

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA – PPGBTOX**

Francine Carla Cadoná

**GUARANÁ, UM FRUTO ULTRACAFEINADO, APRESENTA EFEITO
IN VITRO ANTITUMORAL E NA ATIVIDADE QUIMIOTERÁPICA EM
CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL E DE MAMA**

**Santa Maria, RS, Brasil
2016**

Francine Carla Cadoná

**GUARANÁ, UM FRUTO ULTRACAFEINADO, APRESENTA EFEITO *IN VITRO*
ANTITUMORAL E NA ATIVIDADE QUIMIOTERÁPICA EM CÉLULAS DE CÂNCER
COLORRETAL E DE MAMA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica (PPGBTX), Área de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

**Santa Maria, RS, Brasil
2016**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Carla Cadoná, Francine
GUARANÁ, UM FRUTO ULTRACAFEINADO, APRESENTA EFEITO IN VITRO ANTITUMORAL E NA ATIVIDADE QUIMIOTERÁPICA EM CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL E DE MAMA / Francine Carla Cadoná.- 2016.
122 p.; 30 cm

Orientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2016

1. Guaraná 2. Cafeína 3. Câncer Colorretal 4. Câncer de Mama 5. Atividade Antitumoral I. Beatrice Mânica da Cruz, Ivana II. Título.

Francine Carla Cadoná

**GUARANÁ, UM FRUTO ULTRACAFEINADO, APRESENTA EFEITO *IN VITRO*
ANTITUMORAL E NA ATIVIDADE QUIMIOTERÁPICA EM CÉLULAS DE CÂNCER
COLORRETAL E DE MAMA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica (PPGBTX), Área de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

Aprovado em 15 de julho de 2016:



Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Claudia Giuliano Bica, Dra. (UFCSPA)



Glauber Wagner, Dr. (UFSC)



Margarete Dulce Bagatini, Dra. (UFFS)



Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

DEDICATÓRIA

À minha mãe e ao meu irmão, por todo o apoio, força e confiança que me trouxeram até aqui. A vocês dedico todo o meu esforço para a elaboração dessa tese e declaro o meu eterno amor e agradecimento.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Neusa Maria Zachy Sanchez, o meu eterno e sincero agradecimento por sempre ter me apoiado, por ter me levantado quando eu caí e comemorado comigo as minhas vitórias. Obrigada, por ser o meu porto seguro, por todo o carinho e suporte para que eu chegasse até aqui. Obrigada por sempre estar do meu lado! Te amo!

Ao meu irmão Fabrício Carlos Cadoná, por ser um grande amigo e conselheiro. Obrigada por ter me ajudado a sempre tomar as melhores decisões e por ter me guiado para os melhores caminhos. Além disso, é claro, não posso deixar de agradecer por toda a tua paciência em me ajudar com a elaboração de figuras e melhorar qualidade dos artigos da tese.

Ao Maico dos Santos Rosa, por todo o carinho, força e compreensão, principalmente quando a distância, devida a objetivos de crescimento profissional, foi árdua.

À Professora Ivana Beatrice Mânica da Cruz, minha mãe científica, por ter me acolhido há oito anos, quando eu nem sabia o que era pesquisa. Por ser um exemplo inestimável de profissional e de pessoa para mim e para todos. Por, muitas vezes, ter trocado as suas horas de lazer para me ajudar. Por todas as maravilhosas oportunidades que me foram concedidas. Obrigada por tudo!

Ao Alencar Kolinski Machado, obrigada por ter sido o meu fiel companheiro durante todos esses anos de laboratório. Obrigada pela amizade e por transformar as horas de trabalho mais divertidas e agradáveis. Ainda, obrigada pela troca de conhecimento e pela ajuda na elaboração dos trabalhos da tese.

Ao Charles Elias Assmann, por ter sido o meu braço direito no laboratório, além de ser um amigo inestimável. Obrigada por sempre ter estado ao meu lado e pela tua amizade verdadeira.

À Verônica Farina Azzolin, pelo companheirismo e ajuda nos experimentos. Além disso, pela amizade que tornaram as horas árduas de trabalho mais amenas.

Aos colegas de laboratório Beatriz da Silva Rosa Bonadiman, Audrei de Oliveira Alves, Grazielle Castagna Cezimbra Weiss, Micheli Lamberti Jobim, Karen Lilian Schott, Fernanda Barbisan, Eduardo Bortoluzzi Dornelles, Thaís Doeler Algarve, pela ajuda no laboratório, além do companheirismo e da amizade de sempre.

Aos demais amigos e colegas do Laboratório de Biogenômica, obrigada por toda a ajuda e carinho.

Ao Professor Dr. José Luis Rosa, da Univesitat de Barcelona, por ter permitido que eu realizasse o doutorado sanduíche no seu laboratório, onde me proporcionou toda a ajuda e atenção essenciais para o desenvolvimento da pesquisa, além de ter sido uma pessoa maravilhosa que sempre se preocupou com o meu bem-estar. Obrigada pela oportunidade de ter participado de um grupo de pesquisa de excelente qualidade.

Aos colegas do laboratório de Barcelona, Taiane Schneider, Mônica Cubillos, Susana Sánchez Téna, Fernanda Mesquita e Leonardo Pedrazza, por desde o princípio terem me integrado no grupo de pesquisa e me ajudado com o trabalho, além de terem sido amigos maravilhosos durante a minha jornada na Espanha. Queria agradecer especialmente à Taiane Schneider, que esteve sempre ao meu lado, orientando-me no laboratório e também me apoiando fora dele, principalmente, por ter me estendido a mão nas horas que eu mais precisei.

Ao Professor. Dr. Euler Ribeiro e à sua equipe da Universidade Aberta da Terceira Idade da Universidade do Estado do Amazonas pelo apoio recebido.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica toxicológica, pela formação e ensino.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), por ser uma referência de qualidade e excelência em formação.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao Ciência Sem Fronteiras (CNPq) pela bolsa de doutorado sanduíche contemplada.

Àqueles que não foram citados, mas que contribuíram de alguma maneira para a realização desse trabalho.

RESUMO

GUARANÁ, UM FRUTO ULTRACAFEINADO, APRESENTA EFEITO *IN VITRO* ANTITUMORAL E NA ATIVIDADE QUIMIOTERÁPICA EM CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL E DE MAMA

AUTORA: Francine Carla Cadoná
ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Introdução: Dentre os cânceres mais incidentes destacam-se o câncer colorretal (CCR) e o de mama. Extratos antioxidantes são amplamente utilizados, não apenas para prevenir neoplasias, mas ainda durante o tratamento quimioterápico, como é o caso da *Paullinia cupana* (guaraná). Um estudo *in vitro* prévio sugeriu que o guaraná poderia ter ação antitumoral contra o câncer de mama, potencializando ainda o efeito de oito tipos de quimioterápicos. Entretanto, se esse efeito também ocorre no CCR e qual seria o mecanismo causal pelo qual o guaraná age nas células tumorais são questões não esclarecidas, até o presente momento. Considerando as propriedades biológicas do guaraná, pode-se inferir que o mesmo teria efeito antitumoral via modulação das rotas da Proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos (mTOR) e das Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs). **Objetivo:** Avaliar o efeito antitumoral *in vitro* do extrato hidroalcoólico do guaraná e das suas principais moléculas bioativas nas células de CCR e de mama, assim como, na atividade quimioterápica em células de CCR. **Métodos:** o estudo foi realizado em duas linhagens celulares HT-29 e MCF-7, para CCR e câncer de mama, respectivamente. A linhagem celular HT-29 foi exposta a diferentes concentrações de guaraná, bem como, às suas principais moléculas bioativas, cafeína, teobromina e catequina. Para a avaliação do efeito do guaraná na atividade quimioterápica, as células HT-29 foram expostas a concentrações antitumorais do guaraná mais eficazes, bem como, a dos seus compostos bioativos em associação ao quimioterápico Oxaliplatina. Já a linhagem celular MCF-7 foi exposta a diferentes concentrações de guaraná e apenas a sua molécula bioativa mais prevalentes, a cafeína. Foram avaliados parâmetros de viabilidade e proliferação celular, alterações no ciclo celular, ativação da via apoptótica, expressão de proteínas associadas ao câncer, modulações na rota da mTOR e das MAPKs, via análises espectrofotométricas, fluorimétricas e moleculares. Além disso, parâmetros de citotoxicidade do extrato foram realizados em células saudáveis, usando linhagem de fibroblastos (HFF-1) e Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSPs). **Resultados:** O guaraná exibiu atividade antitumoral em determinadas concentrações (0.1; 1; 10; 30; 100 e 300 µg/mL), assim como, as suas moléculas bioativas, tanto em HT-29 quanto em MCF-7. Além disso, foi averiguado um aumento da ação do fármaco em algumas concentrações (30; 100 e 300 µg/mL) do guaraná e seus bioativos em células HT-29. O guaraná não interferiu negativamente na ação da Oxaliplatina. O guaraná e a cafeína inibiram proteínas das vias MAPKs e mTOR nas células MCF-7. Entretanto, nas células HT-29 o guaraná apenas inibiu a rota da mTOR, já a cafeína não apresentou nenhum efeito significativo. Como esperado, o guaraná não exibiu citotoxicidade a células saudáveis. Portanto, os resultados sugeriram que o guaraná apresentou atividade antitumoral contra células de câncer de mama e CCR, e ainda, potencializou a ação da Oxaliplatina em células de CCR. Assim, o guaraná poderia ser usado como um suplemento durante o tratamento quimioterápico, a fim de potencializar resposta antitumoral e assim, diminuir a resistência dessas células.

Palavras-Chave: Guaraná. Cafeína. Câncer Colorretal. Câncer de Mama. Atividade Antitumoral. Sinergismo Quimioterápico.

ABSTRACT

GUARANÁ, A HIGHLY CAFFEINATED FRUIT, HAS *IN VITRO* ANTITUMOR EFFECT AND IN THE CHEMOTHERAPIC ACTIVIT ON COLORECTAL AND ON BREAST CANCER

AUTHOR: Francine Carla Cadoná
ADVISER: Prof^a. Dr^a. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Introduction: Colorectal (CRC) and breast cancer are considered the most incidents in the entire world. Antioxidant extracts are largely used to prevent mutations and neoplasia as well as in patients undergoing the chemotherapy treatment, such as the *Paullinia cupana* (guaraná). A previous *in vitro* study suggested that guaraná could have antitumor action against the breast cancer as well as increase anti-proliferative sensitivity of eight different drugs. However, there are two questions have not yet been clarified: whether this same effect occur in the CRC and which would be the causal mechanism that guaraná act in tumoral cells. There are many biologics proprieties of guaraná published in the literature. Considering that, guaraná could present the antitumor activity by modulations in the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) and Mitogen-activated Protein Kinase (MAPKs) pathways. Objective: the aim of this study was to analyze the antitumor *in vitro* effect of the hydroalcoholic guaraná end its main bioactives molecules in the CRC and in the breast cancer cells. The action in the chemotherapeutic activity of this extract also was investigated in the CRC cells. Besides, the cytotoxicity of guaraná was analyzed in the healthy cells. Methods: The study was performed using two cell lines HT-29 and MCF-7, CRC and breast cancer, respectively. The cell line HT-29 was exposed to different concentrations of guaraná, as well as its main bioactive molecules, caffeine, theobromine and catechin. Guaraná effect in chemotherapy activity was measured by HT-29 exposure to the better antitumor guaraná concentrations, besides its bioactive compounds in the addiction of Oxaliplatin. Although, the cell line MCF-7 was exposed to different concentrations of guaraná and only the molecule more prevalent found in the extract, the caffeine. Some parameters were analyzed, such as cellular proliferation and viability, cell cycle arrests, apoptotic pathway activation, cancer association proteins expression, modulations in mTOR and MAPKs pathways. These parameters were measured by spectrophotometric, fluorimetric and molecular analysis. Moreover, cytotoxicity parameters of the extract were performed in healthy cells, using fibroblast lineage (HFF-1) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Results: Guaraná exhibited antitumor activity in some concentrations (0.1; 1; 10; 30; 100 e 300 µg/mL), as well as its bioactive compounds in the both cell lineage tested, HT-29 and MCF-7. Besides, the action of Oxaliplatin was potentiated in some concentrations of guaraná (30; 100 e 300 µg/mL) and its bioactive molecules on HT-29. The guaraná did not negatively interfere in the action of Oxaliplatin. Guaraná and caffeine inhibited proteins in MAPKs and mTOR pathways on MCF-7. However, the guaraná only inhibited the mTOR pathway and the caffeine did not present effect. The guaraná did not present cytotoxic effect on healthy cells. Therefore, the results suggested that the guaraná could be a potential carcinogenic agent besides it could be used as a supplement during the chemotherapeutic treatment for potentiating the antitumor response and decrease the tumor cells resistance.

Keywords: Guaraná. Caffeine. Colorectal Cancer. Breast Cancer. Antitumor Activity. Synergism Chemotherapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenvolvimento do câncer e sua propagação.....	15
Figura 2 - Complexos do mTOR e suas rotas de sinalização.....	22
Figura 3 - Rota da ativação e da resposta celular das MAPKs.....	24
Figura 4 - Representação dos diferentes estágios da divisão celular e onde alguns quimioterápicos podem atuar.....	25
Figura 5 - Fruto do guaraná (<i>Paullinia cupana</i>).....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INCA	Instituto Nacional do Câncer
CCR	Câncer Colorretal
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
Bcl-2	Linfoma 2
mTOR	Proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos
MAPKs	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos
ERKs	Quinases Reguladas por Sinais Extracelulares
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
IL-1	Interleucina-1
CCS	Ciclo-Celular Específicos
CCNS	Ciclo-Celular Não Específicos
CMSPs	Células Mononucleares do Sangue Periférico
DL50	Dose Letal Mediana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 CÂNCER: A DOENÇA DO SÉCULO	11
1.1.1 Câncer de mama: o mais prevalente entre as mulheres.....	13
1.1.2 Câncer Colorretal: segunda maior incidência no mundo	15
1.2 PRINCIPAIS ROTAS DESBALANCEADAS NOS PROCESSOS TUMORAIS....	17
1.2.1 Apoptose.....	17
1.2.2 Proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos (mTOR).....	18
1.2.3 Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs).....	20
1.3 QUIMIOTERÁPICOS: MECANISMO DE AÇÃO	22
1.3.1 Oxaliplatina: um intercalante do DNA	24
1.4 RESISTÊNCIA TUMORAL: INSENSIBILIDADE AOS QUIMIOTERÁPICOS	24
1.5 QUIMIOTERAPIA: UM AGRESSIVO TRATAMENTO CONTRA O CÂNCER.....	25
1.6 GUARANÁ: UM FRUTO ULTRACAFEINADO DA AMAZÔNIA.....	26
1.6.1 Guaraná: poderia ser um grande aliado para pacientes com câncer	28
1.6.2 Principais moléculas bioativas do guaraná poderiam amenizar efeitos colaterais da quimioterapia	29
1.6.3 Guaraná: possível potencializador da ação quimioterápica	30
1.6.4 Guaraná: um potencial agente antitumoral.....	31
2 OBJETIVOS	35
2.1 GERAL	35
2.2 ESPECÍFICOS	35
3 RESULTADOS	37
4 DISCUSSÃO	38
5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER: A DOENÇA DO SÉCULO

No ano de 2015, apenas no Brasil foram identificados 580 mil novos casos de câncer e mais de 12 milhões de pessoas são diagnosticadas com a doença no mundo todo, sendo que oito milhões chegam a óbito. Caso nenhuma solução para esse grave problema seja encontrada, poderá haver 26 milhões de casos novos e 17 milhões de mortes por ano no mundo em 2030 (INCA, 2015).

O câncer deriva do termo em latim que significa caranguejo, em analogia ao fato de poder agarrar-se de uma maneira obstinada a qualquer parte que se apodera (ALMEIDA et al., 2005). O câncer é formado por células tumorais malignas, que são geradas por uma desregulação no crescimento da célula desencadeado por alterações genéticas que garantem uma série de estratégias de crescimento e de sobrevivência celular. Um dos aspectos relevantes do câncer é capacidade de gerar uma proliferação excessiva e não regulada que se torna autônoma, ou seja, independente dos estímulos fisiológicos do crescimento, apesar de permanecer dependente do hospedeiro para a sua nutrição e aporte sanguíneo. Além disso, frequentemente ocorre escape da morte programada (a apoptose), potencial replicativo sem limite, estímulo para a angiogênese, invasão tecidual e metástase, sendo o processo metastático uma característica marcante e exclusivamente do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2000)

Evidências sugerem fortemente que toda a população de células dentro de um tumor maligno surge de uma célula isolada que sofreu uma alteração genética, que criou uma instabilidade cromossômica, predispondo essa célula a acumular novas mutações até se transformar, gerando cópias denominadas clonais. As células cancerígenas tornam-se desdiferenciadas em relação ao tecido de origem, e essa característica é denominada de anaplasia, a qual é marcada por alterações morfológicas, como, por exemplo, o pleomorfismo. O pleomorfismo é a variação de tamanho ou forma dentro da mesma população de células tumorais malignas, tal como a morfologia nuclear anormal, ou seja, os núcleos são extremamente grandes em relação à célula, com DNA em abundância, o que apresenta uma coloração escura (hipercromática). Ainda, o pleomorfismo é caracterizado por altas taxas mitóticas, o que garante um crescimento acelerado, assim como, ocorre a perda da

polaridade, já que as camadas ou grandes massas crescem de maneira desorganizada e anárquica. Muitas vezes, são encontradas células tumorais gigantes, que podem possuir mais de um núcleo, podendo gerar um processo necrótico tecidual pela falta de aporte sanguíneo (ROBBINS; COTRAN, 2005).

A fim de evitar a proliferação celular desordenada e o desenvolvimento de processos tumorais, o crescimento celular é controlado basicamente por dois grupos de genes: os proto-oncogenes e os genes supressores. Os proto-oncogenes são responsáveis por estimular a divisão das células e o crescimento tecidual, já os genes supressores, tem a função de suprimir a proliferação celular para que a mesma não se torne incontrolável. No entanto, esses grupos de genes podem sofrer alterações, por exemplo, por agentes mutagênicos, transformando os proto-oncogenes em oncogenes e os genes supressores começam a produzir proteínas não funcionais que não exercem mais a sua função adequadamente. Assim, o controle do crescimento celular fica comprometido, contribuindo para o desenvolvimento e instauração do câncer (FARIA; RABENHORST, 2006) (Figura 1).

A formação e o crescimento do câncer podem ser divididos em quatro etapas: transformação maligna, crescimento da célula transformada, invasão local e por fim, metástase (ALMEIDA et al., 2005). O estágio de iniciação do processo tumoral é a primeira etapa onde a célula é acometida por mutações genéticas desencadeadas por agentes carcinogênicos (oncoiniciador). Já no estágio de promoção, as células alteradas entram em contato com agentes oncopromotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna de uma forma lenta e gradual. Faz-se necessário o contato longo e contínuo com o agente cancerígeno promotor e, muitas vezes, a suspensão desse contato interrompe o processo tumoral. O estágio de progressão é uma etapa irreversível, pois as células tumorais começam a crescer descontroladamente promovendo a instalação do câncer e a manifestação de sintomas clínicos da doença. Ainda, algumas células tumorais podem se desassociar do tecido que estavam instaladas e por meio da corrente sanguínea podem ser levadas para um tecido adjacente e assim, acometer outro órgão, gerando a metástase (ROBBINS; COTRAN, 2005).

A metástase é uma característica irrevogável de um tumor maligno, já que os tumores benignos não metastatizam. A disseminação dos tumores pode ocorrer através do implante direto nas cavidades corporais ou nas superfícies, disseminação linfática e disseminação hematogênica. Aproximadamente 30% dos pacientes

recém-diagnosticados com tumores sólidos (excluindo tumores cutâneos, com exceção dos melanomas) apresentam-se com metástases. A disseminação metastática reduz fortemente a possibilidade de cura (SPENCE; JONHSTON, 2001).

O câncer configura-se como um grave problema de saúde pública mundial. Com o advento da tecnologia e o consumo cada vez maior de produtos industrializados, associado com o sedentarismo e uma dieta pobre em antioxidantes, podem favorecer o aumento da incidência de neoplasias (POTENTAS; WITKOWSKA; ZUJKO, 2015).

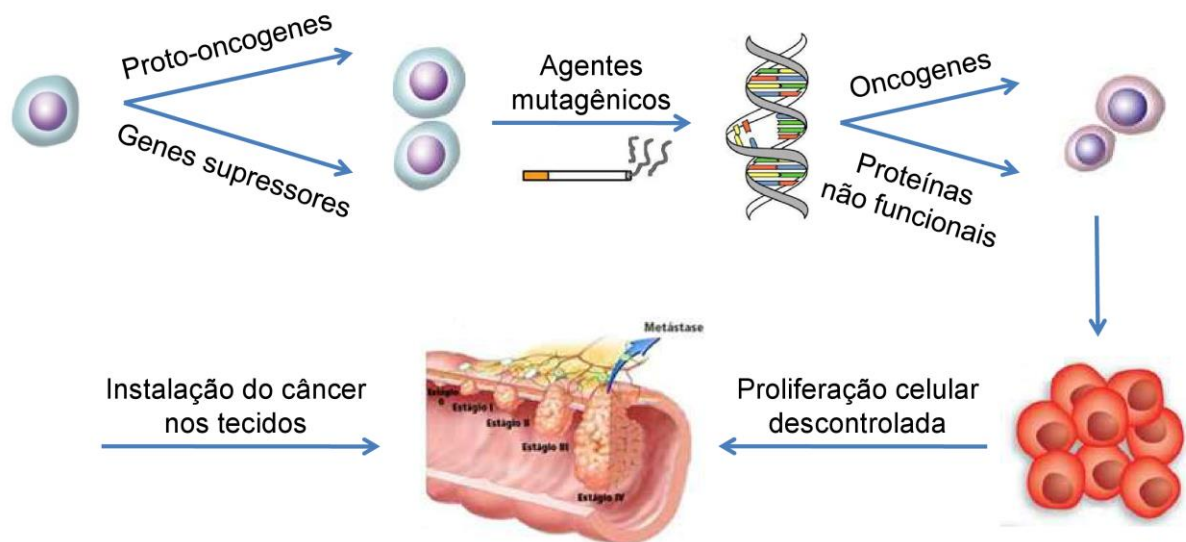


Figura 1: Desenvolvimento do câncer e sua propagação. Fonte: do autor.

1.1.1 Câncer de mama: o mais prevalente entre as mulheres

O câncer de mama é o tipo de neoplasia mais incidente entre as mulheres em todo o mundo. Esse tipo de neoplasia representa 25% de todos os tipos de cânceres que acometem o sexo feminino, sendo a principal causa de morte, principalmente pela resistência tumoral, em alguns casos, e também pelo diagnóstico tardio (ZAPPONI; TOCANTINS; VARGENS, 2012).

O câncer de mama também afeta os homens, porém atinge somente 1% da população masculina, sendo mais raro. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer é o mais incidente nas mulheres das regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste. Na região Norte, é o segundo mais prevalente (INCA, 2015).

Segundo a estimativa para o ano de 2016, realizada pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, os casos novos de câncer de mama seriam de 57.960, já os números previstos para óbitos alcançariam 14.388, sendo 181 homens e 14.207 mulheres (INCA, 2015).

