

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTI-TUMORAL DA GENISTEÍNA EM
CÂNCER DE MAMA: um estudo *in vitro***

Rafael da Fonseca Prietsch

Pelotas, 2013

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTI-TUMORAL DA GENISTEÍNA EM
CÂNCER DE MAMA: um estudo *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Giovana Duzzo Gamaro

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Elizandra Braganhol

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo - CRB-10/744)

P948i Prietsch, Rafael da Fonseca.

Investigação do efeito anti-tumoral da genisteína em câncer de mama: um estudo *in vitro* / Rafael da Fonseca Prietsch; orientadora: Prof^a. Dr^a. Giovana Duzzo Gamaro; co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Elizandra Braganhol. Pelotas, 2013. -68f. : il. –

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

1.Fitoestrógenos 2.Genisteína 3.MCF-7 4.CCD-1059sK
5.Autofagia

I. Gamaro, Giovana Duzzo (orientadora)

II. Título.

CDD 616.994

Banca Examinadora:


.....
Prof^a. Dr^a. Giovana Duzzo Gamaro (Orientadora)


.....
Prof^a. Dr^a. Rejane Giacomelli Tavares


.....
Prof^a. Dr^a. Izabel Cristina Custódio de Souza

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo o amor e dedicação para comigo, por terem sido a peça fundamental para que eu tenha me tornado a pessoa que hoje sou.

À minha família, pelo carinho e apoio dispensados em todos os momentos que precisei.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Giovana Duzzo Gamaro, orientadora desta dissertação. Gostaria de ratificar a sua competência, sugestões e capacidade de compreensão que fizeram com que concluíssemos este trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Elizandra Braganhol, que sempre esteve presente, por sua ajuda e interesse, enorme capacidade científica e sábias ideias.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Prof. Dr. Wilson Cunico e o Prof. Dr. Cláudio Martin Pereira de Pereira, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal e pela confiança a mim depositada.

A minha querida e amada MÃE. Muitas vezes deixava de satisfazer suas vontades para satisfazer as minhas e as dos meus irmãos. Muito obrigado, mãe, por tudo que fez, e ainda fará amo muito você!

Aos meus irmãos Leandro e Adriano pelo carinho e atenção que sempre tiveram comigo, pela força e incentivo.

À minha namorada Caroline Barcelos da Cruz, ofereço um agradecimento mais do que especial, por ter vivenciado comigo passo a passo todos os detalhes deste trabalho, ter me ajudado, por ter me dado todo o apoio que necessitava nos momentos difíceis, todo carinho, respeito e por tornar minha vida cada dia mais feliz.

A todos os meus amigos e amigas que sempre estiveram presentes me aconselhando e incentivando com carinho e dedicação.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, especialmente ao Leonardo Monte e ao Felipe Abreu da Silva.

A todos os professores pela paciência, dedicação e ensinamentos disponibilizados nas aulas, cada um de forma especial contribuiu para a conclusão desse trabalho e consequentemente para minha formação profissional.

Agradeço ao laboratório de Análises Clínicas Ary Costa pelas análises realizadas.

RESUMO

PRIETSCH, Rafael da Fonseca. **Investigação do efeito anti-tumoral da genisteína em câncer de mama: um estudo *in vitro***. 2013. 76f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Dentre as causas mais frequentes de mortes no mundo, podemos citar o câncer. Em países desenvolvidos e em desenvolvimento é um dos problemas mais graves de saúde pública sendo a segunda causa de morte no Brasil. A soja tem vindo a adquirir uma posição de destaque no mercado ocidental ao longo dos últimos anos com o aumento da procura por este produto vegetal. Os fitoestrogênios são importantes constituintes da soja que se ligam a receptores de estrogênio (ER), mimetizando a ação do estradiol. A ação anticarcinogênica, a diminuição de alguns sintomas associados à menopausa, e a prevenção da osteoporose e das doenças cardiovasculares são alguns dos resultados positivos já evidenciados. O fitoestrogênio com maior importância terapêutica é a genisteína. A genisteína tem atraído interesse científico devido os seus possíveis benefícios na prevenção de diversas doenças, incluindo o câncer. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito antiproliferativo seletivo da genisteína, comparando a ação desse fitoestrógeno em linhagens celulares de câncer de mama e em fibroblastos de humanos. Com o objetivo de avaliar o efeito da genisteína sobre a viabilidade e morfologia celulares, linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7) e de fibroblasto humano (CCD1059sK) foram cultivadas em condições padrão e foram expostas a concentrações crescentes de genisteína (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 μ M) por 24, 48 e 72 h de tratamento. Paralelamente, as culturas também foram expostas ao estradiol (10 nM) para fins comparativos. A análise das culturas celulares por imagem revelou que a genisteína promoveu alterações morfológicas características de morte celular por autofagia. Interessantemente, a genisteína não alterou a viabilidade de culturas de fibroblasto. Os resultados obtidos foram favoráveis à validação da utilização da genisteína como potencial agente antitumoral.

Palavras-chave: Fitoestrógenos. Genisteína. MCF-7. CCD1059sK. Autofagia.

ABSTRACT

PRIETSCH, Rafael da Fonseca. **Investigation of anti-tumor effect of genistein in breast cancer: an *in vitro* study**. 2013. 76f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Cancer can be cited as one of the most frequent causes of death worldwide. It is one of the most serious public health problems in developed and developing countries. Soybean has acquired a prominent position in the Western market over the last few years because of its medicinal properties. Phytoestrogens are important soy derived compounds, which bound to estrogen receptors (ER) mimicking the action of estradiol. Anti-carcinogenic action, reduction of some symptoms associated with menopause, prevention of osteoporosis and cardiovascular diseases are some of their positive results already evidenced. Genistein is a phytoestrogen of great therapeutic importance and has been attracting scientific interest for its possible benefits for preventing several diseases, including cancer. The aim of this study was to compare the selective anti-proliferative effect of genistein on mammary carcinoma and human fibroblasts. Cell lineages of mammary carcinoma (MCF-7) and human fibroblast (CCD1059sK) were grown in microculture plates, treated with 10 nM estradiol and with increasing concentrations of genistein (0.01, 0.1, 1.0, 10, and 100 μ M), for 24, 48, and 72 h, to evaluate the effects of these substances on cells viability and morphology. Analysis of cultures by image revealed that genistein promoted characteristic morphological changes of cell death by autophagy in MCF-7 cancer cells. Genistein did not affect the viability of fibroblasts culture. The results achieved were favorable to validate genistein as a potential anti-tumor agent.

Keywords: Phytoestrogens. Genistein. MCF-7. CCD1059sK. Autophagy.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Conteúdo de isoflavonas em alimentos selecionados	21
Tabela 2	Localização dos receptores estrogênicos no organismo	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Comparação estrutural entre a molécula do estradiol e da genisteína	18
Figura 2	Esquema do metabolismo das isoflavonas	21
Figura 3	Estruturas químicas das isoflavonas presentes na soja	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPC - Adenosina Monofosfato cíclico

C57BL/KsJ-db/db - Modelo de animal genético obeso com diabetes tipo 2

Caco-2 - Células derivadas de carcinoma de cólon humano

CAT - Catalase

CCD1059sK - Linhagem celular de fibroblasto humano

Cu-Zn-SOD - Cobre-Zinco Superóxido Dismutase

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ER - Receptor de Estrógeno

ERK1/2 - Proteína quinase ativada por mitógeno 1/2

ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

ER α - Receptor de Estrógeno alfa

ER β - Receptor de Estrógeno beta

EUA - Estados Unidos da América

g - Grama

GPx - Glutathione Peroxidase

GPx-3 - Glutathione Peroxidase Plasmática

GSH - Glutathione Reduzida

h - Hora

H₂O - Água

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

HDL - Lipoproteína de Alta Densidade

HER2 - Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano

IC₅₀ - Menor Concentração Capaz de Inibir 50% da Viabilidade Celular

Kg - Quilograma

L - Litro

LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade

LH-60 - Linhagem celular representativa de Leucemia Mielóide Aguda

LNCAP - Linhagem celular de câncer de próstata humano

MCF-7 - Linhagem celular de câncer de mama humana

mg - Miligrama

Mn-SOD - Manganês Superóxido Dismutase

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (forma reduzida)

NF-kappaB - Fator Nuclear kappa B

nM - Nanomolar

O₂ - Oxigênio

PC-3 - Linhagem celular de câncer de próstata humano

PKA - Proteína Quinase A

PSA - Antígeno Prostático Específico

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

SNC - Sistema Nervoso Central

SOD - Superóxido Dismutase

tipo α - Tipo Alfa

tipo β - Tipo Beta

Trx - Tioredoxina

β -amilóide - Beta amilóide

β -glicosidase - Beta glicosidade

μ M - Micromolar

μ mol - Micromol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
O câncer de mama	14
Os fitoestrógenos	17
Histórico da utilização dos fitoestrógenos	18
Isoflavonas: classe de fitoestrógenos com atividade biológica destacada	20
A genisteína.....	22
A genisteína e o estresse oxidativo	25
3 OBJETIVOS.....	29
Objetivo geral	29
Objetivos específicos.....	29
4 ARTIGO CIENTÍFICO	31
5 CONCLUSÃO GERAL.....	58
REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é provavelmente o tipo de câncer mais temido pelas mulheres, devido à sua elevada frequência e, sobretudo, pelos seus efeitos psicológicos que afetam a percepção da sexualidade e a própria imagem pessoal (JEMAL et al., 2011). O número de casos de câncer de mama está aumentando nos países em desenvolvimento, com mortalidade desproporcionalmente alta (SAAD, 2011). Além disso, a incidência de câncer de mama está aumentando em todo o mundo, devido às mudanças nos hábitos alimentares (KEY et al., 2004). Além do câncer de mama ser uma doença heterogênea, ele também apresenta um comportamento clínico distinto devido às propriedades moleculares, em particular, a presença ou ausência do receptor de estrógeno (ER) (ROUZIER et al., 2005).

Por outro lado, vários nutrientes e compostos bioativos dos alimentos tem sido destacados como agentes anti-carcinogênicos promissores (WORD, 2007). Dentre estes compostos podemos destacar os fitoestrógenos, os quais representam um grande grupo de compostos naturais com estrutura similar a do estrogênio humano (MEDEIROS; MAITELLI; NINCE, 2007). De uma forma geral, os fitoestrógenos podem se comportar como agonistas ou antagonistas dos receptores estrogênicos. Porém seus efeitos apresentam menor intensidade quando comparados ao do 17- β -estradiol ou a de estrogênios sintéticos (ALBERTAZZI; PURDIE, 2002; MCCARTY, 2006). Devido à característica de atuarem sobre receptores estrogênicos, ER α e ER β , muitos estudos estão sendo realizados para elucidar os efeitos da administração contínua destas substâncias como uma alternativa de terapia de reposição hormonal. As isoflavonas possuem maior afinidade pelo receptor β que não causa os efeitos colaterais quando comparado aos receptores α , que são o sítio de ligação dos hormônios estrogênios sintéticos. A utilização desses hormônios sintéticos a longo prazo pode desencadear efeitos

colaterais como o desenvolvimento de câncer de mama e de endométrio e aumento da predisposição a acidentes trombo embólicos (HEDBLAD et al., 2002; CLAPAUCH et al., 2002).

Diversas atividades biológicas têm sido atribuídas às isoflavonas, em especial a genisteína, a qual é considerada a mais ativa das isoflavonas, exibindo propriedades anti-tumorais (DIXON; FERREIRA, 2002). Alguns efeitos farmacológicos da genisteína associados à atividade anti-estrogênica, incluem a inibição de proteínas quinases, as quais participam da modulação de respostas em vários níveis moleculares das células (ZIELONKA; GEBICKI; GRYNKIEWICZ, 2003).

Neste contexto, levando-se em considerações as atividades biológicas, recentemente atribuídas a genisteína, bem como o potencial anti-proliferativo, a presente dissertação visa verificar a ação anti-tumoral seletiva da genisteína em células de câncer de mama humano (MCF-7), comparando com células normais, a linhagem de fibroblastos humanos (CCD1059sK).

2 REVISÃO DE LITERATURA

O câncer de mama

O câncer de mama tem uma prevalência anual de mais de um milhão de casos em todo o mundo, com aproximadamente 400.000 mortes por ano (GERMANO; O'DRISCOLL, 2009). No Brasil, o câncer de mama ocupa o primeiro lugar em mortalidade (INCA, 2012). Em relação a países da América do Norte e da Europa, o câncer de mama é a segunda causa de morte em mulheres, sendo considerado um grave problema de saúde pública da atualidade (CANCER OF THE BREAST, 1997; JEMAL et al., 2008).

Esta doença pode ocorrer em ambos os sexos, mas é mais frequente entre as mulheres principalmente devido a fatores genéticos (COLDITZ et al., 2012). O câncer de mama continua a ser a neoplasia maligna mais comumente diagnosticada entre as mulheres (YOULDEN et al., 2012). Apesar de vários fatores que aumentam o risco de câncer na mulher (sexo, idade e história familiar) não são mutáveis, outros fatores de risco modificáveis, como a ingestão de álcool, gordura da dieta, a obesidade na idade pós-menopausa e estímulos hormonais foram identificados como estratégias possíveis para prevenir o câncer de mama (TIRONA; SEHGAL; BALLESTER, 2010).

Além disso, está presente no processo tumoral o receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) no qual está expresso na maioria dos processos tumorais de câncer de mama em mulheres, em torno de 20% a 25% (COUTURIER et al., 2008). A proteína HER2 é codificada pelo gene *HER2* localiza-se no cromossoma 17. Devido à sua função na ativação de vias de sinalização, HER2 tem um papel central em vários processos celulares, dentre eles podemos

destacar a resistência a apoptose, proliferação e motilidade celular (RUBIN; YARDEN, 2012).

No contexto geral, a expressão de HER2 em câncer de mama está relacionada a tumores mais invasivos e agressivos e com um pior prognóstico e uma maior probabilidade de recidiva, menor sobrevida, quando comparados ao câncer de mama HER2 negativo (HENRY; HAYES, 2006). Além disso, a super-expressão e amplificação de HER2 predizem o efeito de terapia dirigida tanto na metástase como na terapia adjuvante, sendo considerado um importante fator preditivo entre as pacientes com câncer de mama (ROMOND et al., 2005).

Por outro lado, o tratamento do câncer de mama HER2-positivo pode ser realizado com mais eficácia através do Trastuzumab®, um anticorpo monoclonal que tem ação contra o componente extracelular da proteína HER2, no qual resulta na melhoria da doença e uma melhor sobrevida em pacientes com super-expressão de HER2 tanto para terapia adjuvante como na prevenção de metástases (SLAMON et al., 2011).

O câncer de mama caracteriza-se por ser uma síndrome heterogênea, tanto a nível clínico como a nível molecular (MINAFRA et al., 2012; VODUC et al., 2010) no qual se destacam as suas propriedades moleculares relacionadas com o receptor de estrógeno (ER), o qual pode estar expresso ou não (ROUZIER et al., 2005). Muitas mulheres após a menopausa, aproximadamente 75%, apresentam diagnóstico positivo para o câncer de mama (HARLAN et al., 2002). Tal fato tem sido associado com a diminuição da produção do hormônio estrogênio.

