REYNIER, M. A., DURANDO, X., BATHOMEUF, C., CHOLLET, P. Phase I dose escalation trial of docetaxel plus curcumin in patients with advanced and metastatic breast cancer. **Cancer Biology & Therapy**, v. 1, p. 8-14, 2010.

BÉLIVEAU, R., GINGRAS, D. O flagelo do câncer. Em: Os alimentos contra o câncer. – A prevenção e o tratamento do câncer pela alimentação. **Editora Vozes**, Rio de Janeiro, v.1, p. 17-29, 2007.

BERTHIAUME, J. M., WALLACE, K. B. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. **Cell Biology and Toxicology**, v. 23, p. 15-25, 2007.

BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R. L., TORRE, L. A., JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, p. 394-424, 2018.

CAILLEAU, R., OLIVÉ, M., CRUCIGER, Q. V. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. **In Vitro**, v. 14, p. 911-5, 1978.

CALAF, G. M., PONCE-CUSI, R., CARRIÓN, F. Curcumin and paclitaxel induce cell death in breast cancer cell lines. **Oncology Reports**, v. 4, p. 2381-2388, 2018.

CASANOVA, F., QUARTI, J., DA COSTA, D. C., RAMOS, C. A., DA SILVA, J. L., FIALHO, E. Resveratrol chemosensitizes breast cancer cells to melphalan by cell cycle arrest. **Journal of Cell Biochemistry**, v. 113, p. 2586-96, 2012.

CASTANEDA, S. A., STRASSER, J. Updates in the treatment of breast cancer with radiotherapy. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 26, p. 371-382, 2017.

CHAVEZ, K. J., GARIMELLA, S. V., LIPKOWITZ, S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. **Breast Disease**, v. 32, p. 35-48, 2010.

CHEN, L., ZHOU, Q., LI, B., LIU, S. J., DONG, J. X. A new flavonoid from *Cudrania cochinchinensis*. **Natural Products Research**, v. 29, p. 1217-21, 2015.

CHOI, H. Y., LEE, J. H., JEGAL, K. H., CHO, I. J., KIM, Y. W., KIM, S. C. Oxyresveratrol abrogates oxidative stress by activating ERK-Nrf2 pathway in the liver. **Chemico-Biological Interactions**, v. 15, p. S0009-2797, 2015.

CHOI, S. W., JANG, Y. J., LEE, Y. J., LEEM, H. H., KIM, E. O. Analysis of functional constituents in Mulberry (*Morus alba* L.) Twigs by different cultivars, producing areas and heat processings. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 18, p. 256-62, 2013.

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

CHUNG, K. O., KIM, B. Y., LEE, M. H., KIM, Y. R., CHUNG, H. Y., PARK, J. H., MOON, J. O. *In-vitro* and *in-vivo* anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from *Morus alba* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 12, p. 1695-700, 2003.

CIPOLLETTI, M., MONTALESI, E., NUZZO, M. T., FIOCCHETTI, M., ASCENZI, P., MARINO, M. Potentiation of paclitaxel effect by resveratrol in human breast cancer cells by counteracting the  $17\beta$ -estradiol/estrogen receptor  $\alpha$ /neuroglobin pathway. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, p. 3147-3157, 2019.

CIRQUEIRA, M. B., MOREIRA, M. A. R., SOARES, L. R., FREITAS-JÚNIOR, R. Molecular subtypes of breast cancer. **FEMINA**, v. 39, p. 499-503, 2011.

COSTA-LOTUFO, L. V., MONTENEGRO, R. C., ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F., PESSOA, C., MORAES, M. E. A., MORAES, M. O. The contribution of natural products as source of new anticancer drugs: studies carried out at the National Experimental Oncology Laboratory from the Federal University of Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 47-58, 2010.

CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J. Review. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Expert Opinion Investigational Drugs**, v. 9, p. 2783-97, 2000.

CROFT, R. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annuary of New York Academy of Science**, v. 845, p. 435-442, 1998.

CIRQUEIRA, M. B., MOREIRA, M. A. R., SOARES, L. R., FREITAS-JÚNIOR, R. Molecular subtypes of breast cancer. **FEMINA**, v. 39, p. 499-503, 2011.

DAYEM, A. A., CHOI, H. Y., YANG, G. M., KIM, K., SAHA, S. K., CHO, S. G. The anti-cancer effect of polyphenols against breast cancer and cancer stem cells: molecular mechanisms. **Nutrients**, v.8, p. 581, 2016.

DO, M. T., KIM, H. G., CHOI, J. H., KHANAL, T., PARK, B. H., TRAN, T. P., JEONG, T. C., JEONG, H. G. Antitumor efficacy of piperine in the treatment of human HER2-overexpressing breast cancer cells. **Food Chemistry**, v. 3, p. 2591-9, 2013.

DU, Q. H., PENG, C., ZHANG, H. Polydatin: a review of pharmacology and pharmacokinetics. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, p. 1347-54, 2013.

ESMA, F., SALVINI, M., TROIA, R., BOCCADORO, M., LAROCCA, A., PAUTASSO, C. Melphalan hydrochloride for the treatment of multiple myeloma. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 18, p. 1127-1136, 2017.

FAGUET, A., B. A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. **International Journal of Cancer**, v. 136, p. 2022-2036, 2015.

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

FERRAZ DA COSTA, D. C., FIALHO, E., SILVA, J. L. Cancer chemoprevention by resveratrol: The p53 tumor suppressor protein as a promising molecular target. **Molecules**, v. 6, p. E1014, 2017.

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

FREITAS, M. S., COSTA, D. C. F., CASANOVA, F. A. Principais mecanismos de oncogênese. Em: Bases moleculares em clínica médica. **Editora Atheneu**, São Paulo, v. 1, p. 555-571, 2010.

GIORDANO, A., TOMMONARO, G. Review. Curcumin and cancer. **Nutrients**, v. 11, p. E2376, 2019.

GOMES, L., SORGINE, M., PASSOS, C. L. A., FERREIRA, C., DE ANDRADE, I. R., SILVA, J. L., ATELLA, G. C., MERMELSTEIN, C. S., FIALHO, E. Increase in fatty acids and flotillins upon resveratrol treatment of human breast cancer cells. **Scientific Reports**, v. 27, p. 13960, 2019.

GOMES, L., VIANA, L., SILVA, J. L., MERMELSTEIN, C. S., ATELLA, G. C., FIALHO, E. Resveratrol modifies lipid composition of two cancer cell lines. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 10, 2020.

GOMEZ, L. S., ZANCAN, P., MARCONDES, M. C., RAMOS-SANTOS, L., MEYER-FERNANDES, J. R., SOLA-PENNA, M., DA SILVA, D. Resveratrol decreases breast cancer cell viability and glucose metabolism by inhibiting 6-phosphofructo-1-kinase. **Biochimie**, v. 6, p. 1336-43, 2013.

GREENSHIELDS, A. L., DOUCETTE, C. D., SUTTON, K. M., MADERA, L., ANNAN, H., YAFFE, P. B., KNICKLE, A. F., DONG, Z., HOSKIN, D. W. Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. **Cancer Letters**, v. 1, p. 129-140, 2015.

GUIMARÃES, D. A. B., DE CASTRO, D. D. S. B., DE OLIVEIRA, F. L., NOGUEIRA, E. M., DA SILVA, M. A. M., TEODORO, A. J. Pitaya extracts induce growth inhibition and proapoptotic effects on human cell lines of breast cancer via downregulation of estrogen receptor gene expression. **Oxidative Medicine and Cell Longevity**, v. 2017, p. 7865073, 2017.

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

HENG Y. J., WANG, J., AHEARN, T. U., BROWN, S. B., ZHANG, X., AMBROSONE, C. B., DE ANDRADE, V. P., BRUFSKY, A. M., COUCH, F. J., KING, T. A., MODUGNO, F., VACHON, C. M., DUPRE, N. C., GARCIA, C. M., TROESTER, M. A., HUNTER, D. J., ELIASSEN, A. H., TAMIMI, R. M., HANKINSON, S. E., BECK, A. H. Molecular mechanisms linking high body mass index to breast cancer etiology in post-menopausal breast tumor and tumor-adjacent tissues. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 173, p. 667-677, 2019.

HOLLIDAY, D. L. & SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Research**, v. 13, p. 215, 2011.

HONG, T. B., RAHUMATULLAH, A., YOGARAJAH, T., AHMAD, M., YIN, K. B. Potential effects of chrysin on MDA-MB-231 cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 1057-69, 2010.

HU, S., CHEN, F., AND WANG, M. Photoprotective effects of oxyresveratrol and Kuwanon O on DNA damage induced by UVA in human epidermal keratinocytes. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, p. 541-548, 2015.

HU, S., XU, Y., MENG, L., HUANG, L., SUN, H. Curcumin inhibits proliferation and promotes apoptosis of breast cancer cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 16, p. 1266-1272, 2018.

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

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. (2020). Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acessado em 10 de janeiro de 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. INCA, 2017. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>. Acessado em: 10 de janeiro de 2020.

INSTITUTO ONCOGUIA. Quimioterapia para câncer de mama (2015). Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/quimioterapia-para-cancer-de-mama/1405/265/> Acessado em 10 de janeiro de 2020.

JIA, L., HUANG, S., YIN, X., ZAN, Y., GUO, Y., HAN, L. Quercetin suppresses the mobility of breast cancer by suppressing glycolysis through Akt-mTOR pathway mediated autophagy induction. **Life Sciences**, v. 208, p. 123-130, 2018.

JIN, Y. J., LIN, C. C., LU, T. M., LI, J. H., CHEN, I. S., KUO, Y. H., KO, H. H. Chemical constituents derived from *Artocarpus xanthocarpus* as inhibitors of melanin biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 117, p. 424-35, 2015.

JIN, Y., ZHAN, X., ZHANG, B., CHEN, Y., LIU, C., YU, L. Polydatin exerts an antitumor effect through regulating miR-382/PD-L1 axis in colorectal cancer. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 00, 2019.

JOLLY, T. A., WILLIAMS, G. R., BUSHAN, S., PERGOLOTTI, M., NYROP, K. A., JONES, E. L., MUSS, H. B. Adjuvant treatment for older women with invasive breast cancer. **Women's Health (London, England)**, v. 1, p. 129-146, 2016.

JOUNG, D. K., MUN, S. H., CHOI, S. H., KANG, O. H., KIM, S. B., LEE, Y. S., ZHOU, T., KONG, R., CHOI, J. G., SHIN, D. W., KIM, Y. C., LEE, D. S., KWON, D. Y. Antibacterial activity of oxyresveratrol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its mechanism. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 12, p. 1579-1584, 2016.

KUMAR, D. S., BOSE, C., SHAJI, S. K., PANDURANGAN, N., KUMAR, G. B., BANERJI, A., NAIR, B. G. Coconut shell derived bioactive compound oxyresveratrol mediates regulation of matrix metalloproteinase 9. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 8, p. 202-210, 2017.

LEE, H. S., HA, A. W., KIM, W. K. Effect of resveratrol on the metastasis of 4T1 mouse breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Nutrition Research and Practice**, v. 4, p. 294-300, 2012.

LIRDPRAPAMONGKOL, K., SAKURAI, H., ABDELHAMED, S., YOKOYAMA, S., MARUYAMA, T., ATHIKOMKULCHAI, S., VIRIYAROJ, A., AWALE, S., YAGITA, H., RUCHIRAWAT, S., SVASTI, J., SAIKI, I. A flavonoid chrysin suppresses hypoxic survival and metastatic growth of mouse breast cancer cells. **Oncology Reports**, v. 30, p. 2357-64, 2013.

LIU, M. H., SHAN, J., LI, J., ZHANG, Y., LIN, X. L. Resveratrol inhibits doxorubicin-induced cardiotoxicity via sirtuin 1 activation in H9c2 cardiomyocytes. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 12, p. 1113-1118, 2016.

LIU, Y., REN, W., BAI, Y., WAN, L., SUN, X., LIU, Y., XIONG, W., ZHANG, Y.Y., ZHOU, L. Oxyresveratrol prevents murine H22 hepatocellular carcinoma growth and lymph node metastasis via inhibiting tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. **Journal of Natural Medicines**, v. 2, p. 481-492, 2018.

LU, H. P., JIA, Y. N., PENG, Y. L., YU, Y., SUN, S. L., YUE, M. T., PAN, M. H., ZENG, L. S., XU, L. Oxyresveratrol, a stilbene compound from *Morus alba* L. Twig extract active against *Trichophyton rubrum*. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 1842-1848, 2017.

MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., RÉMÉSY, C., JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MANI, R., NATESAN, V. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. **Phytochemistry**, v. 145, p. 187-196, 2018.

MATENCIO, A., DHAKAR, N. K., BESSONE, F., MUSSO, G., CAVALLI, R., DIANZANI, C., GARCÍA-CARMONA, F., LÓPEZ-NICOLÁS, J. M., TROTTA, F. Study of oxyresveratrol complexes with insoluble cyclodextrin based nanosponges: Developing a novel way to obtain their complexation constants and application in an anticancer study. **Carbohydrate Polymers**, v. 231, p. 115763, 2020.

MAUGHAN, K. L., LUTTERBIE, M. A., HAM, P. S. Review. Treatment of breast cancer. **American Family Physician**, v. 81, p. 1339-46, 2010.

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

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p.55-63, 1983.

OMATA, Y., LEWIS, J. B., ROTENBERG, S., LOCKWOOD, P. E., MESSER, R. L., NODA, M., HSU, S. D., SANO, H., WATAHA, J. C. Intra- and extracellular reactive oxygen species generated by blue light. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 3, p. 470-7, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). (2020). Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acessado em 10 de janeiro de 2020.

PAL, M. K., JAISWAR, S. P., SRIVASTAV, A. K., GOYAL, S., DWIVEDI, A., VERMA, A., SINGH, J., PATHAK, A. K., SANKHWAR, P. L., RAY, R. S. Synergistic effect of piperine and paclitaxel on cell fate via cyt-c, Bax/Bcl-2-caspase-3 pathway in ovarian adenocarcinomas SKOV-3cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 15, p. 751-762, 2016.

PAN, J. H., WANG, H. B., DU, X. F., LIU, J. Y., ZHANG, D. J. [Polydatin induces human cervical cancer cell apoptosis via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway]. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 42, p. 2345-2349, 2017.

PARK, B., JO, K., LEE, T. G., HYUN, S. W., KIM, J. S., KIM, C. S. Polydatin inhibits NLRP3 inflammasome in dry eye disease by attenuating oxidative stress and inhibiting the NF-κB pathway. **Nutrients**, v. 15, p. E2792, 2019.