O tipo mais comum de câncer de mama é chamado carcinoma ductal, porque se origina nas células dos ductos mamários. Já o carcinoma lobular, menos comum, tem origem nas células dos lóbulos mamários. Ainda, o tumor pode ser considerado *in situ* (infiltrante) ou invasor. Essa característica indica se as células cancerígenas estão em um determinado ponto específico ou não, o câncer *in situ* não invade um tecido adjacente, já o invasor tem a capacidade de se infiltrar em tecidos proximais (ERBAS et al., 2006).

Entre os fatores de risco para o desenvolvimento dessa doença, destacam-se os hormônios femininos como os principais responsáveis pela etiologia da doença, já que a maior incidência desse tipo de câncer é encontrada em mulheres abaixo de 50 anos. Além disso, há outros fatores associados com o desenvolvimento dessa neoplasia, como, por exemplo, o sedentarismo, o sobrepeso, tabagismo, o consumo excessivo de álcool, histórico familiar de câncer de mama, menarca precoce (primeira menstruação antes dos 12 anos), menopausa tardia (última menstruação após os 50 anos), gravidez após os 30 anos, nunca ter tido filhos, estresse, exposição a agrotóxicos e à radiação (BARLOW et al., 2006). Por outro lado, estudos postulam que fatores como a exposição a campos magnéticos, traumas mamários, uso de antitranspirantes e implantes de próteses mamárias de silicone não estão associados ao câncer de mama (PINHO; CONTINHO, 2007).

O câncer de mama pode ser detectado em fases iniciais por meio de alguns sintomas, principalmente, pelo aparecimento de pequenos nódulos, fixo e geralmente indolores. Ainda, podem aparecer outros sinais e sintomas, como dores, endurecimento, sulco, erosão na pele, vermelhidão ou ardor, fluído desconhecido, protuberância, afundamento do mamilo, assimetria, pele de laranja e nódulo interno (INCA, 2015).

Devido à agressividade da doença, o diagnóstico deve identificar o tumor nos estágios iniciais. Para isso, auto-exames e exames de rotina, como a mamografia devem ser realizados a partir dos 40 anos em um período de até dois anos, porém se o risco for aumentado o exame deve ser realizado anualmente depois dos 35 anos (INCA, 2015).

Os tratamentos imediatos utilizados são a cirurgia, a radioterapia, a hormônioterapia, a quimioterapia e a mastectomia (retirada total ou parcial da mama). A radioterapia geralmente é utilizada após a cirurgia como forma de destruir possíveis células cancerígenas remanescentes o processo cirúrgico, ou pode ser utilizada em conjunto com a quimioterapia caso o câncer já tenha se metastizado. A hormônioterapia busca inibir o crescimento do tumor através da remoção do hormônio sistêmico através da administração de um antagonista hormonal (INCA, 2015).

A prevenção do câncer de mama, em geral, baseia-se no controle dos fatores de risco associado com medidas de proteção. O risco de desenvolver o câncer de mama pode ser reduzido para 28% quando a prática de exercícios é associada com uma boa nutrição habitual. Recomendações básicas para prevenir o câncer de mama fundamentam-se em controlar o peso corporal e evitar a obesidade, por meio da alimentação saudável, da prática regular de exercícios físicos e diminuição do consumo de bebidas alcoólicas. Além disso, a amamentação também é considerada um fator protetor (INCA, 2015).

1.1.2 Câncer Colorretal: segunda maior incidência no mundo

O câncer colorretal (CCR) representa o segundo tipo de neoplasia mais prevalente no mundo, após o câncer de mama, e configura-se o quinto maior causador de mortes. Segundo a estimativa para o ano de 2016, realizada pelo INCA, no Brasil, os casos novos de CCR seriam de 34.280, sendo estimados 16.660 homens e 17.620 mulheres, já os números previstos para óbitos alcançariam 15.415, sendo 7.387 homens e 8.024 mulheres (INCA, 2016).

O desenvolvimento do CCR é gerado em consequência a uma série de alterações genéticas que causam mudanças na mucosa colônica, hiperplasia, adenoma e carcinoma (FEARON; VOLGELSTEIN, 1990). O CCR é caracterizado pelo aparecimento de tumores no segmento do intestino grosso (cólon) e no reto, geralmente sendo desenvolvidos a partir de pólipos, os quais são lesões benignas que se proliferam na parede interna do intestino grosso (HABR-GAMA, 2005). É sugerido que 90% dos casos de CCR evoluem a partir dos pólipos e o período de evolução de mucosa normal para adenocarcinoma é de aproximadamente 20 anos (SAHA; ROMAN; BEAUCHAMP, 2012).

Muitos fatores relacionados com a qualidade de vida e dieta podem favorecer o desenvolvimento do CCR, como, por exemplo, sedentarismo, obesidade, dieta pobre em fibras, consumo excessivo de álcool e carne vermelha. Porém, muitas vezes, esse tipo de neoplasia depende de fatores genéticos, como idade acima de 50 anos, pólipos ou doenças inflamatórias intestinais, histórico familiar e histórico de câncer de ovário ou de mama (GUIMARAES et al., 2013).

Os homens apresentam um maior risco para o desenvolvimento da CCR em relação às mulheres, apesar das diretrizes atuais não destacarem o sexo como um fator determinante de risco, e sim a etnia. Desse modo, pessoas afro-descendentes devem iniciar os exames de rastreamento preventivo antes dos 50 anos, que é o recomendado aos caucasianos (REX, 2007).

Tabagistas também devem iniciar mais cedo os exames preventivos, pois o consumo prolongado do cigarro aumenta em 20% as chances de risco para o desenvolvimento da doença (REID et al., 2003). O mesmo é indicado às pessoas que consomem altas doses de álcool (TOYOMURA et al., 2004).

Dentre os sintomas da doença pode ser observado sangue nas fezes, dor abdominal, alteração no hábito intestinal (prisão de ventre ou diarreia), perda inexplicável de peso, anemia ou fadiga. Geralmente, a doença evolui assintomaticamente, por essa razão, é importante realizar o rastreamento preventivo, através da pesquisa de sangue nas fezes e da colonoscopia. A detecção precoce é de fundamental importância para a cura da doença, já que quando os sintomas estão presentes, geralmente, os tumores já têm um tamanho considerável e são de difícil tratamento (INCA, 2015).

O diagnóstico é realizado por meio de uma biópsia, onde é removido um fragmento do tecido no local da lesão suspeita. O tratamento inicial para o CCR geralmente é a cirurgia, removendo parte do tecido intestinal afetado e os nódulos linfáticos próximos à região, posteriormente, na maioria das vezes, é realizado o tratamento quimioterápico, associado ou não à radioterapia, com o intuito de reduzir a recidiva do CCR (INCA, 2015).

Uma dieta rica em antioxidantes, encontrada em frutas e verduras, ômega 3 oriundo do peixe, suplementação de cálcio associado à vitamina D, vitamina B6 (piridoxina), uso de medicamentos como as estatinas, exercícios físicos e o controle da obesidade são fatores que previnem o surgimento dessa doença (INCA, 2015). O cálcio em especial, parece exercer também um efeito antitumoral em pólipos

colorretais avançados (WALLACE et al., 2004). Esses fatores são essenciais para prevenir o surgimento de células geneticamente mutadas, com rotas de crescimento e sobrevivência desbalanceadas, que favorecem o surgimento e instauração do câncer.

1.2 PRINCIPAIS ROTAS DESBALANCEADAS NOS PROCESSOS TUMORAIS

1.2.1 Apoptose

A morte celular programada, conhecida como apoptose, é um processo fisiológico essencial para prevenir o desenvolvimento do câncer, já que evita que células sem garantias de uma cópia saudável continuem o processo de divisão e perdurem no organismo. Nesse processo algumas características são destacadas, como, por exemplo, tamanho celular reduzido, fragmentação do núcleo em partículas do tamanho dos nucleossomos, membrana e conteúdo celular intactos. (SUSAN, 2007).

A apoptose ocorre normalmente durante o desenvolvimento, bem como, no envelhecimento, a fim de manter a homeostase tecidual. Esse processo também acontece em situações de resposta imune, tanto para conter o crescimento celular no processo inflamatório quanto para eliminar células danificadas. Ainda, a apoptose é essencial para a eliminação de tecidos excedentes na fase embrionária, já que auxilia a formação de membros, como, por exemplo, a perda tecidual a fim de formar os dedos (GRIVICICH et al., 2007).

A apoptose pode ser iniciada por muitos estímulos, tanto patológicos quanto fisiológicos. Há muitos fatores determinantes para desencadear a apoptose, como, por exemplo, a ausência de oxigênio, trauma mecânico, agentes químicos, agentes infecciosos, reações anafiláticas, reações auto-antígenas, distúrbios genéticos e desequilíbrios nutricionais (HENGARTNER et al., 2000).

O processo apoptótico pode ser desencadeado por uma sucessão de eventos bioquímicos moleculares que culminam na ativação das caspases. A família das caspases inclui mais de dez membros e pode ser dividida em dois grupos, iniciadoras (por exemplo, caspase-9 e caspase-8) e efetoras (por exemplo, caspase-3 e caspase-7). O processo apoptótico é iniciado pela fase de ativação, na qual as caspases tornam-se cataliticamente ativas, e seguido por uma fase de execução,

onde essas enzimas atuam provocando a morte da célula. Inicialmente, a apoptose ocorre, sobretudo por duas vias distintas, porém ambas convergem para ativar as caspases, a via extrínseca ou citoplasmática, iniciada por receptores, e a via intrínseca ou mitocondrial (GRIVICICH et al., 2007).

A via extrínseca é iniciada pela ativação de receptores, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF) e o CD95, que ativam caspases iniciadoras e, por sua vez, direcionam a célula para a fase efetora (BUDIHardjo et al., 1999). Já a via intrínseca ou mitocondrial, resulta do aumento da permeabilidade da mitocôndria e da liberação de moléculas pró-apoptóticas para o citoplasma, sem a participação de receptores de morte. Moléculas antiapoptóticas, tal como, a Célula-B de linfoma 2 (Bcl-2) e pró-apoptóticas, como o Bax, estão diretamente envolvidas nesse processo. Quando a célula sofre uma injúria ou estresse, os níveis de Bcl-2 diminuem e em contrapartida os níveis de Bax aumentam, isso gera uma elevação da permeabilidade mitocondrial e extravasamento de proteínas ativadoras das caspases, como o citocromo C. Na última etapa da apoptose, a fase efetora, as caspases iniciadoras ativam as caspases efetoras que, por sua vez, desencadeiam o processo proteolítico dos constituintes celulares (DESAGHER; MARTINOU, 2000).

Algumas situações de estresse celular, como, por exemplo, exposição das células à radiação ou a agentes quimioterápicos, pode induzir a apoptose por meio do dano ao DNA, envolvendo o gene supressor de tumor p53. Quando um estresse genotóxico é gerado, ocorre um acúmulo da p53 que age paralisando o ciclo celular na fase G1, com o intuito de que a célula se restabeleça e repare o dano genômico. Se o DNA não é restaurado, a p53 desencadeia a morte celular por apoptose, garantindo assim que cópias de células com DNA danificado não perdurem no tecido, prevenindo desse modo, o desenvolvimento de processos tumorais (JEGGO; PEARL; CARR, 2016).

No entanto, a p53 pode se encontrar mutada ou ausente na maioria das células tumorais. Então, a p53 não consegue mais exercer o seu papel corretamente e com isso, células geneticamente alteradas são proliferadas desenfreadamente, favorecendo assim, o surgimento do câncer (VIJAYAKUMARAN et al., 2015).

1.2.2 Proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos (mTOR)

A Proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos (mTOR) controla muitos processos metabólicos e energéticos celulares. A mTOR é alvo de uma molécula denominada rapamicina, que é produzida pela bactéria *Streptomyces hygroscopicus*, a qual vem sendo estudada pelo seu papel antiproliferativo e antifúngico. Ainda, a mTOR é uma molécula central no controle do crescimento e proliferação das células, do metabolismo e da angiogênese (LAPLANTE; SABATINI, 2012).

As funções da rota mTOR envolvem dois complexos protéicos, mTORC1 e mTORC2, os quais têm diferentes sensibilidades à rapamicina, bem como, a diferentes estímulos ambientais (DAN et al., 2012). O complexo mTORC1 responde positivamente à presença de aminoácidos, de oxigênio, de níveis de energia. Em contrapartida, age negativamente ao estresse e à rapamicina. Já o mTORC2 é insensível ao tratamento agudo com a rapamicina, mas responde bem ao tratamento crônico. Tanto o mTORC1 quanto o mTORC2 são ativados por fatores de crescimento, como, por exemplo, a insulina (LAPLANTE; SABATINI, 2012) (Figura 2).

Assim, quando ativado, o mTORC1 controla a síntese de macromoléculas, como, proteínas e lipídios, promove a progressão do ciclo celular, bem como, o crescimento e o metabolismo da célula, ainda, bloqueia processos de autofagia e de síntese lisossomal, que é essencial para a eliminação de células e organelas envelhecidas. Enquanto, o mTORC2 está mais envolvido com o metabolismo, organização do citoesqueleto celular e ainda, garante a sobrevivência da célula. Esses processos são regulados através da fosforilação e da consequente ativação de várias moléculas protéicas. O mTORC1 controla a fosforilação dos seus substratos, S6K1 e 4E-BP1, enquanto o mTORC2 regula a sobrevivência/metabolismo e organização do citoesqueleto celular através da fosforilação de diferentes AGC quinases, incluindo o AKT, o SGK1 e o PKC- α (MA; BLENIS, 2009).

A rota de sinalização mTOR está frequentemente desregulada em diversas doenças humanas, como, câncer, obesidade, diabetes tipo 2 e neurodegeneração. Por isso, a inibição dessa rota é alvo de interesse para o desenvolvimento de terapias farmacológicas. Estudos descrevem que a rapamicina e seus análogos são seletivos para o complexo mTORC1 e eficazes no tratamento de alguns tipos de neoplasias (BECK, 2015).

Assim, muitos estudos apontam o importante papel da mTOR para o desenvolvimento e progressão do câncer. Muitas vezes, as rotas do mTORC1 e mTORC2 encontram-se mutadas e superexpressadas em processos cancerígenos, o que estimula diversas vias essenciais para o crescimento das células cancerígenas, proliferação e sobrevivência. Adicionalmente, a perda da atividade da p53, que acomete a maioria dos cânceres, promove a ativação do mTORC1 (FENG et al., 2005; GUERTIN; SABATINI, 2007; PÓPULO; LOPES; SOARES, 2012; LLAGAN; MANNING, 2016).

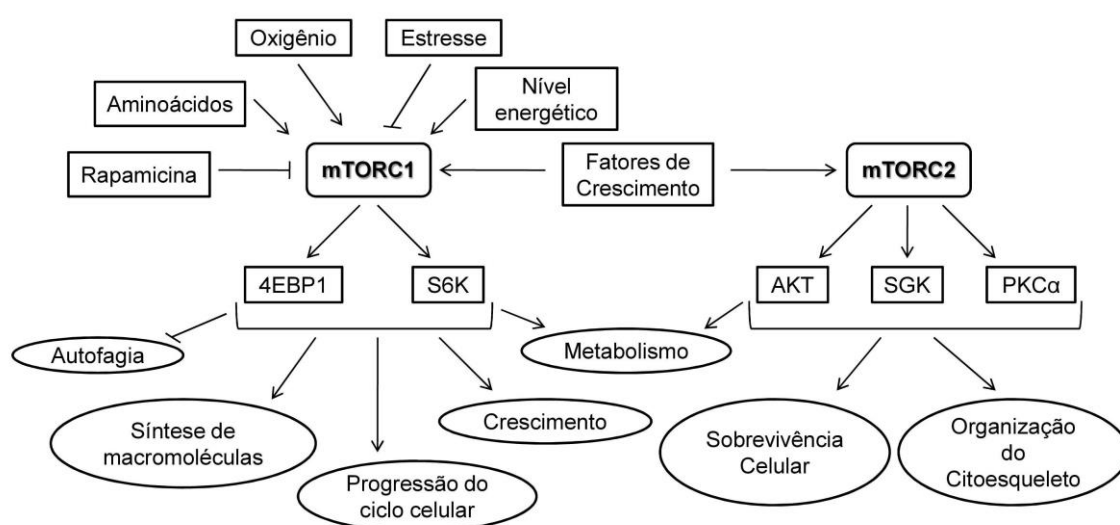


Figura 2: Complexos do mTOR e suas rotas de sinalização. Fonte: adaptada de LAPLANTE; SABATINI, 2012.

1.2.3 Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs)

A rota de sinalização das Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs) permite que as células interpretem uma ampla variedade de sinais externos, desencadeando diferentes efeitos biológicos. Todos os eucariotos apresentam proteínas da família das MAPKs, que regulam a expressão de genes, mitoses, metabolismo, motilidade, sobrevivência, apoptose e diferenciação (CARGNELLO; ROUX, 2011). É sugerido que a rota de sinalização das MAPKs está envolvida em processos anti-apoptóticos e ainda, que a sua ativação garante às células cancerígenas maiores vantagem de sobrevivência, pelo fato de aumentar o escape à apoptose (TSUCHIYA et al., 2008).

Membros da família das MAPKs incluem diferentes moléculas, como as quinases. Dentre as proteínas quinases mais estudadas, destacam-se a extracelular-reguladas por sinais (ERKs) 1/2, a quinase c-Jun N-terminal (JNK) 1, 2, 3 e a proteína p38 (p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ). Tais moléculas são ativadas da oxidação gerada pelas EROs, essas por sua vez, regulam a expressão de diversos genes associados com a sobrevivência, proliferação e morte celular dependendo do estímulo e do tipo de célula (FINKEL, 2011).

Depois de ativadas, as MAPKs fosforilam diversos substratos em todos os compartimentos celulares, incluindo proteínas de membranas, substratos nucleares e proteínas do citoesqueleto, além de outras quinases (THOMAS; HUGANIR, 2014). Os substratos mais estudados são o c-jun, RSK e HSP27, ativados pelas MAPKs JNK, ERK e p38, respectivamente.

Dentre as MAPKs a proteína quinase ERK é amplamente expressa em todos os tecidos e dependendo do tipo celular pode regular diversas vias. A ERK está presente em processos neurológicos, atuando na plasticidade sináptica para o aprendizado e formação das memórias (ADAMS; SWEATT, 2002). A sinalização dessa proteína está envolvida em vários mecanismos, como, por exemplo, age na modulação da proliferação celular, a qual é estimulada por fatores ativadores de mitose, promovendo o avanço da fase G1 e S do ciclo celular. Dessa maneira, a ERK tem grande participação na carcinogênese, além de exercer papel na sobrevivência, migração, angiogênese, ciclo celular, desenvolvimento e diferenciação celular (KRISHNA; NARANG, 2008). Além disso, estudos apontam que muitos inibidores da rota da ERK estão desregulados no câncer, promovendo uma contínua expressão dessa proteína, corroborando para a proliferação e sobrevivência das células tumorais (DHILLON et al., 2007).

Já a proteína p38 é fortemente ativada por fatores de estresse ambiental e citocinas inflamatórias, incluindo estresse oxidativo, radiação UV, hipóxia, isquemia, interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral- α (FNT- α). A MAPK quinase p38 tem um relevante papel no sistema imune e em processos inflamatórios, onde a sua maior função é direcionada para a produção de citocinas pró-inflamatórias, além de respostas funcionais de macrófagos e neutrófilos, como a quimiotaxia, exocitose granular, aderência, apoptose e diferenciação de linfócitos T (DONG et al., 2002).

Adicionalmente, essa molécula é essencial para promover a proliferação celular e garantir a sobrevivência da célula. Dependendo do tipo de célula e do

estímulo recebido, pode tanto estimular a apoptose quanto barrá-la. A p38 está, muitas vezes, desregulada em processos tumorais, onde a sua ativação promove o crescimento acelerado em conjunto com uma sobrevivência celular que se perdura no tecido (ZHENG et al., 2015).

Por isso, inibidores dessa rota de sinalização são alvos para serem utilizados como terapêuticos antitumorais. Nesse contexto, insere-se o estudo realizado por Yang e colaboradores (2011), no qual foi estipulado que a inibição da rota da p38 aumenta a sensibilidade de células de câncer colorretal ao quimioterápico 5-fluoracil. Os resultados encontrados nessa pesquisa sugeririam que a utilização do inibidor da rota da p38, SB203580, em associação com o quimioterápico 5-fluoracil, diminuiu significativamente a viabilidade das células e ainda, aumentou a morte celular, a atividade das caspases e a expressão do gene Bax. Então, postula-se que a p38 está envolvida, diretamente, com a sobrevivência das células cancerígenas e assim, a inibição dessa rota poderia tornar as células mais suscetíveis à ação do fármaco, diminuindo a resistência tumoral e, conseqüentemente, tornando-as vulneráveis à morte (YANG et al., 2011).

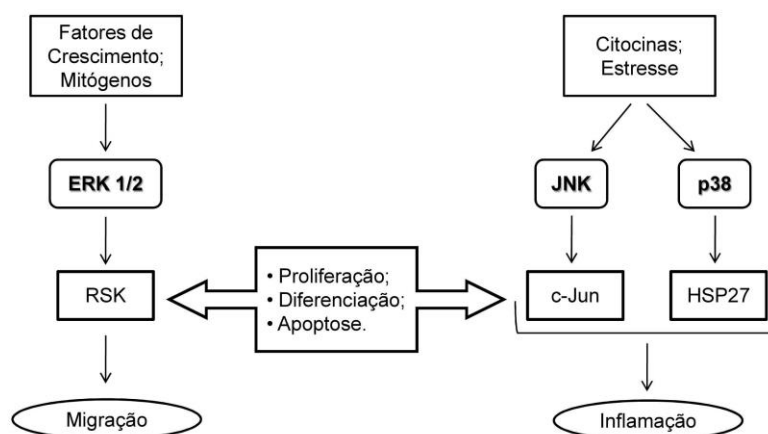


Figura 3: Rota da ativação e da resposta celular das MAPKs. Fonte: adaptada de DHILLON et al., 2007.

1.3 QUIMIOTERÁPICOS: MECANISMO DE AÇÃO

O crescimento celular é dividido em diferentes etapas. Na fase G0 a célula está em repouso e a atividade metabólica é baixa, quando a célula inicia o seu processo de divisão ela passa para a fase G1, nessa etapa o DNA começa a se

desenovelar e ocorre um aumento da síntese de proteínas essenciais para a replicação do DNA, a qual acontece na fase S. Na fase G2 ocorre a síntese de outros componentes necessários para atingir a divisão, como, por exemplo, o fuso mitótico, o qual é importante para a mitose que é realizada na fase M (COOPER et al., 2000).

Após a citocinese e a conclusão da divisão celular, a célula termina o ciclo e retorna para a fase G0. Entretanto, as células cancerígenas não finalizam o ciclo e retornam direto para a fase G1 sem entrar em G0, tornando assim, a multiplicação mais acelerada. Ainda, a maioria das células cancerígenas torna-se imortal pelo fato de apresentar uma mutação na enzima telomerase, a qual é inativa na maioria dos tecidos adultos, e essa alteração genética pode torná-la ativa. Dessa forma, as células tumorais garantem a integridade dos seus telômeros, evitando o envelhecimento e, conseqüentemente, a morte, como aconteceria fisiologicamente em uma célula normal (MURPHY; LEVINE, 2001).

Alguns agentes quimioterápicos exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular e assim, são denominados fármacos ciclo-celular específicos (CCS). Além disso, há um segundo grupo de agentes, denominado fármacos ciclo-celular não específicos (CCNS), que têm a capacidade de eliminar as células tumorais independentemente de estarem atravessando o ciclo (ALMEIDA et al., 2005). A figura 4 retrata alguns quimioterápicos CCS que podem agir em diferentes fases no ciclo celular, bloqueando-o com o intuito de frear o crescimento desordenado das células cancerígenas.