O câncer de mama é uma doença que requer um diagnóstico rápido e eficaz a fim de aumentar as chances de cura ou as taxas de sobrevida (TFAYLI et al., 2010). Atualmente, o desenvolvimento de novas técnicas na área do diagnóstico tem demonstrado uma maior eficácia na detecção do câncer de mama em estágios iniciais, porém ainda se necessita maiores estudos e pesquisas na área (WEISSLEDER; PITTET, 2008; SEGA; LOW, 2008). Dentro desse contexto, o paciente apresentará uma melhora em sua qualidade de vida e sobrevida (CAMPBELL et al., 2002).

O câncer de mama é uma doença caracterizada pela multiplicação e propagação descontrolada e anormal de células do tecido mamário, constituindo o resultado de um acúmulo progressivo de mutações no material genético (WAITZBERG; BRENTANI, 2004).

Fatores nutricionais podem estar diretamente relacionados com geração de espécies reativas no organismo, desencadeando o estresse oxidativo, originando danos oxidativos celulares e, assim, aumentando o risco da doença (LOFT e POULSEN, 1996; WYNDER et al., 1997) e prejudicando o prognóstico de pacientes com câncer de mama (DUMITRESCU; COTARLA, 2005).

Por outro lado, a formação do estresse oxidativo pode estar relacionada com a progressão do câncer de mama, podendo ainda interferir na eficácia do tratamento antineoplásico. Exemplo, logo depois de diagnosticada o câncer de mama, realiza-se os procedimentos cirúrgicos se necessário e também tratamentos à base de quimioterapia e/ou radioterápicos, que podem induzir a produção de espécies reativas de oxigênio nas células, resultando em danos celulares contribuirão negativamente para a progressão ou recidiva do câncer de mama (BOREK, 2004, CONKLIN, 2004).

Mediante afirmações citadas anteriormente, verifica-se de suma importância uma dieta de alimentos ricos em antioxidantes, sendo esse capazes de minimizar e de modular os danos oxidativos decorrentes do tratamento antineoplásico, reduzindo, assim, as chances de recidiva da doença (THOMSON et al., 2007).

Em relação ao tratamento para o câncer de mama, que além de influenciar na geração do estresse oxidativo, também pode estar associado com alterações no estado nutricional e no consumo alimentar de pacientes oncológicos (TRINTIN, 2003).

Além disso, convém ressaltar que a literatura reconhece que o estresse oxidativo também pode estar relacionado com a progressão clínica ou recidiva do câncer de mama. Borek (2004) verificou que após o diagnóstico da doença, os procedimentos cirúrgicos e tratamentos com quimioterápicos e/ou radioterápicos tem a capacidade de produzir espécies reativas no organismo humano, além disso, o excesso de espécies reativas pode danificar também células saudáveis, ocasionando danos celulares que poderão contribuir, negativamente, para a progressão da doença (BOREK, 2004).

Segundo Halliwell (1996), estudos experimentais têm demonstrado que espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são fortemente capazes de alterar o material genético das células. As ERO e ERN constituem substâncias altamente reativas e instáveis que são produzidas no organismo, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, e quando estão em

excesso procuram estabilidade reagindo com constituintes celulares como proteínas, lipídeos, carboidratos e nucleotídeos, resultando no dano celular oxidativo ou estresse oxidativo (HALLIWELL, 1996).

Os fitoestrógenos, genisteína, daidzeína e gliciteína são encontrados na soja, são considerados antioxidantes naturais. Inibem os radicais livres no organismo, defendendo-o contra a ação maléfica destes compostos (CAI et al., 1996). Estudos sugerem que a ação antioxidante das isoflavonas seja parcialmente devido a sua ação sequestradora de radicais livres e como quelante de metais, e esses efeitos dependem diretamente da posição da hidroxila fenólica (ARORA et al., 1998).

Parte desse efeito é atribuído a genisteína, que tem a capacidade de sequestrar os radicais livres (DUGAS et al., 2000) e apresenta efeitos de proteção sobre a peroxidação lipídica e contra o dano oxidativo ao DNA (SAIJA et al., 1995). Isso acontece porque a genisteína aumenta a ação de enzimas antioxidantes como a Superóxido Dismutase (SOD) e a Glutathione Peroxidase Plasmática (GPx-3) (RIMBACH et al., 2007).

Nesse contexto, a utilização de alimentos a base soja como agentes quimiopreventivos é controversa devido à ação semelhante ao estrogênio. No entanto, algumas evidências clínicas indicam que a utilização de isoflavonas não afeta adversamente os marcadores de risco de câncer da mama (HOOPER et al., 2009; HUBER; IMHOF; SCHMIDT, 2010), chineses e norte-americanos através de estudos epidemiológicos indicam que após a administração de alimentos a base de soja há uma melhora do prognóstico de pacientes com câncer de mama (SHU et al., 2009; GUHA et al., 2009; KANG et al., 2010; CAAN, 2011).

Os fitoestrógenos

Os fitoestrogénos são um grupo de compostos naturais que são encontrados em alguns alimentos e plantas. São divididos em três grupos, dentre eles destacam-se os mais importantes e mais comuns: as isoflavonas, os comestanos e as lignanas. De uma forma geral, os fitoestrógenos podem se comportar como agonistas ou antagonistas dos receptores estrogênicos dependendo de sua concentração. Essas moléculas atuam como agonistas quando a produção de hormônios endógenos é baixa e quando a concentração de hormônios apresenta-se

normal exercem função de antagonistas (HWANG et al., 2006). A atividade dos fitoestrógenos nos receptores estrogênicos é cerca de 1000 a 10.000 vezes menor que a do estradiol (MORTON et al., 2002; DESPAIGNE et al., 2001; POTTER et al., 1998). Na Figura 1 podemos observar a semelhança estrutural entre as isoflavonas e o estradiol. Desta forma, os fitoestrógenos têm sido alvo de diversas pesquisas, as quais sugerem que tais moléculas possam potenciais como terapia complementar/alternativa visando à redução do risco de desenvolvimento de algumas patologias relacionadas ao tratamento de reposição hormonal habitual, que utiliza hormônios sintéticos.

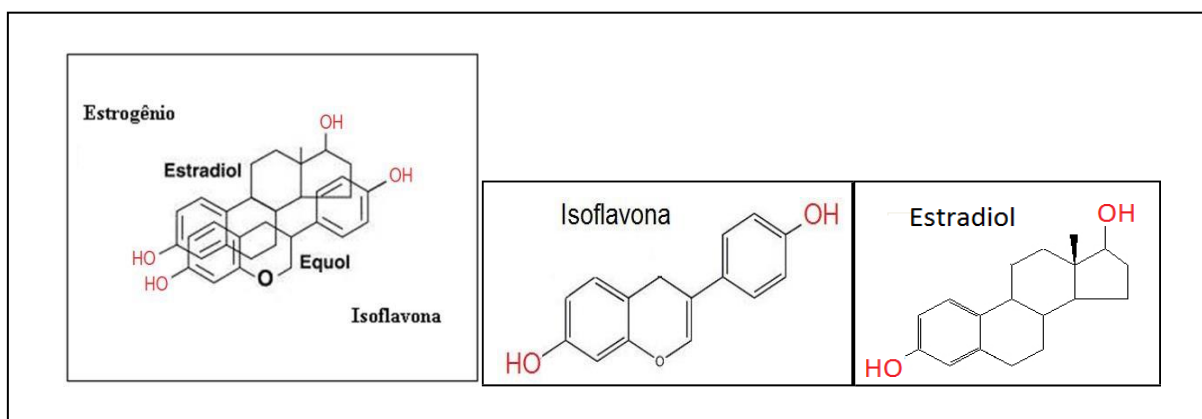


Figura 1 – Comparação estrutural entre a molécula do estradiol e das isoflavonas.

Fonte: adaptado de Potter et al., 1998.

Histórico da utilização dos fitoestrógenos

Os fitoestrógenos vêm sendo estudados desde a década de 1940, onde foi observado que estes compostos derivados de plantas poderiam causar efeitos estrogênicos (BENNETTS; UNDERWOOD; SHIER, 1946). Estudos realizados por Rossiter e Beck em 1966 demonstraram que ovelhas que ingeriram o trevo vermelho (*Trifolium pratense*) apresentaram vários problemas de fertilidade, como dificuldade de engravidar e ocorrência de aborto espontâneo. Tais alterações foram relacionadas com a ingestão de grandes quantidades de isoflavonas, particularmente a genisteína, contidas no trevo vermelho (SETCHELL et al., 2001; HOWES; HOWES, 2002), as quais são capazes de induzir alterações no sistema endócrino (WISNIEWSKI et al., 2003).

A realização de estudos epidemiológicos em relação ao consumo da soja com a diminuição dos sintomas de doenças cardiovasculares, de osteoporose, marcadores da reabsorção óssea, do climatério e câncer de mama, são explicitadas conforme segue detalhado abaixo:

a) Efeito das isoflavonas na prevenção de doença cardiovascular: as isoflavonas derivadas da soja vêm sendo investigadas como potentes agentes redutores do colesterol. Tal evidência está associada à baixa incidência de doença cardiovascular em países onde a soja é consumida rotineiramente na dieta (ALONSO, 2007). Contudo, nesses países orientais também há baixa ingestão de gordura saturada, somado ao estilo de vida bem diferente do ocidental (KNIGHT; ÉDEN, 1995). A prevenção do aumento de colesterol sérico está associada com a redução do risco de doença cardiovascular (CIGNARELLA; KRATZ; BOLEGO, 2010). A ingestão de isoflavonas reduz os níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e aumenta os níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL), a qual também protege contra o desenvolvimento de placas de aterosclerose (KOKUBO et al., 2007).

b) Efeito das isoflavonas sobre a prevenção da osteoporose e de marcadores da reabsorção óssea: As mulheres apresentam maior incidência de fraturas osteoporóticas que os homens, devido ao menor pico de massa óssea e por sofrerem uma diminuição abrupta dos níveis de estrogênios na menopausa com consequente acentuação da perda de massa óssea (THAM; GARDNER; HASKELL, 1998). Em estudo realizado por Arjmandi, Alekel e Hollis em 1996, foi demonstrado que a suplementação dietética com isoflavonas preveniu a perda óssea em ratas ovariectomizadas (ARJMANDI; ALEKEL; HOLLIS, 1996).

c) Efeito das isoflavonas sobre o climatério: O climatério é a transição do período reprodutivo para o não reprodutivo na mulher, devido à diminuição dos hormônios sexuais produzidos pelos ovários. Esta diminuição pode acarretar algumas mudanças fisiológicas, como o aparecimento de fogachos, irritabilidade, cansaço, ansiedade, acompanhados de um decréscimo da calcificação óssea (GUYTON; HALL, 2006). Chung et al (1996) demonstrou que existe uma menor frequência dos fogachos em mulheres orientais quando comparadas as ocidentais, o que em parte pode ser devido à elevada ingestão de soja. Além disso, esse estudo indicou a redução de 70% de fogachos após terapia de reposição hormonal em comparação 30% do placebo (CHUNG et al., 1996).

d) Efeito das isoflavonas sobre o câncer de mama: Tem sido demonstrado que a atividade de várias enzimas, principalmente a topoisomerase II e a tirosina quinase, é inibida pela genisteína e, em alguns casos, por outras isoflavonas. Além disso, outros estudos têm demonstrado propriedades anti-carcinogênicas, anti-oxidativas, efeitos anti-estrogênicos e anti-proliferativos das isoflavonas. Então, pode-se inferir que estas moléculas podem agir de maneiras diferentes, promovendo a inibição da carcinogênese (MOLTENI; BRIZIO-MOLTENI; PERSKY, 1995).

Isoflavonas: classe de fitoestrógenos com atividade biológica destacada

As isoflavonas são fitoestrógenos biologicamente ativos que podem exercer no organismo um fraco efeito hormonal e um potente efeito antioxidante que está associado, principalmente, a capacidade hipocolesterolêmica. As isoflavonas são compostos fenólicos que se encontram naturalmente em algumas plantas, como por exemplo, a soja (PASCUAL-TERESA et al., 2006). Na Tabela 1 são demonstrados a quantidade de isoflavonas presentes nos alimentos (CLAPAUCH et al., 2002). Alguns estudos epidemiológicos evidenciam que nas últimas décadas o consumo diário de isoflavonas derivadas da soja apresenta efeitos protetores sobre doenças crônicas, doenças cardiovasculares, efeitos na menopausa e em alguns tipos de câncer, principalmente o câncer de mama em mulheres e o câncer de próstata em homens (ANJO, 2004).

Diversos estudos em relação ao consumo de isoflavonas pode proporcionar uma proteção em relação a alguns tipos de câncer, entre eles o câncer de mama. Estes estudos realizados descrevem os efeitos biológicos das isoflavonas tanto *in vivo* e *in vitro* (SHILS et al., 2003).

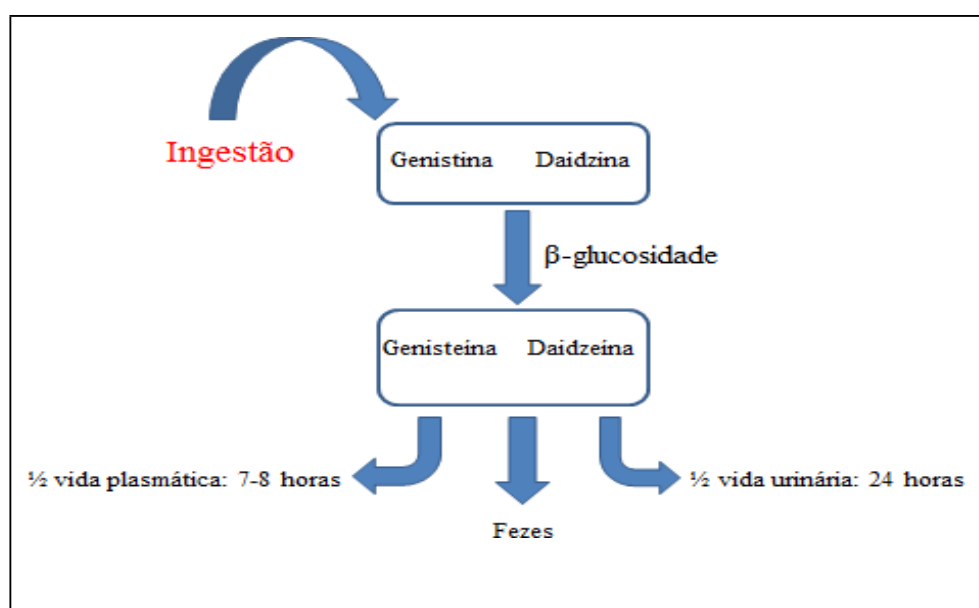
A ingestão de alimentos a base de isoflavonas desde a infância parece ter um papel fundamental para a prevenção de câncer de mama para o futuro, mas na fase adulta também essa suplementação poderá trazer benefícios (KORDE et al., 2009; DONG; GIN, 2011). Estudo *in vitro* envolvendo a utilização de fitoestrógenos em relação à cultura de células de câncer de mama (MCF-7) sugere que doses altas de isoflavonas reduzem a proliferação celular, enquanto baixas concentrações exercem efeito estimulatório sobre a proliferação das células MCF-7 (WU; YANG; PIKE, 2000). Portanto a dose de isoflavonas parece desempenhar importante papel sobre o aumento ou diminuição do risco dessa doença.

Tabela 1 - Conteúdo de isoflavonas em alimentos selecionados.