PASSOS, C. L., FERREIRA, C., SOARES, D. C., SARAIVA, E. M. Leishmanicidal effect of synthetic *trans*-Resveratrol analogs. **PLoS One**, v. 10, p. e0141778, 2015.

PASTORELLI, D., FABRICIO, A. S. C., GIOVANIS, P., D'IPPOLITO, S., FIDUCCIA, P., SOLDÀ, C., BUDA, A., SPERTI, C., BARDINI, R., DA DALT, G., RAINATO, G., GION, M., URSINI, F. Phytosome complex of curcumin as complementary therapy of advanced pancreatic cancer improves safety and efficacy of gemcitabine: Results of a prospective phase II trial. **Pharmacological Research**, v.132, p. 72-79, 2018.

PERRET, G. Y., CRÉPIN, M. New pharmacological strategies against metastatic spread. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 22, p. 465-92, 2008.

PIROLA, L., FRÖJDÖ, S. Resveratrol: one molecule, many targets. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, v. 60, p. 323–332, 2008.

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

PRAT, A., PARKER, J. S., KARGINOVA, O., FAN, C., LIVASY, C., HERSCHKOWITZ, J. I., HE, X., PEROU, C. M. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, p. R68, 2010.

POLAVARAPU, A., STILLABOWER, J. A., STUBBLEFIELD, S. G., TAYLOR, W. M., BAIK, M. H. The mechanism of guanine alkylation by nitrogen mustards: a computational study. **Journal of Organic Chemistry**, v. 77, p. 5914-21, 2012.

POZO-GUISADO, E., ALVAREZ-BARRIENTOS, A., MULERO-NAVARRO, S., SANTIAGO-JOSEFAT, B., FERNANDEZ-SALGUERO, P. M. 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**, v.64, p.1375-86, 2002.

RAHMAN, M. A., BISHAYEE, K., SADRA, A., HUH, S. O. Oxyresveratrol activates parallel apoptotic and autophagic cell death pathways in neuroblastoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 2, p. 23-36, 2017.

RAI, G., MISHRA, S., SUMAN, S., SHUKLA, Y. Resveratrol improves the anticancer effects of doxorubicin *in vitro* and *in vivo* models: A mechanistic insight. **Phytomedicine**, v. 23, p. 233-42, 2016.

RENU, K., V. G. A., P. B. T. P., ARUNACHALAM, S. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy - An update. **European Journal of Pharmacology**, v. 818, p. 241-253, 2018.

RIVANKAR, S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 10, p. 853-8, 2014.

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

RUSSNES H. G., LINGJÆRDE, O. C., BØRRESEN-DALE, A. L., CALDAS, C. Breast cancer molecular stratification: from intrinsic subtypes to integrative clusters. Review. **The American Journal of Pathology**, v. 10, p. 2152-2162, 2017.

SALVIOLI, S., ARDIZZONI, A., FRANCESCHI. C. COSSARIZZA, A. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. **FEBS Letters**, v. 411, p. 77-82, 1997.

SASIVIMOLPHAN, P., LIPIPUN, V., LIKHITWITAYAWUID, K., TAKEMOTO, M., PRAMYOTHIN, P., HATTORI, M., SHIRAKI, K. Inhibitory activity of oxyresveratrol on wild-type and drug-resistant varicella-zoster virus replication *in vitro*. **Antiviral Research**, v. 84, p. 95-7, 2009.

SCHERBAKOV, A. M., SHESTAKOVA, E. A., GALEEVA, K. E., BOGUSH, T. A. [BRCA1 and Estrogen Receptor  $\alpha$  Expression Regulation in Breast Cancer Cells]. **Molecular Biology (Mosk)**, v. 53, p. 502-512, 2019.

SEMLER, U., GROSS, G. G. Distribution of piperine in vegetative parts of *Piper nigrum*, **Phytochemistry**, v. 27, p. 1566-1567, 1988.

SHAPIRO, C. L., RECHT, A. Drug therapy: side effects of adjuvant treatment of breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 62, p. 141-150, 2000.

SIDDIQA, A., LONG, L. M., LI, L., MARCINIAK, R. A., KAZHDAN, I. Expression of HER-2 in MCF-7 breast cancer cells modulates anti-apoptotic proteins Survivin and Bcl-2 via the extracellular signal-related kinase (ERK) and phosphoinositide-3 kinase (PI3K) signaling pathways. **BMC Cancer**, v. 2, p. 8:129, 2008.

SINGH, N., NIGAM, M., RANJAN, V., SHARMA, R., BALAPURE, A. K., RATH, S. K. Caspase mediated enhanced apoptotic action of cyclophosphamide- and resveratrol-treated MCF-7 cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.109, p. 473-485, 2009.

SOTIRIOU, C., NEO, S. Y., MCSHANE, L. M., KORN, E. L., LONG, P. M., JAZAERI, A., MARTIAT, P., FOX, S. B., HARRIS, A. L., LIU, E. T. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 18, p.10393-8, 2003.

SOULE. H. D., VAZGUEZ, J., LONG, A., ALBERT, S., BRENNAN, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, p. 1409-16, 1973.

SOUZA, M. V. N., PINHEIRO, A. C., FERREIRA, M. L., GONÇALVES, R. S. B., CAMILO, H. L. Natural products in advance clinical trials applied to cancer. State of the art. **Revista Fito**, n. 02, 2007.

STEEG, P. S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. Review. **Nature Medicine**, v. 12, p. 895-904, 2006.

SUNILKUMAR, D., DRISHYA, G., CHANDRASEKHARAN, A., SHAJI, S. K., BOSE, C., JOSSART, J., PERRY, J. J. P., MISHRA, N., KUMAR, G. B., NAIR, B. G. Oxyresveratrol drives caspase-independent apoptosis-like cell death in MDA-MB-231 breast cancer cells through the induction of ROS. **Biochemical Pharmacology**, v. 20, p. 113724, 2019.

SU, D., CHENG, Y., LIU, M., LIU, D., CUI, H., ZHANG, B., ZHOU, S., YANG, T., MEI, Q. Comparision of piceid and resveratrol in antioxidation and antiproliferation activities *in vitro*. **PLoS One**, v. 8, p. e54505, 2013.

SYED, S. B., ARYA, H., FU, I. H., YEH, T. K., PERIYASAMY, L., HSIEH, H. P., COUMAR, M. S. Targeting P-glycoprotein: Investigation of piperine analogs for overcoming drug resistance in cancer. **Scientific Reports**, v. 7, p. 7972, 2017.

SYAH, Y. M., ACHMAD, S. A., GHISALBERTI, E. L., HAKIM, E. H., IMAN, M. Z., MAKMUR, L., MUJAHIDDIN, D. ANDALASIN A. A new stilbene dimer from *Morus macroura*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 630-5, 2000.

TALLARIDA, R. J. Drug synergism and dose-effect data analysis. **Chapman & Hall/CRC: New York**, 2000.

TAN, H. Y., TSE, I. M., LI, E. T., WANG, M. Oxyresveratrol supplementation to C57BL/6 mice fed with a high-fat diet ameliorates obesity-associated symptoms. **Nutrients**, v. 9, p. E147, 2017.

TANG, Y., WANG, Y., KIANI, M. F., WANG, B. Classification, treatment strategy and associated drug resistance in breast cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 16, p. 335-343, 2016.

THORN, C. F., OSHIRO, C., MARSH, S., HERMANDEZ-BOUSSARD, T., MCLEOD, H., KLEIN, T. E. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenet Genomics**, v. 21, p. 440-6, 2011.

TI, H., WU, P., LIN, L., WEI, X. Stilbenes and flavonoids from *Artocarpus nitidus* subsp. *lingnanensis*. **Fitoterapia**, v. 82, p. 662-5, 2011.

TOLOSA, E. M. C., RODRIGUES, C. J., BEHMER, A. O., FREITAS, A. N. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. **Editora Manole**, 2003.

VASTANO, B. C., CHEN, Y., ZHU, N., HO, C. T., ZHOU, Z., ROSEN, R. T. Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 253-6, 2000.

VAN DEN BRAND, A. D., VILLEVOYE, J., NIJMEIJER, S. M., VAN DEN BERG, M., VAN DUURSEN, M. B. M. Anti-tumor properties of methoxylated analogues of resveratrol in malignant MCF-7 but not in non-tumorigenic MCF-10A mammary epithelial cell lines. **Toxicology**, v. 422, p. 35-43, 2019.

VINCENT, T. L., GATENBY, R. A. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. **International Journal of Oncology**, v. 32, p. 729-37, 2008.

WANG, X. J., CHEN, J. Y., FU, L. Q., YAN, M. J. Recent advances in natural therapeutic approaches for the treatment of cancer. **Journal of Chemotherapy**, v. 13, p. 1-13, 2020.

WANG, Y., ZHONG, J., BAI, J., TONG, R., AN, F., JIAO, P., HE, L., ZENG, D., LONG, E., YAN, J., YU, J., CAI, L. The application of natural products in cancer therapy by targeting apoptosis pathways. **Current Drug Metabolism**, v. 19, p. 739-749, 2018.

WU, H., CHEN, L., ZHU, F., HAN, X., SUN, L., CHEN, K. The Cytotoxicity Effect of Resveratrol: Cell Cycle Arrest and Induced Apoptosis of Breast Cancer 4T1 Cells. **Toxins**, v. 12, p. E731, 2019.

WU, Y., HU, X., YANG, G. Z., MEI, Z. N., CHEN, Y. Two new flavanols from *Glycosmis pentaphylla*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 14, p. 738-42, 2012.

YADAV, B. S., CHANANA, P., JHAMAB, S. Biomarkers in triple negative breast cancer: A review. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 6, p. 252-63, 2015.

YANG, B., HUANG, J., XIANG, T., YIN, X., LUO, X., HUANG, J., LUO, F., LI, H., LI, H., REN, G. Chrysin inhibits metastatic potential of human triple-negative breast cancer cells by modulating matrix metalloproteinase-10, epithelial to mesenchymal transition, and PI3K/Akt signaling pathway. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, p. 105-12, 2014.

ZASADIL, L. M., ANDERSEN, K. A., YEUM, D., ROCQUE, G. B., WILKE, L. G., TEVAARWERK, A. J., RAINES, R. T., BURKARD, M. E., WEAVER, B. A. Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles. **Science Translational Medicine**, v. 26, p. 229ra43, 2014.

ZHANG, T., ZHU, X., WU, H., JIANG, K., ZHAO, G., SHAUKAT, A., DENG, G., QIU, C. Targeting the ROS/PI3K/AKT/HIF-1 $\alpha$ /HK2 axis of breast cancer cells: Combined administration of polydatin and 2-deoxy-d-glucose. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 23, p. 3711-7723, 2019.

ZHENG, Z. P., TAN, H. Y., WANG, M. Tyrosinase inhibition constituents from the roots of *Morus australis*. **Fitoterapia**, v. 83, p. 1008-13, 2012.

ZHU, W., QIN, W., ZHANG, K., ROTTINGHAUS, G. E., CHEN, Y. C., KLIETHERMES, B., SAUTER, E. R. *Trans*-resveratrol alters mammary promoter hypermethylation in women at increased risk for breast cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 64, p. 393-400, 2012.

ZINGUE, S., CISILOTTO, J., TUECHE, A. B., BISHAYEE, A., MEFEGUE, F. A., SANDJO, L. P., MAGNE, N. DE, C. B., WINTER, E., MICHEL, T., NDINTEH, D. T., AWOUNFACK, C. F., SILIHE, K. K., TANEKOU, T. T., CRECZYNSKI-PASA, T. B., NJAMEN, D., CRATEVA ADANSONII, D. C. An African ethnomedicinal plant, exerts cytotoxicity *in vitro* and prevents experimental mammary tumorigenesis *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 190, p. 183-99, 2016.

## **ANEXO A**

### **Oxyresveratrol is active against breast cancer cells: *in vitro* effects of its association with doxorubicin and melphalan**

Carlos Luan Alves Passos<sup>1</sup>, Christian Ferreira<sup>1</sup>, Marcos Sorgine<sup>2</sup>, Jerson Lima da Silva<sup>2</sup>, Eliane Fialho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil.

Correspondence to: Profª. Eliane Fialho de Oliveira, PhD. Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Caixa Postal 68041, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, CEP 21941-590, Brazil. E-mail adress: fialho@nutricao.ufrj.br. Fax number: + 55 21 2280 8343. Tel number: +55 21 3938 6799.

**Keywords:** Breast cancer, Oxyresveratrol, Doxorubicin, Melphalan.

## ABSTRACT

Breast cancer is the second most common type of cancer in the world, and the one responsible for most deaths in women. The process of carcinogenesis comprises the initiation, promotion and tumor progression, and it has been shown that natural products may act at these different stages. The polyphenols Polydatin (POLY) and Oxyresveratrol (OXY) has several biological effects describes as leishmanicidal, anti-oxidant and anti-inflammatory. The aim of this study was to investigate the effect of POLY, OXY and chemotherapy drugs Doxorubicin (DOX) and Melphalan (MEL), isolated and associated in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell cultures. Our results showed that POLY does not present cytotoxic effect in tumor cells. When using MCF-10, a non-tumor cells, OXY, DOX and MEL showed no cytotoxicity effects. Besides, our results showed that OXY, DOX and MEL presented cytotoxicity in MCF-7 with IC<sub>50</sub> of 164.10 µM, 22.60 µM and 155.50 µM, and for MDA-MB-231 287.08 µM, 32.55 µM and 240.26 µM, respectively, after 24 hours of treatment and with morphological changes observed from light microscopy. The association of OXY, DOX and MEL reduced the cell viability in a dose-dependent manner with decrease of 4.0- and 5.0-fold the concentrations of DOX and MEL in MCF-7, respectively, and 16-fold the concentrations of DOX and MEL in MDA-MB-231. The OXY, DOX, MEL, OXY + DOX and OXY + MEL alter the reactive oxygen species production and also  $\Delta\Psi_m$  in breast cancer cells. The OXY, DOX or MEL, and associations were able to alter the cell cycle, DOX and OXY + DOX leads the cells to necrosis, besides OXY was able to lead the cells to apoptosis and upregulate caspase-3 in MDA-MB-231 cells. In summary, our results demonstrated the *in vitro* anti-breast cancer effect of OXY and its associations with chemotherapeutic agents, however not in non-tumor cells, which lead us to suggest OXY as promising candidate for clinical trials.