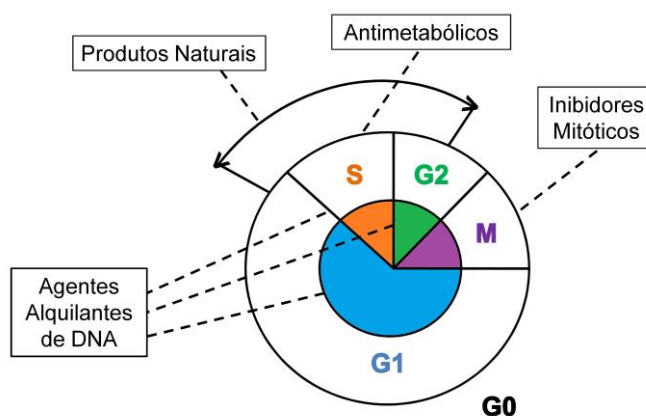


Figura 4: Representação dos diferentes estágios da divisão celular e onde alguns quimioterápicos podem atuar. Fonte: adaptada de ALMEIDA et al., 2005.

1.3.1 Oxaliplatina: um intercalante do DNA

A Oxaliplatina é um quimioterápico derivado da platina de terceira geração, utilizado principalmente no tratamento de CCR. De forma similar à Cisplatina, a Oxaliplatina age de maneira citotóxica nas células tumorais, por meio da formação de adutos de DNA e inibição da síntese do material genético (SEETHARAM; SOOD; GOEL; 2009).

Entretanto, muitas vezes, a eficiência da Oxaliplatina é comprometida, pelo fato dos adutos de DNA serem reconhecidos por enzimas de reparo das células tumorais (CHANEY et al., 2004). Além disso, outros mecanismos celulares estão relacionados com a resistência à Oxaliplatina, como, por exemplo, alteração na via apoptótica mitocondrial (GOURDIER et al., 2002) e a superexpressão da quinase AKT (LEELAWAT et al., 2009). Ainda, estudos realizados com o ensaio *Microarray*, sugerem que há um grande número de genes envolvidos na resistência tumoral com esse fármaco (BOYER et al., 2006).

1.4 RESISTÊNCIA TUMORAL: INSENSIBILIDADE AOS QUIMIOTERÁPICOS

A resistência tumoral é um fenômeno comum, principalmente, em cânceres mais agressivos e em fase mais avançada, em que as células cancerígenas não respondem mais a ação dos quimioterápicos através de várias estratégias adaptativas (HOLOHAN et al., 2013).

A resistência a tradicionais quimioterápicos a nível molecular pode ser desencadeada por diversos fatores, como, por exemplo, inativação intracelular da droga, sistemas de desintoxicação, sistemas de reparo de DNA, evasão da apoptose, transportadores de membrana e adesão celular (RAGUZ; YAGÜE, 2008).

Há dois grandes grupos de fatores que podem contribuir para a insensibilidade tumoral aos fármacos. O primeiro grupo inclui aspectos farmacológicos e fisiológicos, como metabolização e excreção da droga, forma imprópria de acesso do quimioterápico até o tumor e inadequada taxa de perfusão. O segundo grupo inclui fatores específicos celulares e teciduais, como, por exemplo, a família de enzimas do citocromo p450, a qual é responsável por metabolizar uma grande variedade de xenobióticos que, muitas vezes, encontra-se superexpressada

em vários tumores sólidos, contribuindo para uma metabolização mais rápida do fármaco (GARATTINI et al., 2007).

Além disso, muitos fármacos que são análogos a precursores de DNA, como é o caso do 5-fluoracil e da citosina-arabinosídeo, precisam de uma ativação metabólica para exercer a sua atividade, porém, muitas células cancerígenas apresentam mutações nas vias de ativação. Ainda, em muitos cânceres a enzima topoisomerase encontra-se alterada, a qual é importante em processos de replicação do material genético, assim impede a atividade de fármacos que são intercalantes do DNA e atuam impedindo a replicação dessa molécula, como a doxorrubicina, o etoposido e a camptotecina. Muitos quimioterápicos que agem gerando danos ao material genéticos, como compostos de platina, agentes alquilantes, nitrosoureas, são desvencilhados pelas células tumorais pela ativação de um sistema de reparo ao DNA (RAGUZ & YAGÜE, 2008). Além disso, o controle da morte celular por meio da evasão da apoptose ou da senescência, necrose, contribuem para a resistência tumoral (DIM, 2005; MANSILLA et al., 2006).

Adicionalmente, uma molécula envolvida na perda da sensibilidade das células tumorais aos fármacos é a survivina, proteína essencial na regulação da progressão da mitose, inibição da apoptose e resistência à radioterapia e à quimioterapia em diversos tipos de câncer, por isso, muitas pesquisas tentam encontrar mecanismos para a inibição dessa molécula, a fim de aumentar a sensibilização de alguns medicamentos contra o câncer (ZAFFARONI; PENNATI; DAIDONE, 2005).

1.5 QUIMIOTERAPIA: UM AGRESSIVO TRATAMENTO CONTRA O CÂNCER

Devido ao fato da quimioterapia agir em células que estão em constante divisão celular, muitas vezes, os fármacos atuam de forma não-específica e acabam lesionando tanto as células neoplásicas quanto as sadias, que possuem um crescimento frequente, como, por exemplo, as células epiteliais. Por esse fato, efeitos colaterais, como, náuseas, tonturas, perda de cabelo, emagrecimento e fadiga são relatados pelos pacientes (ALMEIDA et al., 2005).

A fadiga é um dos problemas mais frequentes relatados pelos pacientes que estão em tratamento quimioterápico. Fadiga designa-se como cansaço ou exaustão

constante, o que gera um grande impacto negativo na qualidade de vida do paciente. O aumento da produção de marcadores inflamatórios, como as citocinas, relacionado com a progressão do tumor e também durante a quimioterapia, poderia estar relacionado com a fadiga (CAMPOS et al., 2011).

A fadiga pode ser tratada através de exercícios físicos, terapia cognitivo-comportamental, acupuntura, entre outros. Porém, a fadiga moderada e grave pode exigir o uso de tratamentos farmacológicos, como, por exemplo, o uso do metilfenidato para tratar a anemia induzida pela quimioterapia, o que sugere oferecer algum benefício aos pacientes, mas, o tratamento para a fadiga relacionada ao câncer continua insatisfatório (BERRY et al., 2005).

Diante disso, o uso de alimentos funcionais energizantes, principalmente os ricos em compostos bioativos, como, por exemplo, a cafeína, poderiam ser utilizados como antifadigantes durante o tratamento quimioterápico para melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

1.6 GUARANÁ: UM FRUTO ULTRACAFEINADO DA AMAZÔNIA

A *Paullinia cupana*, uma planta conhecida popularmente como guaraná, é uma espécie nativa da região Amazônica do qual tem sido relatadas propriedades estimulantes e medicinais (SCHIMPL et al., 2013) (Figura 5). O guaraná tem sido amplamente usado em bebidas, principalmente energéticas, em todo o mundo. A sua primeira utilização foi mencionada pelo missionário João Felipe Bettendorf, em 1669, que descreveu seu uso pela tribo indígena Sateré-Mawé em virtude dos seus efeitos estimulantes e terapêuticos contra dores de cabeça, febre e infecções. No Brasil, a popularidade do guaraná ocorreu via a produção e comercialização de refrigerantes (SCHIMPL et al., 2013).

As propriedades funcionais do guaraná podem ser atribuídas à presença de diversas moléculas bioativas na sua composição, com destaque, a cafeína, teobromina, teofilina e catequinas. No guaraná, a cafeína é o bioativo mais prevalente, onde a sua concentração é de três vezes maiores a encontrada no café. Um estudo conduzido por Angelo e colaboradores (2008) avaliou o transcriptoma do guaraná identificando transcritos de moléculas nessa planta que também são encontradas no café, chá (verde e preto) e chocolate, indicando uma semelhança de características funcionais do guaraná com estes alimentos (ANGELO et al., 2008).

Entre as propriedades do guaraná, observadas a partir de estudos em modelos experimentais e alguns em seres humanos, destacam-se: ação antioxidante (MATTEI et al., 1998; BASILE et al., 2005; JIMOH; SOFIDIYA; AFOLAYAN, 2007), ação antimicrobiana (FONSECA et al., 1994; PINHEIRO et al., 1987; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007), efeito antialérgico (JIPPO et al., 2009), antiplaquetário (HALLER; JACOB; BENOWITZ, 2005; SUBBIAH; YUNKER, 2008) genoprotetor contra dano no DNA (FUKUMASU et al., 2006), quimiopreventivos na hepatocarcinogênese (FUKUMASU et al., 2008), anticarcinogênicos no melanoma de pulmão (FUKUMASU; LATORRE; ZAIDAN-DAGLI, 2010), citoprotetor contra dano testicular causado pela exposição ao cádmio (LEITE et al., 2010), assim como, efeito gastroprotetor (CAMPOS et al., 2005).

Na cultura popular o guaraná é ainda considerado detentor de propriedades afrodisíacas. Em um estudo realizado em coelhos observou-se ação vasodilatadora do guaraná nos corpos cavernosos (ANTUNES et al., 2001). Também, atribui-se ao guaraná ação neurofuncional na memória, efeito antidepressivo (OTOBONE et al., 2007; KENNEDY et al., 2004), antifadigante (HASKELL et al., 2007), efeito antiobesogênico, termogênico (BÉRUBÉ-PARENT et al., 2005), e hipolipimiente (LIMA et al., 2005).

Uma investigação conduzida por participantes da Rede Amazon-Gene de pesquisa comparou diversos aspectos relacionados à saúde e ao metabolismo de 637 idosos ribeirinhos (KREWER et al., 2011). Os resultados mostraram: menor prevalência de doenças crônicas não-transmissíveis, como, diabetes do tipo 2, hipertensão, obesidade, dislipidemia, doenças cardiovasculares e neoplasias nos idosos que consumiam habitualmente (> 5 vezes por semana) o guaraná. Este estudo deu subsídio a investigações subsequentes do potencial efeito nutrigenético e nutrigenômico do guaraná a partir de protocolos, *in vitro* e *in vivo*, incluindo resultados que mostraram efeito do guaraná na modulação do óxido nítrico (BITTENCOURT et al., 2013), diminuição dos níveis da produção de LDL oxidada (molécula diretamente relacionada a aterosclerose) (PORTELLA et al., 2013), de triglicerídeos, de ácido úrico e de marcadores do estresse oxidativo em adultos que ingeriam uma dose mínima de guaraná (90 mg/dia).



Figura 5 – Fruto do guaraná (*Paullinia cupana*). Fonte: adaptado de Schimpl et al, 2013.

1.6.1 Guaraná: poderia ser um grande aliado para pacientes com câncer

Devido ao fato da quimioterapia ser bastante agressiva e causar uma série de efeitos colaterais que comprometem a qualidade de vida dos pacientes, alimentos antioxidantes e enérgicos são de grande interesse, a fim de serem utilizados durante o tratamento quimioterápico para promover uma melhora em sintomas, como, a fadiga, a perda de peso e a depressão.

Diante disso, Campos e colaboradores (2011) realizaram um estudo randomizado, duplo-cego, placebo controle para avaliar o efeito do Guaraná, contra a fadiga gerada pela quimioterapia em pacientes com câncer de mama. Nesse estudo, foram administrados 100 mg de pó de guaraná por dia, o que reduziu significativamente a fadiga e, ainda, nenhum efeito adverso foi encontrado, como, distúrbio de sono e ansiedade. Além disso, resultados similares foram encontrados no estudo realizado por Giglio e colaboradores (2013), onde foi relatado o efeito antifadigante do guaraná em pacientes com tumores sólidos.

Ainda, a perda de peso também é um grave problema enfrentado pelos pacientes em estágio avançado da doença e submetidos à quimioterapia. Por isso, Palma e colaboradores (2016) averiguaram se o guaraná melhoraria a anorexia

presente em pacientes com câncer avançado. Os pacientes receberam 50 mg do extrato de guaraná, diariamente, durante quatro semanas. Em um grupo de 18 pacientes que completaram o estudo até o final, dois apresentaram ganho de peso em 5%, enquanto que seis pacientes melhoraram o apetite. Os resultados apontaram que o guaraná diminuiu a falta de apetite e a sonolência (PALMA et al., 2016).

Outro fator que diminui a qualidade de vida de pacientes com câncer é os fogachos, os quais são episódios de calor intenso, sudorese, acompanhado de palpitações e ansiedade. São comuns entre pacientes mulheres com câncer de mama e afetam 70% daquelas que recebem tratamento com tamoxifeno, também geralmente acometem 75% das mulheres em período da menopausa. Já que as sobreviventes de câncer de mama necessitam de opções não hormonais para controlar os fogachos, devido aos efeitos potenciais danosos da reposição hormonal com tumores sensíveis a hormônios, instigou o grupo de pesquisa Oliveira e colaboradores (2013) a investigarem o efeito do guaraná na diminuição de fogachos em pacientes com histórico de câncer de mama e que completaram tratamento (cirurgia, quimioterapia adjuvante e neoadjuvante, e radioterapia). Os resultados dessa pesquisa mostraram que o guaraná diminuiu o número dos fogachos e também a gravidade em 10 das 15 pacientes que tiveram experiência anterior de pelo menos 14 fogachos por semana.

1.6.2 Principais moléculas bioativas do guaraná poderiam amenizar efeitos colaterais da quimioterapia

O tratamento quimioterápico pode causar diversos danos em células saudáveis, comprometendo o funcionamento adequado de órgãos e de tecidos. Por isso, além de alimentos funcionais estarem sendo utilizados para minimizar esses efeitos prejudiciais para a qualidade de vida dos pacientes, como é o caso do guaraná, as moléculas bioativas presentes nessas fontes antioxidantes também estão sendo estudadas a fim de amenizar os efeitos colaterais da quimioterapia.

Nesse contexto, insere-se a cafeína, que foi relatada por Geriyol e colaboradores (2015), sendo capaz de diminuir os efeitos citogenotóxicos do quimioterápico vinoblastina. A cafeína foi administrada em ratos em diferentes concentrações (25, 50 e 100 mg/Kg) associada com o quimioterápico (1.5 mg/Kg),

sendo a concentração de 100 mg de cafeína mas eficaz em prevenir danos genotóxicos.

Outra molécula bioativa importante, que está sendo estudada como adjuvante para neutralizar os efeitos nocivos da quimioterapia é a epigalocatequina-3-galato. Saeed e colaboradores (2015) relataram que o pré-tratamento com essa molécula é capaz de atenuar a cardiotoxicidade gerada pela doxorubicina em rato. Ainda, a epigalocatequina-3-galato, é capaz de proteger da neurotoxicidade gerada pela cisplatina pela inibição da apoptose em camundongos (ZOU et al., 2014).

1.6.3 Guaraná: possível potencializador da ação quimioterápica

Devido à crescente utilização do guaraná pelos pacientes com câncer como um atenuador dos graves efeitos colaterais do tratamento quimioterápico, é de essencial importância que seja avaliado a interação do guaraná com os principais quimioterápicos utilizados para o tratamento do câncer.

Diante da necessidade de investigar se o guaraná poderia interferir na ação antitumoral dos quimioterápicos, tanto aumentando a atividade antitumoral quanto diminuindo a ação, instigou Hertz e colaboradores (2014) a testarem o efeito do guaraná *in vitro* em células de câncer de mama (MCF-7) em diferentes fármacos usados durante a quimioterapia. Os resultados do estudo apontaram que em geral o guaraná aumentou o efeito antiproliferativo dos quimioterápicos, causando uma diminuição da proliferação em 40% em relação ao controle, após 72 horas de exposição, sugerindo um sinergismo entre o guaraná e os quimioterápicos (HERTZ et al., 2014).

Além disso, foi sugerido que a cafeína, principal componente do guaraná, seria capaz de diminuir a resistência de alguns tipos de neoplasias que não respondem à quimioterapia, como é o caso do câncer de pulmão, o qual é pouco sensível à cisplatina. A cafeína é capaz de inibir a atividade das enzimas, ATM e ATR, os quais são importantes quinases que mediam a resposta ao dano ao DNA, permitindo a parada do ciclo celular, a fim de facilitar o reparo ao material genético. Os resultados indicaram um aumento da apoptose em cultura de linhagem de células tumorais, HTB182 e CRL5985, de câncer de pulmão tratadas com cafeína e cisplatina. Ainda, a associação da cafeína e da oxaliplatina inibiu o crescimento celular (WANG et al., 2015).

A epigallocatequina-3-galato, importante molécula bioativa encontrada no guaraná e também em outros alimentos, como, o chá verde, foi estudada por Mayr e colaboradores (2015), como um potente potencializador da cisplatina em células de câncer de vesícula biliar. Diferentes tipos de linhagens celulares, para esse tipo de câncer, foram tratadas com epigallocatequina-3-galato isolada e em associação com a cisplatina. Foi encontrada uma significativa diminuição da viabilidade celular nas células tratadas apenas com a catequina e a combinação com o quimioterápico mostrou um sinergismo citotóxico em cinco das linhagens testadas, assim como um efeito antagonista em outros dois tipos. Ainda, o sinergismo aumentou a apoptose e parou o ciclo celular.

Além disso, o efeito sinérgico potencializador da epigallocatequina-3-galato associada à doxorubicina foi encontrado em células de carcinoma hepatocelular (Hep3B), devido ao aumento de vesículas de autofagia dentro das células tumorais e consequente morte celular (CHEN et al., 2014).

Assim como, a epigallocatequina-3-galato, a teobromina também foi postulada ser capaz de potencializar a ação da doxorubicina. Sadzuka e colaboradores (1995) encontraram que a teobromina aumentou a atividade antitumoral da doxorubicina em células de carcinoma de ascite de Ehrlich.

1.6.4 Guaraná: um potencial agente antitumoral

Pelo fato do guaraná ser rico em várias moléculas bioativas, como, a cafeína, a catequina e a teobromina, o seu efeito antitumoral vem sendo estudado, tanto para prevenir o desenvolvimento de processos tumorais quanto para deter o crescimento desenfreado do tumor.

Fukumasu e colaboradores (2006) sugeriram que o guaraná é capaz de reduzir a incidência e a multiplicidade de lesões pré-neoplásicas induzido pelo dietilnitrosamina em fígado de camundongos. Os animais foram tratados com dietilnitrosamina, o qual é considerado um potente agente citotóxico, e receberam três diferentes doses de guaraná durante 25 semanas. As lesões pré-neoplásicas geradas no fígado foram drasticamente reduzidas pela maior dose de guaraná, indicando assim, um efeito protetor dos efeitos da dietilnitrosamina para a hepatocarcinogênese em ratos.

Ainda, o mesmo grupo de pesquisa mostrou que o guaraná é capaz de reduzir a proliferação celular e aumentar a apoptose de metástases pulmonares de melanoma. Esse trabalho analisou o efeito antiproliferativo da administração diária de guaraná (2 mg/g de peso corporal) nas células de metástases pulmonares de melanoma (B16/F10) em modelo experimental de ratos. Os resultados mostraram redução de 65% da área do tumor nos animais que receberam guaraná, além de diminuir a proliferação e aumentar a apoptose celular (FUKUMASU et al., 2008).

Fukumasu e colaboradores (2011) também demonstraram o efeito antiproliferativo do guaraná em células de carcinoma de ascite de Ehrlich, o qual é um adenocarcinoma mamário em ratos, pela diminuição da expressão da molécula ciclina-D1 e indução da parada do ciclo celular na fase G0/G1. As ratas foram tratadas com três diferentes doses do guaraná (100, 1000 e 2000 mg/kg) por 7 dias, depois as células do carcinoma foram injetadas e tratadas até o 21º dia. O tratamento com guaraná diminuiu o volume do tumor, o número celular e hemorragias, além de reduzir a expressão da ciclina-D, proteína importante no ciclo celular, e bloquear a fase G0/G1 do ciclo celular. Ainda, o guaraná significativamente aumentou a sobrevivência dos animais.

1.6.5 Principais moléculas bioativas do guaraná: têm grande potencial anticarcinogênico

As substâncias bioativas isoladas presentes no guaraná, como, por exemplo, a cafeína, a catequina e a teobromina, também estão sendo estudadas como importantes moléculas antitumorais, tanto para a prevenção quanto para deter o crescimento do câncer já instaurado.

Nakamura e colaboradores (2015) sugeriram que o consumo do café pode diminuir o risco de recorrência de tumores de colorretal (adenomas precursores de CCR e estágios iniciais desse tipo de câncer) em homens japoneses, pela ação antitumoral da cafeína presente no café. Esse estudo incluiu 307 pacientes que removeram os tumores de colorretal. Os resultados indicaram que os pacientes que consumiram mais que três xícaras de café por dia, tiveram menos incidências de recidivas do tumor em relação ao grupo que não consumia café.

Ainda, Sun e colaboradores (2015) também relataram que a cafeína tem efeito antitumoral suprimindo a proliferação e aumentando a apoptose de células de

glioblastoma humana (U251). Para essa pesquisa, a linhagem celular U251 foi tratada com cafeína, onde os resultados encontrados mostraram indução de apoptose, aumento da expressão de genes pró-apoptóticos e inibição do crescimento celular.

Além disso, a ação antitumoral da epigalocatequina-3-galato, encontrada no guaraná e em grande concentração no chá-verde, foi descrita por Shimizu e colaboradores (2015), pelo fato de inibir o crescimento e proliferação celular em células de hepatocarcinoma humano pela indução da apoptose e inibição de algumas moléculas de crescimento, como AKT e ERK. Zhang e colaboradores (2015) também encontraram o mesmo efeito antitumoral em células de carcinoma hepatocelular (LM6) e demonstraram que a epigalocatequina-3-galato não afeta as células saudáveis do fígado.

Adicionalmente, a epigalocatequina-3-galato também apresenta efeito anticarcinogênico em células humanas de leucemia promielocítica aguda (HL-60) pela inibição da síntese de DNA, proliferação celular, aumento da apoptose e bloqueio do ciclo celular (SAIKO et al., 2015).

Ainda, Moses e colaboradores (2015) sugeriram que a epigalocatequina-3-galato apresenta atividade antitumoral em células humanas de câncer de próstata pela inibição das proteínas de choque térmico 90, que estão envolvidas em muitos processos de estresse celular e também tem um papel importante para a promoção do crescimento do câncer e sobrevivência.

O efeito antitumoral da epigalocatequina-3-galato também foi encontrado em linhagens celulares de osteossarcoma (MG63 e U2OS) (JIANG et al., 2014), de câncer de pulmão (A549) (SONODA et al., 2014; MA et al., 2014), carcinoma de ovário (OVCAR-3) (WANG et al., 2014) e colorretal (HCT116) (MOSELEY et al., 2013).

Além disso, outro composto presente no guaraná que é bastante estudado é a teobromina, a qual é uma xantina encontrada em grande quantidade no cacau. Sugimoto e colaboradores (2014) analisaram o efeito antitumoral da teobromina em células de glioblastoma humana. Os resultados encontrados sugeriram que essa molécula bioativa é capaz de diminuir o crescimento celular através da inibição de fatores de crescimento.