Alimento	Isoflavonas (mg/100g)
Semente de soja tostada	128,4
Semente de soja fervida sem sal	54,7
Queijo de soja	31,3
Tofu	16,3 a 29,2
Salsicha de soja congelada crua	15,0
Semente de soja verde cozida sem sal	13,8
Bacon, sem carne	12,1
Leite de soja	9,7
Talharim de soja	8,5
Cereal de soja	3,8
Fórmulas infantis	7,0 a 24,4

Fonte: Adaptado de Clapauch et al., 1996, baseado em USDA - Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Foods, 1999.

Dentre as principais isoflavonas podemos citar a genistina e a daidzina que, sob a influência de uma β -glicosidase produzida pela flora intestinal, são convertidas em genisteína e daidzeína (formas ativas), que constituem os fenóis heterocíclicos com estrutura análoga à dos estrogênios. O tempo de meia-vida na circulação da genisteína e da daidzeína é de 7-8 horas e o tempo de meia-vida no trato urinário é de 24 horas (SETCHELL et al., 1998; DESPAIGNE et al., 2001). A Figura 2 esquematiza a absorção e a conversão das isoflavonas da soja para a forma biologicamente ativa.

**Figura 2 – Esquema do metabolismo das isoflavonas.**

Fonte: adaptado de Setchell et al., 1998; Despaigne et al., 2001.

Segundo Kao, Chien e Chen (2008), as isoflavonas na forma ativa, ou seja, as agliconas podem apresentar uma maior biodisponibilidade e maior atividade biológica do que as formas conjugadas. A Figura 3 apresenta as principais isoflavonas presentes na soja: daidzeína, genisteína e gliciteína.

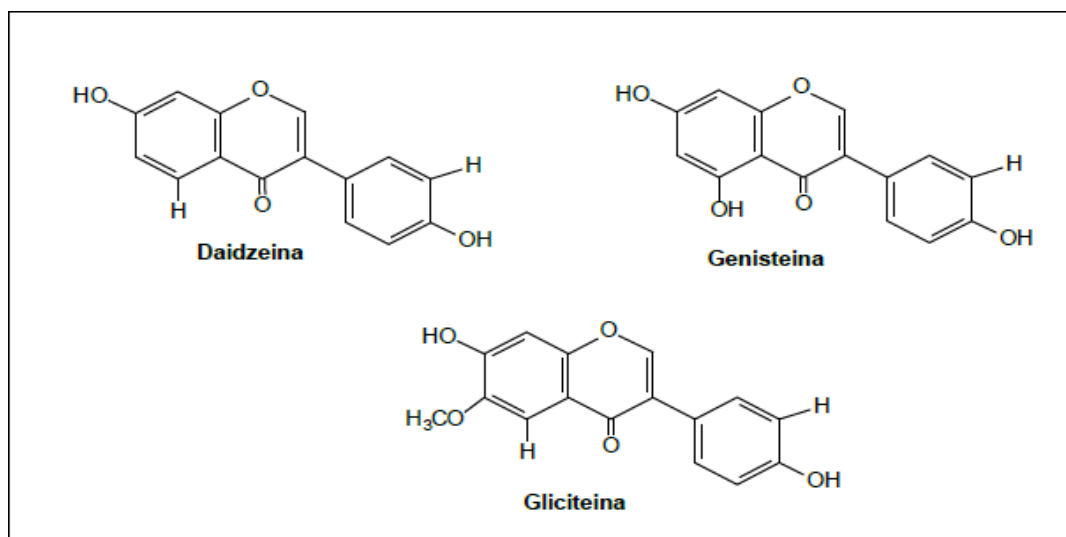


Figura 3 – Estruturas químicas das isoflavonas presentes na soja.

Fonte: adaptado de Mazur e Adlercreutz, 1998.

A genisteína

Dentre as isoflavonas derivadas da soja uma das mais importantes e mais comumente encontrada na natureza é a genisteína. Estudos epidemiológicos têm demonstrado seu potencial efeito anti- e/ou pró-estrogênico, dependendo da concentração utilizada (WARREN; SHORTLE; DOMINGUEZ, 2002).

Uma vez que a genisteína atua em receptores estrogênicos, essa isoflavona pode, então, mimetizar as funções biológicas do estradiol, apresentando potencial na terapia hormonal alternativa (CEDEROTH; NEF, 2009). A utilização desse tipo de composto está associada a efeitos benéficos como em câncer de mama e próstata (BARNES; PETERSON, 1995; LAZAREVIC et al., 2011), diminuindo o risco de osteoporose (YAMAGUCHI et al., 2010), capacidade em reduzir os níveis de colesterol sanguíneo (LAZAREVIC et al., 2011) e também sendo capaz de reduzir os sintomas do climatério e da menopausa (CHIECHI et al., 2003).

A genisteína pode ser ingerida por meio de diversos alimentos a base de soja, conforme citados na Tabela 1 e sua concentração varia de 1-2 mg/g de

alimento (BARNES et al., 1995). O consumo de genisteína causou diminuição na incidência de alguns tipos de câncer entre as populações orientais em relação às ocidentais. Tal evidência está relacionada ao consumo diário de produtos a base soja comparado ao consumo dos ocidentais, como nos EUA, em que a ingestão diária de produtos derivados de soja é baixo, aproximadamente de 1-3 mg/dia (WEI; BOWEN; CAI, 1995).

A genisteína é absorvida no estômago e não age diretamente na inibição do câncer de mama, age em vias de mecanismos quimioterapêuticos e são relativamente suficientes para inibir a proliferação celular (BARNES; SFAKIANOS; COWARD, 1996). Por isso, a ação da genisteína induz alterações morfológicas e pode ser considerada como um processo de reforço da glândula mamária, em última análise, diminuindo a proliferação e a susceptibilidade a carcinogênese química (WANG et al., 2006).

Parte dos efeitos biológicos da genisteína se deve a sua interação com receptores α ou β -estrogênicos, os quais têm como ligante endógeno o estradiol e encontram-se amplamente distribuídos no organismo, conforme apresentado na Tabela 2 (LIU et al., 2001). Tem sido evidenciado que a genisteína e o estradiol se diferenciam com relação à resposta aos receptores estrogênicos. O potencial da genisteína é um terço da potência do estradiol quando interagem com os receptores estrogênicos do tipo β e $1/10^2$ - $1/10^4$ vezes da potência de estradiol, quando interage com receptores estrogênicos do tipo α (KUIPER et al., 1998).

Tabela 2 – Localização dos receptores estrogênicos no organismo.

Receptor α	Receptor β
SNC	SNC
Mama	Tecido ósseo
Endométrio	Parede vascular
Fígado	Trato urogenital

Fonte: adaptado de Liu et al., 2001.

Estudos farmacocinéticos mostraram que a genisteína apresenta uma baixa biodisponibilidade oral e as concentrações plasmáticas foram menores do que o IC_{50} observado em experimentos *in vitro* (MANACH et al., 2005; SETCHELI et al., 2001). Assim, a baixa biodisponibilidade da genisteína pode afetar a sua eficácia *in vivo* e

também pode contribuir para as grandes variações de resultados farmacológicos observados em ensaios clínicos (SETCHELL et al., 2001; LARKIN; PRICE; ASTHEIMER, 2008). Além disso, a maior parte da genisteína apresentada *in vivo* está na forma conjugada (YANG et al., 2010; ZHOU et al., 2008), e sua biodisponibilidade na forma aglicona (genisteína) é geralmente considerada a parte biológica mais ativa quando comparada a forma conjugada (KGOMOTSO; CHIU; NG, 2008).

A genisteína, por ser um inibidor da proteína tirosina quinase, tem sido estudada como regulador da secreção de insulina, já que sua liberação pode ser controlada por mecanismos de sinalização celular. Os efeitos benéficos que vêm sendo estudados em animais e também em cultura de células sugerem que a utilização da genisteína pode ser uma alternativa no tratamento do diabetes do tipo 2 (KAHN, 1998).

Estudos realizados em camundongos C57BL/KsJ-db/dB (AE PARK et al., 2006) e camundongos diabéticos não obesos (CHOI et al., 2008), a genisteína promoveu melhora no metabolismo glicídico e lipídico, elevou os níveis de insulina e preservou as células β pancreáticas. Além disso, a genisteína em concentrações fisiológicas potencializou a secreção de insulina dependente de glicose, tanto em linhagens de células secretoras de insulina, como em ilhotas pancreáticas de rato (LIU et al., 2006). Em ilhotas humanas, a genisteína induziu a fosforilação de ERK1/2 e a expressão de ciclina D1, a principal proteína reguladora do ciclo celular, essencial para o crescimento das células β (FU et al., 2010).

Um estudo de Abler e colaboradores (1992) constataram que a genisteína neutralizou a ação antilipolítica da insulina em adipócitos de ratos tratados com isoproterenol. Este efeito parece estar relacionado à ativação da PKA e a elevação dos níveis de AMPc (SZKUDELSKA; NOGOWSKI; SZKUDELSKI, 2008). Além disso, a genisteína e a dadzeína também são capazes de inibir a síntese de cortisol em cultura de células adreno-corticais, comprovando o envolvimento das isoflavonas na regulação dos níveis dos hormônios do estresse (SZKUDELSKA; NOGOWSKI, 2007).

A genisteína tem a capacidade de inibir a proliferação celular e a angiogênese *in vitro* através da modulação da atividade das tirosina-quinases. Estudos relatam que a genisteína pode inibir também a atividade da topoisomerase II, enzima que participa da replicação do DNA (BANERJEE et al., 2008).

A genisteína inibe o fator de transcrição nuclear NF-kappaB em vários tipos de câncer (WANG et al., 2006, SARKAR et al., 2006). O NF-kB é um poderoso fator de sobrevivência das células tumorais porque ele aumenta a proliferação celular, inibe a apoptose e aumenta a angiogênese tumoral (FELIPPE, 2004).

Estudos clínicos indicam que a genisteína tem feitos benéficos favoráveis na redução do PSA, do colesterol e existe uma correlação inversa entre o consumo de genisteína e risco de câncer de mama (LAZAREVIC et al., 2011; TAYLOR et al., 2009). O efeito citotóxico da genisteína em células tumorais difere do efeito desse composto quando exposto em células normais, evidenciando um efeito protetor dessa isoflavona. Este efeito também pode ser observado em cultura de neurônios submetidos a um tratamento com o peptídeo β -amilóide induzindo toxicidade celular em um modelo *in vitro* da Doença de Alzheimer. Nesse modelo, a genisteína exerceu um efeito neuroprotetor (HUAN-LING et al., 2009). Similarmente, a genisteína também apresenta ação citoprotetora em epitélio intestinal submetido a um protocolo de isquemia (SATO et al., 2011).

A genisteína quanto atua em baixas concentrações aumenta ER dependente da proliferação de ER α de células positivas para o câncer da mama em modelos *in vitro* de um elemento de resposta de estrogênio de modo dependente, (SEO et al., 2006), *in vivo* e na presença de baixos níveis de estrogênio na circulação, atua de forma aditiva para estimular o crescimento de tumores (BENTREM et al., 2003).

Estudos têm atribuído a genisteína várias atividades biológicas, embora os mecanismos celulares e moleculares de sua ação não estão completamente elucidados (LI et al., 1998). A genisteína exerce as suas propriedades anti-neoplásicas através de vários mecanismos de ação, incluindo: a indução de apoptose, a inibição da topoisomerase II, a supressão de atividade da telomerase e a inibição da angiogênese (POLKOWSKI et al., 2004; YE et al., 2004). Estudos frente à ação da genisteína na indução de autofagia e/ou apoptose continuam em estudos para verificar os possíveis mecanismos de morte celular.

A genisteína e o estresse oxidativo

O estresse oxidativo pode ser caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes resultando na indução de danos celulares (FINKEL; HOLBROOK, 2000). O sistema de defesa antioxidante é

formado por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que agem protegendo o organismo contra danos causados por espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) e, portanto, aumentando a defesa imunológica, com menor risco de doenças degenerativas (VALKO et al., 2007).

O sistema antioxidante regula a geração e inativação de EROs e ERNs através dos sistemas enzimáticos e não enzimáticos (EDEAS, 2009). Os principais antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos. No grupo dos enzimáticos, podemos relacionar as enzimas SOD, a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) as quais provêm a primeira linha de defesa antioxidante (GRISSA et al., 2007). Em relação aos componentes da defesa antioxidante não enzimáticos podemos destacar a glutathione reduzida (GSH), a tioredoxina (Trx) (AHSAN et al., 2009), o zinco, o selênio e o ferro, as vitaminas ácido ascórbico, vitamina E, vitamina A, riboflavina, carotenóides beta-caroteno, licopeno, luteína e bioflavonóides (genisteína, quercetina, extrato de ginkgo biloba) (PAPAS, 1999; LEITE; SARNI, 2003).

Nos eucariontes, a SOD corresponde à família de enzimas com diferentes grupos prostéticos na sua composição, nos quais são representados por Cu-Zn-SOD e Mn-SOD (MONTEIRO; RANTIN; KALININ, 2010).

A SOD é uma metaloenzima que converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é subsequentemente transformado em água pela CAT nos lisossomos, ou pela GPx nas mitocôndrias. A GSH que é utilizada pela CAT como dadora de prótons hidrogênio, necessários para a redução do peróxido de hidrogênio em água (JOHANSEN et al., 2005).

A CAT é uma hemoproteína citoplasmática dos peroxissomos, com atividade dependente de NADPH, que catalisa a redução do H_2O_2 a água (H_2O) e oxigênio (O_2). Esta reação é importante, pois o H_2O_2 é nocivo à célula devido a sua capacidade de atacar as cadeias de ácidos graxos insaturados presentes nas membranas, além de outras macromoléculas, como as proteínas. Esta enzima está presente em animais, plantas, bactérias e fungos, podendo ser encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rins e fígado (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A GPx, por sua vez, reduz o H_2O_2 , os peróxidos alifáticos e os aromáticos à água e seu correspondente álcool inerte, em uma reação que precisa da presença de GSH como fonte de equivalentes redutores (GRISSA et al., 2007).

O Trx que se encontra tanto no citosol como na mitocôndria tem uma forte capacidade antioxidante por serem varredores de ERO (AGO, SADOHIMA, 2006). A Trx também influencia distintas vias de sinalização intracelular por modular as quinases e os fatores de transcrição que estão envolvidos no crescimento e na morte celular programada (AGO; SADOHIMA, 2006).

Nesse contexto, foi relatado que a administração dietética de genisteína em ratos aumentou a atividade da CAT no seu intestino delgado (CAI; WEI, 1996). Além disso, Recor, Dreosti e Mcinerney (1995) forneceram evidências de que a administração de genisteína foi um eficaz eliminador de H_2O_2 em lipossomas sendo capaz de proteger as células do músculo esquelético. Estudos comprovam que a administração de genisteína estimula as atividades antioxidantes CAT, SOD, GPx e GSH (ADLERCREUTZ, 2002, MISHRA; KAR; KALE, 2009).

Suzuki e colaboradores (2002) estudaram os efeitos da administração de genisteína 100 $\mu\text{mol/L}$ em células de próstata humana (LNCAP e PC-3). A expressão gênica de Cu-Zn-SOD, Mn-SOD e CAT não foram significativamente afetadas pela genisteína.

A genisteína tem sido relatada por ser protetora contra a doença crônica, em modelos animais (RICE-EVANS; PACKER, 1998; SUZUKI et al., 2002). Além disso, a atividade GPx elevada pode estar associada com maior proteção contra doenças crônicas como câncer e doenças cardiovasculares (SUN et al., 1990; BLANKENBERG et al., 2003). A atividade GPx aumentada pode ser um dos mecanismos pelos quais estudos comprovam que a administração de genisteína protege contra a doença crônica.