## **1. INTRODUCTION**

Cancer is a growing health problem and is one of the leading causes of death. According to WHO by the year 2030, an estimated 27 million new cases of cancer worldwide, and 17 million deaths from the disease. In 2015 were 8.8 million deaths and breast cancer contributed 571.000 deaths, herein breast cancer is the type of cancer that more kills women in the world, particularly in low- and middle-income countries [1]. Current treatments for cancer include cytotoxic chemotherapy, however some limitations are observed as high toxicity and the resistance to chemotherapy which implies the survival of the patient [2; 3].

The chemotherapeutic agents combined with chemopreventive phytochemicals have been shown to be a good alternative in the treatment of breast cancer, enhancing the antitumor effect of the classic chemotherapeutic at lower concentrations and attenuating the toxic effects [4-6].

Polyphenols comprise the largest class of phytochemicals present in plants, and are considered products of secondary metabolism of plants [7]. The polyphenol content is associated with the plant defense system against pathogens and UV radiation, and confers aroma, color and astringency on various foods [8], studies of chemical structures associated with biological properties of polyphenol derived like polydatin (POLY) that is a glucoside of resveratrol in which the glucoside group bound to the position C-3 substitutes a hydroxyl group and oxyresveratrol (OXY), that has one more hydroxyl group than resveratrol and, will aid in the search for new drugs for breast cancer treatment and the synergistic association of conventional chemotherapeutics such as doxorubicin (DOX) and melphalan (MEL) by aiding in the development of therapeutic strategies more effective and that are less toxic to the patient [9; 10].

POLY (resveratrol-3-O- $\beta$ -mono-D-glucoside) is a natural precursor of resveratrol found in rhizoma of *Polygonum cuspidatum*, can also be found in grapes, red wine, peanut and chocolate products and it has several biological effects been described as anti-inflammatory activity, antioxidant effect, anti-arteriosclerosis, neuroprotective activity, anti-microbial and anti-tumor effect. OXY (*trans*-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) is a polyphenol found in roots, stems, leaves and fruits of several species, among them *Morus nigra* L., *Morus alba* L., *Morus australis*, *Morus macroura*, *Cudrania cochinchinensis*, *Glycosmis pentaphylla*, *Artocarpus xanthocarpus*, *Artocarpus nitidus* subsp. *lingnanensis*, *Artocarpus heterophyllus*, *Artocarpus gomezianus*, *Gnetum hainanense* and *Smilax china* [9-23], and it has several biological effects been described as effect on hepatocellular carcinoma, neuroblastoma cells, antioxidant effect, anti-inflammatory, anti-asthmatic, antibacterial, anti-parasitic, antiviral, anti-tumor, on reduction of symptoms associated with obesity and effect on nonalcoholic fatty liver disease [24-33], but no studies were found demonstrating the cytotoxic effect of polyphenol OXY in combination with DOX and MEL in breast cancer cells.

Therefore, the aim of this study was to investigate the cytotoxic effect of POLY (**Figure 1A**), OXY (**Figure 1B**) and whether association with chemotherapeutic agents as DOX (**Figure 1C**) and MEL (**Figure 1D**), would be able to decrease the concentrations of the classical antineoplastic agents and investigate the possible mechanisms of polyphenols in potentiating the anti-tumor effect of chemotherapy in breast cancer cells.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **DRUGS**

Oxyresveratrol (*trans*-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene, OXY), Polydatin (resveratrol-3-O- $\beta$ -mono-D-glucoside, POLY), Melphalan (MEL) and DMSO were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Doxorubicin chloridrate (DOX) was donated by Dr<sup>a</sup>. Raquel Maia (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA, RJ, Brazil).

### **CELL LINES AND CULTURES**

The human breast epithelial cell lines, MDA-MB-231, as estrogen receptor-negative cell line derived from a metastatic carcinoma, MCF-7, an estrogen receptor positive cell line derived from an *in situ* carcinoma, and MCF-10A, a non-tumor breast cell line, obtained from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA) were used in this study. MDA-MB-231 and MCF-7 cells were maintained in DMEM medium supplemented with 10 % fetal bovine serum. MCF-10A was maintained in DMEM/F12 medium supplemented with 10 % fetal bovine serum, insulin 0.01 mg/mL, EGF 0.02 mg/mL and hydrocortisone 0.05 mg/mL. Both media contained 100 units/mL of penicillin and 100  $\mu$ g/mL of streptomycin. The cells cultures were kept at 37°C in a humidified atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub> in air.

## **CELL VIABILITY ASSAY**

The cell viability assay was performed using MTT assay according to the method described by Carmichael *et al.* (1987) [34] modified. Briefly, cell cultures were treated with different concentrations of POLY, OXY, DOX and MEL for 24 h. After treatment, cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and then incubated for 3 h in 0.5 mL of MTT solution (0.5 mg/mL of PBS) at 37°C in 5 % CO<sub>2</sub> in an incubator. The medium was removed, and DMSO 0.5 mL was added to each well to dissolve the resulting formazan crystals. The absorbance was measured at a wavelength of 570 nm. The results are expressed in percentage of viable cells compared to untreated control.

## **SELECTIVITY INDEX CALCULATION (SI)**

The selectivity index was calculated as the ratio of non-tumor cell MCF-10A CC<sub>50</sub> by cancer cell MCF-7 IC<sub>50</sub> or MDA-MB-231 IC<sub>50</sub>, as described by Passos et al., modified [30].

## **ISOBOLOGRAM CONSTRUCTION**

The fractional inhibitory concentration index (FIC) of OXY was calculated using the formula IC<sub>50</sub> of OXY in association/IC<sub>50</sub> of OXY alone (IC<sub>50</sub>, 50 % inhibitory concentration) in MCF-7 or MDA-MB-231 cells. The same formula was applied to DOX and MEL. The sum FICs ( $\Sigma$ FICs) were calculated as FIC of OXY + FIC of DOX and FIC of OXY + FIC of MEL. The mean FIC was calculated for each combination and then compared to the reference values and reported as synergistic ( $\Sigma$ FIC,  $\leq$  0.5), indifferent ( $\Sigma$ FIC,  $>$  0.5 and  $\leq$  4), or antagonistic ( $\Sigma$ FIC,  $>$  4). The synergistic effect between OXY +

DOX and OXY + MEL were analyzed using FIC values to plot the isobogram, according to the method of Tallarida (2000) [35]. Antagonistic combinations were defined as points above the line of additivity, and synergistic combinations were defined as points below the line.

### **TEST OF COLONY FORMATION (CFU)**

The test of colony formation was performed using crystal violet according to the method described by Guimarães et al. [36] modified. The MCF-7 or MDA-MB-231 cells were adjusted at a density of  $10^3$  cells/per well in a 24-well plate for 24 h. The cells were treated with OXY, DOX, MEL and associations at their respective IC<sub>50</sub> concentrations for 24 h with medium replace every 3 days. After 15 days, colonies were fixed in methanol, (Sigma, St. Louis, USA) for 10 min and then stained with 5 % crystal violet (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) for 30 min at room temperature. For colonic analyses, they were washed five times with PBS for 5 min and 50 cells were counted using an inverted microscope.

### **DETECTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS)**

Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) was performed using MCF-7 or MDA-MB231 cells were adhered to 96-well opaque culture plates and treated with OXY, DOX, MEL and associations at their respective IC<sub>50</sub> concentrations for 3 h. The cells were then stained with 50  $\mu$ M 2',7'-Dichlorofluorescin diacetate (DCFDA, Sigma-Aldrich), and ROS was measured immediately using 500/526 nm excitation/emission wavelengths.

## **MEASUREMENT OF THE MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL ( $\Delta\Psi M$ )**

The MCF-7 or MDA-MB-231 cells were treated or not with IC<sub>50</sub> of OXY, DOX, MEL and associations for 24 h and then incubated with a JC-1 solution (5 µg/ml, Sigma) for 20 min at 37°C according to the manufacturer's instructions.  $\Delta\Psi m$  was measured in 96-well opaque plates using 490/530 nm excitation/emission (JC-1 monomers) and 525/590 nm excitation/emission (J-aggregates) as described by Ferreira et al., modified [37].

## **CELL CYCLE ANALYSIS**

The MCF-7 or MDA-MB-231 cells were treated with OXY, DOX, MEL and associations at their respective IC<sub>50</sub> concentrations for 24 h. After treatment, the cells (5x10<sup>5</sup>) were washed with PBS and fixed in 70 % (v/v) ice-cold methanol/PBS for at least 1 hour at 4°C. The fixed cells were washed once with PBS and then incubated in PBS supplemented with 10 µg/mL propidium iodide (PI) and 20 µg/mL RNase at 37°C for 30 min at room temperature in the dark. For each sample, 10,000 events were analyzed using a FACScan (Becton and Dickson) and analyzed using CellQuest software.

## **ASSESSMENT OF APOPTOTIC CELLS BY DAPI STAINING**

The cells were treated with OXY, DOX, MEL and associations at their respective IC<sub>50</sub> concentrations for 24 h. Next, the cells were fixed with 70 % methanol/PBS for 1h and then permeabilized with Triton X-100 (0.5 % in PBS) for 25 min. Cells were finally stained using 10 µg/mL DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) in PBS and allowed to stand for 7 min in a dark condition. The cells were washed and then collected by flow

cytometry BD FACSCalibur (Becton, Dickinson) and analyzed using the CellQuest software.

## IMMUNOCYTOCHEMISTRY

The cells were treated with OXY, DOX, MEL and associations at their respective IC<sub>50</sub> concentrations for 24 h. Next, the cells were fixed with 4 % paraformaldehyde, 0.3 % BSA and Triton X-100 0.5 % for 20 min and permeabilized with Triton X-100 (0.5 % in PBS) for 25 min. The cells were then washed in PBS three times and primary antibody anti-caspase-3 was added and incubated in the dark for approximately 1 h. The cells were then washed in PBS three times and the fluorescence secondary antibody (Alexa 647, ThermoFisher) was added and incubated in the dark for approximately 1 h. The cells were washed and then collected by flow cytometry BD FACSCalibur (Becton, Dickinson) and analyzed using the CellQuest software.

## ANNEXIN V BINDING ASSAY

Double staining for annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) and PI was performed with the Annexin-V apoptosis detection kit (Molecular Probes). MCF-7 or MDA-MB-231 cells were treated or not with different concentrations of OXY, DOX, MEL and associations for 24 hours. They were then washed twice in cold annexin V-buffer and centrifuged at 2500 rpm for 5 min. Pellets were resuspended in 20 µL of annexin V FITC, and after 15 min of incubation in the dark, 480 µL of annexin V-buffer was added according to the manufacturer instructions. Annexin V-FITC labeling was recorded on a BD FACScalibur (Becton and Dickson) and analyzed using CellQuest software.

## **qPCR**

Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed in untreated and treated cells [38]. mRNA from cells were isolated using Trizol (Invitrogen, USA) reagent, according to the manufacturer's instructions, and quantified using a Nanodrop spectrophotometer. Two micrograms of total RNA were used as a template for cDNA synthesis, using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies, USA). PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, USA), was used to quantify mRNA expression levels, with actin as an endogenous control. Real-time reactions were performed in triplicates using a StepOne Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, USA). Relative quantification was performed using the Delta-Delta Ct method. Primer sequences were as follows:

<b>Genes</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<b>Caspase 3</b>	GCTGGATGCCGTCTAGAGTC	ATGTGTGGATGATGCTGCCA
<b>GAPDH</b>	CATGGGGAAGGTGAAGGTCGA	TTGGCTCCCCCTGCAAATGAG

## **STATISTICAL ANALYSIS**

Data were analyzed using Student's t-test when comparing two groups or one-way ANOVA for more than two groups using the software GraphPad Prism 6.0. P values less than 0.05 were considered significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

Stilbenes are natural products isolated from several plant species and resveratrol is by far the most studied among them, with several of its biological effects having already been described, including anti-cancer effect. Among its effects, resveratrol has been shown to potentiate the cytotoxic effect of melphalan on MCF-7 breast cancer cells [39-42].

Here, we describe the anti-breast cancer effects of two *trans*-resveratrol derivatives. The polyphenols POLY and OXY has been widely studied, and several of its biological activities have been described: antineoplastic, antiviral, antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant, neuroprotective, hypoglycemic activity, whitening and skin care effects and protective function of hepatic damage [9; 43].

It has been demonstrated that POLY reduced cell viability on breast cancer cells 4T1 and MCF-7 as well as present IC<sub>50</sub> values of 66.56 and 103.1 μM, respectively. For OXY has been demonstrated that 10 μM has an estrogenic activity and can induce proliferation of MCF-7 cells and upregulation of ERα/β expression. Although it has been shown that OXY, isolated from *S. china* L., present IC<sub>50</sub> values of 4.5 and 5.6 μg/mL, for MCF-7 and MDA-MB-231 cells, respectively [44-46]. Actually, breast cancer is the type of cancer that more kills women in the world, and in 2015, were 571,000 deaths [1]. Thus, we sought to better characterize the effect of polyphenols in breast cancer cells, and by evaluating its anticancer effect of association with two classical chemotherapeutic agents, DOX (anthracycline antibiotic) and MEL (nitrogen mustard alkylating agent).

Initially, we performed the cytotoxicity assay to assess the effect POLY, OXY, DOX and MEL in breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 and non-tumor breast cell line MCF-10A. After the treatment with different concentrations of compounds

for 24 hours, the MTT assay was performed (**Figure 2**). Our results demonstrated that POLY in the 24 hour treatment of MDA-MB-231 cells only at the highest concentration tested (300  $\mu$ M), significantly decreased 27.94 % of cell viability ( $P < 0.0031$ ). Furthermore, POLY showed no cytotoxicity in MCF-7 cell (**Figure 2A**). We observed that OXY reduced the cell viability of the MCF-7 and MDA-MB-231 cells in a dose-dependent manner. The cytotoxicity in MCF-7 and MDA-MB-231 cells started at the concentration of 50  $\mu$ M with a significantly reduction of 24.63 and 8.58 % ( $P < 0.05$ ), respectively (**Figure 2B**). The DOX significantly reduced 29.55 and 31.98 % ( $P < 0.001$ ) the viability of MCF-7 and MDA-MB-231 at concentrations of 0.5 and 2  $\mu$ M, respectively (**Figure 2C**). MEL, at concentrations of 100 and 50  $\mu$ M, significantly reduced the viability in MCF-7 and MDA-MB-231 cells by 45.00 and 15.24 % ( $P < 0.05$ ), respectively (**Figure 2D**). In human non-tumor mammary cells MCF-10A, the OXY, DOX and MEL, at the concentration of 100  $\mu$ M, had 83.59, 35.11 and 87.43 % of viable cells, respectively. However, POLY showed no cytotoxicity in MCF-10A cells (**Figure 2A-D**).