Apesar de alguns trabalhos já relatarem o efeito antitumoral do guaraná, bem como, o dos seus principais compostos, ainda é necessário descobrir essa atividade

em outros tipos de carcinomas, principalmente, os que são resistentes aos quimioterápicos tradicionais. Assim como, é imprescindível desvendar outras rotas e mecanismos de interações até hoje desconhecidos, que seriam capazes de deter a proliferação desenfreada de células tumorais.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Analisar o efeito antitumoral *in vitro* do extrato hidroalcólico guaraná e das suas principais biomoléculas em células de câncer colorretal e de mama, assim como na atividade quimioterápica em células de câncer colorretal, avaliando também sua ação nas rotas mTOR e MAPK como possível mecanismo causal antitumoral.

2.2 ESPECÍFICOS

Averiguar o efeito antitumoral *in vitro* do extrato hidroalcólico do guaraná (*Paullinia cupana*) e das suas principais moléculas bioativas, cafeína, catequina e teobromina, nas células de CCR (HT-29) e de mama (MCF-7), bem como, na atividade quimioterápica (Oxaliplatina) em células HT-29, através de análises:

1) Na atividade quimioterápica e antitumoral em células HT-29, a partir da avaliação:

- da viabilidade celular;
- da proliferação celular;
- de marcadores de apoptose;
- da alteração do ciclo da célula;
- da expressão de genes associados a apoptose e a proliferação celular;

2) No efeito antiproliferativo e na modulação de rotas tumorais em células HT-29 e MCF-7, via determinação:

- da proliferação celular;
- da formação de colônias tumorais;
- da expressão de proteínas do mTOR e das MPAKs associadas ao câncer.

Investigar um possível efeito citotóxico do extrato do guaraná em células saudáveis, nas mesmas concentrações utilizadas para a análise antitumoral, em

linhagem celular de fibroblastos (HFF-1) e Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSPs), via análise:

- da viabilidade celular;
- de marcadores de apoptose;
- da alteração do ciclo da célula.

3 RESULTADOS

Os resultados referentes a esta tese estão apresentados sob a forma de três manuscritos a seguir. Os itens Materiais e Métodos e Resultados encontram-se nos próprios manuscritos. A apresentação do primeiro manuscrito está baseada na versão publicada na revista *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, com o título de “*Guaraná a caffeine-rich food increases oxaliplatin sensitivity of colorectal HT-29 cells by apoptosis pathway modulation*”. O segundo manuscrito é referente à versão submetida à revista *Food Research International*, intitulado “*Antitumor effects of Guaraná (Paullinia cupana) against Colorectal Cancer Cell (HT-29) involves modulation of S6K/mTOR Pathway*”. Já a apresentação do terceiro manuscrito está baseada na versão submetida à revista *Journal of Natural Products*, com o título de “*Guaraná, a high caffeine fruit that improves fatigue in patients undergoing chemotherapy, presents cytotoxic activity by inhibiting AKT/mTOR/S6K and MAPK Pathways in Breast Cancer Cell (MCF-7)*”.

RESEARCH ARTICLE

Guaraná a Caffeine-Rich Food Increases Oxaliplatin Sensitivity of Colorectal HT-29 Cells by Apoptosis Pathway Modulation

Francine Carla Cadoná^{a,d}, Alencar Kolinski Machado^{b,d}, Verônica Farina Azzolin^{b,d}, Fernanda Barbisan^{b,d}, Eduardo Bortoluzzi Dornelles^{a,d}, Werner Glanzner^c, Paulo Bayard Dias Gonçalves^c, Charles Elias Assmann^{a,d}, Euler Esteves Ribeiro^e and Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{a,b,d,f*}

^aPost-Graduate Program in Biochemistry and Toxicology at Federal University of Santa Maria, Brazil; ^bPost-Graduate Program in Pharmacology at Federal University of Santa Maria, Brazil; ^cLaboratory of Biotechnology and Animal ReproducBioRep at Federal University of Santa Maria, Brazil; ^dLaboratory of Biogenomic at Federal University of Santa Maria, Brazil; ^eThird Age Open University, University of Amazonas State, Brazil; ^fPost-Graduate Program in Gerontology, at the Federal University of Santa Maria, Brazil

Abstract: We investigated the *in vitro* effects of guaraná and its main metabolites (caffeine, theobromine and catechin) on cytotoxicity and cell proliferation on colorectal cancer (CRC) line HT-29 cells and on oxaliplatin sensitivity. The cells were exposed to different concentrations of guaraná extract with and without oxaliplatin. The concentrations of bioactive molecules were also estimated considering their potential proportion on guaraná hydro-alcoholic extract. Apoptosis effect was analyzed by annexin V quantification using flow cytometry, while apoptosis pathway gene modulation (p53, Bax/Bcl-2 genes ratio, caspases 8 and 3) was determined by qRT-PCR analysis. Cells exposed to guaraná at a concentration of 100 µg/mL presented a similar cytotoxic effect as HT-29 cells treated with oxaliplatin and did not affect the sensitivity of the drug. Guaraná presented cell anti-proliferative effect and increased anti-proliferative oxaliplatin sensitivity at all concentrations tested here. Guaraná was able to induce apoptosis and up-regulate the p53 and Bax/Bcl-2 genes.



Ivana Beatrice Mânica da Cruz

ARTICLE HISTORY

Received: July 13, 2015
Revised: November 20, 2015
Accepted: December 08, 2015

DOI:
10.2174/18715206166661512171211
38

Keywords: Guaraná, HT-29, cancer colorectal, oxaliplatin.

1. INTRODUCTION

Studies have shown that caffeine might be efficient to prevent colorectal cancer (CRC) development. Despite the potential use of caffeinated beverages in cancer prevention and cancer related fatigue (CRF) treatment, data produced until now are not satisfactorily consistent, mainly considering the impact of the concomitant use of caffeine-rich beverages during chemotherapeutic treatment. In fact, the concomitant use of caffeinated beverages during chemotherapy could alter the response of sensitive and resistant cancer cells to drug exposition.

A recent investigation suggested that caffeine could negatively effect the CRF response to chemotherapy drugs, such as paclitaxel on CRC [1]; the authors advised that the consumption of caffeine could be avoided in CRC patients treated with this drug. The relevance of these results is related to the evidence that has shown CRC high incidence worldwide, presenting a high prevalence of metastasis. In general, CRC is treated with chemotherapy, it can decrease the size and the growth of the tumor and reduce the metastasis generation. Although chemo treatment 50-60% of patients develop metastasis following initial therapy for localized disease [2, 3], indicating genetic resistance to chemotherapeutic drugs [4, 5].

However, the potential effect of nutritional constituents, mainly concomitant input of caffeinated foods or as part of complementary alternative medicine (CAM) [6] on CRC chemotherapy response is a question not decided yet. It is the case of foods containing guaraná (*Paullinia cupana*). Guaraná an Amazonian fruit consumed since pre-Columbian times, besides contains more caffeine than any other plants consumed by Western populations [7] presents in its

composition other bioactive molecules such as theobromine, other xanthine alkaloids and catechins that have several biological activities including carcinogenic effects [8].

Recent investigations suggested that guaraná could be use as anti fatigue supplement for some type cancers [9, 10], also improving anorexia in patients with advanced cancer [11]; helping in the control of hot flashes in breast cancer patients [12]. Also, Hertz *et al.* (2014) performed an *in vitro* investigation that showed potential guaraná interaction of seven chemotherapeutic drugs used in the breast cancer treatment [13].

Refers to that, the hypothesis of present investigation is that caffeinated foods, such as guarana, could be some effect on oxaliplatin, a wide use chemotherapeutic Oxaliplatin is a key drug in CRC treatment, with a mechanism of action that involves double-stranded DNA breaks and apoptosis triggering of CRC cells [14].

In this context, we investigated here the *in vitro* effect of guaraná and its main metabolites (caffeine, theobromine and catechin) on HT-29 cytotoxicity and cell proliferation and on oxaliplatin sensitivity, a commercial line that presents some resistance to its chemotherapeutic drug. The study also evaluated the potential apoptosis induction by guaraná with and without concomitant oxaliplatin exposure, considering late and early apoptotic HT-29 cells identified by annexin IV, as well as by the differential modulation of genes related to apoptosis pathway.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals

All reagents and solvents used were of analytical grade. Oxaliplatin, caffeine, catechin and theobromine were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The other chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and Gibco® Life Technologies Inc. (Grand Island, NY, USA). The HT-29

*Address correspondence to this author at the I.B.M. da Cruz, Av Roraima 1000, Building 19, Santa Maria-RS, Brazil. Zip Code: 97105-900; Tel/Fax: 55-55-32208163; E-mail: ibmcruz@hotmail.com

colorectal cancer cell lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC®). The chemicals and chemotherapeutic drugs were diluted in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high glucose (4.5 g/L, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Germany) and supplemented with 10% fetal calf serum, and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen, USA).

2.2. Plant Material

The present study is part of a project previously authorized by Brazil Environmental Ministry to access the components of genetic patrimony in national territory (n^o 010547/2013-4) according to Brazilian legislation (n^o 2186-16). To produce a hydro-ethanolic extract, guaraná grain powder (~4 kg) was obtained from Western EMBRAPA, a Brazilian governmental, nonprofit enterprise dedicated to agricultural investigations located in Maués City (03° 23' 01" S, 57° 43' 07" W, Amazonas, Brazil). Details of the guaraná extract production used here were previously described in Bittencourt *et al.* [15]. Based on the small solubility of guaraná powder by the standard means of alcohol and water (70:30) to 100 mL of extraction fluid prepared at a concentration of 300 mg/mL. After 21 days of extraction, the preparation was centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes, and the floating was isolated. Then, the solution was lyophilized to determine xanthine and catechin compositions. The main bioactive molecules present in the guaraná extract were determined by the chromatographic analysis performed on a HPLC machine, as described in Carlson and Thompson [16]. From these procedures, it was possible to determine that the extract used in this study has 12.240 mg/g of caffeine, 6.733 mg/g of theobromine, and 4.336 mg/g total catechins. The concentration of condensed tannin was 16 mg/g. The *in vitro* tests were performed using lyophilized extract diluted directly in culture medium. Furthermore, the solution was sterilized by filtration (0.22 µm diameter). The guaraná concentrations were chose considering an *in vivo* guaraná supplementation lower than 100 mg/day.

2.3. Experimental Design

The *in vitro* study developed was performed in two general protocols. In the first, HT-29 cells were exposed to oxaliplatin at different concentrations and a mortality curve was performed to determine the concentration required to kill 50% of cells (LD50). The LD50 oxaliplatin dosage was used in all experiments in order to test the potential guaraná action on HT-29 cells' sensitivity to oxaliplatin. The second protocol was conducted by exposing HT-29 cells to different concentrations of guaraná extract (0, 5, 10, 30, 100, 300 and 1000 µg/mL) with or without the LD50 oxaliplatin. The concentrations of bioactive molecules also were estimated considering their potential proportion on guaraná hydro-alcoholic extract: Caffeine (0.06, 0.12, 0.36, 1.22, 3.67 and 12.24 µg/mL), theobromine (0.03, 0.06, 0.20, 0.67, 2.01 and 6.73 µg/mL) and catechin (0.02, 0.04, 0.12, 0.43, 1.29 and 4.33 µg/mL); their effects on HT-29 viability and cell proliferation also were determined.

All protocols evaluated the cytotoxicity (24 h exposition) and anti-proliferative effect (72 h exposition) by MTT Assay, that analyzes the cell metabolism through of the reduction yellow salt 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT).

A complementary flow cytometry analysis of treatment concentrations was performed to determine the oxaliplatin and guaraná effects on apoptosis triggering by flow cytometry analysis as well as by analyzing the modulation of apoptosis pathway genes after six hours of exposure (p53, Bax/Bcl-2 genes ratio, caspases 8 and 3).

2.4. Cell Culture and Treatments

The human cancer colorectal HT-29 cell line (ATCC HTB38 - Rio de Janeiro Cell Bank, RJC B 0111, Brazil) was cultured in Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) with 10% fetal bovine

serum (FBS), supplemented with 1% penicillin/streptomycin and amphotericin B. The cells were cultured at 37°C with 5% CO₂ and were expanded by obtaining the optimal amount for the experiments.

Cell suspension was situated in each of 96-well plates (2.5 x 10⁵ cells/well). After cell attachment, the cultures were treated with guaraná extract in several concentrations and its main bioactive molecules. Further, the cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ for 24 and 72 hours to perform the assays.

2.5. MTT Assay

The HT-29 viability and cellular proliferation were initially evaluated by MTT Assay. The floating of the treatments was discarded and the cells were washed and resuspended in phosphate buffer (PBS, 0,01M; pH 7.4), to avoid the interference of the polyphenols present in the guaraná extract. The sample treatments were disposed in a 96 well plate and MTT reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added (dissolved in 5 mg/mL PBS) and incubated for 1 hour at 37 °C. The formazan crystals generated were released from the cells through of DMSO (dimethylsulphoxide) added and measured by 560 nm wavelength [17].

2.6. Flow Cytometry Analysis

Complementary analyses of flow cytometry were performed to confirm the treatment cytotoxicity using Annexin-V-FITC and Propidium Iodide (PI) staining kit (BD Pharmingen™). Annexin-V-FITC can detect early apoptotic processes, while PI allows identifying dead cells. The detection was realized through the connection between the cell receptor with the fluorescent antibodies to Annexin-V and PI. The analysis was performed according to the manufacturer's instructions. Soon, the cells were seeded in 6-well plates at 1 x 10⁶ cells per well in 2 mL of the different treatments in DMEM and incubated for 24 and 72 hours. Following incubation, the cells were trypsinized to be detached and were washed twice with cold PBS and then resuspended in 1X Binding Buffer at a concentration of 1 x 10⁶ cells/ml. After, 100 µL of the solution (1 x 10⁵ cells) containing the cells was transferred to a 5 mL culture tube. Resuspended cells underwent smooth vortexing and staining with 5 µL of Annexin-V-FITC and 5 µL of PI. Following short incubation for 15 min in the dark at room temperature, 400 µL of 1X Binding Buffer was added to each tube, and the florescence of cells was analyzed by flow cytometry according to the manufacturer's specifications [18].

The cell cycle analysis also was performed using flow cytometry after 24 h and 72 h of HT-29 treatment with guaraná, bioactive molecules and oxaliplatin. The PI reagent can insert between the DNA bases and this way measures the quantity of molecules present in the sample. However, PI also can link with RNA molecules, and then the sample needs a prior treatment with nucleases to eliminate this interference. Cells were seeded in 6-well plates at 5 x 10⁵ cells per well in 2 mL of the different treatments in DMEM and incubated for 24 and 72 hours. Following incubation, the cells were trypsinized, washed with PBS and resuspended in 70% ethanol (the suspension was put in the vortex) at -20°C overnight. Previous to analysis, the cells were centrifuged and washed once with PBS; after that, the cells were resuspended in 500 µl PI-solution in PBS: 50 µg/ml PI from 50x stock solution (2.5 mg/ml), 0.1 mg/ml RNase A and 0.05% Triton X-100, and incubated for 40 min at 37°C. Finally, 3 ml of PBS was added to washing and resuspended in 500 µl PBS to flow analysis [19].

2.7. Quantitative Real Time RT-PCR (qRT-PCR) Analysis

Total RNA was extracted using Trizol, following the manufacturer's instructions (Ludwing-Biotec, Brazil). The RNA extracted was measured by a Thermo Scientific NanoDrop™ 1000

Spectrophotometer at a wavelength of 532 nm. To perform reverse transcription, RNA was added to the samples of RNA (1 µg/mL) with 0.2 µL of DNAase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at 37°C during 5 minutes, followed by heating at 65°C by 10 minutes. The cDNA was generated with 1 µL of Iscript cDNA and 4 µL of Mix Iscript (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA-USA). The next steps of the reaction were of 25°C for 5 minutes, 42°C for 30 minutes, and 85°C for 5 minutes and finally with an incubation of 5°C for 60 minutes. qRT-PCR was realized in the Passo One Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) with SYBR Green PCR mastermix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at 95°C for 3 minutes, 40 cycles of 95°C for 15 seconds, and 60°C for 1 minute. The reactions of each sample were made in triplicate, using 0.5µM of each primer (Table 1) and 2X Power SYBR Green PCR mastermix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) the final volume in 15µL. The beta-actin gene was used as a housekeeping gene [20].

2.8. Statistical Analysis

The data were expressed as mean ± standard deviation (SD). The results of viability and anti-proliferative effect of guaraná and chemical molecules were expressed as a percent (%) of control

Table 1. Genes used in Quantitative Real Time PCR.

Name	Forward Sequence	Reverse Sequence
Caspase 1	CGCACACGCTTGTCTCAT	TACGCTGTACCCAGATTTGTAG
Caspase 8	AAGGAGCTGCTCTCCGAATT	CCCTGCCTGGTGTCTGAAGT
P53	TTGGGTCTTTGAACCTTGCT	GTGCAGGCCAACTTGTTCACT
BAX	CCCTTTTCTACTTTGCCAGCAA	CCCGGAGGAAGTCCAATGT
BCL-2	GAGGATTGTGGCCTTCTTTGAGT	AGTCATCCACAGGGCGATGT
Beta-Actina	TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA	TGCGAAGTTAGGTTTGTCA

group. Therefore, the data were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett Test. The statistical tests were performed using GraphPad Prism Software.

3. RESULTS

As can be seen in Fig. 1a, the concentration curve to determine HT-29 cell mortality exposed to oxaliplatin was performed, and the LD50 calculated was 20 µmol/L. This oxaliplatin concentration was use in all subsequent experiments.

Viability analysis showed that cells exposed to guaraná at 100 µg/mL concentration presented a similar cytotoxic effect to HT-29 cells treated with oxaliplatin (Fig. 1b). However, lower and higher guaraná concentrations did not have the same effects.

The anti-proliferative effect of guaraná on HT-29 cells at 30 and 100 µg/mL was more evident and similar to that observed in cells treated with oxaliplatin (Fig. 1c). This anti-proliferative effect was significantly more accentuated in cells exposed to higher guaraná concentrations (300 µg/mL) when compared to cells exposed to oxaliplatin and other low guaraná concentrations. Guaraná also decreased significantly cell proliferation for all of the concentrations tested in 72 hours of exposure (Fig. 1c).

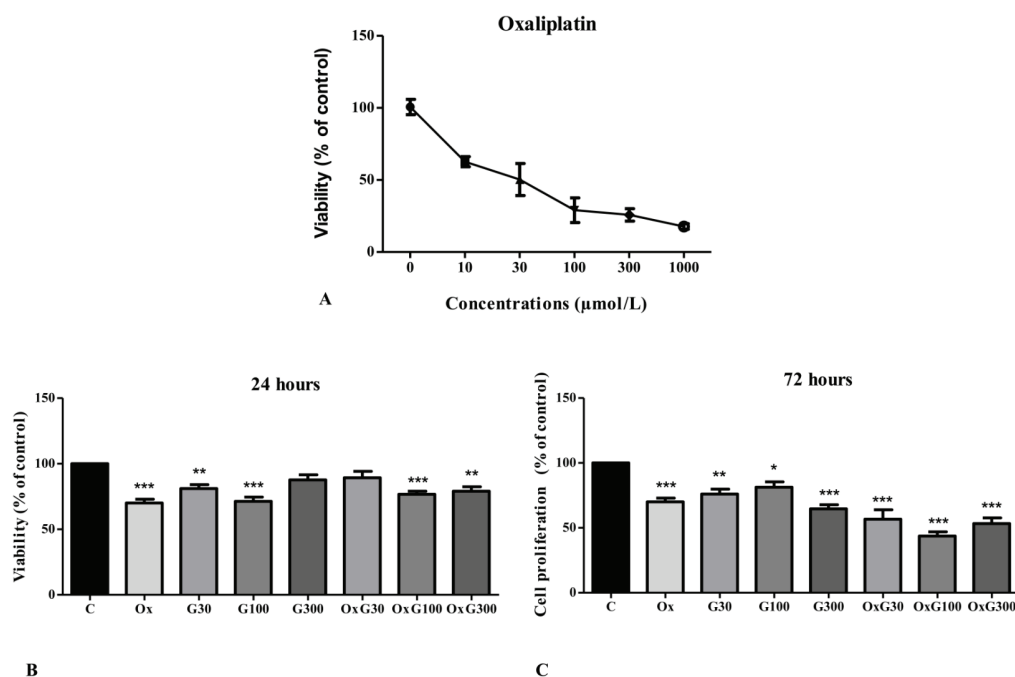


Fig. (1). The concentration curve to determine HT-29 cells' mortality exposed to oxaliplatin was performed and the LD50 calculated was 20 µmol/L (A) after 24 hours. HT-29 viability and proliferation levels exposed to different concentrations of guaraná isolated and in association with oxaliplatin (20 µmol/L) in 24 (B) and 72 (C) hours. The results were compared, like the percentage of negative control (only cells). N=3, significant differences ***($p < 0.0001$), **($p < 0.001$) and * ($p < 0.005$) among treatments were compared by One-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test.

From these results, a complementary analysis was performed to identify the contribution of main guaraná metabolites (caffeine, theobromine and catechin) on cytotoxic and previously described anti-proliferative effects (Fig. 2). At 100 µg/mL, the lowest guaraná concentration that presented cytotoxic (Fig. 2a) and anti-proliferative (Fig. 2b) effect against HT-29 was reported. Therefore, we used its guaraná concentration as well as its estimated concentrations of caffeine, theobromine and catechin to perform the complementary

protocols. As we can see in the Fig. 2c, the best antiproliferative guaraná concentration was 100 µg/mL. For this reason, the proportional concentrations of caffeine, catechin and theobromine found in 100 µg/mL of guaraná were tested in association with oxaliplatin.

Considering that guaraná is cytotoxic and it has an anti-proliferative effect on HT-29 cells, the apoptosis induction by the Annexin V apoptosis marker was determined (Fig. 3, Table 2). At

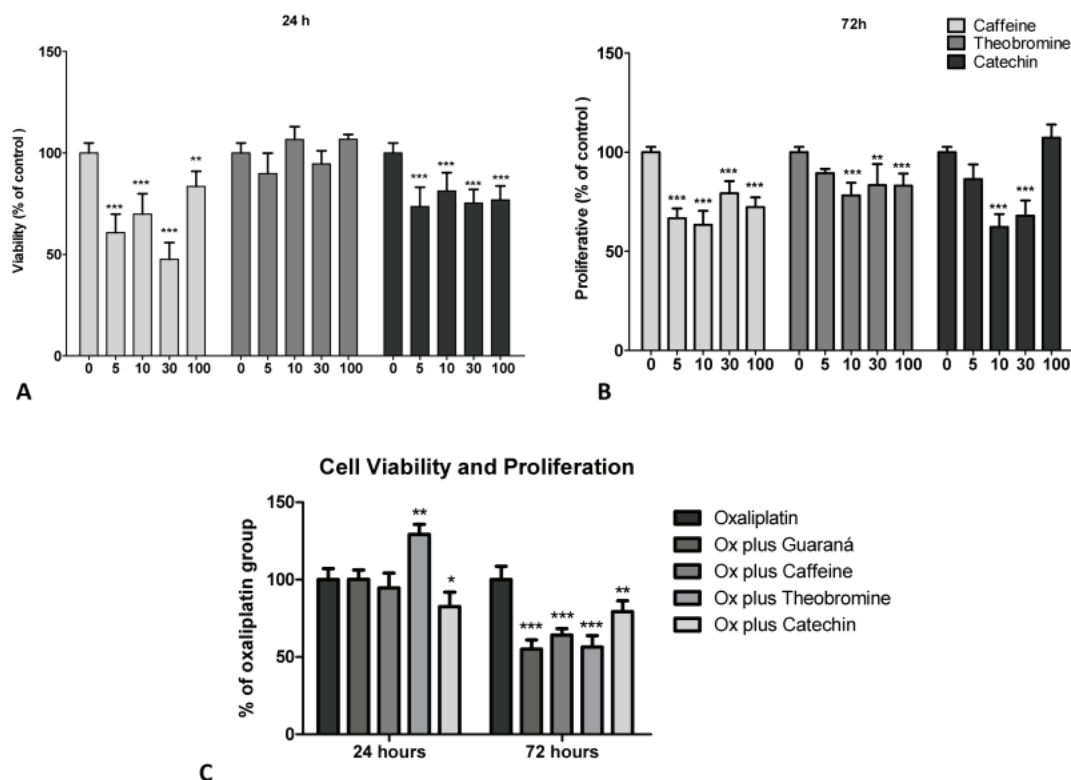


Fig. (2). Viability (2A) and proliferative (2B) effect of HT-29 by MTT Assay of bioactive molecules of guaraná (caffeine, catechin and theobromine) in proportional concentrations of guaraná extract (5, 10, 30, 100 µg/mL). This was followed by the concentrations: Caffeine (0.06; 0.12; 0.36; 1.22 µg/mL), theobromine (0.03; 0.06; 0.20; 0.67 µg/mL) and catechin (0.02; 0.04; 0.12; 0.43 µg/mL). In graphic 2C, the HT-29 cells were treated with the bioactive molecules (in the concentration proportional of 100 µg/mL guaraná extract) associated with oxaliplatin (20 µmol/L). The results were compared, like the percentage of negative control (only cells). N=3, ***($p < 0.0001$), **($p < 0.001$) and * ($p < 0.005$).