Kameoka e colaboradores (1999) estudaram a administração de genisteína 100 $\mu\text{mol/L}$ em células humanas de câncer de intestino (Caco-2) durante 48 horas. A genisteína não aumentou as atividades da Cu-Zn-SOD ou CAT.

A genisteína inibe a produção de H_2O_2 em linhagem células LH-60 e aumentando assim as atividades da CAT, SOD E GPx em órgãos de camundongos (CAI; WEI, 1996).

A genisteína é considerada um forte antioxidante, sendo ela capaz de estimular a atividade de enzimas como CAT, GPx e SOD no intestino de ratos, por modular a inflamação vascular e prevenção da aterosclerose (WATANABE et al., 2000a; WATANABE et al., 2000b).

Park e colaboradores (2011) observaram que a genisteína reduziu a expressão de enzimas antioxidantes endógenos: como Cu-Zn-SOD e Mn-SOD no local da ferida em ratos e relativamente sugere também que a baixa expressão dessas enzimas com a utilização de genisteína foi suficiente para lidar com o estresse oxidativo na fase inicial da cura da ferida. O aumento do estresse oxidativo reduz a capacidade de cicatrização de feridas.

Harborne e Williams (2000) descreveram que a genisteína tem diversas atividades antioxidantes. Essa isoflavona seria capaz de agir como bloqueadora das espécies reativas do oxigênio e inibidora da peroxidação lipídica. Esse composto também inibiria o ânion superóxido gerado pela enzima xantina oxidase. Realizando-se experimentos em animais, constatou-se que a genisteína aumenta a atividade antioxidante das enzimas SOD, GPx, CAT e GSH (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Em contraste, Breinholt e colaboradores (1999) observaram que a administração de genisteína na dieta de 0,1 g/kg de peso corporal por 2 semanas consistentemente inibiu a atividade de CAT, SOD e GPx em eritrócitos de ratos fêmeas, enquanto que não houve efeito da genisteína em enzimas antioxidantes no fígado.

Banz e colaboradores (2004) descreveram um aumento nos níveis de CAT no fígado em ratos tratados com genisteína, no entanto, não demonstrou estatística significativa. Em contrapartida, uma diminuição da atividade da CAT com tratamento de genisteína foi observada nas células vermelhas do sangue (BREINHOLT; LAURIDSEN; DRAGSTED, 1999) e no fígado de ratos com diabetes induzidos por estreptozotocina (LEE et al., 2006).

A genisteína atua protegendo contra a disfunção vascular através da regulação das vias de sinalização antioxidantes endógenas (SLOW; MANN, 2012).

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar a atividade antitumoral da genisteína frente à linhagem celular de câncer de mama MCF-7, investigando as vias moleculares envolvidas nesse efeito. Foi utilizado 5 concentrações crescentes de genisteína (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 μ M) por 24, 48 e 72 h de tratamento. Paralelamente, as culturas celulares também foram expostas ao estradiol (10 nM) para fins comparativos.

Objetivos específicos

- a) Avaliar a citotoxicidade da genisteína, utilizando o método do MTT, nas linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7) e de fibroblasto (CCD1059sK);
- b) Avaliar a indução de necrose, utilizando o ensaio de marcação com Iodeto de Propídeo (IP) em linhagem celular MFC-7 após o tratamento com genisteína;
- c) Avaliar a indução de necrose, apoptose e apoptose tardia, utilizando o ensaio de Anexina-V, por citometria de fluxo, na linhagem celular MCF-7 após o tratamento com genisteína;
- d) Avaliar a formação de autofagossomos através de ensaio imunocitoquímico utilizando o anticorpo LC3A/B em cultura de células MCF-7 após o tratamento com genisteína;

- e) Após o tratamento das células MCF-7 com genisteína, avaliar a expressão das enzimas do sistema antioxidantes e de marcadores de apoptose e de sobrevivência celular por PCR em tempo real.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

GENISTEIN INDUCES APOPTOSIS AND AUTOPHAGY IN HUMAN BREAST MCF-7 CELLS BY MODULATING THE EXPRESSION OF PRO-APOPTOTIC FACTORS AND OXIDATIVE STRESS ENZYMES

Rafael F. Prietsch¹, Leonardo G. Monte², Felipe Abreu¹, Fátima T. Beira³, Francisco A. B. del Pino¹, Vinícius F. Campos⁴, Tiago Collares⁴, Luciano da Silva Pinto², Rosélia M. Spanevello¹, Giovana D. Gamaro¹, Elizandra Braganhol^{1*}.

¹Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

²Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Proteômica, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

³Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

⁴Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

*Corresponding Author

Elizandra Braganhol (E-mail: Elizandra.braganhol@ufrgs.br)

Bioquímica – Prédio 29, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Universidade Federal de Pelotas - Campus Capão do Leão - s/n

CEP 96010 900 - caixa Postal 354; Pelotas, RS, Brasil

Phone: 55 53 3275 7355 FAX: 55 53 3275 7354

Abstract

Introduction. Breast cancer is one of the common tumors occurring in woman and despite treatment the majority of breast cancer is incurable. Genistein, a major isoflavone constituent of soy products, has been reported to have chemopreventive and chemotherapeutic in multiple tumor types. Here, we investigated the antiproliferative effect of genistein in MCF-7 breast cancer cells and the underlying molecular mechanisms involved in this effect.

Methods. MCF-7 cancer cells and CCD1059sK fibroblast cells were treated with crescent concentrations of genistein for different times and the cell viability was evaluated by MTT assay. The membrane cell permeability was evaluated by LDH activity and PI incorporation; apoptosis was investigated by the externalization (flip-flop) of phosphatidylserine by flow cytometry and presence of autophagy was detected by LC3A/B immunostaining. The expression of apoptotic proteins and antioxidant enzymes was evaluated by qPCR.

Results. The results demonstrate that genistein selectively induced MCF-7 cell death independent of estrogen receptor activation. The anti-tumor effect of genistein involved the participation of oxidative stress, with consequent increase of pro-apoptotic BAX/Bcl-2 ratio and parallel down-regulation of anti-apoptotic survivin which, in turn, resulted in induction of apoptosis and progression of autophagy.

Conclusions. Taken together, these results suggest genistein as a potential strategy in cancer prevention and treatment due alterations in apoptotic signaling and induction of autophagy.

Keywords: MCF-7, apoptosis, autophagy, survivin, antioxidant enzymes.

1. Introduction

Breast cancer is one of the common tumors occurring in woman, characterized by a distinct metastatic pattern involving the regional lymph nodes, bone marrow, lung and liver [1]. Therapy to breast cancer includes surgery, radiotherapy, and chemotherapy [2]. Despite treatment, the majority of breast cancer is incurable and ultimately claims the life of the patient with complications and development of chemoresistance [3]. Therefore, understanding the molecular mechanism of breast carcinoma progression and the identification of new therapeutic strategies are important for effective treatment.

Soybeans products have been used as an alternative hormone replacement to overcome the undesired effects of menopause [4]. The association between the lower risk of cardiovascular/neurodegenerative diseases and cancer and the consumption of soy products has led to the widespread interest in isoflavone supplements and foods to which isoflavones have been added [5]. Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavone), a major isoflavone constituent of soybeans and soy products, has been reported to have beneficial effects to human health. Genistein is similar to the primary structure of 17- β -estradiol, exhibiting both estrogenic agonist and antagonist weak activities, which modulate estrogen-regulated gene expression [6]. Moreover, genistein can exert a variety of biological effects in an estrogen receptor independent way, including the alteration of estrogen metabolism via aromatase inhibition [7]. The metabolism of genistein includes absorption from the gastrointestinal tract and elimination in urine. Urinary levels are higher in people like the Japanese and Western vegetarians, who eat soy or other vegetables [8].

Significant amounts of genistein in human blood [8] and accumulation of this molecule in breast tissue and in milk also has been shown [9,10].

The chemopreventive and chemotherapeutic potential of genistein has been described in multiple tumor types, most notably prostate and breast cancer [11]. Genistein exerts its anti-cancer properties through several mechanisms, which include induction of apoptosis, cell cycle arrest and inhibition of angiogenesis [12,13]. This isoflavone also promotes the inhibition of protein tyrosine kinase by competing with ATP for binding to tyrosine kinase domain and thereby, decrease the cancer cell proliferation by interfere with tyrosine kinase cascade activated by mitogens [14,15]. In ovarian cancer cells, genistein not only initiated apoptosis, but also induced autophagy [16]. Autophagy is mediated by double-or multi-membrane autophagosomes and, in addition to its basic role in the turnover of proteins and organelles, this process has multiple pathophysiological functions including cell differentiation, immune defense, and cell death [17,18]. Although genistein's anti-cancer properties have been investigated in several cell types, little is known with regard to its ability to induce autophagy in breast cancer cells.

The present study examined the molecular mechanism involved in the antiproliferative effect of genistein in human MCF-7 breast cancer cell line. Our data show that genistein decreased the MCF-7 cell viability without alter LDH activity and PI up-take. The mechanism of cell death was further characterized, revealing that genistein modulated the expression of genes related to antioxidant enzymes and apoptosis, induced cell death by apoptosis and progression of autophagy. Taken together, these results suggest genistein as a potential strategy in cancer prevention and treatment due alterations in apoptotic signaling.

2. Materials and Methods

Cell culture and 17 β -Estradiol (E2) or genistein treatments. Human breast adenocarcinoma (MCF-7) and human fibroblast (CCD1059sK) cell lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA). The cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO₂. E2 and genistein (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) were dissolved in DMSO at concentration of 10 nM and 100 nM, respectively, and further diluted with DMEM/10% FBS to obtain 10 nM, final E2 concentration and 0.01, 0.1, 1, 10 or 100 μ M, final genistein concentrations. Appropriate controls containing 0.5% DMSO were performed. All experiments were performed in triplicate.

MTT cell viability assay. Cytotoxicity tests were carried out by following the colorimetric reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to formazan (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Briefly, MCF-7 or CCD1059sK cells were sub cultured into 96-well tissue culture plates containing 5 x 10³ cells per well and reaching sub-confluence after 24 h of culture. At this point, cells were exposed to E2 (10 nM) or genistein (0.01 – 100 μ M) for 24, 48 and 72 h. Appropriate controls containing 0.5% DMSO (vehicle control) were performed. Following the treatments, MTT assay was performed following manufacturer's instructions. Results were expressed as absorbance at 492 nm.

Lactate dehydrogenase assay (LDH). LDH was analyzed as a marker for cell membrane integrity to determine cell viability [19], after exposure to E2 or genistein. MCF-7 breast cancer or CCD1059sK fibroblast cells were seeded in 96-well plate at

a density of 5×10^3 cells per well in culture medium. Cells were treated with E2 or genistein as described above and LDH activity was measured in the supernatants using in vitro kinetic assay kit (Labtest, Lagoa Santa, MG, BR) in accordance with the manufacturer's instructions. The absorbance was determined at 340 nm using plate reader.

Propidium iodide assay. MCF-7 cells were sub cultured into 24-well tissue culture plates containing 20×10^3 cells per well and reaching sub confluence after 24 h of culture. Cells were treated with E2 (10 nM) or genistein (10, 100 μ M) for 72 h. Following the treatments, cells were incubated with propidium iodide (PI) (7.5 μ M) for 1 h. PI fluorescence was excited at 515-560 nm using an inverted microscope (Olympus IX71, Tokyo, Japan) fitted with a standard rhodamine filter. Images were captured using a digital camera connected to the microscope.

Annexin-V binding assay. MCF-7 cells were subcultured into 6-well tissue culture plates containing 50×10^3 cells per well and reaching sub confluence after 24 h of culture. MCF-7 cells were treated with DMSO (0.5%; vehicle control) or genistein (100 μ M) for 72 h. Control and treated cells were trypsinized, and externalized phosphatidylserine was labeled with Guava Nexin reagent (Guava Technologies) following the manufacturer's instructions. Briefly, 1×10^5 cells were incubated with annexin-V and 7-AAD in the dark at room temperature for 20 min and samples (2×10^3 cells/well) were acquired on the flow cytometry Guava Easy Cyte System. Viable (annexin⁻/7-AAD⁻), apoptotic (annexin⁺/7-AAD⁻) and late apoptotic/necrotic (annexin⁺/7-AAD⁺) cells were characterized as previously described [20].

Gene expression evaluation by real-time PCR. MCF-7 breast cancer cells were treated with DMSO (0.5%; vehicle control) or genistein (100 μ M) for 72 h and the total RNA extraction, cDNA synthesis and real-time PCR (qPCR) were carried out as

previously described [21]. Briefly, RNA samples were isolated using TRIzol Reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) and samples were DNase-treated with a DNA-free kit (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. First-strand cDNA synthesis was performed with 2 µg of RNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The qPCR reactions were run on a Strata gene Mx3005P real-time PCR system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) using specific primers for Cu, Zn-superoxide dismutase (CuZnSOD), Mn-superoxide dismutase (MnSOD), Thioredoxin reductase (TrxR), Glutathione peroxidase (GPx), BAX, Bcl-2 and Survivin described at Begnini [22].

LC3A/B Immunofluorescent staining (IF). MCF-7 breast cancer cell cultures were fixed in 10% phosphate-buffered formalin mixed with cold acetone and washed three times for 10 min in PBS. Cells were then incubated in 7% FBS prepared in PBS containing 0.2% Tween-20 for 45 min at room temperature. These sections were incubated 90 min at room temperature with the primary anti body rabbit monoclonal anti-LC3A/B (1:200) (Epitomics, Inc., Burlingame, CA, USA) diluted in 7% FBS prepared in PBS containing 0.2% Tween-20. They were then incubated with FITC-conjugated goat anti-rabbit (1:1000) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD, USA) for 60 min at room temperature. Sections were counterstained with DAPI blue (1:10000) for 5 min at room temperature. Images were captured using a digital camera connected to the microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

Statistical analysis. Data were expressed as mean $\pm$ SD and were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer post-hoc test (for multiple comparisons). The statistical significance between DMSO-treated and genistein-treated groups and other two-group analyses were carried out by means of unpaired Student's t test (Prism GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences between mean values were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

Genistein selectively decreases the MCF-7 breast cancer cell line viability but not in CCD1059sK fibroblast cells. We determine the genistein effect on viability of breast cancer cells by exposing MCF-7 cell line to increasing genistein concentrations (0.01 - 100 μ M) for 24, 48 and 72 h. E2 (10 nM) was used to compare its actions with genistein. At the end of incubations, MTT and LDH assays were performed. In parallel, CCD1059sK fibroblast cells were used as a non-transformed cell model in order to evaluate the selectivity of genistein. As shown in Figure 1, exposition of MCF-7 to genistein at concentrations ranging from 1.0 to 100 μ M for 72 h resulted in a decrease of cell viability by $\sim$ 40% compared to untreated cells (Fig. 1C), whereas fibroblast viability was not significantly altered at same condition (Fig. 2). In addition, the treatment with E2 (10 nM) did not promote significant alterations on MCF-7 or CCD1059sK cell growth (Fig. 1 and 2). These results suggest that genistein target selectively cancer cells and that this effect is estrogenic receptor independent.