We determined that the IC<sub>50</sub>s of OXY, DOX and MEL for MCF-10A, MCF-7 and MDA-MB-231 cells were >300, 26.54 and 195.97  $\mu$ M, 164.10, 22.60 and 155.70  $\mu$ M and 287.08, 32.55 and 240.26  $\mu$ M, respectively (**Table 1**). This value is higher than the IC<sub>50</sub>s of 4.5 and 5.6  $\mu$ g/mL (18.42 and 22.93  $\mu$ M), that were established for MCF-7 and MDA-MB-321 cells, respectively [44]. The selectivity index (SI) was also calculated from the IC<sub>50</sub> obtained from the MCF-10A cells and the IC<sub>50</sub> from the MDA-MB-231 cells, the SI for OXY was >1.05 and for DOX and MEL were 0.82 (**Table 1**).

It has been commonly assumed that combination chemotherapy for breast cancer, with true synergistic potential, will result in improved response rate, better symptom palliation and improved survival compared to single agent chemotherapy [46].

Therefore, we assessed whether OXY could synergize with DOX and MEL, using the fractional inhibitory concentration index and the isobologram method. Thus, the IC<sub>50</sub>s for both drugs were determined (**Table 2**), the calculated IC<sub>50</sub> value for OXY was plotted on the y axis, and the IC<sub>50</sub> values for DOX were plotted on the x axis (**Figure 3A-C**), for MEL, the IC<sub>50</sub> values were plotted on the x axis (**Figure 3B-D**). The two points were connected to form the line of additivity. The points on this line were classified as additive, points above the line indicate antagonistic effects, and points below the line indicate synergistic effects. The combination of 93.61 μM OXY + 5.65 μM DOX in MCF-7 and 211.09 μM OXY + 2.034 μM DOX in MDA-MB-231 both showed a moderate synergism effect, with FIC values of 0.82 and 0.80, respectively. Likewise the combination of 10.25 μM OXY + 29.25 μM MEL in MCF-7 showed strong synergism and 132.93 μM OXY + 15.01 μM MEL in MDA-MB-231 presented synergism, with FIC values 0.25 and 0.52, respectively (**Table 2**), according to Chou [48]. Rai and colleagues [49] demonstrated that resveratrol improves the anticancer effects of DOX *in vitro* and *in vivo*, besides the combinatorial treatment of 216 nM DOX plus 84.6 μM resveratrol was able to reduced 2.5 fold the dose of DOX in comparison to IC<sub>50</sub> of DOX alone. Our results demonstrated that 93.61 μM OXY + 5.65 μM DOX in MCF-7 and 211.09 μM OXY + 2.034 μM DOX in MDA-MB-231 cells were able to decrease the concentrations of the antineoplastic DOX and MEL, 4.0 and 16.0 times, respectively, meanwhile, the associations of 10.25 μM OXY + 29.25 μM MEL in MCF-7 and 132.93 μM OXY + 15.01 μM MEL in MDA-MB-231 cells were able to decrease in 5.0 and 16.0 times the concentrations of the chemotherapeutic agents, respectively, without them losing their activity, when compared separately. Due to the fact that these associations are synergistic and contain the lowest concentration of the chemotherapeutic agents, they were chosen for the other assays.

Light microscopy was used to evaluate the morphological effect of OXY, DOX, MEL, and its associations, exposure on MCF-7 and MDA-MB-231 cells. MCF-7 and

MDA-MB-231 cells were exposed to the compounds for 24 h at the determined IC<sub>50</sub> values. The treatment of OXY in MCF-7 cells showed no significant morphological changes, but reduced cell density. Regarding the treatment with DOX, MEL and OXY + DOX and OXY + MEL combinations, it was possible to observe changes in cell morphology, with reduction of cell size in relation to the control. In addition, there was fragmentation and formation of cell membrane extensions. OXY treatment of MDA-MB-231 cells resulted in morphological changes that include rounding and retraction up of cells, with reduced cell size compared to control. The same pattern of change in cell morphology was observed after treatment with DOX and association OXY + DOX and OXY + MEL. In all treatments, a decrease in cell density was observed (**Figure 4**).

To further examine the cytotoxic effects of OXY, DOX, MEL and associations over a prolonged period of time, clonogenic assays were performed on both of the cell lines for 18 days after treatment with IC<sub>50</sub>, respectively. According to the literature, cell groups with than 50 cells were considered as colonies [50]. Our data showed that the clonogenic ability of MCF-7 and MDA-MB-231 cells was inhibited in the presence of IC<sub>50</sub> of OXY, DOX, MEL and associations of OXY + DOX and OXY + MEL (**Figure 5A-C**). The clonogenicity assay allows evaluation of the ability of cells to form colonies. This assay detects, after the cytotoxic effect of treatment, whether cells can form and maintain the ability to generate daughter cells. Resveratrol, another stilbene, also has ability to inhibit colony formation in MDA-MB-231 cell in a concentration of 100 µM [51]. This mechanism is valid for cancer control since the cell is unable to divide and is unable to maintain the tumor.

The mechanism of action of DOX is due to the induction of DNA-damage, mainly through inhibition of DNA topoisomerase II enzyme after induction of double-strand DNA breaks [52]. Doxorubicin-induced ROS production could promote loss of

mitochondrial membrane potential, mitochondrial swelling and outer membrane rupture that initiates the release of cytochrome c, which the eventual outcome is apoptotic cell death [53]. Corroborating these data, we found that DOX increase the ROS production 1.13 and 1.89-fold in MCF-7 and MDA-MB-231 cells, respectively. However, the association OXY + DOX in both cells reduced ROS levels by 1.87 and 1.41-fold (**Figure 6A-B**).

OXY is a molecule that has an antioxidant effect on many types of cell [26]. Passos and colleagues [30] showed that 30.5  $\mu\text{M}$  of OXY reduced ROS levels by 3.6-fold in mice peritoneal macrophages. It has been suggested that OXY present protective effects against oxidative hepatic damage *in vitro* and *in vivo* [54]. OXY also have protective effects against reactive oxygen and nitrogen species in a murine microglial cell line, by considerably decreasing nitric oxide and ROS levels [55]. Similarly, treatment with 164.10  $\mu\text{M}$  OXY in MCF-7 and 287.08  $\mu\text{M}$  in MDA-MB-231 cells reduced ROS levels by 0.50 and 1.71-fold (**Figure 6A-B**). However, a difference in ROS production was observed in MCF-7 and MDA-MB-231 cells after treatment with MEL and OXY + MEL. We found that 155.70  $\mu\text{M}$  MEL and 10.25  $\mu\text{M}$  OXY + 29.25  $\mu\text{M}$  MEL increased ROS production in 1.51 and 1.78-fold in MCF-7 cell (**Figure 6A**). However, in cell MDA-MB-231 the association of 132.93  $\mu\text{M}$  OXY + 15.01  $\mu\text{M}$  MEL reduced ROS levels by 1.40-fold (**Figure 6B**).

In breast cancer, the tumor suppressor genes are associated with abnormal histone modification like acetylation and methylation of histone along with DNA. Among these changes, loss of cell cycle checkpoints may compromise the fidelity of DNA replication prior to cell division, playing an important role during carcinogenesis [56; 57]. Studies have reported that phytochemicals can regulate gene expression by targeting different

components of the epigenetic machinery. These epigenetic changes can occur through cell cycle arrest, initiating apoptosis and reactivation of tumor suppressing genes [58; 59].

Due to the morphological effects of OXY, DOX, MEL and associations in MCF-7 and MDA-MB-231 cells, we verified whether these compounds would be able to alter the cell cycle. For this, the cells were incubated in the presence or absence of the compounds for 24 hours, labeled with cell cycle solution and analyzed by flow cytometry. The cells treated with DMSO did not alter the cell cycle, in relation of untreated control (**Figure 8A-B**). Our results demonstrate that OXY was not able to alter the MCF-7 cell cycle. However, DOX, MEL and OXY + DOX and OXY + MEL associations were able to significantly alter the G0/G1 phase with increasing 1.76, 1.69, 1.39 and 1.33-fold, respectively (**Figure 8A**).

In the MDA-MB-231 cells, OXY affected the division pattern of the cells by decreasing the cells in G0/G1 phase 1.29-fold and increasing the cells in S phase 2.11-fold. The DOX increased by 9.63-fold the sub-G0/G1 phase and decreased by 31.88-fold the G0/G1 phase. MEL decreased by 1.54-fold the G0/G1 phase and increased by 2.45-fold the S phase. The association between OXY + DOX and OXY + MEL, increased the sub-G0/G1 phase by 9.0- and 7.03-fold, and decreased the G0/G1 phase by 1.91- and 1.64-fold, respectively (**Figure 8B**). Casanova and colleagues [42] demonstrated that MEL at the concentration of 50  $\mu$ M did not alter the sub-G0/G1 and S phase of the cell cycle in MCF-7 cells, however its association with resveratrol was able to significantly increase the cells in the sub-G0/G1 and S phase.

In the early stages of apoptosis, cells morphology changes, with size reduction, with well-compacted organelles in the cytoplasm and chromatin condensation [60]. Our light microscopy data show that after treatment with 287.08  $\mu$ M OXY the cells shrunken

(**Figure 4**), indicative of apoptotic death. To discriminate apoptotic and necrotic cell death, the cells were stained with Annexin V-FITC and PI, and analyzed using flow cytometry. Our results demonstrate that OXY and OXY + MEL increased the percentage of annexin-V positive cells, which characterizes apoptosis death, by 3 and 5-fold in relation to untreated control, respectively (**Figure 9A**). Data in literature has been demonstrating the apoptotic effect of OXY in cancer cells. OXY induce autophagy along with apoptosis in neuroblastoma cells, and down-regulated the anti-apoptotic Bcl-2 and up-regulated the pro-apoptotic Bax protein [61]. Sunilkumar *et al.* [62] demonstrated that 40  $\mu$ M OXY for 48 h was able to externalize phosphatidylserine in MDA-MB-231breast cancer cells indicating apoptosis. Our results demonstrated that DOX increased the percentage of PI positive cells and annexin-V/PI positive cells by 25.8- and 353.3-fold, respectively, in relation to untreated control (**Figure 9B**) and the association of OXY + DOX increased the percentage of PI positive cells by 54.1- and 10.8-fold, respectively, which characterizes late apoptotic cells and necrotic cells (**Figure 9B-C**).

To further confirm the mode of cell death, the MDA-MB-231 cells were assessed by DAPI staining. With the process of apoptosis, the ability of permeability for DAPI dye is improved and the apoptotic cells will produce high blue fluorescence. Our results demonstrated that after incubation with 287.08  $\mu$ M OXY, 211.09  $\mu$ M OXY + 2.03  $\mu$ M DOX and 132.93  $\mu$ M OXY + 15.01  $\mu$ M MEL for 24 hours, the apoptotic cells increased 2.48-, 2.24- and 1.74-fold, confirming the results obtained in the cell death experiment by Annexin-V/PI (**Figure 10**). To determine the effect of OXY, DOX, MEL and associations on MDA-MB-231 cells, caspase-3 involved in apoptosis was analyzed by immunocytochemistry and qPCR. Our immunocytochemistry results showed that OXY, DOX and OXY + DOX increased 3.47-, 24.59- and 9.33-fold the levels of caspase-3 compared with untreated control (**Figure 11A**). In addition, OXY and OXY + DOX

induced significant upregulation of caspase-3 demonstrated by RT-PCR results (**Figure 11B**). These data suggest that OXY and its association with DOX induces apoptosis in MDA-MB-231 cells through a caspase-3 mediated pathway. Furthermore, caspase-3 is the principal caspase that catalyse the cleavage of many key cellular proteins within the apoptosis machinery [63].

In conclusion, the results of our study demonstrated the *in vitro* anti-breast cancer effect of OXY and its associations with chemotherapeutic agents DOX and MEL, however not in non-tumor cells, which lead us to suggest OXY as promising candidate for clinical trial.

### **Conflict Of Interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### **Funding Statement**

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, 001) and Fundação do Câncer. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Acknowledgments

We thank Raquel Maia (Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, Brazil) for their donation of Doxorubicin.

## REFERENCES

- [1] Desantis CE, Bray F, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Anderson BO, Jemal A. International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10:1495-506, 2015.
- [2] Palumbo MO, Kavan P, Miller WH Jr, Panasci L, Assouline S, Johnson N, Cohen V, Patenaude F, Pollak M, Jagoe RT, Batist G. Systemic cancer therapy: achievements and challenges that lie ahead. *Front Pharmacol*, 7:4-57, 2013.
- [3] Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*, 446(7137):749-57, 2007.
- [4] Zhan Y, Chen Y, Liu R, Zhang H, Zhang Y. Potentiation of paclitaxel activity by curcumin in human breast cancer cell by modulating apoptosis and inhibiting EGFR signaling. *Arch Pharm Res*, 37(8):1086-95, 2014.
- [5] Jin X, Wei Y, Liu Y, Lu X, Ding F, Wang J, Yang S. Resveratrol promotes sensitization to Doxorubicin by inhibiting epithelial-mesenchymal transition and modulating SIRT1/β-catenin signaling pathway in breast cancer. *Cancer Med*, 8(3):1246-1257, 2019.

- [6] Li S, Yuan S, Zhao Q, Wang B, Wang X, Li K. Quercetin enhances chemotherapeutic effect of doxorubicin against human breast cancer cells while reducing toxic side effects of it. *Biomed Pharmacother*, 100:441-447, 2018.
- [7] Croft RD. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annuary of New York Academy of Science*, 845:435-442, 1998.
- [8] Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5):727-747, 2004.
- [9] Du, QH, Peng, C, Zhang H. Polydatin: a review of pharmacology and pharmacokinetics. *Review. Pharmaceutical Biology*, (11):1347-54, 2013.
- [10] Wang HL, Gao JP, Han YL, Xu X, Wu R, Gao Y, Cui XH. Comparative studies of polydatin and resveratrol on mutual transformation and antioxidative effect *in vivo*. *Phytomedicine*. 22(5):553-9. 2015.
- [11] Abbas, GM, Abdel Bar FM, Baraka HN, Gohar AA, Lahloub MF. A new antioxidant stilbene and other constituents from the stem bark of *Morus nigra* L. *Natural Products Research*, 28:952-9, 2014.
- [12] Choi SW, Jang YJ, Lee YJ, Leem HH, Kim EO. Analysis of functional constituents in Mulberry (*Morus alba* L.) Twigs by different cultivars, producing areas and heat processings. *Preventive Nutrition and Food Science*, 18:256-62, 2013.
- [13] Lu HP, Jia YN, Peng YL, Yu Y, Sun, SL, Yue MT, Pan MH, Zeng LS, Xu L. Oxyresveratrol, a stilbene compound from *Morus alba* L. Twig extract active against *Trichophyton rubrum*. *Phytotherapy Research*, 31(12):1842-1848, 2017.