Table 2. Guaraná (100 µg/mL) and main metabolites effect on HT-29 cell apoptosis with and without oxaliplatin-exposed.

Treatments	Cell Condition			
	24 h		72 h	
	Early Apoptosis	Dead	Early Apoptosis	Dead
Control	0.01 ± 1.25	6.45 ± 0.29	2.27 ± 1.56	0.19 ± 1.03
Ox	0.27 ± 1.30 ***	12.14 ± 2.60 ***	2.12 ± 1.32	0.33 ± 1.56 ***
Guaraná	0.51 ± 1.19 ***	9.61 ± 0.72 ***	2.72 ± 1.15*	0.52 ± 2.04 ***
Caffeine	0.24 ± 1.10 ***	13.20 ± 1.67 ***	3.95 ± 1.25*	0.89 ± 1.76 ***
Theobromine	0.11 ± 2.17 ***	8.24 ± 0.71 ***	8.57 ± 1.01 ***	1.89 ± 1.28 ***
Catechin	0.33 ± 1.12 ***	7.99 ± 1.08 ***	7.51 ± 2.14 ***	1.52 ± 1.93 ***
Ox plus Guaraná	0.26 ± 1.23 ***	7.98 ± 1.26 ***	3.05 ± 1.07 *	0.58 ± 2.17 ***
Ox plus Caffeine	0.32 ± 1.50 ***	13.02 ± 1.83 ***	4.79 ± 1.89 **	1.09 ± 1.29 ***
Ox plus Theobromine	0.22 ± 0.62 ***	5.74 ± 0.66	7.39 ± 2.02 ***	1.14 ± 1.56 ***
Ox plus Catechin	0.64 ± 1.60 ***	7.31 ± 3.36***	5.29 ± 1.01**	0.95 ± 1.48 ***

Ox= oxaliplatin

***($p < 0.0001$), **($p < 0.001$) and * ($p < 0.005$) compare to control, N=3.

first, the proportion of viable, dead cells, early and late apoptosis HT-29 cells after 24 and 72 h of exposure were evaluated by cytometry. As can be seen in Fig. 3, after 24 h exposure, oxaliplatin LD50 presented a high number of early apoptosis and dead cells. As expected, after 24 hours of oxaliplatin exposure a significant increase of early apoptosis and dead events was observed when compared with untreated cells. This effect was also observed in cells treated with guaraná extract and its main metabolites ($p=0.0001$), except the cells treated with oxaliplatin plus theobromine. However, after 72 h of exposure, the number of cells in early apoptosis was similar between control and cells treated with oxaliplatin. This effect was not similar in cells treated with guaraná and main metabolites, since they present a significant proportion of cells in early apoptosis. The proportion of dead cells was higher in all treatments when compared to the negative control group ($p=0.0001$).

The effect on HT-29 cell cycle was also evaluated after 24 hours (Fig. 4) and 72 hours (Fig. 5). Guaraná acted similar to oxaliplatin; however, the guaraná action was more acute than that of oxaliplatin. The effect of guaraná can be seen within 24 hours, whereas the oxaliplatin effect is only found after 72 hours. The caffeine also presented a similar effect for guaraná, although at a lower level. The catechin and theobromine showed a similar effect, with oxaliplatin promoting a delay in phase S after 24 hours. In 72 hours, oxaliplatin as well as the associated guaraná and its bioactive molecules, promoted a decreased in phase G0/G1 followed by an increased in phase S and G2/M. The action of the oxaliplatin, guaraná and its compounds caused an arrest in the S and the G2/M period and this can indict disturbances in the processes of protein

synthesis with the intention of repairing the genotoxic and cell damage caused by the treatments.

We also evaluated the potential effect of guaraná on the apoptotic pathway from the analysis of four genes' expression after six hours of treatment exposure (Fig. 6). All genes studied here presented some differential regulations according to the treatment of HT-29 cells ($p=0.001$). The p53 gene was up-regulated in cells treated with oxaliplatin, guaraná and catechin and in cells concomitantly exposed to oxaliplatin and caffeine. The other treatments presented similar p53 levels to the untreated control cells (Fig. 6a). The Bax/Bcl-2 ratio was strongly up-regulated in cells exposed to theobromine or concomitantly exposed to oxaliplatin and guaraná, and slightly up-regulated in cells exposed to guaraná, caffeine and oxaliplatin plus guaraná. The other treatments maintained a similar Bax/Bcl-2 ratio to untreated cells (Fig. 6b). Analyses of caspase-8 transcription showed the up-regulation of its gene in the presence of catechin, when cells were concomitantly exposed to oxaliplatin and caffeine (Fig. 6c). Caspase 3 levels presented heterogeneous results according to treatment. The HT-29 cells exposed to oxaliplatin and isolated theobromine showed the down-regulation of this gene. In contrast, exposure to guaraná, catechin and caffeine slightly up-regulated its genes. Cells concomitantly exposed to oxaliplatin and guaraná and its main metabolites showed a strong caspase 3 up-regulation (Fig. 6d).

In addition, a general color plan to compare the effect of each treatment in all of the genes related to apoptosis pathways are present in Fig. 6e. Compared to the control group, six hours after exposure, oxaliplatin plus caffeine up-regulated all genes studied here, indicating that its treatment activates a faster apoptotic route

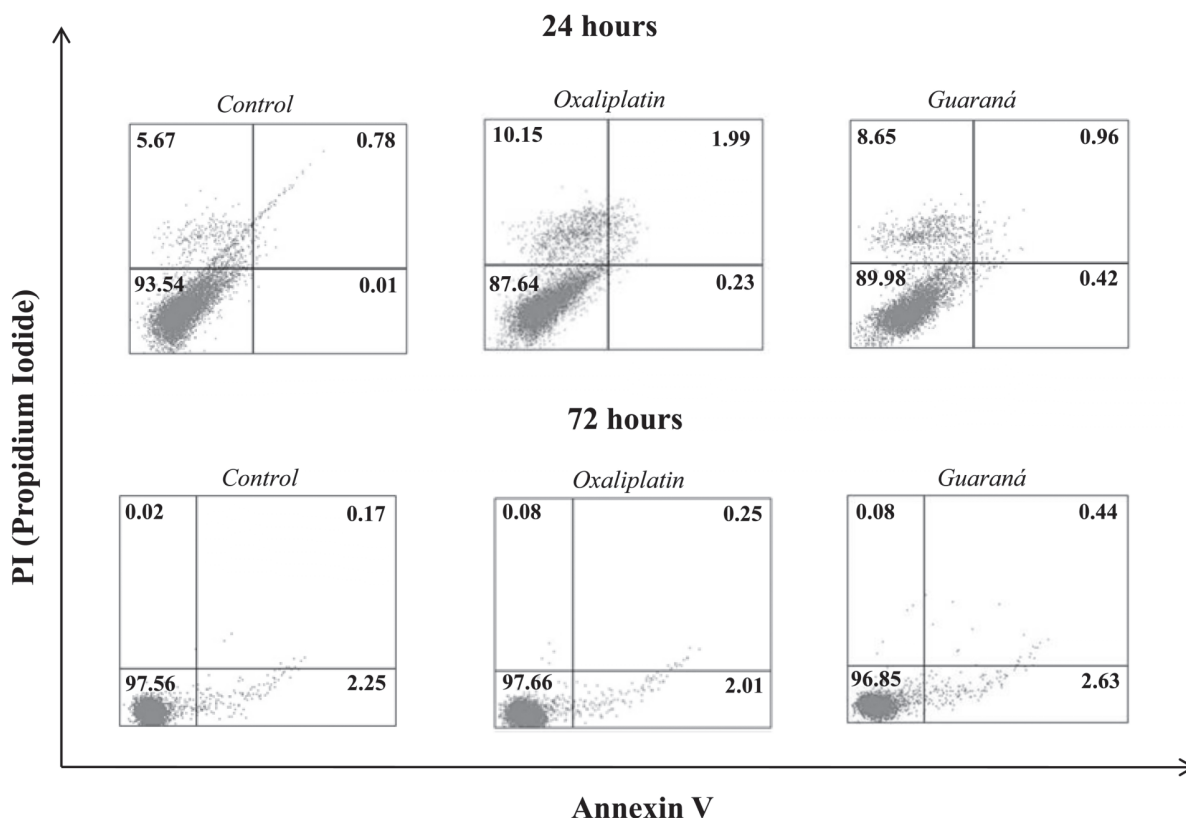


Fig. (3). HT-29 cells were treated for 24 and 72 hours with oxaliplatin (20 $\mu\text{mol/L}$) and guaraná (100 $\mu\text{g/mL}$). Apoptosis was assessed using FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen). A total of 10,000 events were acquired and analyzed using FACS Calibur with CELL Quest software. Cells FITC Annexin V and PI negative were considered viable cells; live-gated cells within the FITC Annexin V + PI - compartment were identified as early apoptotic cells and gated cells within the Annexin-V+PI+ compartment were identified as late apoptotic/dead cells. $N=3$.

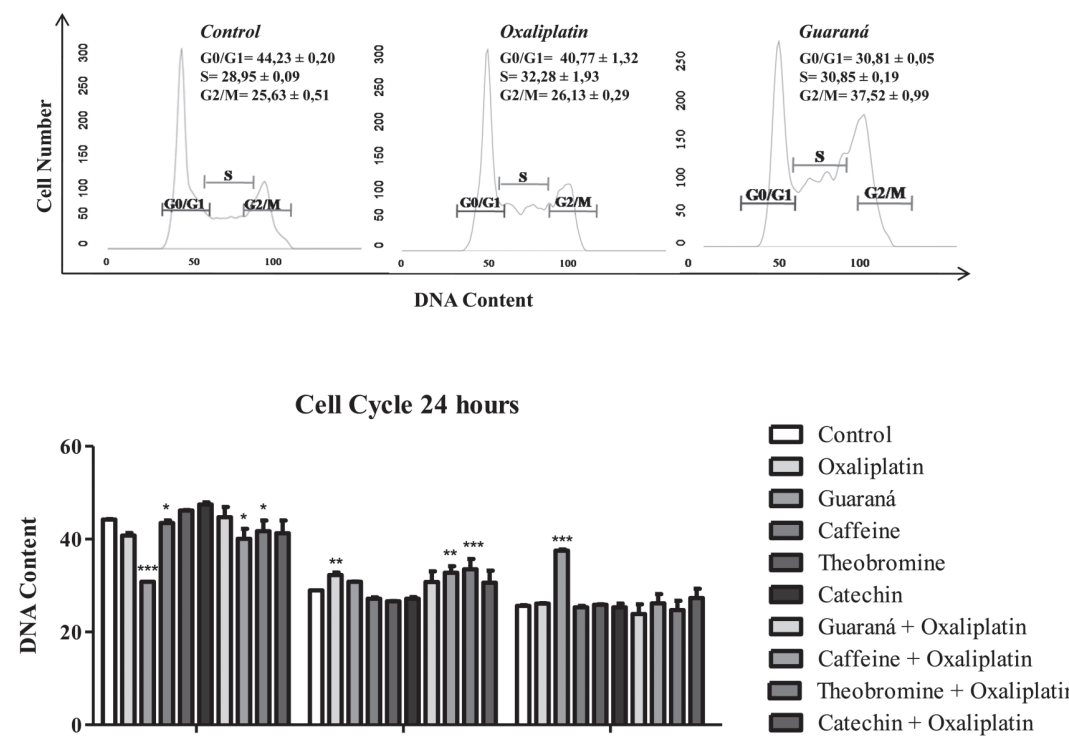


Fig. (4). Cell cycle profile of HT-29 cells treated with oxaliplatin (20 µmol/L) guaraná (100 µg/mL) and proportional concentrations of caffeine (1.22 µg/mL), theobromine (0.67 µg/mL) and catechin (0.43 µg/mL) isolated and in association with oxaliplatin (20 µmol/L) were assessed after 24 hours. The graphic shows the DNA content in each phase of the cell cycle (4A). N=3, ***(p<0.0001), ** (p<0.001) and * (p<0.005).

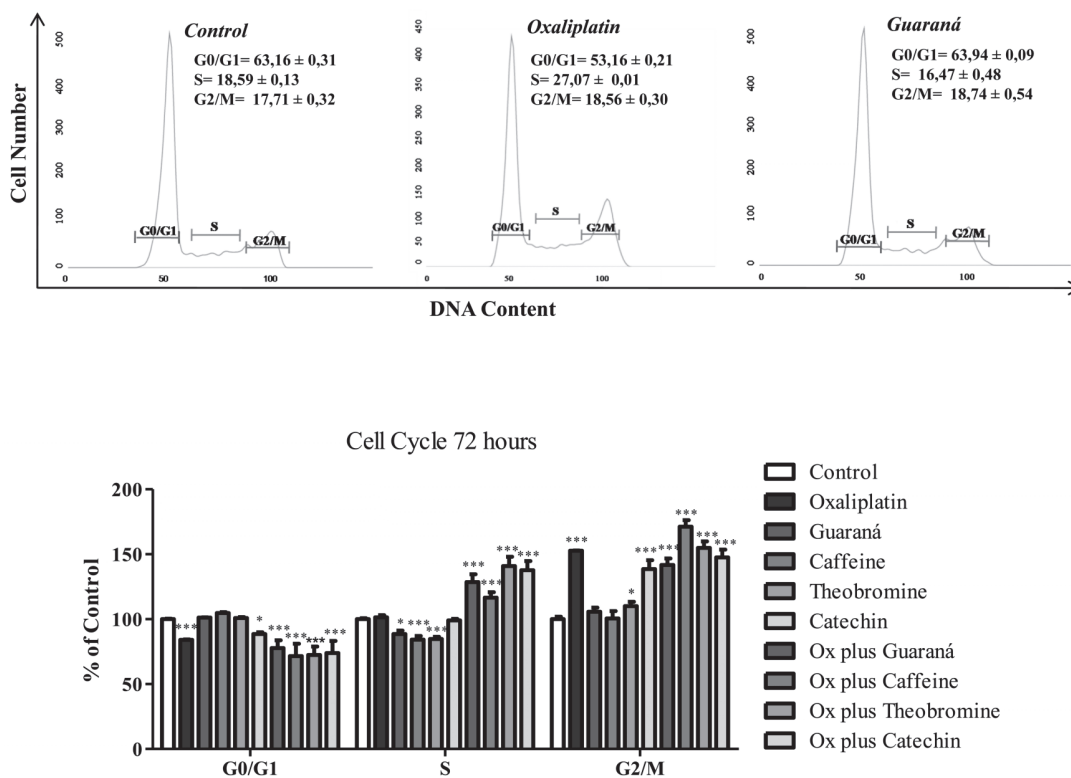


Fig. (5). Cell cycle profile of HT-29 cells treated with oxaliplatin (20 µmol/L) guaraná (100 µg/mL) and proportional concentrations of caffeine (1.22 µg/mL), theobromine (0.67 µg/mL) and catechin (0.43 µg/mL) isolated and in association with oxaliplatin (20 µmol/L) for 72 hours. The graphic shows the DNA content in each phase of cell cycle (4A). N=3, ***(p<0.0001), ** (p<0.001) and * (p<0.005).

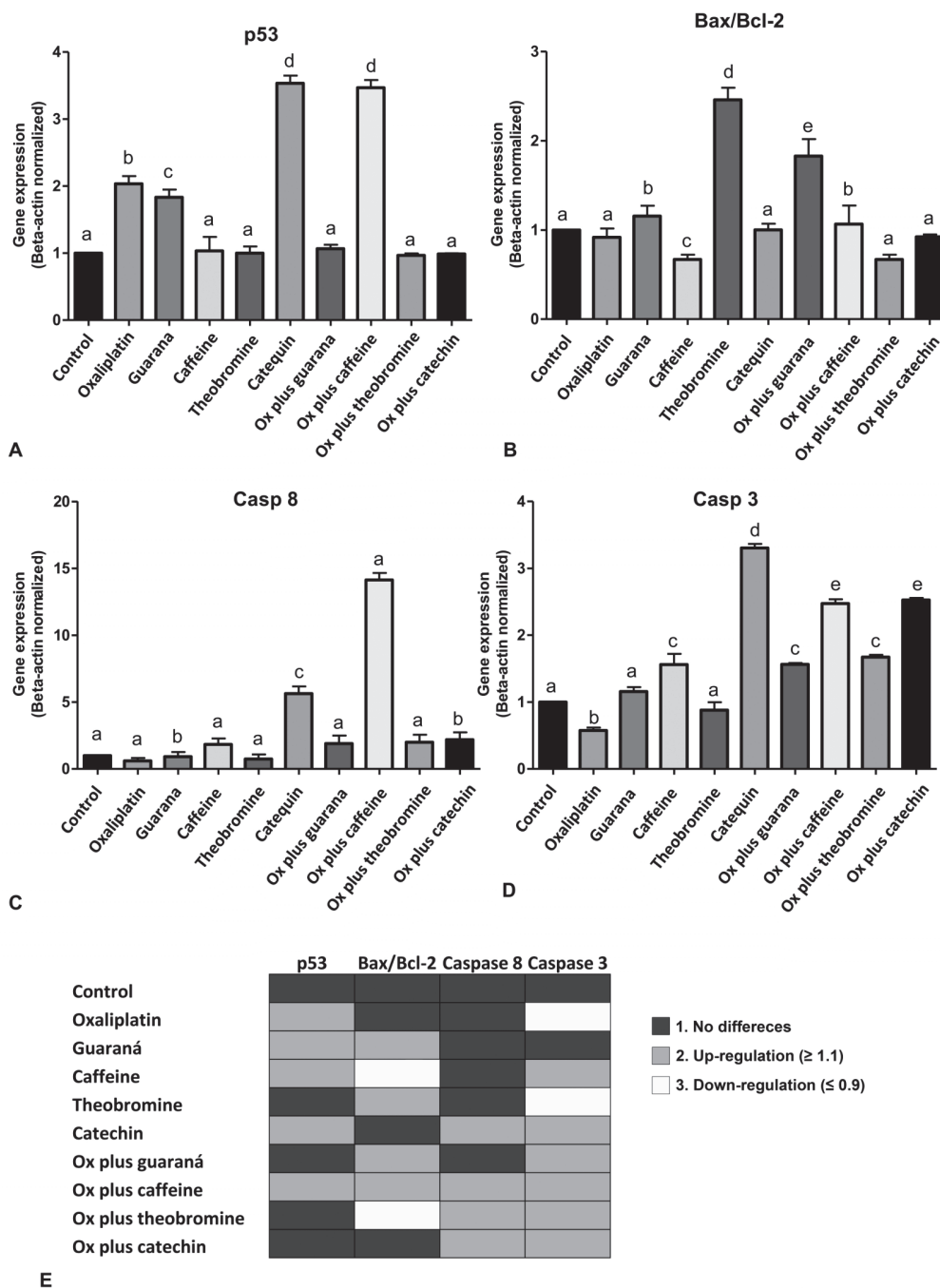


Fig. (6). Guaraná, its main metabolites (caffeine, theobromine and catechin) and oxaliplatin (ox) effect on genes of the apoptosis pathway: p53 (A), Bax, Bcl-2 (presented as Bax/Bcl-2 ratio, B), caspase 8 (C) and caspase 3 (D) of HT-19 CRC cells. The whole effect of treatments on gene expression was represented by color (E): 1= no differences among gene expression in relation to control group; 2= up-regulation (≥ 1.1); 3= down-regulation (≤ 0.9). Different letters (a to e) indicated significant differences ($p \leq 0.05$) by one-way analysis of variance followed by Tukey pos hoc test. N=3.

than others. The gene were up-regulated in a larger number of treatment was caspase 3. However, caspase 3 up-regulation only occurred in the presence of isolated caffeine and catechin exposition, or when HT-29 cells were exposed concomitantly to oxaliplatin, guaraná and its main metabolites.

4. DISCUSSION

Association between the consumption of caffeinated beverages and CRC is a question that has been studied well but is not

completely understood. Generally, investigations involve the *in vivo* and *in vitro* effect of coffee and tea beverages and its main constituents, but this has studied the effect of other caffeinated beverages such as yerba mate and guaraná [21]. Therefore, we investigated here guaraná effect on a CRC commercial cell line (HT-29) considering four main questions: Does Guaraná show some anti-proliferative and cytotoxic effect on CRC cells? Does Guaraná have some influence on the sensitivity of CRC cells to oxaliplatin? What is the contribution of the major guaraná bioactive

constituents (caffeine, theobromine and catechin) in action against HT-29 cells and its sensitivity to oxaliplatin? Does guaraná have effects on HT-29 cells involving triggering of the apoptotic pathway?

To answer this question, initially HT-29 cells were exposed to oxaliplatin in order to determine LD50 dosis to be used in the further experiments with guaraná. 20 $\mu\text{mol/L}$ oxaliplatin was determined as LD50. These results corroborated a previous investigation performed by Oliveira *et al.* (2014) that evaluated the effect of *Uncaria tomentosa* extract on apoptosis triggered by oxaliplatin exposure on HT-29 cells [22]. However, further experiments did not show a precise 50% mortality caused by oxaliplatin exposition. Well two potential causes could to explain this fact. First one, is related to 95% confidence interval of LD50 calculated by Probit regression. Second one, we cannot discard some resistance of HT-29 cells to oxaliplatin exposition as previously related by other studies [23].

Despite this variation, the overall results indicated that guaraná presents some cytotoxic and anti-proliferative effect on HT-29 cells and interact on oxaliplatin, significantly decreasing cell proliferation after 72 h exposure. However, its effect was not strong, since a similar response was reported for cells treated with oxaliplatin at LD50 (20 $\mu\text{mol/L}$). The potential anti-carcinogenic effect of guaraná on HT-29 cells is according with previous investigations that suggested guaraná anti-proliferative effects on Ehrlich Ascites Carcinoma (EAC)-bearing animals [24]. Chemo preventive action against mouse hepatocarcinogenesis and metastasis reduction of mice injected with B16/F10 melanoma cells were also described in the literature. In this mouse model, guaraná treatment was able to decrease proliferation and increased the apoptosis of tumor cells [25].