In contrast with the decreases in cancer cell viability, genistein did not promote a significant leakage of LDH into culture medium (Fig. 3A and B), indicating no

alterations in cell membrane integrity. In addition, the membrane cell permeability was also evaluated by PI incorporation. As show in Figure 4, genistein (10 and 100 μ M) exposure for 72 h promoted a marked decrease in the cell density and significant morphological alterations, mainly at higher genistein concentration (100 μ M), including cell detachment and vesicle formation. However, no PI incorporation was observed in MCF-7 treated cells. These results suggest that the anti-proliferative effect of genistein is not mediated by necrosis and that other cell death pathway such as apoptosis and/or autophagy may be involved.

Genistein promotes MCF-7 cell death via apoptosis and autophagy-dependent pathways. To better evaluate the mechanisms involved in the suppression of cancer cell proliferation, MCF-7 cells were exposed to genistein (100 μ M) for 72 h and then the externalization (flip-flop) of phosphatidylserine and/or PI staining were evaluated by flow cytometry (Fig. 5). Genistein promoted a reduction by ~40% of MCF-7 viable cells and elicited early apoptosis in 10% cell population (Annexin⁺/PI⁻), necrosis in 12% (Annexin⁻/PI⁺) and late apoptosis in majority of MCF-7 cells, totalizing 27% of death cells (Annexin⁺/PI⁺). Recent studies point to the cross-talk between apoptosis and autophagy in the cell death regulation and its relevance in either pro-or antitumor effects mediated by phytochemicals, as genistein [11]. Based in the morphology changes promoted by genistein in MCF-7 cells (Fig. 4) and in the genistein potential to induce autophagy in ovary and colon cancer cells [16,23], the expression of microtubule-associated protein-1 light chain-3 (LC3) was evaluated by immunofluorescent staining. During autophagy, conversion of LC3-I to LC3-II is an essential process for the autophagosomes formation, making the expression of LC3A/B an indicator of autophagy [24]. As shown in Figure 6, the presence of LC3-positive puncta characteristic of autophagosome formation [25], was observed in the

MCF-7 cells exposed to genistein (100 μ M) for 72 h, while no LC-3 positive staining was observed in control or E2 (10 nM) treated cells. Taken together, these results suggest that genistein induced MCF-7 cell death by modulating apoptosis and autophagy pathways.

Genistein modulates apoptotic- and antioxidant-related gene expression in MCF-7. To further investigate the mechanisms of genistein-induced MCF-7 cell death, the gene expression of anti/pro-apoptotic and antioxidant enzymes in treated and control cancer cells was assessed by qPCR. When compared to control, genistein (100 μ M) treatment for 72 h did not alter significantly the expression of BAX and Bcl-2, a pro- and anti- apoptotic genes, respectively (data not shown). However, genistein promoted a 3 times increase of BAX/Bcl-2 ratio and an important reduction of 20 times of anti-apoptotic survivin (Fig. 7A). The expression of caspase 3, 8 and 9 was not altered by treatment suggesting that the genistein-induced MCF-7 apoptosis is caspase-independent (data not shown). In addition, genistein also altered the antioxidant enzyme expression. As shown in Figure 7B, this isoflavone reduced the expression of CuZnSOD, MnSOD, and Thioredoxin reductase (TrxR) by 9.3, 5.5 and 3.6 times, respectively, while the expression of Glutathione Peroxidase (GPx) was increased by 6.5 times. Importantly, TrxR up-regulation and GPx down-regulation have been related to breast cancer progression [26,27] and the modulation of the enzyme expression by genistein may be involved in MCF-7 cell death. Moreover, these results suggest that the effect of genistein on MCF-7 cell death may be dependent on both modulation of pro/anti-apoptotic gene expression and alterations on redox state of cancer cells.

4. Discussion

The present work demonstrates a novel function of genistein in the control of breast cancer progression. First, we investigated the effect of genistein on MCF-7 and CCD1059sK fibroblast cell viability. While no alterations were observed in fibroblast cells, genistein treatment reduced selectively MCF-7 cell viability. Well so characterized the cell death pathway involved in anti-tumor activity of genistein. Genistein treatment did not promote alterations on MCF-7 cell membrane integrity suggestive of necrosis, as evidenced by the lack of LDH release and PI incorporation. We further demonstrate that the anti-tumor effect of genistein was due to apoptosis induction and progression of autophagy via down-regulation of anti-apoptotic survivin, up-regulation of BAX/Bcl-2 ratio and alterations on redox state of cancer cells.

Mounting evidence links the intake of isoflavones in soy rich foods to lower rates of prostate and breast cancers in Asian countries than in Western population [5,28]. Genistein is the predominant isoflavone found in soybean enriched foods and, in addition to its anti-cancer properties, genistein has an excellent bioavailability via oral administration and safety use for clinical transition [29]. In line with this information, we started our work evaluating the anti-tumor activity of genistein in MCF-7 breast cancer. Genistein reduced selectively the MCF-7 cell viability, while no cytotoxicity was observed in CCD1059sK fibroblast cells or in E2-treated cells. Genistein is structurally similar to E2, binding with higher affinity to estrogen receptor β (ER β) than to estrogen receptor α (ER α) [30]. MCF-7 cell line applied in this study is ER α -positive/ER β -negative breast cancer [31]. Therefore, considering the lack of

E2 effect on the analyzed parameters, the anti-tumor effect of genistein may be independent of nuclear receptor pathways.

The mechanisms involved in genistein anti-tumor activity were further investigated. Genistein induced cancer cell death preferentially by apoptosis and progression of autophagy. We speculate that genistein anti-tumor activity was linked to modulation of anti- and pro-apoptotic protein expression, including BAX, Bcl-2 and survivin. Accordingly, genistein promoted an increase in BAX/Bcl-2 ratio and a parallel decrease of anti-apoptotic survivin. These data are in agreement to evidence suggesting that BAX/Bcl-2 expression ratio is more decisive to apoptosis outcome than the expression level of each Bcl-2 member isolated [32]. Moreover, survivin down-regulation by genistein was already reported in other tumor kinds [33] and may be of therapeutic interest. Indeed, survivin plays an essential role in the regulation of cell cycle and apoptosis and its differential expression in cancer cells have been related to increased tumor malignity and progression [34].

In accordance with the role of poly phenols in modulation of anti- and pro-oxidant defenses [35], we observed that treatment with genistein markedly reduced the expression of antioxidant enzymes, namely CuZnSOD, MnSOD and TrxR while the GPx expression was increased. These data suggest that genistein induces disequilibrium in the antioxidant response, which may favor an oxidative stress in MCF-7 with consequent apoptosis and autophagy induction. These results are in agreement with recent works showing that the apoptosis and autophagy induction by natural compounds in MCF-7 cells was associated with reactive oxygen species and it was prevented by the over expression of CuZn-SOD/Mn-SOD or by treatment with antioxidant molecules [36,37]. Importantly, genistein also modulated the TrxR and GPx expression. The differential expression of these antioxidant enzymes are known

to promote tumor progression [38,39,40]. TrxR is one of main components of thiol reducing system and its high expression has been associated with worst prognosis in human breast cancer. By other hand, low levels of GPx expression has been reported in cancer tissues [40,41]. Therefore, TrxR down-regulation and GPx up-regulation by genistein could be a therapeutic alternative not only for breast cancer, but also to other tumors that exhibit alterations on antioxidant enzymes.

In conclusion, our results demonstrate that genistein selectively induced MCF-7 cell death independent of estrogen receptor activation. The anti-tumor effect of genistein involved the participation of oxidative stress, with consequent increase of pro-apoptotic BAX/Bcl-2 ratio and parallel down-regulation of anti-apoptotic survivin which, in turn, resulted in induction of apoptosis and progression of autophagy. In addition, the ability of genistein to differentially modulate the expression of survivin, TrxR and GPx may be a therapeutic alternative. Although further studies are necessities to examine the autophagy and apoptotic process induced by genistein in an *in vivo* breast cancer model, the data reported here reinforce the potential of dietary phytochemicals as novel strategy in cancer prevention and treatment.

5. Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian funding agencies: CNPq-Brazil; Capes-PROAP and FAPERGS

6. References

- [1] Singh D, Joshi DD, Hameed M, Qian J, Gascon P, et al. Increased expression of preprotachykinin-I and neurokinin receptors in human breast cancer cells: Implications for bone marrow metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:388-393
- [2] Grover PL, and Martin FL. "The initiation of breast and prostate cancer," *Carcinogenesis*. 2002;23(7):1095-1102
- [3] Sui M, Zhang H, Fan W. The role of estrogen and estrogen receptors in chemoresistance. *Curr Med Chem*. 2011;18(30):4674-83.
- [4] Gencel VB, Benjamin MM, Bahou SN, Khalil RA. Vascular effects of phytoestrogens and alternative menopausal hormone therapy in cardiovascular disease. *Mini Rev Med Chem*. 2012;12(2):149-74.
- [5] Peto J. "Cancer epidemiology in the last century and the next decade," *Nature*. 2001;6835(411):390-395.
- [6] Makiewicz L, Garey J, Adlercreutz H, Gurbide E. In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1993;45:399-405.
- [7] Kao Y, Zhou C, Sherman M, Laughton CA, Chen S. Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: a site-directed mutagenesis study, *Environ. Health Perspect.* 1998;106:85-92.
- [8] Adlercreutz H, Honjo H, Fotsis T, Hamalainen E, Hasegawa T, Okada H. Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming traditional Japanese diet. *Am J Clin Nutr.* 1991;54:1093-1100.
- [9] Setchell KDR, Lawson AM, Mitchell FL, Adlercreutz H, Kirk DN, Axelson M. Lignans in man and animal species. *Nature*. 1980;287:74-742.

- [10] Setchell KDR, Borriello SP, Huhne P, Kirk DN, Axelson M. Nonsteroidal estrogen of dietary origin: possible roles in hormone dependent disease. *AmJ Clin Nutr.* 1984;40:569-578.
- [11] Sanjeev B, Yiwei I, Zhiwei W, and Fazlul HS. Multi-Targeted Therapy of Cancer by Genistein. *Cancer Lett.* 2008;269(2):226-242.
- [12] Yu Z, Li W, Liu F. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells. *Cancer Lett.* 2004;215:159-66.
- [13] Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H. Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:2690-4.
- [14] Shao ZM, Wu J, Shen ZZ, Barsky SH. Genistein exerts suppressive effects on human breast carcinoma cells, *Cancer Res.* 1998;58:4851-4857.
- [15] Hoffman R. Potent inhibition of breast cancer cell lines by the isoflavonoid kievitone: comparison with genistein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995;211(2):600-606.
- [16] Gossner G, Choi M, Tan L, Fogoros S, Griffith KA, Kuenker M, Liu JR Genistein-induced apoptosis and autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol.* 2007;105(1):23-30.
- [17] Yoshimori T. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;313:453-8
- [18] Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science.* 2000;290:1717-21.
- [19] Decker T, and Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactated hydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J. Immunol. Methods.* 1998;15:61-69.

- [20] Casciola-Rosen L. et al. Auxotrophic recombinant *Mycobacterium bovis* BCG overexpressing Ag85B enhances cytotoxicity on superficial bladder cancer cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996;93:1624-1629.
- [21] Chang SH, Ying J, Zhang JJ, Su JY, Zeng YJ, Tong YP, Li B, Li ZS. Expression of a Wheat S-like RNase (WRN1) cDNA during natural- and dark-induced senescence. *Acta Botanica Sinica.* 2003;45(9):1071-1075.
- [22] Begnini KR, Rizzi C, Campos VF, Borsuk S, Schultze E, Yurgel VC, Nedel F, Dellagostin OA, Collares T, Seixas FK. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97(4):1543-52.
- [23] Nakamura Y, Yogosawa S, Izutani Y, Watanabe H, Otsuji E, Sakai T. A combination of indol-3-carbinol and genistein synergistically induces apoptosis in human colon cancer HT-29 cells by inhibiting Akt phosphorylation and progression of autophagy. *Mol Cancer.* 2009;12(8):100.
- [24] Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy.* 2007;3:542-5.
- [25] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000;19:5720-8.
- [26] Hsieh TC, Elangovan S, Wu JM. Differential suppression of proliferation in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells exposed to alpha-, gamma- and delta-tocotrienols is accompanied by altered expression of oxidative stress modulatory enzymes. *Anticancer Res.* 2010;30(10):4169-76.
- [27] Wong YS, Liu C, Liu Z, Li M, Li X, Ngai SM, Zheng W, Zhang Y, Chen T. Enhancement of Auranofin-Induced Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cells by

Selenocystine, a Synergistic Inhibitor of Thioredoxin Reductase. PLoS One.

2013;8(1):e53945.

[28] Banerjee S, Li Y, Wang Z, and Sarkar FH. Multi-Targeted Therapy of Cancer by Genistein. Cancer Lett. 2008;269(2):226-242.

[29] Cassidy A, Faughnan M: Phyto-oestrogens through the life cycle. Proc Nutr Soc. 2000;59:489-496.

[30] Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, Saag PT Van Der, Burg B Van Der, Gustafsson JA: Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor α . Endocrinology. 2004;139:4252-63.

[31] Brandes LJ, Hermonat MW. Receptor status and subsequent sensitivity of subclones of MCF-7 human breast cancer cells surviving exposure to diethylstilbestrol. Cancer Res. 1983;43(6):2831-5.

[32] Gajewski TF, Thompson CB. Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence Cell. 1996;87:589-592.

[33] Ahmad A, Sakr WA, Rahman KM. Novel targets for detection of cancer and their modulation by chemopreventive natural compounds. Front Biosci (Elite Ed). 2012;1(4):410-25.

[34] Waligórska-Stachura J, Jankowska A, Waśko R, Liebert W, Biczysko M, Czarnywojtek A, Baszko-Błaszcyk D, Shimek V, Ruchała M. Survivin--prognostic tumor biomarker in human neoplasms--review. Ginekol Pol. 2012;83(7):537-40.

[35] Firuzi O, Miri R, Tavakkoli M, Saso L. Antioxidant therapy: current status and future prospects. Curr Med Chem. 2011;18(25):3871-88.

[36] Chandra-Kuntal K, Lee J, Singh SV. Critical role for reactive oxygen species in apoptosis induction and cell migration inhibition by diallyltrisulfide, a cancer chemopreventive component of garlic. Breast Cancer Res Treat. 2013;138(1):69-79

- [37] Shi JM, Bai LL, Zhang DM, Yiu A, Yin ZQ, Han WL, Liu JS, Li Y, Fu DY, Ye WC. Saxifragifol in D induces the interplay between apoptosis and autophagy in breast cancer cells through ROS-dependent endoplasmic reticulum stress. *Biochem Pharmacol.* 2013;2952(13)46.
- [38] Okuno T, Miura K, Sakazaki F, Nakamuro K, Ueno H. Methylseleninic acid (MSA) inhibits 17 β -estradiol-induced cell growth in breast cancer T47D cells via enhancement of the antioxidative thioredoxin/thioredoxin reductase system. *Biomed Res.* 2012;33(4):201-10.
- [39] Karlenius TC, Shah F, Di Trapani G, Clarke FM, Tonissen KF. Cycling hypoxia up-regulates thioredoxin levels in human MDA-MB-231breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;419(2):350-5.
- [40] Agnani D, Camacho-Vanegas O, Camacho C, Lele S, Odunsi K, Cohen S, Dottino P, Martignetti JA. Decreased levels of serum glutathione peroxidase 3 are associated with papillary serous ovarian cancer and disease progression. *J Ovarian Res.* 2011;22(4):18.
- [41] Björkhem-Bergman L, Ekström L, Eriksson LC. Exploring anticarcinogenic agents in a rat hepatocarcinogenesis model--focus on selenium and statins. *In Vivo.* 2012;26(4):527-35.