- [14] Zheng ZP, Tan HY, Wang M. Tyrosinase inhibition constituents from the roots of *Morus australis*. *Fitoterapia*, 83:1008-13, 2012.
- [15] Syah YM, Achmad SA, Ghisalberti, EL, Hakim EH, Iman MZ, Makmur L, Mujahiddin D, Andalasin A. A new stilbene dimer from *Morus macroura*. *Fitoterapia*, 71:630-5, 2000.
- [16] Chen L, Zhou Q, Li B, Liu SJ, Dong JX. A new flavonoid from *Cudrania cochinchinensis*. *Natural Products Research*, 29:1217-21, 2015.
- [17] Wu Y, Hu X, Yang GZ, Mei ZN, Chen Y. Two new flavanols from *Glycosmis pentaphylla*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 14:738-42, 2012.
- [18] Jin YJ, Lin CC, Lu TM, Li JH, Chen IS, Kuo YH, Ko HH. Chemical constituents derived from *Artocarpus xanthocarpus* as inhibitors of melanin biosynthesis. *Phytochemistry*, 117:424-35, 2015.
- [19] Ti H, Wu P, Lin L, Wei X. Stilbenes and flavonoids from *Artocarpus nitidus* subsp. *lingnanensis*. *Fitoterapia*, 82:662-5, 2011.
- [20] Fang SC, Hsu CL, Yen GC. Anti-inflammatory effects of phenolic compounds isolated from the fruits of *Artocarpus heterophyllus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:4463-8, 2008.
- [21] Likhitwitayawuid K, Chaiwiriya S, Sritularak B, Lipipun V. Antiherpetic flavones from the heartwood of *Artocarpus gomezianus*. *Chemistry & Biodiversity*, 3:1138-43, 2006.
- [22] Huang KS, Wang YH, Li RL, Lin M. Five new stilbene dimers from the lianas of *Gnetum hainanense*. *Journal of Natural Products*, 63:86-9, 2000.

- [23] Shao B, Guo HZ, Cui YJ, Liu AH, Yu HL, Guo H, Xu M, Guo DA. Simultaneous determination of six major stilbenes and flavonoids in *Smilax china* by high performance liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 44:737-42, 2007.
- [24] Liu Y, Ren W, Bai Y, Wan L, Sun X, Liu Y, Xiong W, Zhang YY, Zhou L. Oxyresveratrol prevents murine H22 hepatocellular carcinoma growth and lymph node metastasis via inhibiting tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. J Nat Med. 72(2):481-492, 2018.
- [25] Rahman MA, Bishayee K, Sadra A, Huh SO. Oxyresveratrol activates parallel apoptotic and autophagic cell death pathways in neuroblastoma cells. Biochim Biophys Acta, 1861(2):23-36, 2017.
- [26] Aftab N, Likhithwitayawuid K, Vieira A. Comparative antioxidant activities and synergism of resveratrol and oxyresveratrol. Natural Product Research, 24:1726-33, 2010.
- [27] Wei J, Chen JR, Pais EMA, Wang TY, Miao L, Li L, Li LY, Qiu F, Hu LM, Gao XM, Fan GW. Oxyresveratrol is a phytoestrogen exerting anti-inflammatory effects through NF-κB and estrogen receptor signaling. Inflammation, 40:1285-1296, 2017.
- [28] Ashraf MI, Shahzad M, Shabbir A. Oxyresveratrol ameliorates allergic air way inflammation via attenuation of IL-4, IL-5, and IL-13 expression levels. Cytokine, 76(2):375-381, 2015.
- [29] Joung DK, Mun SH, Choi SH, Kang OH, Kim SB, Lee YS, Zhou T, Kong R, Choi JG, Shin DW, Kim YC, Lee DS, Kwon DY. Antibacterial activity of oxyresveratrol

against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its mechanism. Experimental and Therapeutic Medicine, 12:1579-1584, 2016.

[30] Passos CL, Ferreira C, Soares DC, Saraiva EM. Leishmanicidal effect of synthetic trans-Resveratrol analogs. PLoS One, 10:e0141778, 2015.

[31] Sasivimolphan P, Lipipun V, Likhitwitayawuid K, Takemoto M, Pramyothin P, Hattori M, Shiraki K. Inhibitory activity of oxyresveratrol on wild-type and drug-resistant varicella-zoster virus replication *in vitro*. Antiviral Research, 84:95-7, 2009.

[32] Tan HY, Tse IM, Li ET, Wang M. Oxyresveratrol supplementation to C57BL/6 mice fed with a high-fat diet ameliorates obesity-associated symptoms. Nutrients, 9:E147, 2017.

[33] Lee JH, Baek SY, Jang EJ, Ku SK, Kim KM, Ki SH, Kim CE, Park KI, Kim SC, Kim YW. Oxyresveratrol ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by regulating hepatic lipogenesis and fatty acid oxidation through liver kinase B1 and AMP-activated protein kinase. Chem Biol Interact, 289:68-74, 2018.

[34] Carmichael J, Degraff W, Gazdar A, Minna J, Mitchell J. Evaluation of a tetrazolinium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res, 1987, 47:936–942.

[35] Tallarida, R. J. Drug synergism and dose-effect data analysis. Chapman & Hall/CRC: New York, 2000.

[36] Guimarães DAB, De Castro DDSB, de Oliveira FL, Nogueira EM, da Silva MAM, Teodoro AJ. Pitaya Extracts Induce Growth Inhibition and Proapoptotic Effects on Human Cell Lines of Breast Cancer via Downregulation of Estrogen Receptor Gene Expression. Oxid Med Cell Longev, 7865073, 2017.

- [37] Ferreira C, Soares DC, Barreto-Junior CB, Nascimento MT, Freire-De-Lima L, Delorenzi JC, Lima ME, Atella GC, Folly E, Carvalho TM, Saraiva EM, Pinto-Da-Silva LH. Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. *Phytochemistry*, 72(17):2155-64, 2011.
- [38] Gomes L, Sorgine M, Passos CLA, Ferreira C, de Andrade IR, Silva JL, Atella GC, Mermelstein CS, Fialho E. Increase in fatty acids and flotillins upon resveratrol treatment of human breast cancer cells. *Sci Rep*, 27;9(1):13960, 2019.
- [39] Marchal J, Pifferi F, Aujard F. Resveratrol in mammals: effects on aging biomarkers, age-related diseases, and life span. *Ann N Y Acad Sci*. 1290:67–73. 2013.
- [40] Poulsen MM, Jørgensen JO, Jessen N, Richelsen B, Pedersen SB. Resveratrol in metabolic health: an overview of the current evidence and perspectives. *Ann N Y Acad Sci*. 1290:74–82. 2013.
- [41] Ko JH, Sethi G, Um JY, Shanmugam MK, Arfuso F, Kumar AP, Bishayee A, Anh KS. The role of resveratrol in cancer therapy. *International Journal Molecular Science*, (12):2589. 2017.
- [42] Casanova F, Quarti J, da Costa DC, Ramos CA, da Silva JL, Fialho E. Resveratrol chemosensitizes breast cancer cells to melphalan by cell cycle arrest. *J Cell Biochem*. 113(8):2586-96, 2012.
- [43] Li X, Chao L, Wei X, Hu C, Xiaoli Q, Xianzhi H. Advances in the study of oxyresveratrol. *International Journal of Pharmacology*, 10: 44-54, 2014.
- [44] Zhang T, Zhu X, Wu H, Jiang K, Zhao G, Shaukat A, Deng G, Qiu C. Targeting the

ROS/PI3K/AKT/HIF-1 $\alpha$ /HK2 axis of breast cancer cells: Combined administration of Polydatin and 2-Deoxy-d-glucose. *J Cell Mol Med.* 23(5):3711-3723, 2019.

[45] Wei J, Chen JR, Pais EMA, Wang TY, Miao L, Li L, Li LY, Qiu F, Hu LM, Gao XM, Fan GW. Oxyresveratrol is a phytoestrogen exerting anti-inflammatory effects through NF- $\kappa$ B and estrogen receptor signaling. *Inflammation*, 40(4):1285-1296, 2017.

[46] Wu LS, Wang XJ, Wang H, Yang HW, Jia AQ, Ding Q. Cytotoxic polyphenols against breast tumor cell in *Smilax china* L. *J Ethnopharmacol*, 130(3):460-4, 2010.

[47] Hassan MS, Ansari J, Spooner D, Hussain SA. Chemotherapy for breast cancer (Review). *Oncol Rep.* 24(5):1121-31, 2010.

[48] Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev.* 58: 621-681, 2006.

[49] Rai G, Mishra S, Suman S, Shukla Y. Resveratrol improves the anticancer effects of doxorubicin *in vitro* and *in vivo* models: A mechanistic insight. *Phytomedicine*, 23(3):233-42, 2016.

[50] S. B. Klein, G. J. Fisher, T. C. Jensen, J. Mendelsohn, J. J. Voorhees, and J. T. Elder, "Regulation of TGF- $\alpha$  Expression in human keratinocytes: PKC-dependent and - independent pathways," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 151, no. 2, pp. 326–336, 1992.

[51] Sprouse AA, Herbert BS. Resveratrol augments paclitaxel treatment in MDA-MB-231 and paclitaxel-resistant MDA-MB-231 breast cancer cells. *Anticancer Res.* Oct;34(10):5363-74. 2014.

- [52] Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci*, 96:2181-96, 2007.
- [53] Armstrong J, Dass CR. Doxorubicin action on mitochondria: relevance to osteosarcoma therapy? *Curr Drug Targets*. 19(5):432-438, 2018.
- [54] Choi HY, Lee JH, Jegal KH, Cho IJ, Kim YW, Kim SC. Oxyresveratrol abrogates oxidative stress by activating ERK-Nrf2 pathway in the liver. *Chem Biol Interact*, 245:110-21, 2016.
- [55] Lorenz P, Roychowdhury S, Engelmann M, Wolf G, Horn TF. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide*, 9(2):64-76, 2003.
- [56] Pasculli B, Barbano R and Parrella P: Epigenetics of breast cancer: Biology and clinical implication in the era of precision medicine. *Semin Cancer Biol* 51: 22-35, 2018.
- [57] Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*. 6(8):597-610. 2005.
- [58] Arora I, Sharma M, Tollefson TO. Combinatorial Epigenetics Impact of Polyphenols and Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy. *Int J Mol Sci*. 20(18). pii: E4567. 2019.
- [59] Romagnolo DF, Daniels KD, Grunwald JT, Ramos SA, Propper CR, Selmin OI. Epigenetics of breast cancer: Modifying role of environmental and bioactive food compounds. *Mol Nutr Food Res*. 60(6):1310-29. 2016.
- [60] G. Häcker, The morphology of apoptosis, *Cell Tissue Res*. 301:5-17, 2000.

[61] Rahman MA, Bishayee K, Sadra A, Huh SO. Oxyresveratrol activates parallel apoptotic and autophagic cell death pathways in neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 1861(2):23-36. 2017.

[62] Sunilkumar D, Drishya G, Chandrasekharan A, Shaji SK, Bose C, Jossart J, Perry JJP, Mishra N, Kumar GB, Nair BG. Oxyresveratrol drives caspase-independent apoptosis-like cell death in MDA-MB-231 breast cancer cells through the induction of ROS. *Biochem Pharmacol.* 20:113724. 2019.

[63] Khalilzadeh B, Shadjou N, Kanberoglu GS, Afsharan H, de la Guardia M, Charoudeh HN, Ostadrahimi A, Rashidi MR. Advances in nanomaterial based optical biosensing and bioimaging of apoptosis via caspase-3 activity: a review. *Mikrochim Acta.* 185(9):434. 2018.

**TABLE 1. Cytotoxicity results for oxyresveratrol, doxorubicin and melphalan in non-tumor breast cell MCF-10A and breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells.**

DRUGS	IC <sub>50</sub> MCF-10A (μM)	IC <sub>50</sub> MCF-7 (μM)	SI*	IC <sub>50</sub> MDA-MB-231 (μM)	SI#
OXYRESVERATROL	>300	164.10 ± 19.17	1.83	287.08 ± 11.09	1.05
DOXORUBICIN	26.54 ± 4.81	22.60 ± 1.61	1.17	32.55 ± 17.80	0.82
MELPHALAN	195.97 ± 11.07	155.70 ± 6.21	1.26	240.26 ± 25.46	0.82

\* The selectivity index (SI) was calculated as the ratio of IC<sub>50</sub> on MCF-10A cells to IC<sub>50</sub> on MCF-7 cells.

#The selectivity index (SI) was calculated as the ratio of IC<sub>50</sub> on MCF-10A cells to IC<sub>50</sub> on MDA-MB-231 cells.