The effect of guaraná against HT-29 cells was particularly associated with caffeine and catechin molecules. In fact, cells exposed to oxaliplatin plus caffeine, or oxaliplatin plus catechin tend to show similar results, despite the occurrence of variation in the intensity of responses. Previous investigations have shown that caffeine as well as catechins might be able to prevent CRC development [26]. The theobromine effect was slightly less than that of caffeine and catechin. In nutritional terms, methaxanthine is obtained from foods that are commonly consumed by humans, mainly cocoa, and is endogenously produced from the breakdown of caffeine by liver cells. Previous investigations also reported that cocoa consumption is a protective factor against cardiovascular and cancer diseases [27; 28]. However, we are not able to find any previous specific studies showing the effect of theobromine on CRC cells.

As commented before, investigations reported caffeine and catechin anti-tumoral action against CRC [29]. Generally, the production of these results performed from independent studies separately evaluated these molecules, and did not consider the effect of isolated metabolites against CRC cells at concentrations estimated to be found in rude extract. However, there are probably other unknown chemical molecule interactions in foods, which, against, can decrease its property. Therefore, it would be desirable that *in vitro* exploratory studies evaluating antitumor effects of foods consider performing a complementary analysis of the effect of the main chemical constituents on cancer cells at estimated concentrations present in the extract. In this case, we are not sure that results obtained just from caffeine analyses justify the coffee and tea consumption restriction in determined situations.

Another important question investigated here is about to potential guaraná action on oxaliplatin sensitivity. The results suggested that oxaliplatin plus guaraná did not decrease the antitumor effect on HT-29 cells, increasing the anti-proliferative effect of this chemotherapeutic at all concentrations tested. Again,

mainly caffeine and catechin molecules have a significant role with regard to producing these effects.

Methylxanthines including caffeine and theobromine, as well as catechins, are an integral part of everyday human food and drink; evidence suggests that its molecules can trigger multiple physiologic effects in the organism. However, some effects can potentially positively or negatively modulate the activity of anticancer therapy [30]. For example, caffeine may interfere with drug transport to tumor cells by the formation of a mixed stacking complex, preventing the intercalating drugs binding to DNA, and consequently break up the mitosis cycles. Catechins may also influence both desirable and undesirable effects on chemotherapeutic drugs. Unfortunately, we did not identify any previous studies describing the specific action of caffeine and catechin on oxaliplatin sensitivity. However, there are studies showing an increase of rat hepatocytes's doxorubicin sensitivity when concomitantly exposed to several catechin molecules [31].

Our results strongly suggest that several molecules present in the same nutritional matrix of foods can produce similar biological properties. However, the similar effects did not involve necessarily the same causal mechanisms. Generally, the apoptosis pathway are frequently deregulated in cancer. Therefore, a primary antitumor effect of some anti-carcinogenic molecules involved an increase in cytotoxicity by apoptosis triggering of cancer cells. For this reason, we also investigated whether guaraná and its main metabolites could increase apoptotic events and modulate some genes directly involved in the apoptosis pathway.

Guaraná increased the number of cells undergoing early apoptosis (marked by Annexin V) as well as the number of cells in late apoptosis or necrosis was observed after 24 and 72 h exposition. We also observed this effect in cells treated with a proportional concentration of its metabolites. As expected, oxaliplatin increased apoptosis levels; therefore, the guaraná effect presents some similarities with this chemotherapeutic drug.

We also performed the analysis of four genes participating in apoptosis modulation to confirm the potential action of guaraná on the apoptosis pathway. The selection of genes was based on two distinct apoptotic pathways that occur in mammals: extrinsic and intrinsic pathways. The extrinsic pathway is mediated by death receptor genes/proteins. The death receptor pathway is initiated by extracellular ligands, including death receptors (DRs) known as tumor necrosis factor receptor 1 (TNF-R1), Fas, DR3, DR4, DR5 and DR6. These death receptors are activated by respective ligands, leading to the activation of caspases. Caspases and proteinases cannot self-activate, and are initially synthesized as inactive proteins. Upon stimulation, these are initialized by autolytic cleavage. Caspases 8 and 9 are initiators that are able to activate downstream effector caspases, including caspase 3 and 7, through proteolytic cleavage [32].

The intrinsic apoptosis pathway involves mitochondria and p53 protein modulation. The p53 protein is considered an important tumor suppressor gene; in cell growth and development, it is crucial that its function is highly regulated. The p53 regulation involves an anchoring protein such as MDM2 that blocks the transcriptional activity of p53 by binding to this protein. During cellular stress, MDM2 response is inhibited, and p53 is released and accumulates in the cell. In a well-functioning cell, the controlled p53 levels induce the synthesis of anti-apoptotic proteins such as Bcl-2, can promote the stabilization of the external mitochondrial membrane.

In cases of cellular stress, the MDM2-p53 binding is disrupted and p53 levels increase in the cytoplasm. The p53 gene is also up-regulated to produce more p53 molecules. This event induces the down-regulation of Bcl-2 genes and concomitant up-regulation of pro-apoptotic genes, such as the BAX gene. The Bax protein produced causes pores in the mitochondrial membrane, releasing

cytochrome C from the mitochondrial intermembrane space to the cytoplasm. In the cytosol, cytochrome c forms a complex with other molecules such as pro-caspase 9. After cleavage, caspase 9 activates the apoptosis effector caspase 3 [33]. Both death receptors and p53 constitute molecules with potential targets for cancer therapy [34].

Therefore, in this way, we analyzed the acute response of HT-29 cells to guaraná and oxaliplatin exposure, evaluating the potential regulation of p53, Bax and Bcl-2 gene expression, which are directly involved in the apoptosis intrinsic route, and caspase 8, which is more closely associated with the apoptosis intrinsic route. Caspase 3 was evaluated since this is an apoptosis effector protein involved in two pathways. The up-regulation of the p53 gene indicated some guaraná acute effects on the intrinsic apoptotic route of HT-29 cells, similar to that occurring in cells exposed to oxaliplatin.

After six hours, catechin exposition up-regulated all genes except the Bax/Bcl-2 ratio, which presented similar expression to untreated cells, indicating that its treatment first triggers the extrinsic apoptotic pathway. The high levels of caspase 8 transcripts in cells treated concomitantly with oxaliplatin and caffeine indicated some action on the extrinsic apoptotic route. The up-regulation of the apoptosis effector caspase 3 gene in cells treated with oxaliplatin plus guaraná and its metabolites corroborate the hypothesis that interaction between oxaliplatin and guaraná could increase HT-29 sensitivity to chemotherapeutics by accelerating cell metabolism.

The results described here about the effect of oxaliplatin on the HT-29 apoptosis pathway corroborate previous investigations that showed the effect of other phytotherapeutic plants on apoptosis regulation of its cells such as *Uncaria tomentosa* extract [35]. Other investigations also showed an association between oxaliplatin and some molecules present in foods, such as curcumin, which can also induce apoptosis in HT-29 cells [36].

In general, these results indicated that the speed of apoptosis extrinsic and intrinsic pathways gene regulation of HT-29 cells is different according to the treatment to which cells are exposed. However, considering the cells marked by annexin V analysis after 24 h of exposure to guaraná with and without oxaliplatin showed apoptosis induction.

Our results also showed an important effect of guaraná on HT-29 cell proliferation. Recently, Hertz *et al.* (2014) [37] showed guaraná *in vitro* to have a cytotoxic and anti-proliferative effect against the MCF-7 breast cancer cell line. The results showed that, generally, guaraná improved MCF-7 sensitivity to chemotherapeutic drugs, increasing cytotoxicity and cell proliferation. However, these authors did not study the specific effect of guaraná on oxaliplatin. On the other hand, previous investigations have described the anti-proliferative effect of catechin against HT-29 cells, mainly by epigallocatechingallate (EGCG), the major catechin found in green tea [38, 39]. From the results of guaraná on HT-29 cell proliferation, complementary investigations need to be performed in order to evaluate the causal mechanisms associated with results. For example, does guaraná have an effect on the regulation of other cell routes, such as inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, a key regulator of multiple cellular signaling pathways [40].

Despite the potential relevance of guaraná on CRC response to oxaliplatin the present study did not investigated concomitantly the potential guaraná effect of healthy colorectal cells. In fact, this study was not performed since previous evidence suggested that guaraná did not present a cytotoxic effect on healthy cells when exposed to similar concentrations. Against, there are some investigations that suggest that guaraná has a protective effect on cells exposed to toxicant molecules. It is the case of guaraná

investigation performed by Bittencourt and collaborators (2013) related the protective effects of guaraná extract on mouse embryonic stem-cell line (NIH-3T3) exposed to sodium nitroprusside that generates high nitric oxide levels causing high cellular toxicity [41]. Machado *et al.* (2015) study showed that guaraná could to revert some replicative senescent characteristics of adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates [42].

In vivo investigations also suggested that guaraná has a protective effect against toxicant molecules. For example, Kober *et al.* described a genoprotective and hepatoprotective effects of guaraná on CC14-induced liver damage in rats [43]. Moreover, studies performed for other research groups also did not described guaraná toxic effect on cells. At contrary, guaraná was described as a protective extract preventing Guarana preventing β -amyloid aggregation and generation of advanced glycation-end products in human neuronal-like cells exposed to acrolein [44]. Therefore, despite the lack of concomitant analysis of guaraná effect on CRC and healthy colorectal cells, we believe that this methodological limitation did not invalid the results described here.

Despite being an exploratory *in vitro* investigation, the results described here suggest that beverage foods rich in caffeine, other than coffee and teas, have an antitumor effect against CRC cancer. However, the chemical association caffeine-catechin is probably more plausible to explain the antitumor effect of these foods, such as guaraná investigated here, rather than only caffeine.

The potential clinical relevance of these data is related to an increase in the use of caffeinated supplements food as a complementary addition to reduce fatigue and as an adjuvant to control pain in CRC patients [45, 46].

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

REFERENCES

- [1] Mhaidat, N.M.; Alzoubi, K.H.; Al-Azzam, S.I.; Alsaad, A.A. Caffeine inhibits paclitaxel-induced apoptosis in colorectal cancer cells through the upregulation of Mcl-1 levels. *Mol. Med. Rep.*, **2014**, *9*, 243-248.
- [2] Temraz, S.; Mukherji, D.; Alameddine, R.; Shamseddine, A. Methods of overcoming treatment resistance in colorectal cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **2014**, *89*, 217-230.
- [3] Panczyk, M. Pharmacogenetics research on chemotherapy resistance in colorectal cancer over the last 20 years. *World. J. Gastroenterol.*, **2014**, *20*, 9775-827.
- [4] Jensen, N.F.; Smith, D.H.; Nygård, S.B.; Rømer, M.U.; Nielsen, K.V.; Brønner, N. Predictive biomarkers with potential of converting conventional chemotherapy to targeted therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Scand. J. Gastroenterol.*, **2012**, *47*, 340-355.
- [5] Zheng, Y.; Zhou, J.; Tong Y. Gene signatures of drug resistance predict patient survival in colorectal cancer. *Open Pharmacogenom. J. Adv.*, **2014**, *15*, 1-9.
- [6] Leggett, S.; Koczwara, B.; Miller, M. The impact of complementary and alternative medicines on cancer symptoms, treatment side effects, quality of life, and survival in women with breast cancer--a systematic review. *Nutr. Cancer*, **2015**, *67*, 373-391.
- [7] Smith, N.; Atroch, A.L. Guarana's Journey from Regional Tonic to Aphrodisiac and Global Energy Drink. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, **2010**, *7*, 279-282.
- [8] Schimpl, F.C.; Silva J.F.; Gonçalves, J.F.; Mazzafera, P. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *J. Ethnopharmacol.*, **2013**, *150*, 14-31.
- [9] De Oliveira Campos, M.P.; Riechelmann, R.; Martins, L.C.; Hassan, B.J.; Casa, F.B.; Del Giglio, A. Guarana (*Paullinia*

- cupana*) improves fatigue in breast cancer patients undergoing systemic chemotherapy. *J. Altern. Complement. Med.*, **2011**, *17*, 505-512.
- [10] Del Giglio, A.B.; Cubero, D.I.; Lerner, T.G.; Guariento, R.T.; De Azevedo, R.G.; Paiva, H.; Goldman, C.; Carelli, B.; Cruz, F.M.; Schindler, F.; Pianowski, L.; De Matos, L.L.; Del Giglio, A. Purified dry extract of *Paullinia cupana* (guaraná) (PC-18) for chemotherapy-related fatigue in patients with solid tumors: An early discontinuation study. *J. Diet Suppl.*, **2013**, *10*, 325-34.
- [11] Palma, C.G.; Lera, A.T.; Lerner, T.; De Oliveira, M.M.; De Borta, T.M.; Barbosa, R.P.; Brito, G.M.; Guazzelli, C.A.; Cruz, F.J.; Del Giglio, A. Guarana (*Paullinia cupana*) Improves anorexia in patients with advanced cancer. *J. Diet Suppl.*, **2015**.
- [12] Oliveira, S.S.; Del Giglio, A.B.; Lerner, T.G.; Zanellato, R.M.; Tiemi, L.; Reifur, L.; Santi, P.X.; Del Giglio, A. *Paullinia cupana* for control of hot flashes in breast cancer patients: A pilot study. *Einstein*. **2013**, *11*, 435-438.
- [13] Hertz, E.; Cadoná, F.C.; Machado, A.K.; Azzolin, V.; Holmrich, S.; Assmann, C.; Ledur, P.; Ribeiro, E.E.; Filho, O.C.Z.; Mânica-Cattani, M.F.; Da Cruz, I.B.M. Effect of *Paullinia cupana* on mcf-7 breast cancer cell response to chemotherapeutic drugs. *Mol. Clinical. Onc.*, **2015**, *3*, 37-43.
- [14] Alcindor, T.; Beauger, N. Oxaliplatin: A review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr. Oncol.*, **2011**, *18*, 18-25.
- [15] Bittencourt, L.S.; Machado, D.C.; Machado, M.M.; Dos Santos, G.F.; Algarve, T.D.; Marinovic, D.R.; Ribeiro, E.E.; Soares, F.A.; Barbisan, F.; Athayde, M.L.; Cruz, I.B. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodiumnitroprusside. *Food. Chem. Toxicol.*, **2011**, *53*, 119-125.
- [16] Carlson, M.; Thompson, R.D. Liquid chromatographic determination of saffrole in sassafras-derived herbal products. *J. AOAC Int.*, **1997**, *80*, 1023-1028.
- [17] Fukui, M.; Yamabe, N.; Zhu, B.T. Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Cancer.*, **2010**, *46*, 1882-1891.
- [18] Zhao, X.; Huang, S.; Luo, H.; Wan, X.; Gui, Y.; Li, J.; Wu, D. Evaluation of vesicular stomatitis virus mutant as an oncolytic agent against prostate cancer. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **2014**, *7*, 1204-1213.
- [19] William-Falcao, S.; Rouillard, D.; Lechat, P.; Bastian, G. Cell cycle arrest and apoptosis induced by oxaliplatin (L-OHP) on four human cancer cell lines. *Anticancer Res.*, **2006**, *26*, 2093-2099.
- [20] Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic. Acid. Res.*, **2001**, *29*, 45.
- [21] Puangpraphant, S.; Berhow, M.A. Vermillion, K.; Potts, G.; Gonzalez de Mejia, E. Dicafeoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF- κ B nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells. *Mol. Nutr. Food. Res.*, **2011**, *55*, 1509-1522.
- [22] De Oliveira, L.Z.; Farias, I.L.; Rigo, M.L.; Glanzner, W.G.; Gonçalves, P.B.; Cadoná, F.C.; Cruz, I.B.; Farias, J.G.; Duarte, M.M.; Franco, L.; Bertol, G.; Colpo, E.; Brites, P.C.; Rocha, J.B.; Leal, D.B. Effect of *Uncaria tomentosa* extract on apoptosis triggered by oxaliplatin exposure on HT29 Cells. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2014**, (Epub 2014).
- [23] Lin, Y.L.; Liao, J.Y.; Yu, S.C.; Ou, D.L.; Lin, L.I.; Tseng, L.H.; Chang, Y.L.; Yeh, K.H.; Cheng, A.L. KRAS mutation is a predictor of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cells. *PLoSOne*, **2012**, *7*(11), e50701.
- [24] Fukumasu, H.; Latorre, A.O.; Zaidan-Dagli, M.L. *Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*, guarana, increases survival of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) bearing mice by decreasing cyclin-D1 expression and inducing a G0/G1 cell cycle arrest in EAC cells. *Phytother. Res.*, **2011**, *25*, 11-6.
- [25] Fukumasu, H.; Da Silva, T.C.; Avanzo, J.L.; De Lima, C.E.; Mackowiak, I.I.; Atroch, A.; De Souza, S.H.; Moreno, F.S.; Dagli, M.L. Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.*, **2006**, *233*, 158-164.
- [26] Saldanha, S.N.; Kala, R.; Tollefsbol, T.O. Molecular mechanisms for inhibition of colon cancer cells by combined epigenetic-modulating epigallocatechingallate and sodium butyrate. *Exp. Cell Res.*, **2014**, *324*, 40-53.
- [27] Kim, J.; Kim, J.; Shim, J.; Lee, C.Y.; Lee, K.W.; Lee, H.J. Cocoa phytochemicals: Recent advances in molecular mechanisms on health. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, **2014**, *54*, 1458-1472.
- [28] Sugimoto, N.; Miwa, S.; Hitomi, Y.; Nakamura, H.; Tsuchiya, H.; Yachie, A. Theobromine, the primary methylxanthine found in *Theobroma cacao*, prevents malignant glioblastoma proliferation by negatively regulating phosphodiesterase-4, extracellular signal-regulated kinase, Akt/mammalian target of rapamycin kinase, and nuclear factor-kappa. *B. Nutr. Cancer*, **2014**, *66*, 419-423.
- [29] Merighi S.; Benini A.; Mirandola P.; Gessi S.; Varani K.; Simioni C.; Leung E.; MacLennan S.; Baraldi P.G.; Borea P.A. Caffeine inhibits adenosine-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor, and interleukin-8 expression in hypoxic human colon cancer cells. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *72*, 395-406.
- [30] Sabisz, M.; Skladanowski, A. Modulation of cellular response to anticancer treatment by caffeine: inhibition of cell cycle checkpoints, DNA repair and more. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2008**, *9*, 325-336.
- [31] Rudolfová, P.; Hanušová, V.; Skálová, L.; Bártíková, H.; Matoušková, P.; Boušová, I. Effect of selected catechins on doxorubicin antiproliferative efficacy and hepatotoxicity *in vitro*. *Acta. Pharm.*, **2014**, *64*, 199-209.
- [32] McIlwain, D.R.; Berger, T.; Mak, T.W. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2013**, *5*, 86-56.
- [33] Comel, A.; Sorrentino, G.; Capaci, V.; Del Sal, G. The cytoplasmic side of p53's oncosuppressive activities. *FEBS Lett.*, **2014**, *588*, 2600-2609.
- [34] Pflaum, J.; Schlosser, S.; Müller, M. p53 family and cellular stress responses in cancer. *Front. Oncol.*, **2014**, *4*, 285.
- [35] De Oliveira Campos, M.P.; Riechelmann, R.; Martins, L.C.; Hassan, B.J.; Casa F.B.; Del Giglio, A. Guarana (*Paullinia cupana*) improves fatigue in breast cancer patients undergoing systemic chemotherapy. *J. Altern. Complement. Med.*, **2011**, *17*, 505-512.
- [36] Guo, L.D.; Shen, Y.Q.; Zhao, X.H.; Guo, L.J.; Yu, Z.J.; Wang, D.; Liu, L.M.; Liu, J.Z. Curcumin combined with oxaliplatin effectively suppress colorectal carcinoma *in vivo* through inducing apoptosis. *Phytother. Res.*, **2015**, *29*, 357-365.
- [37] Hertz, E.; Cadoná, F.C.; Machado, A.K.; Azzolin, V.; Holmrich, S.; Assmann, C.; Ledur, P.; Ribeiro, E.E.; Filho, O.C.Z.; Mânica-Cattani, M.F.; Da Cruz, I.B.M. Effect of *Paullinia cupana* on mcf-7 breast cancer cell response to chemotherapeutic drugs. *Mol. Clin. Oncol.*, **2015**, *3*, 37-43.
- [38] Jung, Y.D.; Kim, M.S.; Shin, B.A.; Chay, K.O.; Ahn, B.W.; Liu, W.; Bucana, C.D.; Gallick, G.E.; Ellis, L.M. (2001). EGCG, a major component of green tea, inhibits tumour growth by inhibiting VEGF induction in human colon carcinoma cells. *Br. J. Cancer*, **2011**, *84*, 844-850.
- [39] Haratifar, S.; Meckling, K.A.; Corredig, M. Antiproliferative activity of tea catechins associated with casein micelles, using HT29 colon cancer cells. *J. Dairy. Sci.* **2014**, *97*, 672-678.
- [40] Cai, Z.; Ke, J.; He, X.; Yuan, R.; Chen, Y.; Wu, X.; Wang, L.; Wang, J.; Lan, P.; Wu, X. Significance of mTOR signaling and its inhibitor against cancer stem-like cells in colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, **2014**, *21*, 179-188.
- [41] Bittencourt, L.S.; Machado, D.C.; Machado, M.M.; Dos Santos, G.F.; Algarve, T.D.; Marinovic, D.R.; Ribeiro, E.E.; Soares, F.A.; Barbisan, F.; Athayde, M.L.; Cruz, I.B. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodiumnitroprusside. *Food Chem. Toxicol.*, **2013**, *53*, 119-125.
- [42] Machado, A.K.; Cadoná, F.C.; Azzolin, V.F.; Dornelles, E.B.; Barbisan, F.; Ribeiro, E.E.; Mânica-Cattani, M.F.; Duarte, M.M.M.F.; Saldanha, J.R.P.; Da Cruz, I.B.M. Guarana (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipospirates. *Food Res. Int.*, **2015**, *67*, 426-433.
- [43] Kober, H.; Tatsch, E.; Torbitz, V.D.; Cargnin, L.P.; Sangoi, M.B.; Bochi, G.V.; Da Silva, A.R.; Barbisan, F.; Ribeiro, E.E.; Cruz, I.B.; Moresco, R.N. Genoprotective and hepatoprotective effects of Guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*) on CCl4-induced liver damage in rats. *Drug Chem. Toxicol.*, **2015**, *20*, 1-5.
- [44] Bittencourt, L.S.; Zeidán-Chuliá, F.; Yatsu, F.K.; Schnorr, C.E.; Moresco, K.S.; Kolling, E.A.; Gelain, D.P.; Bassani, V.L.; Moreira, J.C. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) prevents β -amyloid aggregation, generation of advanced glycation-endproducts (AGEs), and acrolein-

- induced cytotoxicity on human neuronal-like cells. *Phytother. Res.*, **2014**, *28*, 1615-1624.
- [45] Del Giglio, A.B.; Cubero, D.I.; Lerner, T.G.; Guariento, R.T.; De Azevedo, R.G.; Paiva, H.; Goldman, C.; Carelli, B.; Cruz, F.M. Schindler, F; Pianowski, L.; De Matos, L.L.; Del Giglio, A. Purified dry extract of Paullinia cupana (guaraná) (PC-18) for chemotherapy-related fatigue in patients with solid tumors: An early discontinuation study. *J. Diet Suppl.* **2013**, *10*, 325-334.
- [46] Mercadante, S.; Serretta, R.; Casuccio, A. Effects of caffeine as an adjuvant to morphine in advanced cancer patients. A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *J. Pain. Symptom. Manage.*, **2001**, *21*, 369-372.