Legends to figures

Figure 1. Effect of genistein treatment on MCF-7 cell viability. Cell cultures were exposed to E2 (10 nM) or to increasing genistein concentrations (0.01 – 100 μ M) for 24, 48 and 72 h, and the cell viability was assessed by the MTT. Appropriate controls containing 0.5% DMSO were performed. The values represent the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey-Kramer test). **Significantly different from Control or E2 treated cells ($P < 0.01$).

Figure 2. Effect of genistein treatment on CCD1059sK fibroblast cell viability. Cell cultures were exposed to E2 (10 nM) or to increasing genistein concentrations (0.01 - 100 μ M) for 24, 48 and 72 h, and the cell viability was assessed by the MTT. Appropriate controls containing 0.5% DMSO were performed. The values represent the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey-Kramer test).

Figure 3. Effect of genistein treatment on LDH release by cancer and fibroblast cell cultures. **(A)** MCF-7 and **(B)** CCD1059sK fibroblast cell cultures were exposed to E2 (10 nM) or to increasing genistein concentrations (0.01 - 100 μ M) for 72 h, and the cell linkage was assessed by LDH release in the culture medium. Appropriate controls containing 0.5% DMSO were performed. The values represent the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey-Kramer test).

Figure 4. Propidium iodide incorporation in MCF-7 cells following genistein treatment. Cell cultures were exposed to E2 (10 nM) or to genistein (10 or 100 μ M) and after 72h of treatment the cells were incubated with PI diluted in culture medium. Fluorescence (right panel) and phase contrast (left panel) microphotographs were taken using an Olympus inverted microscope. Arrows indicate morphologic changes, including cell detachment and vesicle formation in MCF-7 cells following 100 μ M genistein exposure (20x magnification; insert 40x magnification).

Figure 5. Analysis of genistein effect on MCF-7 cell death. Cell cultures were exposed to genistein (100 μ M) for 72 h and the MCF-7 cell death was evaluated by Annexin V-FITC bound phosphatidylserine and red fluorescence of DNA-bound PI in individual breast cancer cells by flow cytometry as described in Materials and methods. The values represent the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments. Data were analyzed by Student's t test. *Significantly different from Control cells ($P < 0.05$).

Figure 6. Detection of autophagosomes in MCF-7 following genistein treatment. Cell cultures were exposed to E2 (10 nM) or genistein (100 μ M) for 72 h and were subjected to LC3A/B immunostaining, as described in material and methods. Note the presence of LC3A/B expression in genistein treated MCF-7 cells (arrows), while no staining was seen in control or E2 treated cells (magnification 40x).

Figure 7. Analysis of apoptotic- and antioxidant-related gene expression in genistein-treated MCF-7 cells. Cancer cell cultures were treated with genistein (100 μ M) for 72 h and the gene expression was evaluated by qPCR as described in material and methods. **(A)** Anti-apoptotic Bcl-2 and survivin; pro-apoptotic BAX; **(B)** Antioxidant enzymes: CuZnSOD, MnSOD, Thioredoxin reductase (TrxR), Glutathione peroxidase (GPx). The values represent the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments. Data were analyzed by Student's t test. *, ***Significantly different from Control cells ($P < 0.05$; $P < 0.001$).

Figure 1

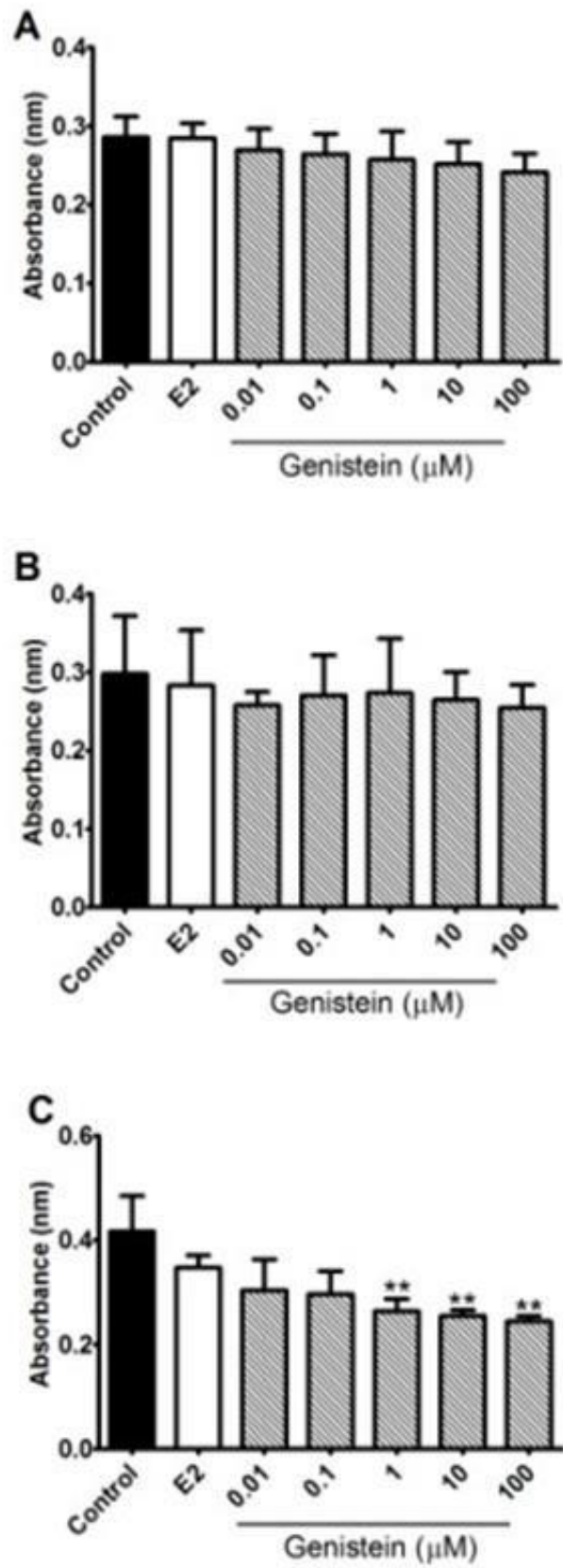


Figure 2

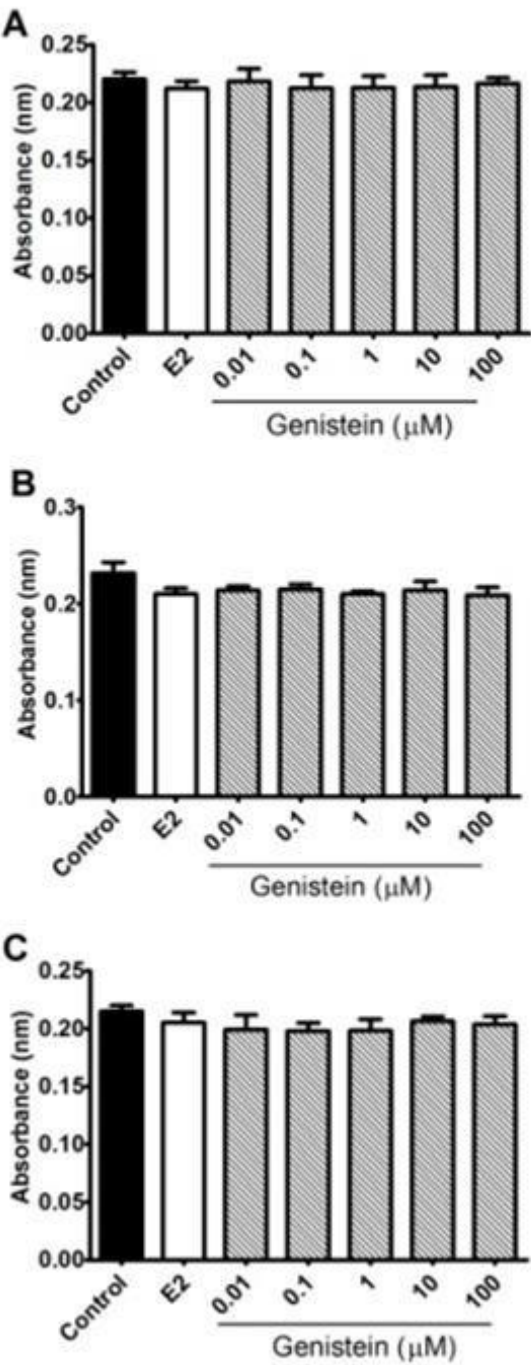


Figure 3

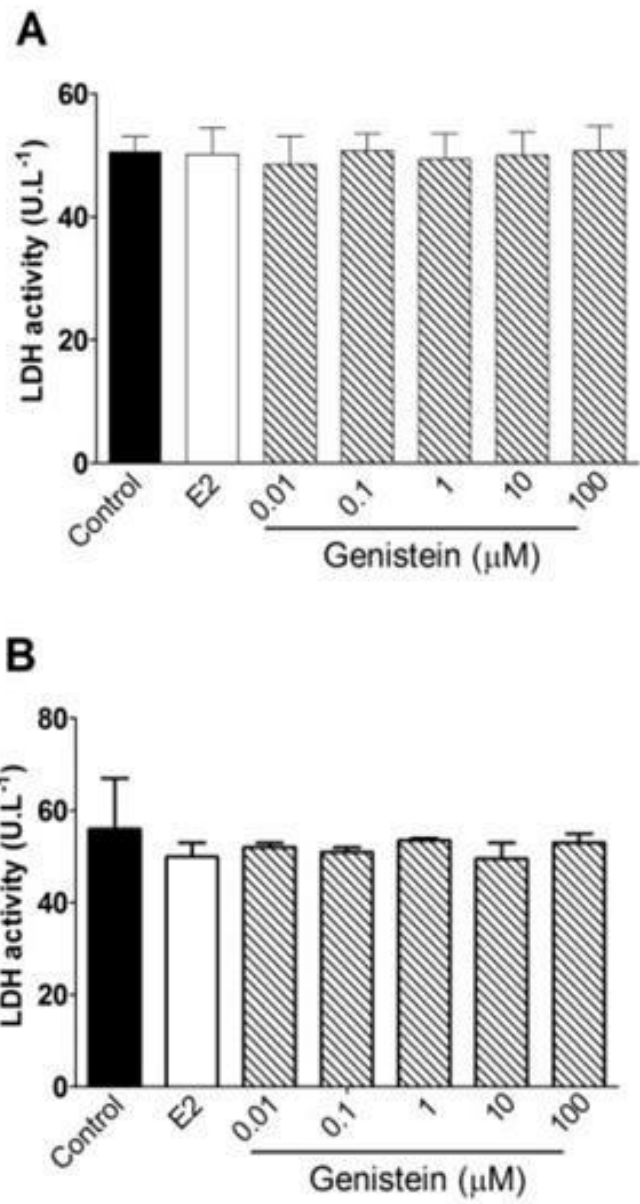
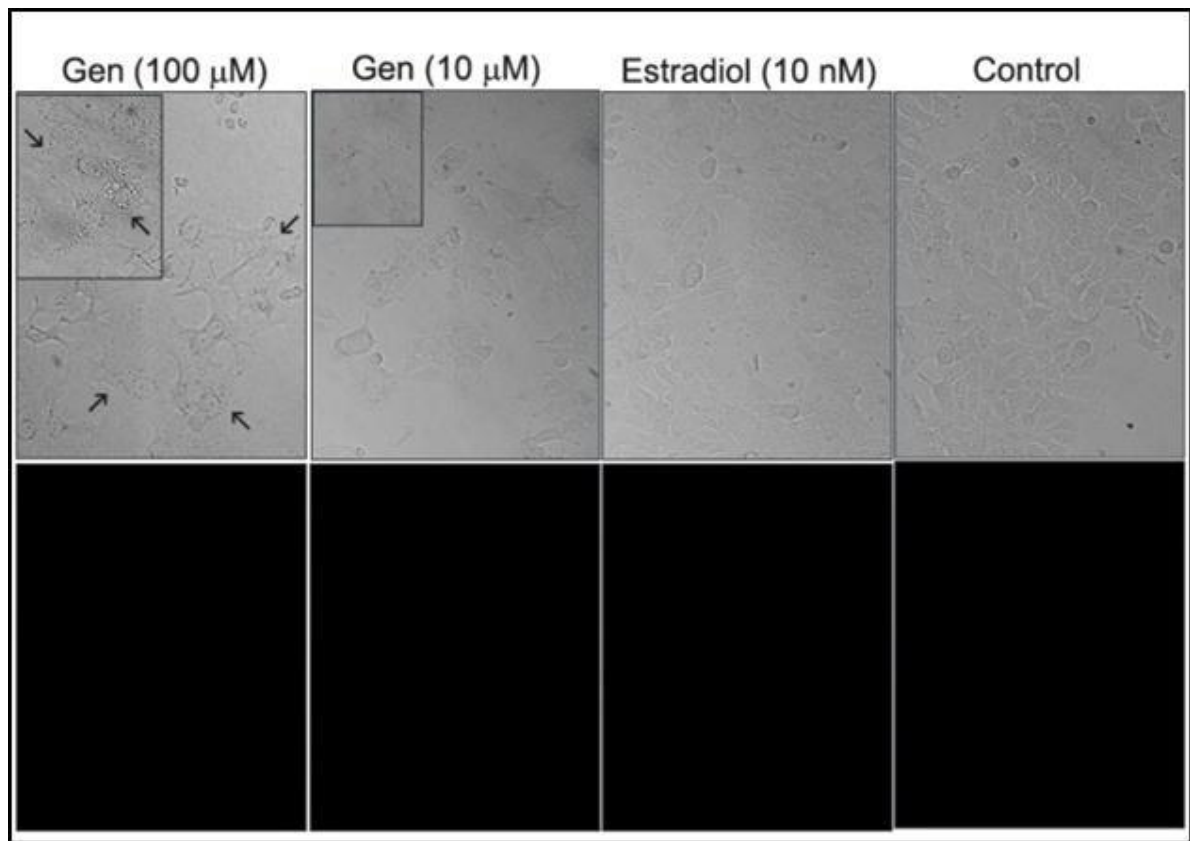