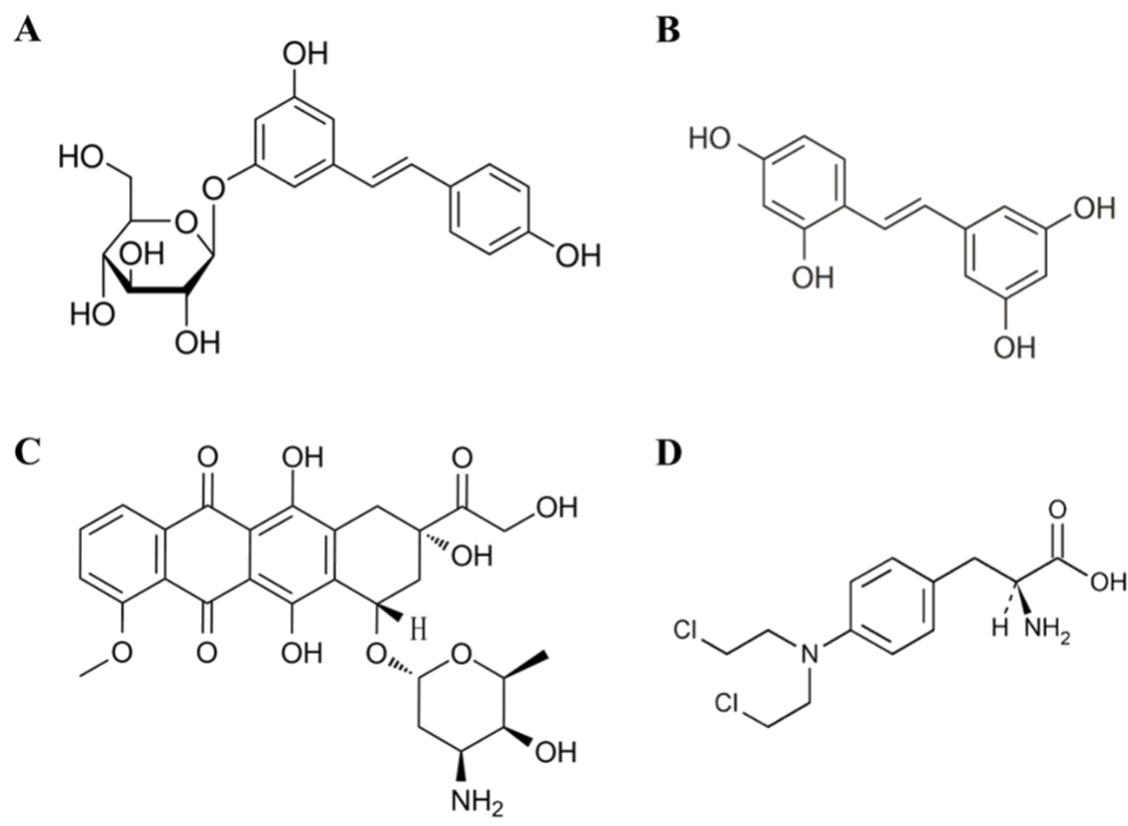
IC<sub>50</sub> – Inhibitory concentration to 50% of the cells.

**TABLE 2. Combination index of oxyresveratrol with doxorubicin (OXY + DOX) and oxyresveratrol with melphalan (OXY + MEL) in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells.**

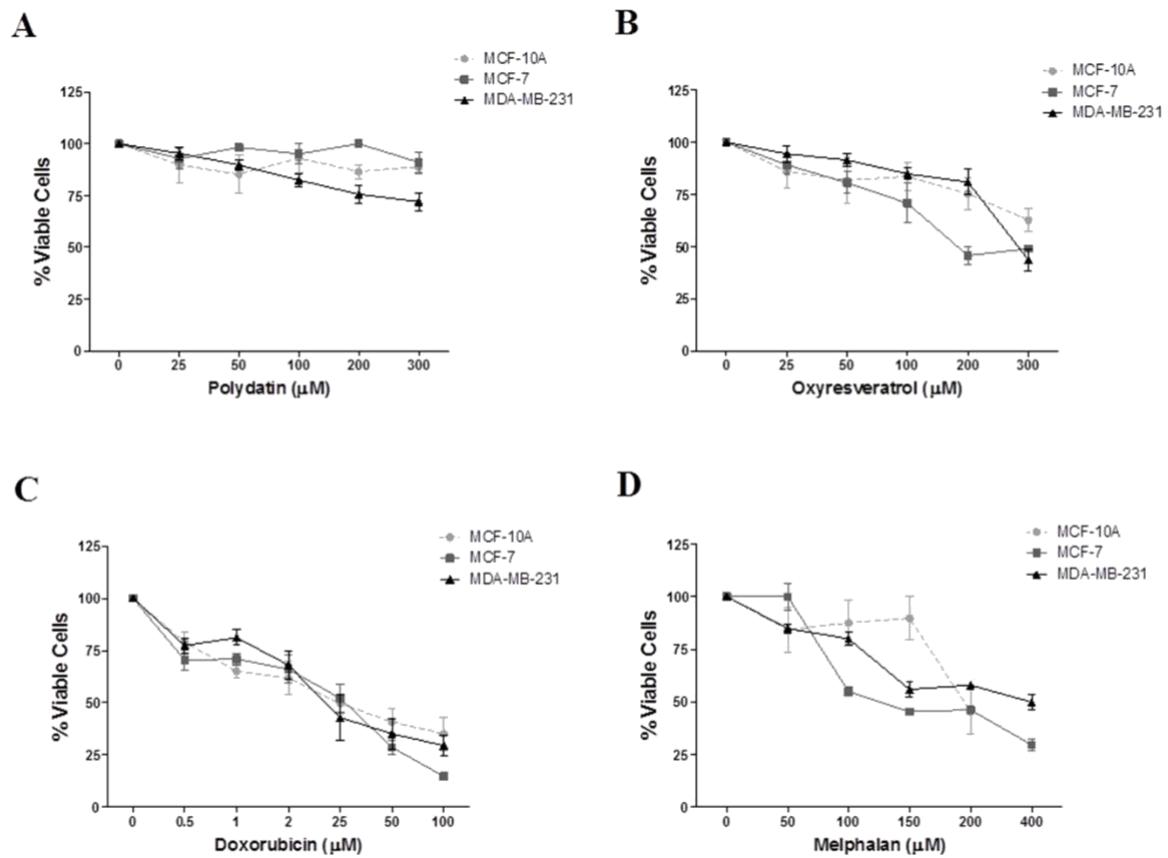
CELLS LINE	COMBINATIONS DOSE ( $\mu$ M)	*FIC	EFFECTS
MCF-7	OXY 93.61 + DOX 5.65	0.82	Moderate Synergism
	OXY 42.95 + DOX 11.30	0.76	Moderate Synergism
	OXY 10.25 + MEL 29.25	0.25	Strong Synergism
	OXY 20.51 + MEL 31.34	0.32	Synergism
	OXY 41.02 + MEL 33.40	0.46	Synergism
MDA-MB-231	OXY 82.05 + MEL 32.30	0.63	Synergism
	OXY 211.09 + DOX 2.03	0.80	Moderate Synergism
	OXY 208.09 + DOX 8.14	0.97	-
	OXY 202.30 + DOX 16.27	1.20	-
	OXY 132.93 + MEL 15.01	0.52	Synergism
	OXY 116.30 + MEL 30.03	0.53	Synergism
	OXY 87.69 + MEL 60.06	0.55	Synergism
	OXY 37.69 + MEL 120.13	0.63	Synergism

\* FIC, fractional inhibitory concentration

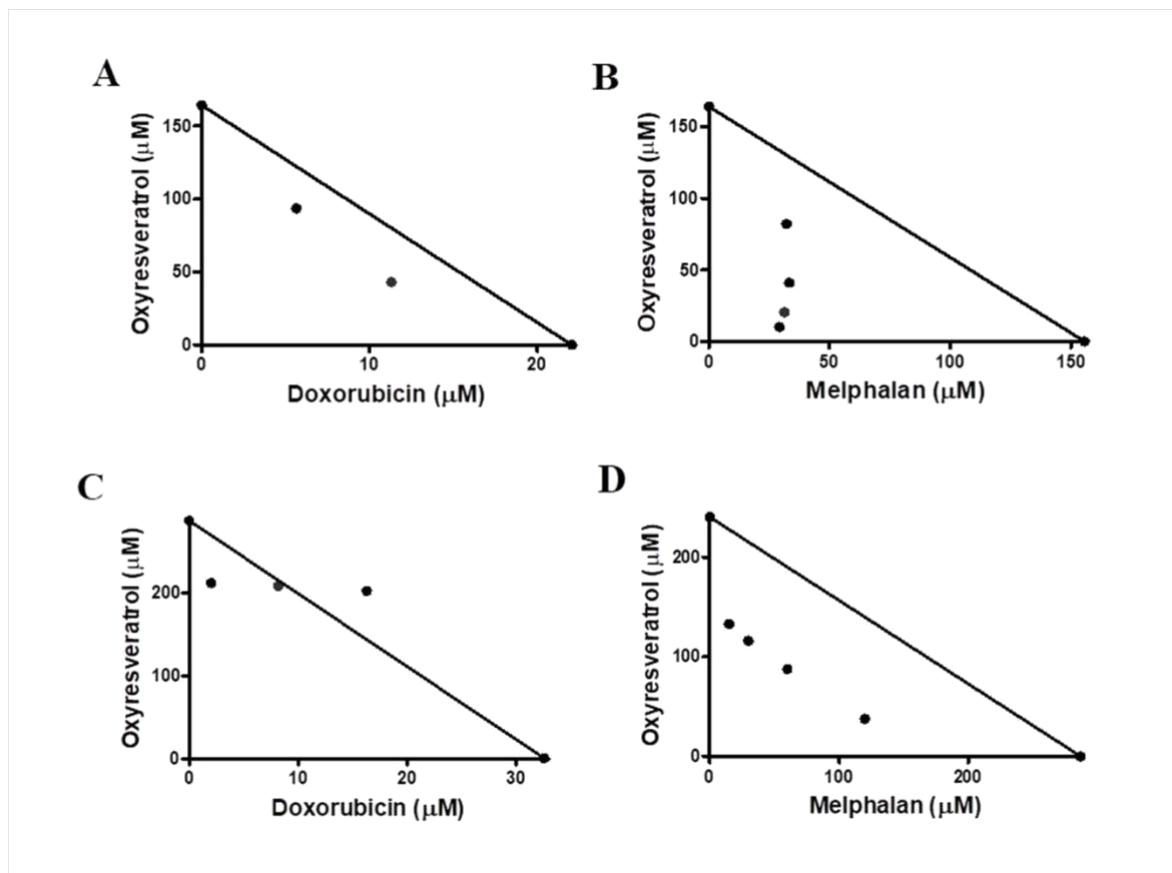
OXY, oxyresveratrol; DOX, doxorubicin; MEL, melphalan.



**Figure 1.** Chemical structure of (A) Polydatin, (B) Oxyresveratrol, (C) Doxorubicin, (D) Melphalan.

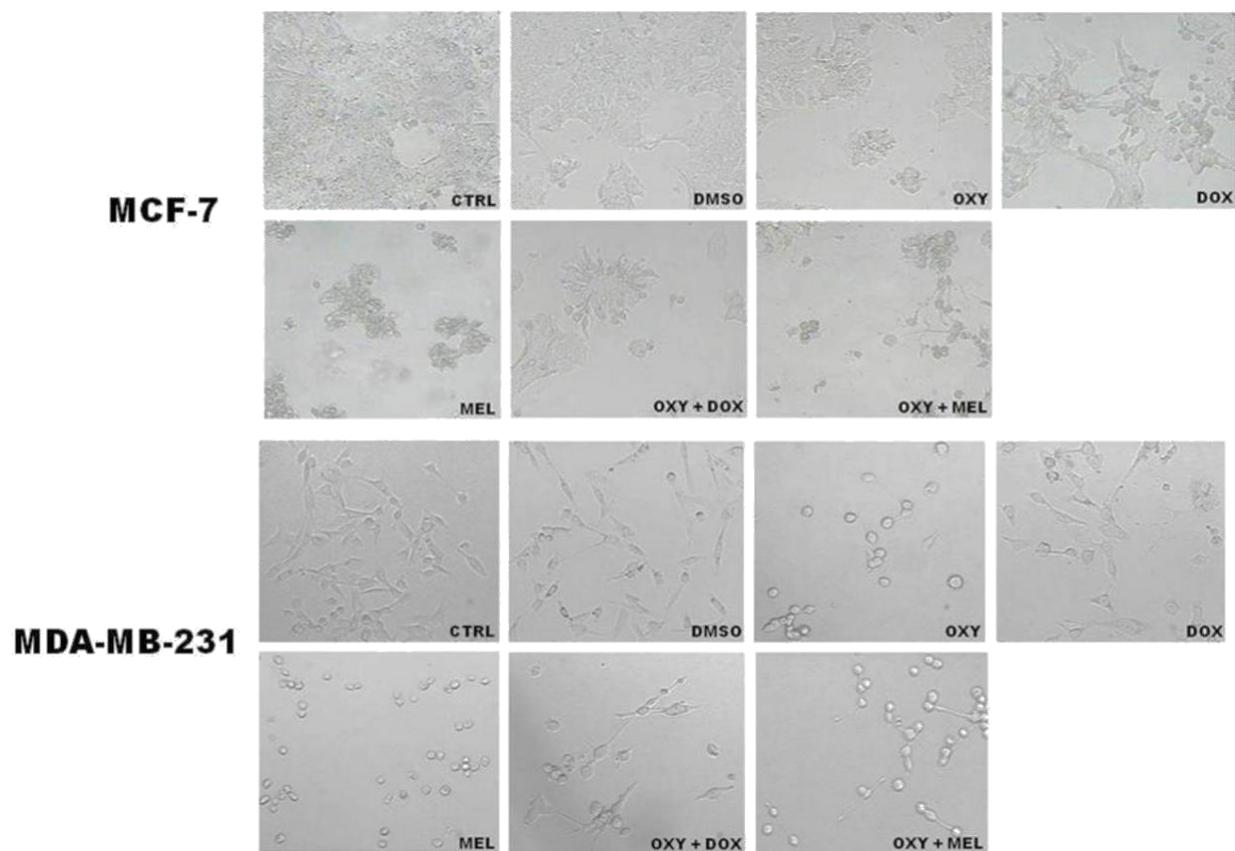


**Figure 2. Effects of Polydatin, Oxyresveratrol, Doxorubicin and Melphalan against non-tumor breast cell line MCF-10A and breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells.** The cells were treated with different concentrations of Polydatin (A), Oxyresveratrol (B), Doxorubicin (C) and Melphalan (D) for 24 h and then cells viability was assessed by MTT assay. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* P <0.05, \*\* P <0.001, \*\*\* P. <0.0001.