Manuscript Number:

Title: Antitumor effects of Guaraná (Paullinia cupana) against Colorectal Cancer Cell (HT-29) involves modulation of S6K/mTOR Pathway

Article Type: Research Paper

Keywords: HT-29; Paullinia cupana; Guaraná; Colorectal Cancer; mTOR; MAPKs.

Corresponding Author: Prof. Ivana Manica da Cruz, PhD

Corresponding Author's Institution: Federal University of Santa Maria

First Author: Francine C Cadoná, PhD

Order of Authors: Francine C Cadoná, PhD; Jose L Rosa, PhD; Taiane Schneider, MSc; Monica Cubillos-Rojas, PhD; Susana Sánchez-Tena, PhD; Verônica F Azzolin, MSc; Charles E Assmann, MSc; Euler E Ribeiro, PhD; Ivana Manica da Cruz, PhD

Abstract: Guaraná (Paullinia cupana) is a native fruit of Amazon. It is composed by several bioactive molecules, such as caffeine, catechins and theobromine. Studies describe that these compounds can present antitumor activity in primary as well as secondary tumors. Additionally, some studies suggest that these bioactive molecules can modulate important pathways in the proliferation and in the cellular metabolism, such as mTOR and MAPKs pathways. Nevertheless, the mechanism underlying guaraná activity on cancer cells is not well established. Therefore, we investigated here the in vitro effect of guaraná on AKT/mTOR/S6K and MAPK pathways in colorectal cancer cells (HT-29). Initially, we discarded potential guaraná cytotoxicity on two health cells: line of fibroblast foreskin cells (HFF-1) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from healthy adults. The cells were exposed to concentrations tested here (0.1-100 µg/mL) by MTT assay, annexin and iodide propide flow cytometry. Guaraná antiproliferative effect on cancer cell lines was confirmed by cell growth curve and Clonogenic assays. Guaraná and proportional caffeine concentrations effect on mTOR and MAPKs modulation was evaluated by Western blot after 1 hour of exposition. Guaraná did not present cytotoxic effect on healthy cells. However, guaraná showed a significant antiproliferative effect against cancer cells as verified in cell growth curve and Clonogenic assays. Besides, guaraná modulated mTORC1 (p-S6KT389) pathway. The isolated caffeine did not show effect. The results suggest that guaraná presents better effect on HT-29 by another component and/or the synergism and it could be an important target as food supplement in pharmacologic therapies.

June 25th, 2016

Brazil

Food Research International

A. Sant'Ana

Editor in Chief

Dear A. Sant'Ana:

I would like to submit the following manuscript, entitled "Antitumor effects of Guaraná (*Paullinia cupana*) against Colorectal Cancer Cell (HT-29) involves modulation of S6K/mTOR Pathway", by Francine Carla Cadoná, Jose Luis Rosa, Taiane Schneider, Monica Cubillos-Rojas, Susana Sánchez-Tena, Verônica Farina Azzolin, Charles Elias Assmann, Euler Esteves Ribeiro and Ivana Beatrice Mânica da Cruz for possible publication in Food Research International.

The aim of our study was find out whether guaraná and its main bioactive molecule, the caffeine, could have antitumor affects against colorectal cancer using the HT-29 cell line. Besides, we investigated here the *in vitro* effect of guaraná on AKT/mTOR/S6K and MAPK pathways in HT-29 cells.

Based on that, we performed an *in vitro* experiment using HT-29 cell line exposed to different concentrations of guaraná and proportional concentrations of caffeine, to evaluate antitumor activity by Cell Growth curve and Clonogenic Assay. Moreover, levels of phosphorylated proteins of AKT/mTOR/S6K and MAPK pathways were performed by Western Blot.

The results indicated that guaraná have antitumor activity against HT-29 cells in some concentrations. Guaraná showed a significant antiproliferative effect on HT-29, as it was verified in cell growth curve and Clonogenic assays. Besides, guaraná modulated mTORC1 (p-S6KT389) pathway. However, the isolated caffeine did not show effect.

Therefore, the overall results suggest that guaraná presents better effect on HT-29 by another component and/or the synergism, since the isolated caffeine did not show the same action than the guaraná extract. Moreover, the

guaraná could be important target as food supplement in pharmacologic therapies, mainly in the resistance tumors, such as the colorectal cancer.

The data presented in the manuscript submitted corroborate this hypothesis, and we believe that it will be of some interest to readers of the Food Research International.

This manuscript has not been published or accepted for publication elsewhere.

Sincerely,

Ivana Beatrice Mânica da Cruz
Corresponding Author

Highlights

- Guaraná has antitumor effects against colorectal cancer cells line (HT-29);
- Guaraná is able to modulate the S6K/mTOR pathway in HT-29 cells;
- Guaraná decreases the colony formation of HT-29 cells in the highest concentration tested;
- Guaraná did not present cytotoxic effect on healthy cells.

1 **Antitumor effects of Guaraná (*Paullinia cupana*) against**
2 **Colorectal Cancer Cell (HT-29) involves modulation of**
3 **S6K/mTOR Pathway**

4

5 Francine Carla Cadoná^{a,b}, Jose Luis Rosa^c, Taiane Schneider^c, Monica
6 Cubillos-Rojas^c, Susana Sánchez-Tena^c, Verônica Farina Azzolin^{b,d}, Charles
7 Elias Assmann^{a,b}, Euler Esteves Ribeiro^e, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{a,b,d,*}

8

9 ^a Post-Graduate Program in Biochemistry and Toxicology at Federal University of Santa Maria,
10 Brazil;

11 ^b Laboratory of Biogenomic at Federal University of Santa Maria, Brazil;

12 ^c Departament de Ciències Fisiològiques II, Campus de Bellvitge, Institut d'Investigació
13 Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat,
14 Barcelona, Spain;

15 ^d Post-Graduate Program in Pharmacology at Federal University of Santa Maria, Brazil;

16 ^e Third Age Open University, University of Amazonas State, Brazil; Post-Graduate Program in
17 Gerontology, at the Federal University of Santa Maria, Brazil.

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29 Corresponding authorat: Av Roraima 1000, Building 19, Santa Maria-RS, Brazil, Zip
30 Code: 97105900. Tel.: +55 55 32208163.

31 E-mail address: ibmcruz@hotmail.com (I.B.M. da Cruz).

32

33

34 **Abstract**

35 Guaraná (*Paullinia cupana*) is a native fruit of Amazon. It is composed by
36 several bioactive molecules, such as caffeine, catechins and theobromine.
37 Studies describe that these compounds can present antitumor activity in
38 primary as well as secondary tumors. Additionally, some studies suggest that
39 these bioactive molecules can modulate important pathways in the proliferation
40 and in the cellular metabolism, such as mTOR and MAPKs pathways.
41 Nevertheless, the mechanism underlying guaraná activity on cancer cells is not
42 well established. Therefore, we investigated here the *in vitro* effect of guaraná
43 on AKT/mTOR/S6K and MAPK pathways in colorectal cancer cells (HT-29).
44 Initially, we discarded potential guaraná cytotoxicity on two health cells: line of
45 fibroblast foreskin cells (HFF-1) and peripheral blood mononuclear cells
46 (PBMCs) obtained from healthy adults. The cells were exposed to
47 concentrations tested here (0.1-100 µg/mL) by MTT assay, annexin and iodide
48 propide flow cytometry. Guaraná antiproliferative effect on cancer cell lines was
49 confirmed by cell growth curve and Clonogenic assays. Guaraná and
50 proportional caffeine concentrations effect on mTOR and MAPKs modulation
51 was evaluated by Western blot after 1 hour of exposition. Guaraná did not
52 present cytotoxic effect on healthy cells. However, guaraná showed a significant
53 antiproliferative effect against cancer cells as verified in cell growth curve and
54 Clonogenic assays. Besides, guaraná modulated mTORC1 (p-S6KT389)
55 pathway. The isolated caffeine did not show effect. The results suggest that
56 guaraná presents better effect on HT-29 by another component and/or the
57 synergism and it could be an important target as food supplement in
58 pharmacologic therapies.

59

60

61 **Keywords** HT-29. *Paullinia cupana*. Guaraná. Colorectal Cancer. mTOR.
62 MAPKs.

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76 **1. Introduction**

77

78 The colorectal cancer is considered the second most common cancer
79 worldwide and it is very aggressive because in some cases this cancer can
80 present pharmacological resistance and recurrence (Tanaka et al., 2015).
81 Previous evidence suggest that natural foods containing bioactive compounds,
82 such as caffeine and catechin that could aid in the treatment of colorectal
83 cancer (Ku et al., 2011).

84 Guaraná (*Paullinia cupana*), an Amazonian fruit consumed since pre-
85 Columbian times, is composed by high levels of caffeine and also catechins
86 (Bérubé-Parent, Pelletier, Doré, & Tremblay, 2005). Some previous evidence
87 suggest that guaraná could have antitumor activity (Fukumasu et al., 2008;
88 Fukumasu et al., 2006; Fukumasu, Latorre, & Zaidan-dagli, 2011). Recently,
89 Cadoná et al. (2016) described *in vitro* the antiproliferative effect of guaraná on
90 human colorectal cancer cells (HT-29). This study also showed that guaraná
91 was able to improve the responsively of HT-29 cells to oxaliplatin
92 chemotherapeutic drug. However, the causal mechanism of foods rich in caffeine
93 and catechin, including guaraná on HT-29 cells has not been elucidated yet
94 (Cadoná et al., 2016).

95 The mammalian target of rapamycin (mTOR) is a central molecule for the
96 growth and cell proliferation, metabolism and angiogenesis. The functional of
97 this pathway involves two complexes: mTORC1 and mTORC2. The mTOR

98 pathway is associated with the control of energetic metabolism, acting like a
99 sensor for consume and store of energy (Caron, Richard, & Laplante, 2015).

100 The mTOR pathway is frequently deregulated in several human
101 diseases, such as cancer (Laplante & Sabatini, 2012). Several bioactive
102 molecules present in the natural products seem to inhibit mTOR pathway, such
103 as resveratrol, epigallocatechin and caffeine (Zhou, Luo, & Huang, 2010).
104 Therefore, the guaraná could inhibit this pathway because it presents a lot of
105 these bioactive compounds.

106 Besides, guaraná could modulate the mitogen-activated protein kinases
107 (MAPKs) pathway. The reactive oxygen species (ROS) in low concentration are
108 important to regulate cellular signaling pathways. The MAPKs allow that cells
109 receive external signals and produce different biological effects. Members of the
110 family of MAPKs include different molecules, such as extracellular signal-
111 regulated kinases (ERK) and p38. These molecules are activated by ROS that
112 modulate the differential expression of several genes associated with survival,
113 proliferation and cellular death. Sometimes, MAPKs pathway is found
114 upregulated in some cancers (Zarubin & Han, 2005). As guaraná is considered
115 an antioxidant plant (Bittencourt et al., 2013; Mattei, Dias, Espínola, Carlini, &
116 Barros, 1998; Santa Maria, Lopez, Diaz, Muñoz-Mingarro, & Pozuelo, 1998), its
117 effects on HT-29 cells could involves inhibition of MAPK pathway.

118 Therefore, the present investigation analyzed whether the antitumor
119 effect of guaraná against HT29 cells involved differential modulation of mTOR
120 and MAPKs pathways.

121

122 **2. Material and Methods**

123

124 **2.1. Chemicals**

125

126 All reagents and solvents used were of analytical grade. Insulin, (Sigma-
127 Aldrich); hydrogen peroxide solution (H₂O₂) (Panreac); Bleomycin
128 (CalbioChem); anti-mTOR, anti-P-T389-S6K1 (1A5), anti-P-S380-RSK and anti-
129 PT180/Y182-p38, anti-Phospho-Hsp27 (Ser15), anti-p-ERK (42/44), anti-p-AKT
130 (Ser473), anti-AKT antibodies (Cell Signaling Technology); anti-S6K1, (C-18)
131 and anti-RSK1 (C-21), anti-p38 (C-20), anti-HSP27 (M-20) antibodies (Santa
132 Cruz Biotechnology); anti-ERK (Upstate Biotechnology); anti-CHC BD
133 (Transduction Laboratories).

134

135 **2.2. Plant Material**

136

137 The investigation was previously authorized by Brazil Environmental
138 Ministry to access the components of genetic patrimony in national territory (n^o
139 010547/2013-4) according to Brazilian legislation (n^o 2186-16). The guaraná
140 hydroalcoholic extract used in the present study was the same prepared by
141 Bittencourt et al. (2013) (Bittencourt et al., 2013). Briefly, the guaraná powder
142 was obtained from Western EMBRAPA, a Brazilian governmental, nonprofit
143 enterprise dedicated to agricultural investigations located in Maués City (03° 23'
144 01" S, 57° 43' 07" W, Amazonas, Brazil). The Guaraná powder was dissolved in
145 alcohol and water (70:30). After 21 days of extraction, the solution was
146 centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes, and the supernatant was isolated,
147 lyophilized and storage at -20°C. The main bioactive compounds were

148 quantified by the chromatographic analysis performed on a HPLC machine
149 (Reynertson et al., 2005), and the concentration of caffeine was estimated to be
150 12.240 mg/g; theobromine 6.733 mg/g and total catechins 4.336 mg/g total. The
151 guaraná extract was tested in two non-cellular assays, before being used in the
152 antitumor analysis. The DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) Assay, that is a
153 synthetic radical and a scavenger of other radicals, it is used to determine the
154 antioxidant capacity of the extract (Sharma & Bhat, 2009) and Genomodifier
155 Capacity Assay (GEMO) that is able to determined the genotoxic and/or
156 genoprotective extract effect (Cadoná et al., 2014). These tests confirmed that
157 the guaraná extract maintained its chemical proprieties and was able to be used
158 in the *in vitro* protocols described here.

159

160 **2.3. Cell Cultures**

161

162 The HT-29 cell line was cultured in Dulbecco's Modified Eagle Media
163 (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS), supplemented with 1%
164 penicillin/streptomycin and glutamine. Cell cultures were maintained at 37°C in
165 a humidified atmosphere of 5% CO₂. The HT-29 cells were expanded by
166 obtaining the optimal amount for the experiments. The potential cytotoxic effect
167 of guaraná on healthy cells was also performed using peripheral blood
168 mononuclear cells (PBMCs) obtained from young adult volunteers that
169 participate of a research study approved by the Ethics Committee of the Federal
170 University of Santa Maria - UFSM (n° 23081.015838/2011-10). All blood cell
171 donors signed a consent form. The potential cytotoxic guaraná effect was also

172 performed in a commercial line of fibroblast foreskin cells (HFF-1) obtained from
173 American Type Culture Collection (ATCC).

174

175 **2.4. Cell Growth Curve and Clonogenic Assay**

176

177 The guaraná antitumor effect against HT-29 cells previously described by
178 Cadoná et al. (2016) was confirmed by cell growth curve and Clonogenic
179 Assay. The growth curve was performed using 1000 HT-29 cell/well in the six
180 well plates. The guaraná concentrations were used in the all experiments: 0.1;
181 1; 10; 100 µg/mL. A chemotherapeutic drug (bleomycin) was used as a positive
182 control for cytotoxicity evaluation. The cells were counting by the automatic cell
183 counting Scepter (Millipore). Living cells were detected by 0.2 % Violet Cristal
184 dye dissolved in ethanol 2%. The cells were exposed to dye at 30 minutes for
185 37 °C, this procedure was repeated every day during seven days. The living
186 cells were determined by the dye dissolution with Sodium Dodecyl Sulfate
187 (SDS) 1% and the absorbance was measured by 550 nm wavelength.

188 The Clonogenic Assay was performed using 100 HT-29 cells/well in
189 triplicate in the six well plates. The colonies were incubated until formatted 50
190 cells for colony (approximately 10-15 days). After that, the colonies were also
191 dyed by Violet Cristal and the number of colonies was counted by the software
192 ImageJ (Cubillos-rojas et al., 2014).

193

194 **2.5. Analyses of mTOR and MAPKs signaling pathways**

195

196 A suspension of HT-29 cells was placed in 6 well plates. After cell
197 attachment, the cultures were treated with different concentrations of the
198 guaraná extract (0.1; 1; 10 and 100 µg/mL) and proportional caffeine
199 concentrations found in the guaraná extract (0.0012; 0.012; 0.12; 1.2 µg/mL) for
200 1 hour. Further, cells were exposed to H₂O₂ (0.4 mM) for 30 min in order to
201 activate the MAPKs pathway. The mTOR pathway was analyzed in the culture
202 by overnight deprivation of serum fetal bovine. Moreover, the cells were
203 incubated with 200 nM insulin for 30 min to cause mTOR pathway activation.
204 After this procedure, the cells were one-hour exposure to different guaraná
205 concentrations and the proportional caffeine concentrations.

206

207 **2.6. Cell lysate and Immunoblotting**

208

209 Initially, treated cells were harvested and lysed in NP40 lysis buffer pH
210 7.5 (TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM, NP40 0.5%, 50 mM NaF, 1 mM sodium
211 vanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml
212 aprotinin, 1 µg/ml pepstatin A, 50 mM β-glycerophosphate, 100 µg/ml
213 benzamidine) for 15 minutes at 4 °C and centrifuged at 13.000 rpm at 4 °C for
214 10 min. After that, the same quantity of proteins was separated by
215 electrophoresis. Large and small proteins were analyzed in the same gel by the
216 Tris-Acetate PAGE systems (Cubillos-rojas et al., 2014). Subsequences to
217 electrophoresis, the proteins were transferred to nitrocellulose membranes
218 (Protran nitrocellulose membrane, Whatman). Membranes were blocked with 10
219 % milk and overnight incubated with specific primary antibodies (Casas-
220 terradellas, Tato, Bartrons, Ventura, & Rosa, 2008). After, the membranes were

221 incubated with the specific secondary antibody and the protein expressions
222 were analyzed through of a gel documentation system (LAS-3000 Fujifilm). The
223 levels of proteins were equalized with respect to mTOR or CHC or total proteins
224 levels and expressed as a percentage of positive control.

225

226 **2.7. Guaraná effects on healthy cells**

227

228 The potential cytotoxic effect of guaraná on healthy cells was also
229 performed using PBMC and HFF-1 cells were exposed to the guaraná extract
230 and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂, for 24, 48 and
231 72 hours.

232 The cells were exposed to higher concentration of guaraná (100 µg/mL)
233 for 24 hours of incubation. After, the apoptosis and necrosis levels were
234 measured using Annexin-V-FITC and Propidium Iodide (PI) staining kit (BD
235 Pharmingen™). Annexin-V-FITC can detect early apoptotic processes, whereas
236 PI allows the investigator to identify late or necrotic apoptotic cells. The
237 fluorescent antibodies to Annexin-V and PI are able to bind between the cell
238 receptors and florescence can be detected. After the treatment, the cells were
239 trypsinized to be detached and were washed twice with cold PBS and then
240 resuspended in 1X Binding Buffer at a concentration of 1×10^6 cells/mL.
241 Resuspended cells underwent gentle vortexing and staining with 5 µL of
242 Annexin-V-FITC and 5 µL of PI. Following short incubation for 15 min in the
243 dark at room temperature, 400 µL of 1X Binding Buffer was added to each tube,
244 the florescence was analyzed by flow cytometry according to the manufacturer's
245 specifications (Zhao et al., 2014).

246 The cytotoxicity was also evaluated by MTT Assay. The cells were
247 exposed to different guaraná concentrations (0.1; 1; 10 and 100 µg/mL) and
248 incubated for 48 hours. After that, the MTT was performed, that is a colorimetric
249 assay that measures the reduction of yellow 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-
250 diphenyl tetrazolium bromide by mitochondrial succinate dehydrogenase. The
251 MTT reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in a 5 mg/mL
252 phosphate buffer (PBS, 0,01M; pH 7.4), added into a 96-well plate containing
253 the sample treatments and incubated for 1 hour. The supernatant was then
254 removed from the wells; next, the cells were resuspended in DMSO
255 (dimethylsulfoxide) (200 µL) and measured by 560 nm wavelength (Fukui, M.,
256 Yamabe, N., & Zhu, B. T., 2011).

257 The potential effect on cell proliferation was also evaluated by cell cycle
258 analysis by flow cytometry. The cells were exposed to higher concentration of
259 guaraná (100 µg/mL) for 72 hours of incubation. Subsequently, the cell cycle
260 analysis was performed using the PI reagent. It binds to DNA by intercalating
261 between the bases with little or no sequence preference. Since, PI also binds to
262 RNA, it needs treatment with nucleases to distinguish between RNA and DNA
263 staining. Following incubation, the cells were trypsinized, washed with PBS and
264 resuspended in 70% ethanol (the suspension was put in the vortex) at - 20°C
265 overnight. Prior to analysis, the cells were centrifuged and washed once with
266 PBS; after that, the cells were resuspended in 500 µl PI-solution in PBS: 50
267 µg/mL PI from 50x stock solution (2.5 mg/mL), 0.1 mg/mL RNase A and 0.05%
268 Triton X-100, and incubated for 40 min at 37°C. Finally, 3 mL of PBS was added
269 for washing and resuspended in 500 µL PBS for flow analysis (William-faltaos,
270 Rouillard, Lechat, & Bastian, 2006)

271

272 **2.8. Statistical analysis**

273

274 All experiments were performed of at least three independent replicates.
275 The data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). The data were
276 compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett or
277 Tukey *post hoc* tests. The statistical tests were performed using GraphPad
278 Prism Software, and $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

279

280 **3. Results**

281

282 **3.1. Guaraná decreased the colony formation and the cell growth curve**

283

284 As showed in Fig.1 the antiproliferative effect of guaraná was analyzed
285 by the Clonogenic Assay and the growth curve on the HT-29. The
286 chemotherapeutic bleomycin was used as a control of damage and cellular toxicity.
287 The levels of cell growth and the colony formation treated with bleomycin were
288 much lower than non treat cells ($p < 0.0001$). The guaraná significantly affected
289 the colony formation at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.001$) (Fig. 1a) and the guaraná
290 treatments also decreased cell proliferation at 10 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentrations
291 ($p < 0.0001$) when compare with the non treated cells (Fig. 1b).

292

293 **3.2. Effect of Guaraná on HT-29 MAPKs pathway**

294

295 The MAPKs pathway was analyzed by evaluation the proteins
296 expressions of p-p38 and its substrate p-HSP27, as well as p-ERK and its
297 substrate p-RSK. Since this pathway is stimulated by ROS, the activation was
298 performed by H₂O₂. As can be seen in Fig. 2 and in Fig. 3, the levels of
299 phosphorylated proteins on non treated cells and cell treated only with different
300 guaraná concentrations were significantly lower than H₂O₂ control (p<0.0001)
301 whereas total protein levels were not significantly modified. The proteins levels
302 expression of non treated cells and cell treated only with different guaraná
303 concentrations were significantly lower than H₂O₂ control (p<0.0001). The HT-
304 29 cells expression of p-p38 and p-HSP27 were not significantly altered by the
305 guaraná in associated to H₂O₂ (Fig. 2). Even as, the levels of p-ERK and p-RSK
306 were not modified by none concentrations of guaraná tested (Fig. 3).

307

308 **3.3. Guaraná inhibited the mTORC1 pathway on HT-29**

309

310 The mTOR pathway was measured by evaluation the proteins
311 expressions of the substrate of mTORC1 (p-S6KT389) and mTORC2 (p-AKT).
312 Since, the mTOR pathway is stimulated by growth factors; the activation was
313 performed by insulin in serum starved cells. As can be seen in Fig. 4, the levels
314 of phosphorylated protein on non treated cells and cell treated just with different
315 concentrations of guaraná were significantly lower than insulin control
316 (p<0.0001), whereas total protein levels were not significantly modified.
317 Differently of MAPK pathway signaling, guaraná affected directly the mTOR.
318 However, this effect was only found in mTORC1, the guaraná did not affect the

319 mTORC2. As can be seen in Fig. 4, all guaraná concentrations decreased the
320 levels of mTORC1 substrate phosphorylation (p-S6KT389) ($p < 0.0001$).