Figure 4



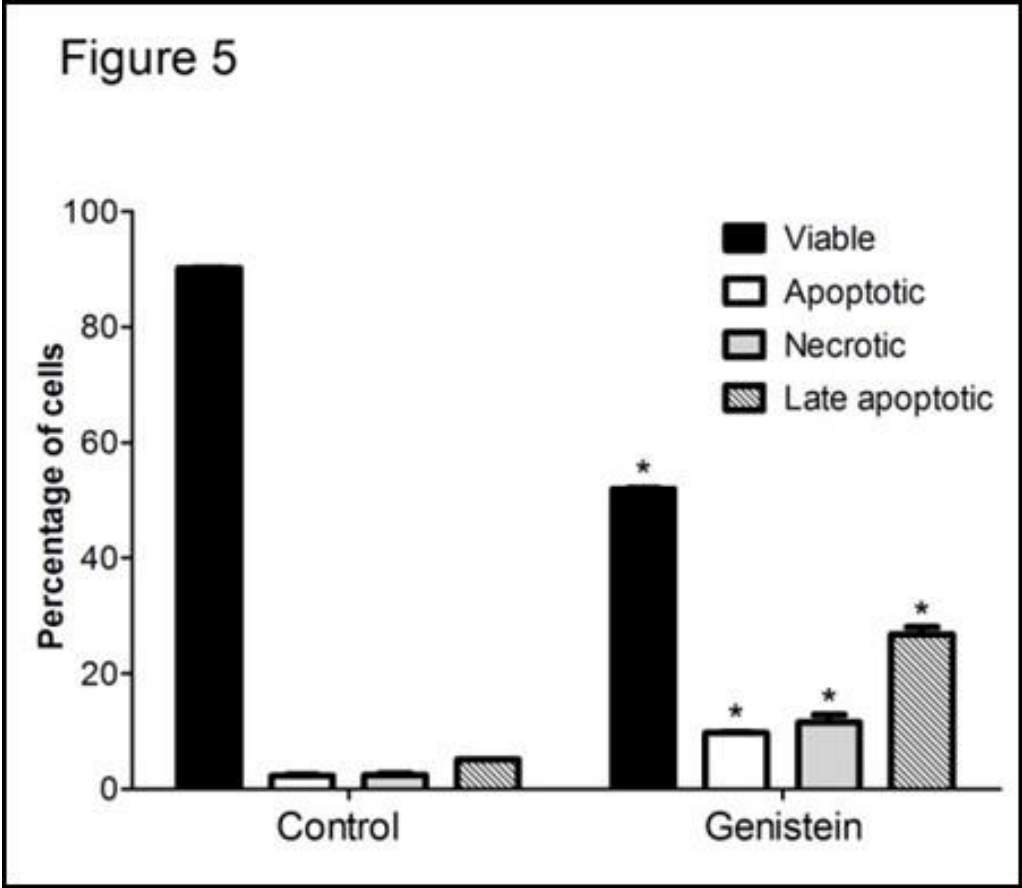
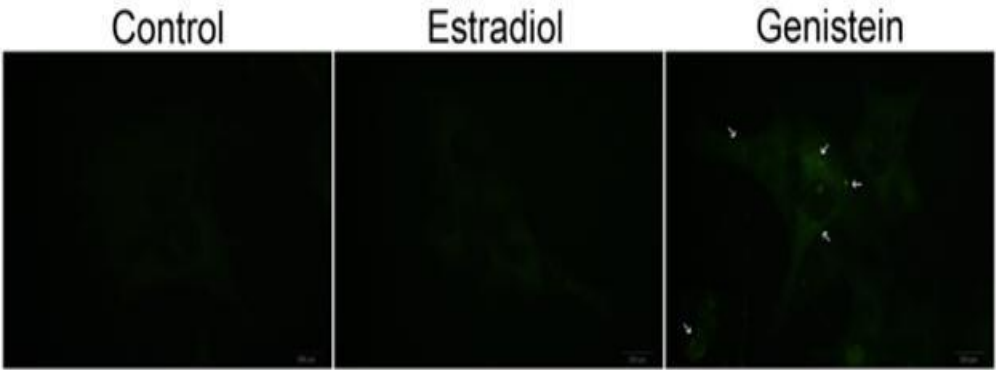
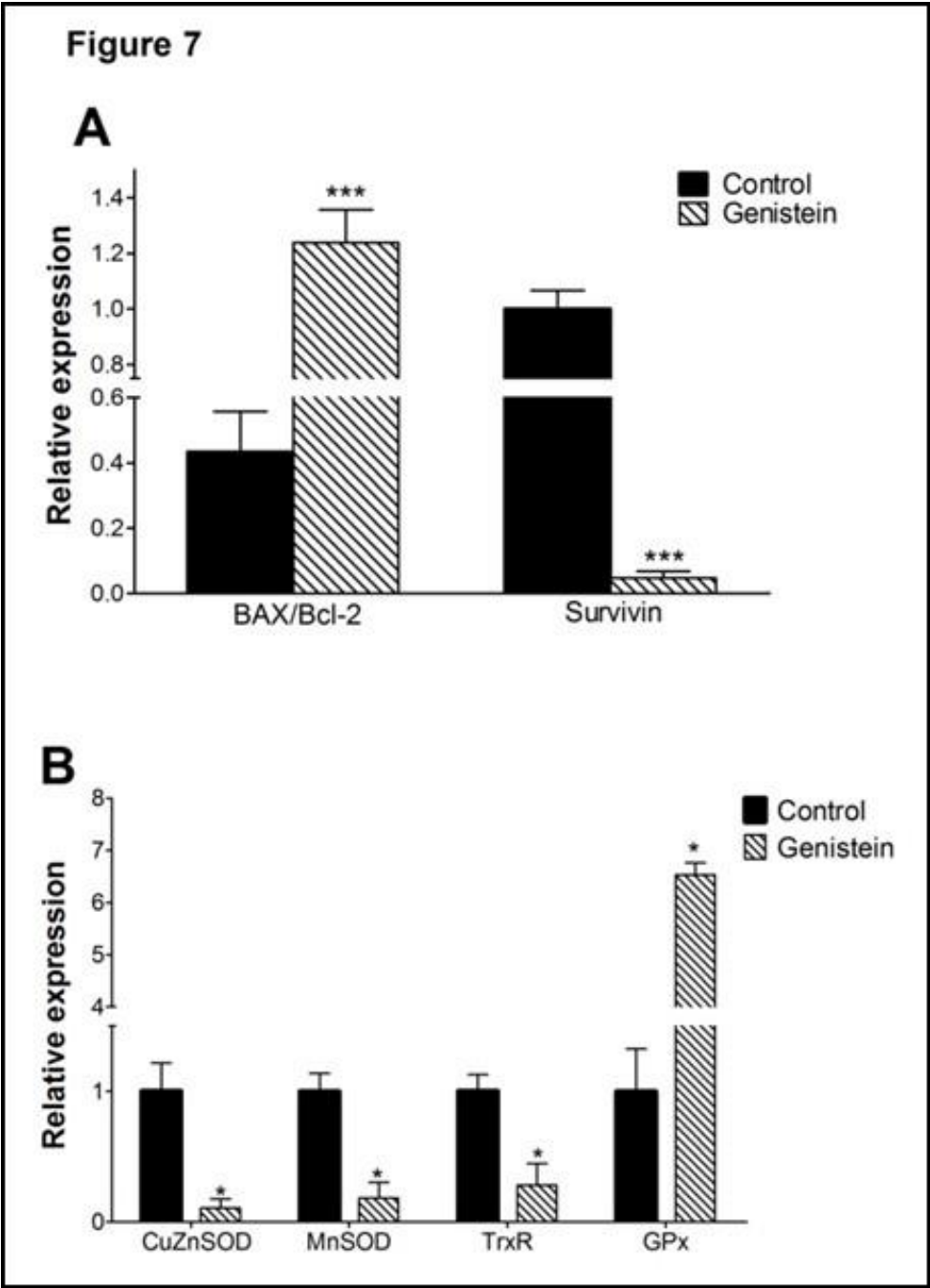


Figure 6





5 CONCLUSÃO GERAL

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum especialmente entre as mulheres. Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos na gênese desse processo neoplásico, bem como na busca de novas alternativas terapêuticas propiciando uma melhor sobrevida para os pacientes.

De uma forma geral, os fitoestrógenos têm recebido destaque pelos efeitos benéficos a saúde e pela suposta baixa incidência de efeitos colaterais e inibição do processo carcinogênico. Uma das principais fontes de fitoestrógenos da dieta são os alimentos derivados da soja. Esse grão é rico em isoflavonas, uma classe de fitoestrógeno com potente atividade biológica, sendo a molécula representante a genisteína. A genisteína é um agonista exógeno de receptores estrogênicos, apresentando um baixo efeito hormonal e um potente efeito antioxidante, o qual é independente de receptores estrogênicos. Entre as ações benéficas da genisteína estão incluídas: ação antitumoral, neuroprotetora, cardioprotetora, além de prevenir a osteoporose e contornar os efeitos indesejados da menopausa. A genisteína, um fitoestrógeno, tem atraído interesse científico para os seus possíveis benefícios na prevenção de diversas doenças, incluindo o câncer.

A análise da cultura celular MCF-7 revelou alterações morfológicas características de morte celular por apoptose seguido de autofagia. Interessantemente, a genisteína não alterou a viabilidade de culturas de fibroblasto. Os achados apontam a genisteína como uma inibidora seletiva da proliferação tumoral. Os dados indicam que a morte celular induzida pela genisteína ocorre por um processo independente de necrose, uma característica desejada para uma molécula de ação antitumoral, já que se caracteriza por uma morte limpa. Estudos

estão em curso para melhor caracterizar os mecanismos sinalizadores de morte tumoral.

REFERÊNCIAS

ABLER, A. et al. Genistein differentially inhibits post receptor effects of insulin in rat adipocytes without inhibiting the insulin receptor kinase. **J Biol Chem**, n.267, p.3946-51, 1992.

ADLERCREUTZ, H. Phyto-oestrogens and cancer. **Lancet Oncol**, v.3, p.364-73, 2002.

AE PARK, S. et al. Genistein and daidzein modulate hepatic glucose and lipid regulating enzyme activities in C57BL/KsJ-db/db mice. **Life Sci**, n.79, p.1207-13, 2006.

AGO, T. SADOSHIMA, J. Thioredoxin and ventricular remodeling. **J. Moll Cell Cardiol.**, v.41, p.762-73, 2006.

AHSAN, M. K. et al. Redox regulation of cell survival by the trioredoxin superfamily: an implication of redox gene therapy in the heart. **Antioxid Redox Signal**, v.11, n.11, p.2741-58, 2009.

ALBERTAZZI, P.; PURDIE, D. W. The nature and utility of phytoestrogens: a review of the evidence. **Maturitas**, v.42, p.173-85, 2002.

ALONSO, J. **Consumo de fitoestrógenos na dieta da população**. Fitoestrógenos e Menopausa. 2007. (Pós-graduação de Fitomedicina). Faculdade de Medicina. Buenos Aires: Universidade de Buenos Aires, p.17-18.

ANJO, D. L. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v.3, n.2, p.145, 2004.

ARORA, A.; NAIR, M. G.; STRASBURG, M. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. **Arch Biochem Biophys**, v.356, n.2, p.133-4, 1998.

ARJMANDI, B. H.; ALEKEL, L.; HOLLIS, B. W. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model off osteoporosis. **J. Nutr.**, v.126, p.161-7, 1996.

BANERJEE, S. et al. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. **Cancer Lett.**, v.269, p.226-42, 2008.

BANZ, W. et al. Soy isoflavones modify liver free radical scavenger systems an liver parameters in Sprague-Dawley rats. **J Med Food**, v.7, p.477-81, 2004.

BARNES, S. et al. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. **J Nutr.**, v.125, p.777-83, 1995.

BARNES, S.; PETERSON, T. G. Biochemical targets of the isoflavone genistein in tumor cell lines. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.208, p.103-7, 1995.

BARNES, S.; SFAKIANOS, J.; COWARD, L. Soy isoflavonoids and cancer prevention. Underlying biochemical and pharmacological issues. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v.401, p.87-100, 1996.

BENNETTS, H. W.; UNDERWOOD, E. J.; SHIER, F. L. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. **Aust. Vet. J.**, v.22, p.2-12, 1946.

BENTREM, D. et al. Distinct molecular conformations of the estrogen receptor alpha complex exploited by environmental estrogens. **Cancer Res**, v.63, p.7490-96, 2003.

BLANKENBERG, S. et al. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. **N. Engl. J. Med.**, v.349, p.1605-13, 2003.

BOREK, C. Dietary antioxidants and human cancer. **Integr Cancer Ther**, v.3, n.4, p.333-41, 2004.

BREINHOLT, V.; LAURIDSEN, S. T.; DRAGSTED, L. O. Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. **Xenobiotica**, v. 29, n.12, p.1227-1240, 1999.

CAAN, B. J. Soy food consumption and breast cancer prognosis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.20, p.854-8, 2011.

CAI, Q.; WEI, H. Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCA mice. **Nutr Cancer**, v.25, p.1-7, 1996.

CAMPBELL, R. A. et al. **Biol. Chem**, v.276, p.9817-24, 2002.

CANCER OF THE BREAST. In: DEVITA, V. T.; HEFFMAN, S.; ROSENBERG, A. S. **Cancer Principles and Practice of Oncology**. Lippincott-Raven Publishers, 5. ed. Phyladelphia, NY, 1997.

CEDERROTH, C. R.; NEF, S. Soy, phytoestrogens and metabolism: a review. **Mol. Cell. Endocrinol**, v.304, p.30-42, 2009.

CHIECHI, L. M. et al. The effect of soy rich diet on the vaginal epithelium in postmenopause: a randomized double blind trial. **The European Menopause Journal**, v.45, n.4, p.241-6, 2003.

CHOI, M. S. et al. Genistein and daidzein prevent diabetes onset by elevating insulin level and altering hepatic gluconeogenic and lipogenic enzyme activities in non-obese diabetic (NOD) mice. **Diabetes Metab. Res. Rev.**, v.24, p.74-81, 2008.

CHUNG, T. K. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study on the effect of oral o estradiol on acute menopausal symptoms. **Maturitas**, v.25, p.115-23, 1996.

CIGNARELLA, A.; KRATZ, M.; BOLEGO, C. Emerging role of estrogen in the control of cardiometabolic disease. **Trends Pharmac. Sci**, v.31, n.4, p.183-9, 2010.

CLAPAUCH, R. et al. Fitoestrógenos: Posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina na Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.46, n.6, p.669-95, 2002.

COLDITZ, G. A. et al. Family history and risk of breast cancer: nurses' health study. **Breast Cancer Res Treat**, v.133, n.3, p.1097-104, jun. 2012.

CONKLIN, K. A. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact in chemoterapeutic effectiveness. **Integr Cancer Ther**, v.3, n.4, p.294-300, 2004.

COUTURIER, J. et al. Diagnosis of HER2 gene amplification in breast carcinoma. **Pathol Biol (Paris)**, v.56, n.6, p.375-9, sep. 2008.

DESPAIGNE, D. et al., Fitoestrógenos y su utilidad para el tratamiento del síndrome climatérico. **Rev. Cubana Endocrinol**, v.12, p.128-31, 2001.

DIXON, R. A.; FERREIRA, D. Genistein. **Phytochemistry**. v.60, p.205-11, 2002.

DONG, J. Y.; GIN, L. Q. Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence: a meta-analysis of prospective studies. **Breast Cancer Res Treat**, v.125, p.315-23, 2011.

DUGAS, J. R. et al. Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. **Journal of natural products**, Cincinnati, v.63, p.327-31, 2000.

DUMITRESCU, R. G.; COTARLA, I. Underestimating breast cancer risk - where do we stand in 2005? **J Cell Mol Med**, v.9, p.208-21, 2005.

EDEAS, M. Anti-oxidants, controversies and perspectives: how can the failure of clinical studies using anti-oxidants be explained? **J Soc Biol**, v.203, n.3, p.271-80, 2009.

FELIPPE, J. J. Tratamento do câncer com medidas e drogas que inibem o fator de transcrição nuclear NF-kappaB. **Revista Eletrônica da Associação Brasileira de Medicina Complementar**. 2004. Disponível em: <www.medicinacomplementar.com.br>. Acesso em: fev. 2013.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. **Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing**. *Nature*, v.408, n.9, p.239-246, 2000.