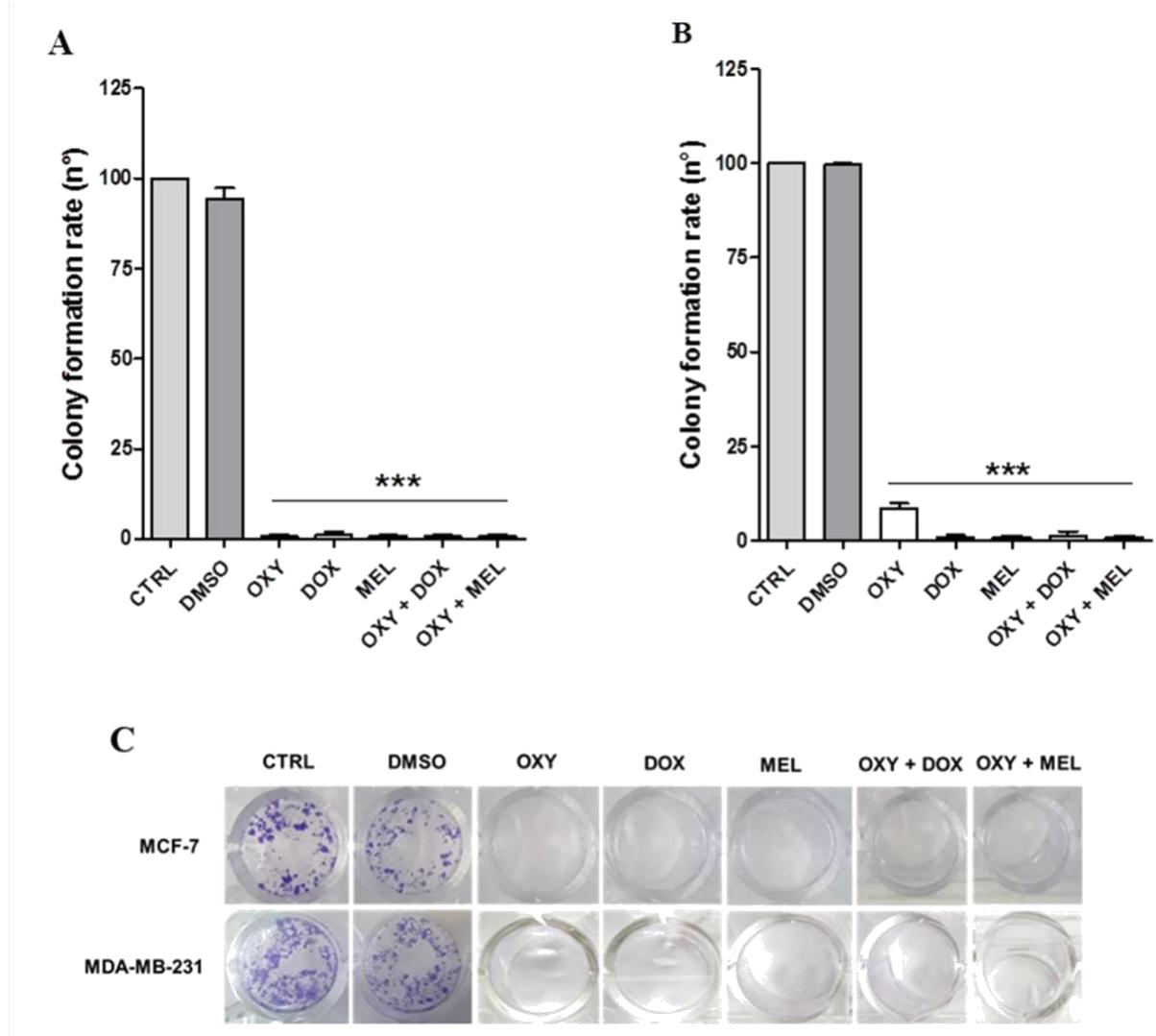


**Figure 3. Isobolographic analysis of the oxyresveratrol (OXY) + doxorubicin (DOX) and OXY + melphalan (MEL) association with MCF-7 and MDA-MB-231 cells.**

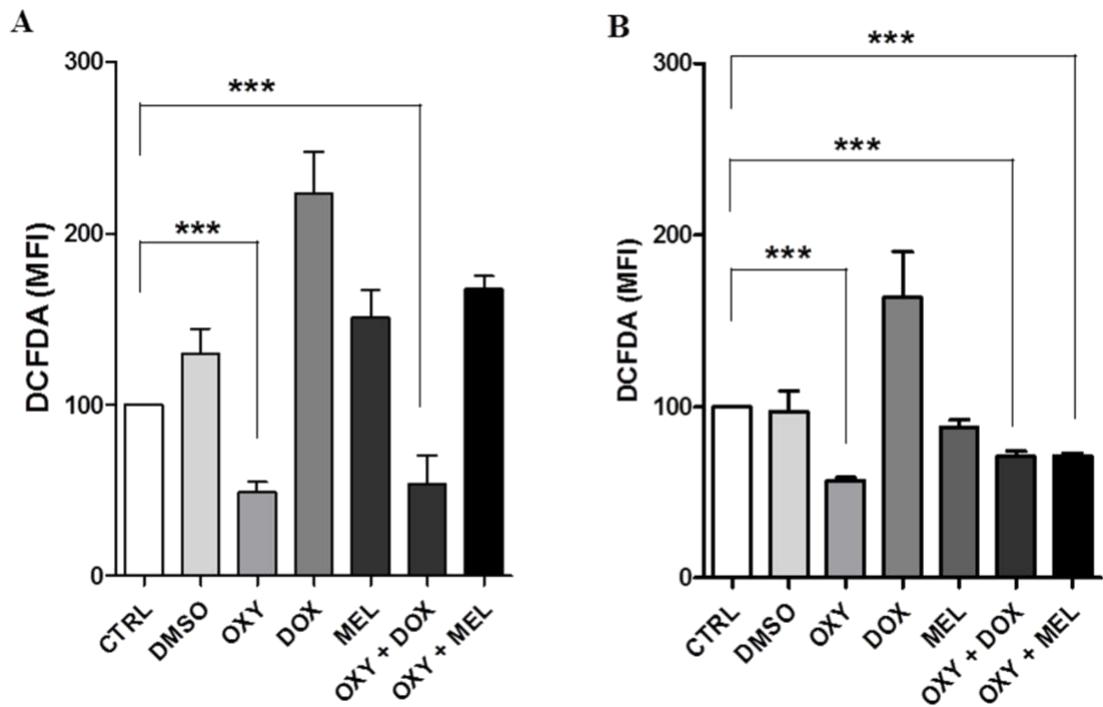
MCF-7 cell were grown in presence or absence of the indicated concentration of OXY + DOX (**A**) and OXY + MEL (**B**), by the same way, MDA-MB-231 cell were grown in presence or absence of the indicated concentration of OXY + DOX (**C**) and OXY + MEL (**D**). Cytotoxicity for cells was determined by MTT assay after 24 h of treatment. The straight line is the line of additivity and represents all of the additive theoretical combinations that should inhibit survival by 50%. The points below the additivity line represent synergistic combinations. The results represent the means  $\pm$  SEM from three experiments performed in triplicate. FIC, fractional inhibitory concentration.



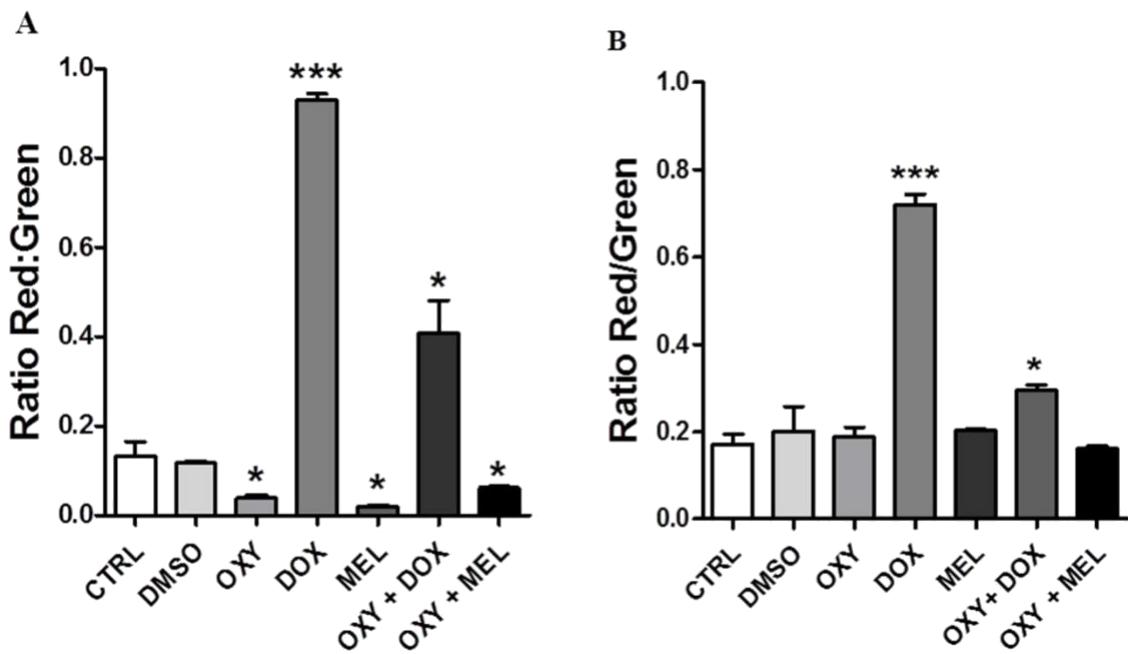
**Figure 4. Morphological analysis of breast cancer cells.** The MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with oxyresveratrol (OXY), doxorubicin (DOX), melphalan (MEL), oxyresveratrol + doxorubicin (OXY + DOX) and oxyresveratrol + melphalan (OXY + MEL) combinations for 24h.



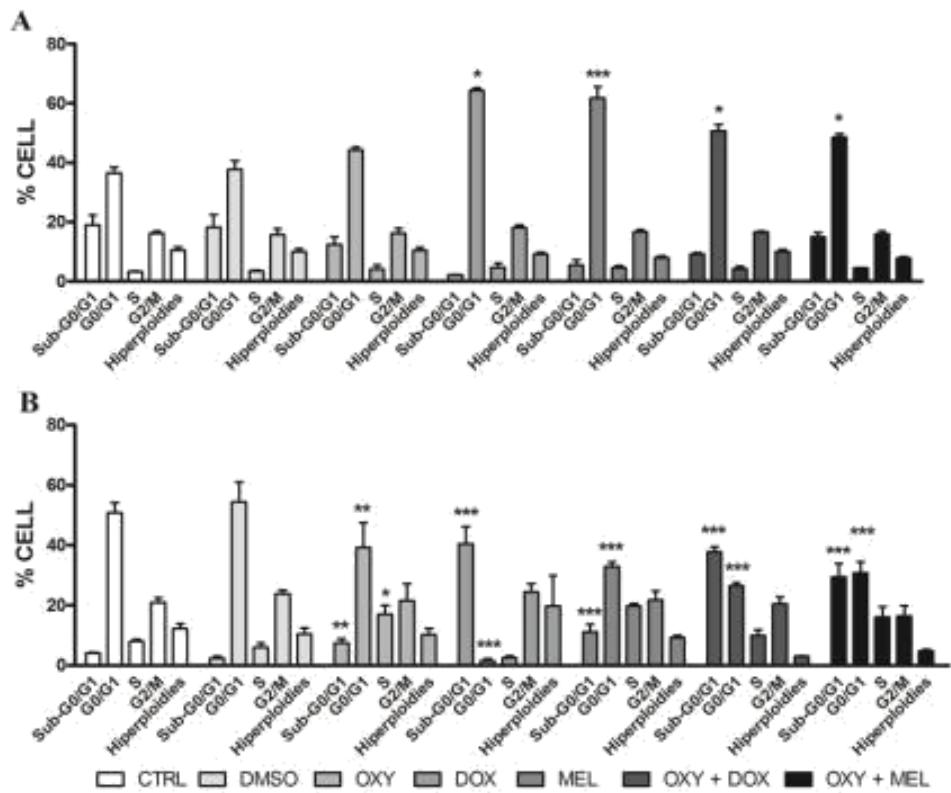
**Figure 5. Formation of MCF-7 and MDA-MB-231 colonies after treatment by oxyresveratrol, doxorubicin, melphalan, oxyresveratrol with doxorubicin and oxyresveratrol with melphalan.** After treatment with IC<sub>50</sub> concentrations of OXY, DOX, MEL, OXY with DOX and OXY with MEL or 1% DMSO for 24 h, the number of MCF-7 (A) and MDA-MB-231 (B) colonies was determined after 15 days of culture. MCF-7 and MDA-MB-231 (C) cells plated treated with OXY, DOX, MEL, OXY with DOX and OXY with MEL for 24 h, with medium replace every 3 days. Cell colonies were stained with crystal violet. Data are presented as the mean ± SEM of three independent experiments. \*\*\* P <0.0001, in relation of control.



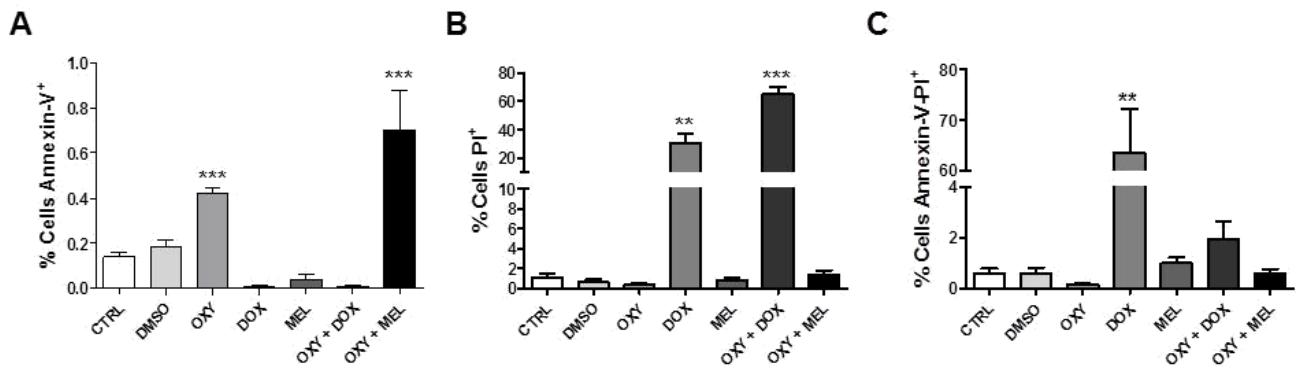
**Figure 6. Effect of oxyresveratrol, doxorubicin, melphalan, oxyresveratrol with doxorubicin and oxyresveratrol with melphalan on production of reactive oxygen species (ROS) in MCF-7 and MDA-MB-231 cells.** Detection of ROS was performed using MCF-7 (A) and MDA-MB-231 (B) cells were adhered to 96-well opaque culture plates and treated with OXY, DOX, MEL and associations or 1% DMSO at their respective IC<sub>50</sub> concentrations for 3 h. The cells were then stained with 50  $\mu$ M 2',7'-Dichlorofluorescin diacetate (DCFDA, Sigma-Aldrich), and ROS was measured immediately using 500/526 nm excitation/emission wavelengths. The data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*\*\* P <0.0001, in relation of control. OXY, oxyresveratrol; DOX, doxorubicin; MEL, melphalan.