FU, Z. et al. Genistein induces pancreatic beta-cell proliferation through activation of multiple signaling pathways and prevents insulin deficient diabetes in mice. **Endocrinology**, v.151, p.3026-37, 2010.

GERMANO, S.; O'DRISCOLL, L. Breast cancer: understanding sensitivity and resistance to chemotherapy and targeted therapies to aid in personalized medicine. **Curr Cancer Drug Targets**, v.9, p.398-418, 2009.

GRISSA, O. et al. Antioxidant status and circulating lipids are altered in human gestational diabetes and macrosomia. **Transl Res.**, v.150, p.164-71, 2007.

GUHA, N. et al. Soy isoflavones and risk of cancer recurrence in a cohort of breast cancer survivors: the Life After Cancer Epidemiology study. **Breast Cancer Res Treat**, v.118, p.395-405, 2009.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1264p.

HALLIWELL, B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free Radical Research**, v.25, p.57-74, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press, 2007. 851p.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochem.**, v.55, n.6, 2000.

HARLAN, L. C. et al. Adjuvant therapy for breast cancer: practice patterns of community physicians. **J. Clin. Oncol.**, v.20, p.1809-17, 2002.

HEDBLAD et al. Incidence of cardiovascular disease cancer and death in postmenopausal women affirming use of hormone replacement therapy. **Scand J. Public Health**, v.30, p.12-9, 2002.

HENRY, N. L.; HAYES, D. F. Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring, and treatment of primary and metastatic breast cancer. **Oncologist**, v.11, n.6, p.541-52, jun. 2006.

HOOPER, L. et al. Effects of soy protein and isoflavones on circulating hormone concentrations in pre- and post-menopausal women: a systematic review and meta-analysis. **Hum Reprod Update**, v.15, p.423-40, 2009.

HOWES, J.B.; HOWES, L.G. Content of isoflavone-containing preparations. **Med. J. Aust.**, v.176, p.135-6, 2002.

HUAN-LING. et al. **Neuroprotective effects of genistein and folic acid on apoptosis of rat cultured cortical neurons induced by b-amyloid**. v.102, p.31-5, p.655-62, 2009.

HUBER, J.; IMHOF, M.; SCHMIDT, M. Effects of soy protein and isoflavones on circulating hormone concentrations in pre- and post-menopausal women: a systematic review and meta-analysis. **Hum Reprod Update**, v.16, p.110-1, 2010.

HWANG, C. S. et al. Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.101, p.246-53, 2006.

INCA. 2012. Disponível em:

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama>. Acesso em: 05 fev. 2013.

IOWA STATE UNIVERSITY database on the Isoflavone Content of Foods: USDA - United States Department of Agriculture, 1999.

JEMAL, A. et al. Cancer Statistics. **CA Cancer J Clin**, v.58, p.71-96, 2008.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v.61, n.2, p.69-90, 2011.

JOHANSEN, J. S. et al. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovasc Diabetol**, v.4, p.5, 2005.

KAHN, C.R. Section on cellular and Molecular physiology. **JOSLIN Magazine**, v.11, n.3, p.17, 1998.

KAMEOKA, S. et al. Expression of antioxidant proteins in human intestinal Caco-2 cells treated with dietary flavonoids. **Elsevier**, v.146, p.161-7, 1999.

KANG, X. et al. Effect of soy isoflavones on breast cancer recurrence and death for patients receiving adjuvant endocrine therapy. **CMAJ**, v.182, p.1857-62, 2010.

KAO, T. H.; CHIEN, J. T.; CHEN, B. H. Extraction yield of isoflavones from soybean cake as affected by solvent and supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, v.107, p.1728-36, 2008.

KEY, T. J. et al. Diet, nutrition and the prevention of cancer. **Public Health Nutr.**, v.7, n.1(A), p.187-200, 2004.

KGOMOTSO, T.; CHIU, F.; NG, K. Genistein- and daidzein 7-O-beta-D-glucuronic acid retain the ability to inhibit copper-mediated lipid oxidation of low density lipoprotein. **Mol. Nutr. Food Res.**, v.52, n.12, p.1457-66, 2008.

KNIGHT, D. C.; EDEN, J. A. Phytoestrogens a short review. **Maturitas**, v.22, p.167-75, 1995.

KOKUBO, Y. et al. Association of Dietary Intake of Soy. Beans, and isoflavones With Risk of Cerebral and Myocardial Infarctions in Japanese Populations The Japan Public Health Center-Based (JPHC) **Study Cohort I. Circulation**, v.116, p.2553-62, 2007.

KORDE, L. A. et al. Child hood soy intake and breast cancer risk in Asian American women. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.18, p.1050-59, 2009.

KUIPER, G. G. et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor b. **Endocrinology**, v.139, p.4252-63, 1998.

LARKIN, T.; PRICE, W. E.; ASTHEIMER, L. The key importance of soy isoflavone bioavailability to understanding health benefits. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.48, n.6, p.538-52, 2008.

LAZAREVIC, B. et al. Efficacy and safety of short-term genistein intervention in patients with localized prostate cancer prior to radical prostatectomy: a randomized, placebo-controlled, double-blind phase 2 clinical trial. **Nutr. Cancer**, v.63, n.6, p.889-98, 2011.

LEE, J. S. et al. Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sci.**, v.79, p.1578-84, 2006.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Rev Bras Nutr Clin**, v.18, n.2, p.60-5, 2003.

LI, Y. et al. Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein. **Oncogene**, v.18, p.3166-72, 1998.

LIU, D. et al. Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic b-cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway. **Diabetes**, v.55, p.1043-50, 2006.

LIU, J. et al. Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p.2472-9, 2001.

LOFT, S.; POULSEN, H. E. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. **J Mol Med.**, v.74, p.297-312, 1996.

MANACH, C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.81, suppl.1, p.230S-242S, 2005.

MAZUR, W.; ADLERCREUTZ, A. Naturally occurring oestrogens in food. **Pure & Applied Chem**, v.70, p.1759, 1998.

MCCARTY, M. F. Isoflavones made simple-genistein's agonist activity for beta-type estrogen receptor mediates their health benefits. **Med. Hypotheses**, v.66, p.1093-114, 2006.

MEDEIROS, S. F.; MAITELLI, A.; NINCE, A. P. B. Efeitos da terapia de reposição hormonal na menopausa sobre o sistema imune. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.29, n.11, p. 593-601, 2007.

MINAFRA, L. et al. Unmasking epithelial-mesenchymal transition in a breast cancer primary culture: A study report. **BMC Res. Notes** 5, v.343, 2012.

MISHRA, P.; KAR, A.; KALE, R. K. Chemoprevention of mammary tumorigenesis and chemomodulation of the antioxidative enzymes and peroxidative damage in prepubertal Sprague Dawley rats by Biochanin A. **Mol Cell Biochem.**, v.312, p.1-9, 2009.

MOLTENI, A.; BRIZIO-MOLTENI, L.; PERSKY, V. In vitro hormonal effects of soybean isoflavones. **Journal of Nutrition, Bethesda.**, v.125, suppl 3, p.751-6, 1995.

MONTEIRO, D. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. N. Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, **Bryconamazonicus (Spix and Agassiz, 1829)**. **Ecotoxicology**, v.19, p.105-123, 2010.

MORTON, M. S. et al. Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. **J. Nutr.**, v.132, p.3168-71, 2002.

PAPAS, A. M. Diet and antioxidant status. **Food Chem Toxicol**, v.37, p.9-10, p.999-1007, 1999.

PARK, E. et al. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.410, p.514-19, 2011.

PASCUAL-TERESA, S. et al. Absorption of isoflavones in humans: effects of food matrix and processing. **J. Nutr. Biochem**, v.17, p.257, 2006.

POLKOWSKI, K. et al. Cytostatic and cytotoxic activity of synthetic genistein glycosides against human cancer cell lines. **Cancer Lett**, v.203, p.59-69, 2004.

POTTER, S. M. et al. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.68, p.1370-5, 1998.

RECOR, I. R.; DREOSTI, I. E.; MCINERNEY, J. K. The antioxidant activity of genistein in vitro. **J. Nutt. Biochem.**, v.6, p.481-5, 1995.

RICE-EVANS, C. A.; PACKER, L. **Flavonoids in Health and Disease**. New York: Marcel Dekker, Inc. New York, 1998.

RIMBACH, G. et al. Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease – A molecular perspective. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**. New York, v.3, p.335-41, 2007.

ROMOND, E. H. et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med**, v.353, p.1673-84, 2005.

ROSSITER, R. C.; BECK, A. B. Physiological and ecological studies on the estrogenic isoflavones in subterranean clover (*Trifolium subterraneum*) I. Effects of temperature. **Aust. J. Agric. Res.**, v.17, p.29-37, 1966.

ROUZIER, R. et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. **Clin. Cancer Res.**, v.11, n.16, p.5678-85, 2005.

RUBIN, I.; YARDEN, Y. The basic biology of HER2. **Ann Oncol.** v.12, suppl.1, p.S3-S8, 2012.

SAAD, E. D. Endpoints in advanced breast cancer: methodological aspects & clinical implications. **Indian J. Med. Res.** v.134, n.4, p.413-8, 2011.

SAIJA, A. et al. Flavonoids as antioxidante agentes: importance of their interaction with biomembranes. **Free radical biology & medicine.**, New York, v.19, p.481-95, 1995.

SARKAR, F. H. et al. The role of genistein and synthetic derivatives of isoflavone in cancer prevention and therapy. **Mini Rev Med Chem.**, v.6, n.4, p.401-7, 2006.

SATO, Y. et al. **Protective effect of soy isoflavone genistein on ischemia-reperfusion in the rat small intestine.** v.34, p.1448-54, 2011.

SEGA, E. I.; LOW, P. S. **Cancer Metastasis Rev.** v.27, p.655-64, 2008.

SEO, H. S. et al. Stimulatory effect of genistein and apigenin on the growth of breast cancer cells correlates with their ability to activate ER alpha. **Breast Cancer Res Treat**, v.99, p.121-34, 2006.

SETCHELL, K. D. et al. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. **J. Nutr.**, v.131, p.1362S-1375S, 2001.

SETCHELL, K. D. R. et al. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.68, p.1333-46, 1998.

SHILS, E. M. et al. **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**. 9. ed. São Paulo: Manole, 2003. p.1363-70.

SHU, X. O. et al. Soy food intake and breast cancer survival. **JAMA**, v.302, p.2437-43, 2009.

SLOW, R. C.; MANN, G. E. Dietary isoflavones and vascular protection: activation of cellular antioxidant defenses by SERMs or hormesis? **Mol Aspects Med**, v.31, p.468-77, 2012.

SLAMON, D. et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med**, v.365, p.1273-83, 2011.

SUN, Y. et al. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. **Free Radic. Biol. Med.**, v.8, p.583-99, 1990.

SUZUKI, K. et al. Genistein, a soy isoflavone, induces glutathione peroxidase in the human prostate cancer cell lines LNCAP and PC-3. **Int. J. Cancer**, v.99, p.846-52, 2002.

SZKUDELSKA, K.; NOGOWSKI, L. Genistein - A dietary compound inducing hormonal and metabolic changes. **J Steroid Biochem Molec Biol.**, v.105, n.1-5, p.37-45, jun./jul. 2007.

SZKUDELSKA, K.; NOGOWSKI, L.; SZKUDELSKI, T. Genistein, a plant-derived isoflavone, counteracts the antilipolytic action of insulin in isolated rat adipocytes. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v.109, n.108-14, 2008.

TAYLOR, C. K. et al. The effect of genistein aglycone on cancer and cancer risk: a review of in vitro, preclinical, and clinical studies. **Nutr. Rev.**, v.67, n.7, p.398-415, 2009.

TFAYLI, A. et al. Breast cancer in low- and middle-income countries: an emerging and challenging epidemic. **J Oncol.**, p.490631, 2010.

THAM, D. M.; GARDNER, C. D.; HASKELL, W. L. Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. **J. Clin. Endocrinol Metab.**, v.83, p.2223-35, 1998.

THOMSON, C. A. et al. Diet and biomarkers of oxidative damage in women previously treated for breast cancer. **Nutr Cancer**, v.51, p.146-54, 2007.

TIRONA, M. T.; SEHGAL, R.; BALLESTER, O. Prevention of breast cancer (Part I): epidemiology, risk factors, and risk assessment tools. **Cancer Investigation**, v.28, p.743-50, 2010.

TRINTIN, L. A. Avaliação Nutricional. In: IKEMORI, E. H. A. et al. **Nutrição em Oncologia**, São Paulo: Lemar, 2003. p.45-82,

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v.39, p.44-84, 2007.

VODUC, K. et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **J Clin Oncol**, v.28, p.1684-91, 2010.

WAITZBERG, A. F. L.; BRENTANI, M. M. Nutrição e câncer de mama. In: WAITZBERG, D. L. **Dieta, Nutrição e Câncer**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004.

WANG, Z. et al. Inhibition of nuclear factor kappaB activity by genistein is mediated via Notch-1 signaling pathway in pancreatic cancer cells. **Int J Cancer**, v.118, n.8, p.1930-6, 2006.

WARREN, M. P.; SHORTLE, B.; DOMINGUEZ, J. E. Use of alternative therapies in menopause. **Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol**, v.16, p.411-48, 2002.

WATANABE, S. et al. Antioxidant activity of soya hypocotyl tea in humans, **BioFactors**, v.12, p.227-32, 2000a.

WATANABE, S. et al. Effects of isoflavone supplement on healthy women, **BioFactors**, v.12, p.233-41, 2000b.

WEI, H.; BOWEN, R.; CAI, Q. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v.208, p.124-130, 1995.

WEISSLEDER, R.; PITTET, M. J. **Nature**. V.452, p.580-9, 2008.

WISNIEWSKI, A. B. et al. Exposure to genistein during gestation and lactation de masculinizes the reproductive system in rats. **Journal of Urol**, v.169, p.1582-86, 2003.

WORD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEACH. **Food, Nutrition, Physical Activity, and the prevention of cancer: a global perspective**. Washington DC: AIRC, 2007. 517p.

WU, A. H.; YANG, D.; PIKE, M. C. A meta-analysis of soy foods and risk of stomach cancer: the problem of potential confounders. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v.9, p.1051-58, 2000.

WYNDER, E. L. et al. Breast cancer: Weighing the evidence for a promoting role of dietary fat. **J Natl Cancer Inst.**, v.89, p.766-75, 1997.

YANG, Z. et al. Simultaneous determination of genistein and its four phase II metabolites in blood by a sensitive and robust UPLC-MS/MS method: Application to an oral bioavailability study of genistein in mice. **J. Pharm. Biomed. Anal**, v.53, n.1, p.81-9, 2010.

YAMAGUCHI, M. et al. Nutritional Factors and Osteoporosis Prevention. **Nova Science Publishers, Inc.**, New York, USA, 2010.

YE, F. et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 activity in head and neck cancer cells by genistein. **Cancer Lett**, v.211, p.39-46, 2004.

YOULDEN, D. R. et al. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. **Cancer Epidemiology**, v.36, p.237-48, 2012.

ZHOU, S. et al. Dose-dependent absorption, metabolism, and excretion of genistein in rats. **J. Agric. Food Chem.**, v.56, n.18, p.8354-9, 2008.

ZIELONKA, J.; GEBICKI, J.; GRYNKIEWICZ, G. Radical scavenging properties of genistein. **Free Radical Biology & Medicine**, v.35, n.8, p.958-65, 2003.