**Figure 7. Analysis of the mitochondrial activity of breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231 after treatments by oxyresveratrol, doxorubicin, melphalan, oxyresveratrol plus doxorubicin and oxyresveratrol plus melphalan.** The MCF-7 (A) and MDA-MB-231 (B) cells were cultured in the presence of IC<sub>50</sub> OXY, DOX, MEL and associations, or 1% DMSO for 3 h. The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) was evaluated using JC-1. Results expressed as red/green fluorescence ratios, represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* P <0.05, \*\*\* P <0.0001, in relation of control. OXY, oxyresveratrol; DOX, doxorubicin; MEL, melphalan.

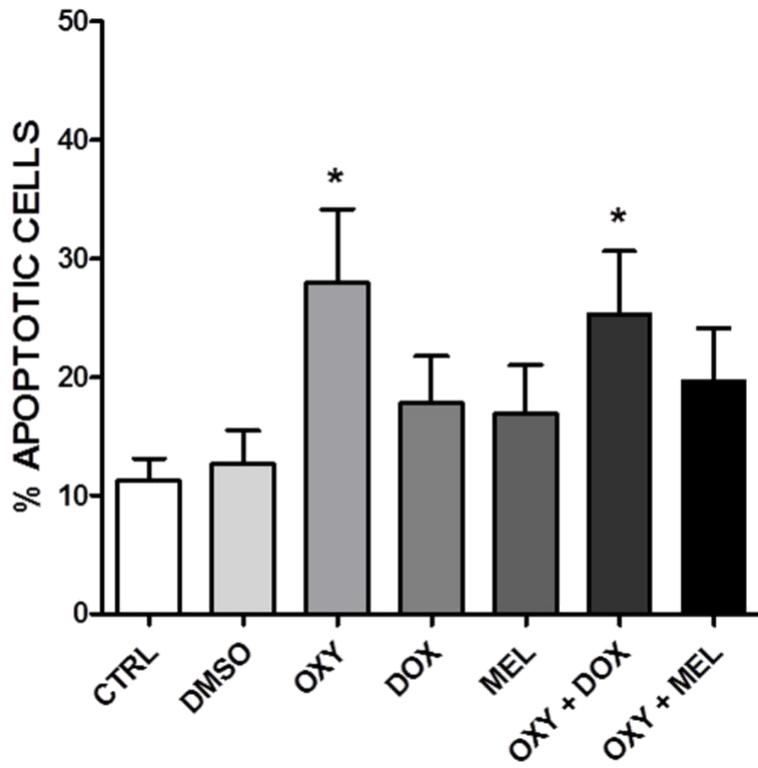


**Figure 8. Evaluation of cell cycle through analysis of DNA content of breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231 after treatments by oxyresveratrol, doxorubicin, melphalan, oxyresveratrol plus doxorubicin and oxyresveratrol plus melphalan.** The MCF-7 (A) and MDA-MB-231 cells (B) were treated or not with 1% DMSO and IC<sub>50</sub> of OXY, DOX, MEL and associations for 24 hours and cell cycle evaluated after PI staining by flow cytometry analysis. The data represent the mean ± SEM of three independent experiments. \* P <0.05, \*\* P <0.001, \*\*\* P <0.0001, in relation of control. OXY, oxyresveratrol; DOX, doxorubicin; MEL, melphalan.

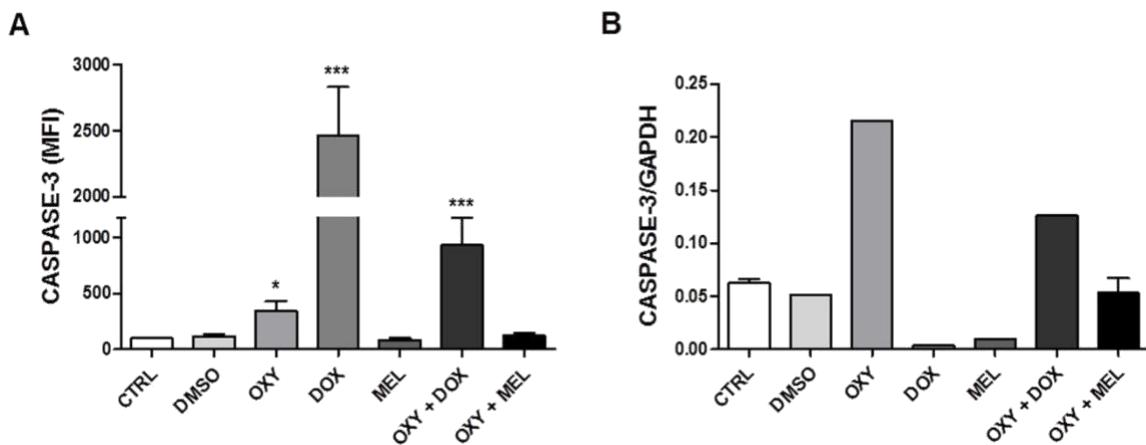


**Figure 9. Effects of oxyresveratrol, doxorubicin, melphalan, oxyresveratrol plus doxorubicin and oxyresveratrol plus melphalan on type of cell death in MDA-MB-231 cells.**

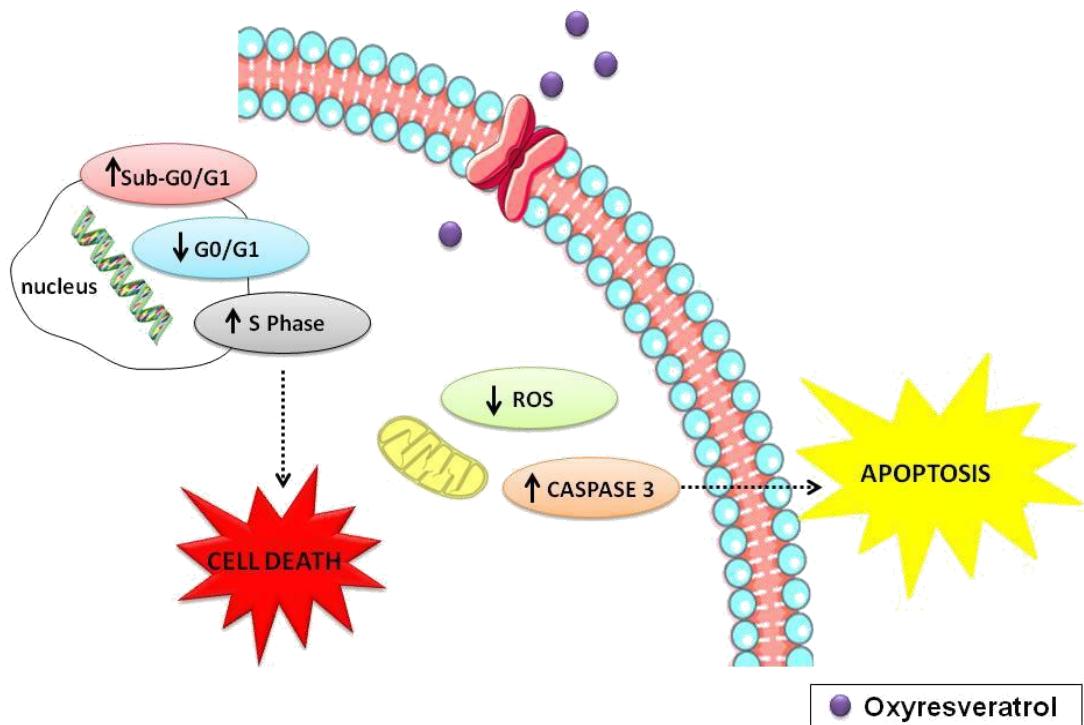
The cells were treated or not with 1% DMSO and IC<sub>50</sub> of OXY, DOX, MEL and associations for 24 hours. They were then stained with Annexin V-FITC and propidium iodide (PI), and the result was evaluated in flow cytometer BD FACScalibur (Becton and Dickson) and analyzed using CellQuest software. Annexin V/PI<sup>+</sup> cells (A), PI<sup>+</sup> cells (B) and Annexin V<sup>+</sup> cells (C) in MDA-MB-231 cell. The data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* P <0.05, \*\* P <0.001, \*\*\* P <0.0001, in relation of control.



**Figure 10. Assessment of apoptotic cells by DAPI staining.** The MDA-MB-231 cells were treated or not with 1% DMSO and IC<sub>50</sub> of OXY, DOX, MEL and associations for 24 hours. They were then fixed, permeabilized and stained with DAPI. The result was evaluated in flow cytometer BD FACScalibur (Becton and Dickson) and analyzed using CellQuest software. The data represent the mean  $\pm$  SEM of two independent experiments. \* P <0.05, in relation of control.



**Figure 11. Relative fluorescence of immunocytochemistry and mRNA expression of caspase-3 in MDA-MB-231 cells.** The cells were treated or not with oxyresveratrol, doxorubicin, melphalan, oxyresveratrol plus doxorubicin and oxyresveratrol plus melphalan for 24 hours. **(A)** The cells were fixed, permeabilized, stained with primary antibody anti-caspase-3, and then stained with fluorescence secondary antibody. The result was evaluated in flow cytometer BD FACScalibur (Becton and Dickson) and analyzed using CellQuest software. The data represent the mean  $\pm$  SEM of two independent experiments. **(B)** The RNA was extracted using the Trizol reagent. Two micrograms of total RNA were used in cDNA synthesis. The qPCR was performed with caspase-3 primers, and the results obtained after normalization as a function of actin expression, showed as mean  $\pm$  SEM of two independent experiments. \* P <0.05, \*\*\* P <0.0001 in relation of control.



**Figure 12.** The effects of Oxyreveratrol in MDA-MB-231 breast cancer cell.

**ANEXO B**  
**Artigo publicado durante o Mestrado**

[www.nature.com/scientificreports/](http://www.nature.com/scientificreports/)

**SCIENTIFIC  
REPORTS**  
nature research

**OPEN**

## Increase in fatty acids and flotillins upon resveratrol treatment of human breast cancer cells

Received: 28 June 2018

Accepted: 6 September 2019

Published online: 27 September 2019

Luciana Gomes<sup>1</sup>, Marcos Sorgine<sup>2</sup>, Carlos Luan Alves Passos<sup>1</sup>, Christian Ferreira<sup>1</sup>, Ivone Rosa de Andrade<sup>3</sup>, Jerson L. Silva<sup>2</sup>, Georgia C. Atella<sup>2</sup>, Claudia S. Mermelstein<sup>2</sup> & Eliane Fialho<sup>1</sup>

Flotillin-1 and flotillin-2 are highly conserved proteins that localize into cholesterol-rich microdomains in cellular membranes. Flotillins are closely related to the occurrence and development of various types of human cancers. Flotillin-1 is highly expressed in breast cancer, and the high expression level of flotillin-1 is significantly correlated with poorer patient survival. Here we studied the relationship between the formation of lipid rafts and the expression of flotillins and lipids in human breast cancer cells. We used the polyphenol compound resveratrol to alter the structure and function of the plasma membrane. Our data revealed an increase in fatty acids in MCF-7 and MDA-MB-231 cells upon resveratrol treatment. Interestingly, we also found an increase in the expression of both flotillin-1 and flotillin-2 in breast tumor cells after treatment. Resveratrol also induced changes in the pattern of flotillin distribution among detergent-resistant lipid rafts fractions in both cell lines and induced the nuclear translocation of flotillin-2. Since resveratrol has been pointed out as a putative cancer therapy agent, our results could have an impact on the understanding of the effects of resveratrol in tumor cells.

Lipid rafts are specialized membrane structures that are involved in myriad of cellular functions, such as endocytosis, cell signaling and the control of cell survival and death. They are enriched in cholesterol, sphingolipids and specific proteins, such as flotillins. Several studies found that flotillins are closely related to the occurrence and development of tumors<sup>1–3</sup>. Flotillin-1 is highly expressed in breast cancer specimens, and the high expression level of flotillin-1 is significantly correlated with later clinical staging and poorer patient survival<sup>1</sup>. Knockdown of either flotillin-1 or -2 inhibits the proliferation and invasiveness of MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells<sup>1,4,5</sup>.

Besides flotillins, alterations in lipids from membrane microdomains, are found in cancer cells, and they correlate with changes in the control of cell adhesion, cell proliferation, cell death, and cell signaling<sup>6</sup>. Thus, studies with substances that alter lipid rafts in cancer cells are relevant. It has been shown that resveratrol induces phase separation and formation of liquid-ordered domains in bilayer structures<sup>7</sup>. Resveratrol is a polyphenol compound present in grape skin and seeds, and it has been pointed out as a possible contributor to cancer therapy, antioxidant activity, cardiovascular protection, and neurodegenerative diseases treatment<sup>8</sup>. Noteworthy, the mechanism by which resveratrol exerts such pleiotropic effects remains unclear and controversial.

Resveratrol has a high affinity for the lipid part of membranes; the hydroxyl groups of resveratrol interact with the polar head groups of phospholipids<sup>9</sup>. Recently, it was found that resveratrol increases the surface area per lipid, decreases membrane thickness, and protects lipid membranes from hydrolysis by phospholipases<sup>10</sup>. Colin and colleagues showed a different interaction of resveratrol and the plasma membrane in cancer cells, where resveratrol could enter the cell by endocytosis via lipid rafts activating downstream signaling pathways<sup>11</sup>. They also showed that resveratrol promotes the redistribution of specific signaling proteins into lipid rafts, which could be associated with resveratrol anticancer effects. In face of the recent findings related to the influence of resveratrol in the organization of the plasma membrane, and specifically the lipid rafts, we decided to study the effects of resveratrol in the expression of flotillins and lipids in human breast cancer cells.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Rio de Janeiro, RJ, 21941-590, Brazil. <sup>2</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Rio de Janeiro, RJ, 21941-590, Brazil. <sup>3</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Rio de Janeiro, RJ, 21941-590, Brazil. Claudia S. Mermelstein and Eliane Fialho contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to E.F. (email: fialho@nutricao.ufrj.br)