321

322 **3.4. Effect of caffeine in mTOR pathways on HT-29**

323

324 A complementary investigation was performed to analyze whether the
325 guaraná effect on mTOR pathways could involve caffeine. Therefore, HT-29
326 cells cultures were supplemented with proportional caffeine concentrations
327 estimated to be found in guaraná extracts. However, the results showed that
328 isolated caffeine did not affect the p-S6 and the p-AKT expression on HT-29
329 (Fig. 5).

330

331 **3.5. Guaraná cytotoxic effect against PBMCs and HFF-1 cell line**

332

333 Since guaraná could present cytotoxic effect against healthy cells,
334 PBMCs and HFF-1 cell line were exposed to the guaraná extract (Fig. 6). The
335 guaraná did not trigger dead or apoptosis induction in the healthy cells (Fig. 6a),
336 did not interfere in the cell viability (Fig. 6b) and did not change cell cycle of
337 these cells (Fig. 6c).

338

339 **4. Discussion**

340

341 The present investigation confirmed that guaraná has antitumor effect
342 against HT-29 cell line (Cadoná et al, 2016). The results described here
343 suggest that guaraná was able to inhibit the colony growth and the cell

344 proliferation in the highest concentration tested. Moreover, the results indicate
345 the guaraná presents antitumor activity by modulation of mTORC1 pathway.

346 Previous investigations suggested that some bioactive molecules, such
347 as caffeine decrease the tumor colony formation (Sun et al., 2015). For this
348 reason, since the guaraná is a high caffeinated fruit, this modulation could be
349 associated with this bioactive molecule.

350 Several essential pathways are upregulated in tumor process, for
351 instance the mTOR and MAPKs pathways are frequently deregulated in cancer.
352 Because of that, the cell proliferation became uncontrolled and it corroborates
353 to promote the growth and installation the cancer in the tissue.

354 Since previous studies described that several bioactive molecules found
355 in guaraná, such as caffeine and catechins, could inhibit the mTOR pathways,
356 that is a central molecule in the control of growth and cell proliferation, in the
357 metabolism and angiogenesis (Miwa et al., 2012), we analyzed whether
358 guaraná and its major compound, caffeine, could interfere in this pathway in the
359 HT-29 cells.

360 The results showed that the guaraná extract specially decreased the
361 expression of mTOR pathway. Guaraná was able to reduce the expression of
362 mTORC1 complex, p-S6KT389. However, the caffeine tested in the guaraná in
363 proportional concentrations did not affect this pathway. Therefore, the antitumor
364 guaraná effects against HT-29 cells are not due caffeine, but probably it
365 involves a synergism of the others bioactive molecules presents in the extract.

366 Some investigations have reported the relevance of chemical synergism
367 on cancer biology, such as in D'Angelo et al. (2014) study. In this investigation,
368 the authors found that the association of three natural compounds,

369 eicosapentaenoic acid-free fatty acid, epigallocatechin-3-gallate and
370 proanthocyanidins acted an antitumor affect in the colorectal cancer by
371 inhibition of mTOR, reduce cell proliferation and induce apoptosis (D'Angelo et
372 al., 2014).

373 Besides, the MAPKs is another pathway of therapeutic interest since it is
374 upregulated in several cancers. MAPKs modulate the expression of a lot of
375 genes that are associated with survival, proliferation and cell death. This
376 pathway is controlled by ROS, since the guaraná is considered an important
377 antioxidant (Bittencourt et al., 2013), the potential influence on MAPKs pathway
378 on HT-29 cells was postulated. However, the results described here did not
379 showed guaraná effect on MAPKs.

380 There are previous investigations that described that guaraná was able
381 to control human ovarian carcinoma by MAPKs modulation, mainly the p38
382 expression (Wang, Bhoopalan, Wang, Wang, & Xu, 2015). Since we did not find
383 similar results, we can postulate that the guaraná effects on MAPKs pathway is
384 dependent on other specific cellular metabolic pathways that diverge in HT-29
385 cells and ovarian carcinoma cells.

386 The guaraná cytotoxic and antiproliferative effects on HT-29 cells
387 described by Cadoná et al. (2016) seem not to affect healthy cells as showed in
388 the complementary protocol performed here using HFF-1 cell line and PBMCs.
389 The non-toxicological effects of guaraná on healthy cells observed here agree
390 with previously reported literature. This study showed that guaraná presents
391 safe concentrations, since it was not able to cause damage in the health cells. It
392 corroborates with previous investigations that described the antioxidants and

393 the protective effects of guaraná (Bittencourt et al., 2013; Mattei et al., 1998;
394 Santa Maria et al., 1998) in normal cells.

395 In summary, guaraná could be a supplement that improve the
396 chemotherapeutic response and decrease the HT-29 cells proliferation by
397 modulation of mTOR pathway. Despite the methodological limitations related
398 with *in vitro* experimental models, these results could be taken into account in
399 clinical therapies. In fact, guaraná has been used as supplement to improve the
400 fatigue of cancer patients undergoing chemotherapy.

401

402 **Acknowledgments**

403

404 We thank the Biogenomic Lab and the Universitat de Barcelona,
405 especially to the research team of Professor Jose Luis Rosa Lopez for helping
406 us with data collection. This study was partially supported by Spanish Ministerio
407 de Ciencia e Innovación Grant BFU2011-22498 to J.L.R. Besides, this work
408 was supported by grants and fellowships from Brazilian governmental funds:
409 Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas (FAPEAM), Fundação de
410 Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGs) and Conselho Nacional
411 de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq).

412

413 **Compliance with ethical standards**

414

415 The authors declare that they have no conflict of interest including any
416 financial, personal, or other relationships with other people or organizations that
417 could inappropriately influence, or be perceived to influence, the present work.

418

419 **References**

420

- 421 Bérubé-Parent, S., Pelletier, C., Doré, J., & Tremblay, A. (2005). Effects of
422 encapsulated green tea and Guarana extracts containing a mixture of
423 epigallocatechin-3-gallate and caffeine on 24 h energy expenditure and fat
424 oxidation in men. *The British Journal of Nutrition*, *94*(3), 432–436.
- 425 Bittencourt, L. S., Machado, D. C., Machado, M. M., Santos, G. F. F. Dos,
426 Algarve, T. D., Marinowic, D. R., et al. (2013). The protective effects of
427 guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to
428 sodium nitroprusside. *Food and Chemical toxicology*, *53*, 119–125.
- 429 Cadoná, F. C., Machado, A. K., Azzolin, V. F., Barbisan, F., Dornelles, E. B.,
430 Glanzner, W., et al. (2016). Guaraná a Caffeine-Rich Food Increases
431 Oxaliplatin Sensitivity of Colorectal HT-29 Cells by Apoptosis Pathway
432 Modulation. *Agents in Medicinal Chemistry*, *16*, 1055–1065.
- 433 Cadoná, F. C., Manica-Cattani, M. F., Machado, A. K., Oliveira, R. M., Ribas da
434 Silveira Flôres, E., Assmann, C., et al. (2014). Genomodifier capacity
435 assay: a non-cell test using dsDNA molecules to evaluate the
436 genotoxic/genoprotective properties of chemical compounds. *Anal.*
437 *Methods*, *6*(21), 8559–8568.
- 438 Caron, A., Richard, D., & Laplante, M. (2015). The Roles of mTOR Complexes
439 in Lipid Metabolism. *Annual Review of Nutrition*, *35*, 321–348.
- 440 Casas-terradellas, E., Tato, I., Bartrons, R., Ventura, F., & Rosa, J. L. (2008).
441 Biochimica et Biophysica Acta ERK and p38 pathways regulate amino acid
442 signalling. *BBA - Molecular Cell Research*, *1783*(12), 2241–2254.
- 443 Cubillos-rojas, M., Amair-pinedo, F., Peiró-jordán, R., Bartrons, R., Ventura, F.,
444 & Rosa, J. L. (2014). The E3 Ubiquitin Protein Ligase HERC2 Modulates
445 the Activity of Tumor Protein p53 by Regulating Its Oligomerization, *Journal*
446 *of Biological Chemistry*, *289*(21), 14782–14795.
- 447 Cubillos-rojas, M., Amair-pinedo, F., Tato, I., Bartrons, R., Ventura, F., & Rosa,
448 J. L. (2014). Chapter 17 Tris – Acetate Polyacrylamide Gradient Gels for
449 the Simultaneous Electrophoretic Analysis of Proteins of Very High and
450 Low Molecular Mass, *869*, 205–213.
- 451 D'Angelo, L., Piazza, G., Pacilli, A., Prossomariti, A., Fazio, C., Montanaro, L., et
452 al. (2014). A combination of eicosapentaenoic acid-free fatty acid,
453 epigallocatechin-3-gallate and proanthocyanidins has a strong effect on
454 mTOR signaling in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, *35*(10), 2314–
455 20.
- 456 Fukumasu, H., Avanzo, J. L., Nagamine, M. K., Barbuto, J. a., Rao, K. V., &
457 Dagli, M. L. Z. (2008). *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná, reduces
458 cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung
459 metastases in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*,
460 *41*(4), 305–310.
- 461 Fukumasu, H., Latorre, A. O., & Zaidan-dagli, M. L. (2011). Increases Survival
462 of Ehrlich Ascites Carcinoma (EAC) Bearing Mice by Decreasing Cyclin-D1
463 Expression and Inducing a G0/G1 Cell Cycle Arrest in EAC Cells.

- 464 *Phytotherapy Research*, 16, 11–16.
- 465 Fukumasu, H., Silva, T. C. Da, Avanzo, J. L., Lima, C. E. De, MacKowiak, I. I.,
466 Atroch, A., et al. (2006). Chemopreventive effects of Paullinia cupana Mart
467 var. sorbilis, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Letters*,
468 233(1), 158–164.
- 469 Ku, B. M., Lee, Y. K., Jeong, J. Y., Ryu, J., Choi, J., Kim, J. S., et al. (2011).
470 Caffeine inhibits cell proliferation and regulates PKA/GSK3 pathways in
471 U87MG human glioma cells. *Molecules and Cells*, 31(3), 275–279.
- 472 Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and
473 disease. *Cell*, 149(2), 274–93.
- 474 Fukui, M., Yamabe, N., & Zhu, B. T. (2011). Resveratrol Attenuates the
475 Anticancer Efficacy of Paclitaxel in Human Breast Cancer Cells In Vitro and
476 In Vivo. *European Journal of Cancer*, 46(10), 1882–1891.
- 477 Mattei, R., Dias, R., Espínola, E., Carlini, E., & Barros, S. B. (1998). Guarana
478 (Paullinia cupana): toxic behavioral effects in laboratory animals and
479 antioxidant activity in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, 60(2), 111–116.
- 480 Miwa, S., Sugimoto, N., Yamamoto, N., Shirai, T., Nishida, H., Hayashi, K., et
481 al. (2012). Caffeine induces apoptosis of osteosarcoma cells by inhibiting
482 AKT/mTOR/S6K, NF-kappaB and MAPK pathways. *Anticancer Research*,
483 32, 3643–3649.
- 484 Reynertson, K. A., Balick, M. J., Lee, R., Raynor, W., Pelep, Y., & Kennelly, E.
485 J. (2005). A traditional method of Cinnamomum carolinense preparation
486 eliminates safrole from a therapeutic Pohnpean tea, *Journal of*
487 *Ethnopharmacology*, 102, 269–274.
- 488 Santa Maria, A, Lopez, A, Diaz, M. M., Muñoz-Mingarro, D., & Pozuelo, J. M.
489 (1998). Evaluation of the toxicity of guarana with in vitro bioassays.
490 *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 39(3), 164–7.
- 491 Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food*
492 *Chemistry*, 113(4), 1202–1205.
- 493 Sun, F., Han, D., Cao, B., Wang, B., Dong, N., & Jiang, D. (2015). Caffeine-
494 induced nuclear translocation of FoxO1 triggers Bim-mediated apoptosis in
495 human glioblastoma cells. *Tumor Biology*. 37(3), 3417-23.
- 496 Tanaka, S., Hosokawa, M., Yonezawa, T., Hayashi, W., Ueda, K., & Iwakawa,
497 S. (2015). Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition and Down-
498 Regulation of miR-200c and miR-141 in Oxaliplatin-Resistant Colorectal
499 Cancer Cells. *Biol Pharm Bull*, 38(3), 435–440.
- 500 Wang, G., Bhoopalan, V., Wang, D., Wang, L., & Xu, X. (2015). The effect of
501 caffeine on cisplatin-induced apoptosis of lung cancer cells. *Experimental*
502 *Hematology & Oncology*, 4(1), 5.
- 503 William-faltaos, S., Rouillard, D., Lechat, P., & Bastian, G. (2006). Cell Cycle
504 Arrest and Apoptosis Induced by Oxaliplatin (L-OHP) on Four Human
505 Cancer Cell Lines, *Anticancer Research*, 2100, 2093–2099.
- 506 Zarubin, T., & Han, J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase
507 pathway. *Cell Research*, 15(1), 11–18.
- 508 Zhao, X., Huang, S., Luo, H., Wan, X., Gui, Y., Li, J., & Wu, D. (2014).
509 Evaluation of vesicular stomatitis virus mutant as an oncolytic agent against
510 prostate cancer. *International Journal of Clinical and Experimental*
511 *Medicine*, 7(5), 1204–13.
- 512 Zhou, H., Luo, Y., & Huang, S. (2010). Updates of mTOR inhibitors. *Anti-Cancer*
513 *Agents in Medicinal Chemistry*, 10(7), 571–81.

514
515
516
517

Figure Captions

518

519 **Fig. 1** Cell proliferation curve during 7 days of HT-29 cell exposed to different
520 guaraná concentrations (0.1; 1; 10 e 100 µg/ml) and positive control, bleomicyn
521 (a). Colony formation assays were performed of HT-29 cell exposed to guaraná
522 concentrations (0.1; 1; 10 e 100 µg/ml) and bleomicyn (b). The results were
523 compared with negative control (only cells). N=3, ***($p < 0.0001$), **($p < 0.001$)
524 and * ($p < 0.005$).

525

526 **Fig. 2** Lysates from HT-29 exposed to different guaraná concentrations were
527 analyzed by immunoblotting with antibodies against the p-p38, p38, p-HSP27,
528 pHSP27 and CHC proteins. N=3, ***($p < 0.0001$), **($p < 0.001$) and * ($p < 0.005$).

529

530 **Fig. 3** Lysates from HT-29 exposed to different guaraná concentrations were
531 analyzed by immunoblotting with antibodies against the p-ERK, ERK, p-RSK,
532 RSK and CHC proteins. N=3, ***($p < 0.0001$), **($p < 0.001$) and * ($p < 0.005$).

533

534 **Fig. 4** Lysates from HT-29 exposed to different guaraná concentrations were
535 analyzed by immunoblotting with antibodies against the p-S6KT389, S6K, p-
536 AKT, AKT and CHC proteins. N=3, ***($p < 0.0001$), **($p < 0.001$) and * ($p < 0.005$).

537

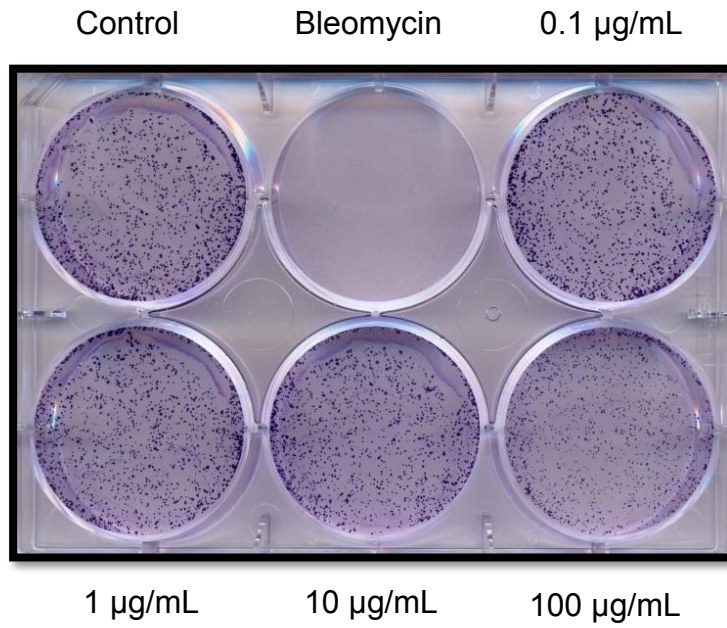
538 **Fig. 5** Lysates from HT-29 exposed to different caffeine concentrations were
539 analyzed by immunoblotting with antibodies against the p-S6KT389, S6K, p-
540 AKT, AKT and CHC proteins. N=3, ***($p < 0.0001$), **($p < 0.001$) and * ($p < 0.005$).

541

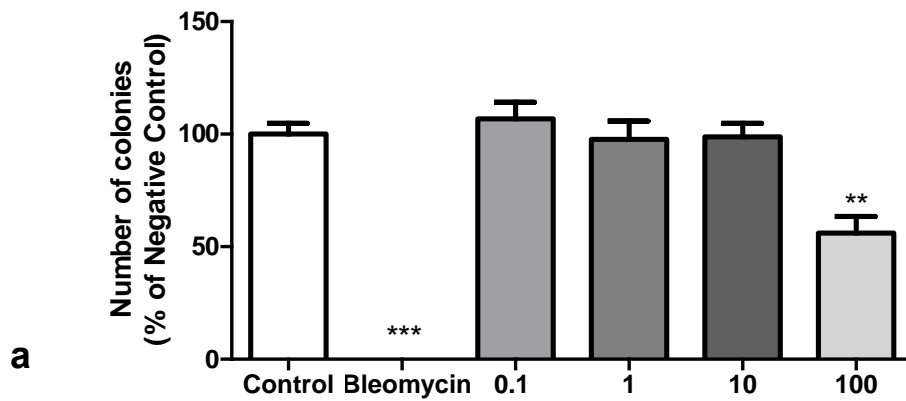
542 **Fig. 6** PBMC and HFF-1 cells were treated with the highest guaraná
543 concentration (100 µg/mL) for 24 hours. Apoptosis was assessed using FITC
544 Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen). A total of 10.000 events
545 were acquired and analyzed using FACS Calibur with CELL Quest software.
546 Cells FITC Annexin V and PI negative were considered viable cells; live-gated
547 cells within the FITC Annexin V + PI - compartment were identified as early
548 apoptotic cells and gated cells within the Annexin-V+PI+ compartment were
549 identified as late apoptotic/dead cells (a). PBMC and HFF-1 cells were treated
550 for 48 hours with all the guaraná concentrations (0.1; 1; 10 and 100 µg/mL). The
551 MTT assay was performed to analyze the cell viability (b). Cell cycle profile of
552 treated PBMC and HFF1 cells was performed with the highest guaraná
553 concentration (100 µg/mL) for 72 hours (c). N=3.

554

Clonogenic Assay



Clonogenic Assay HT-29



Cell Growth Curve HT-29

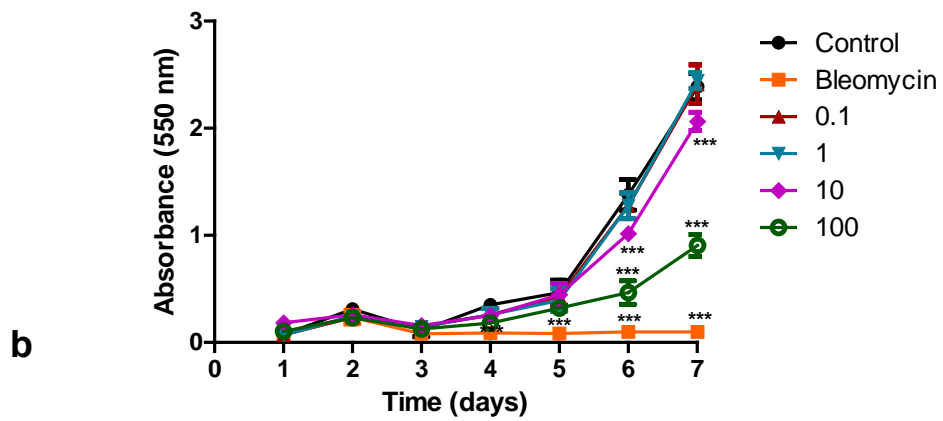


Figure 1

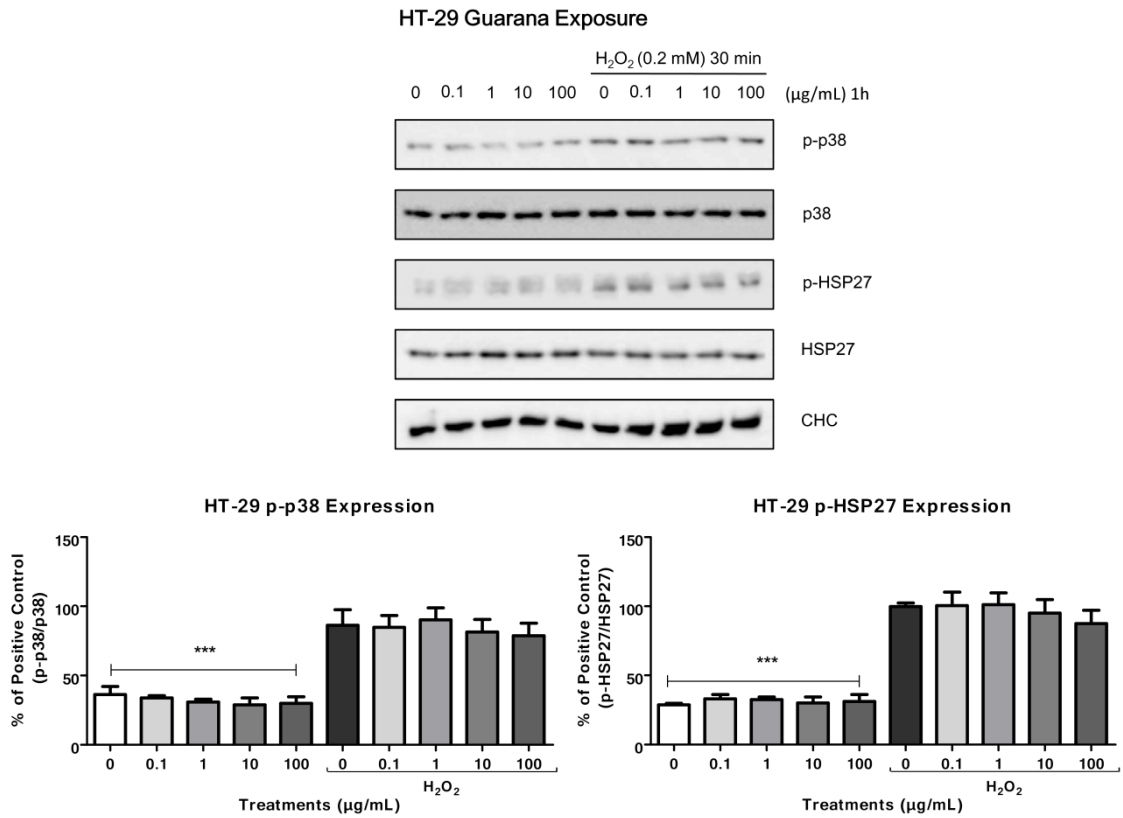


Figure 2

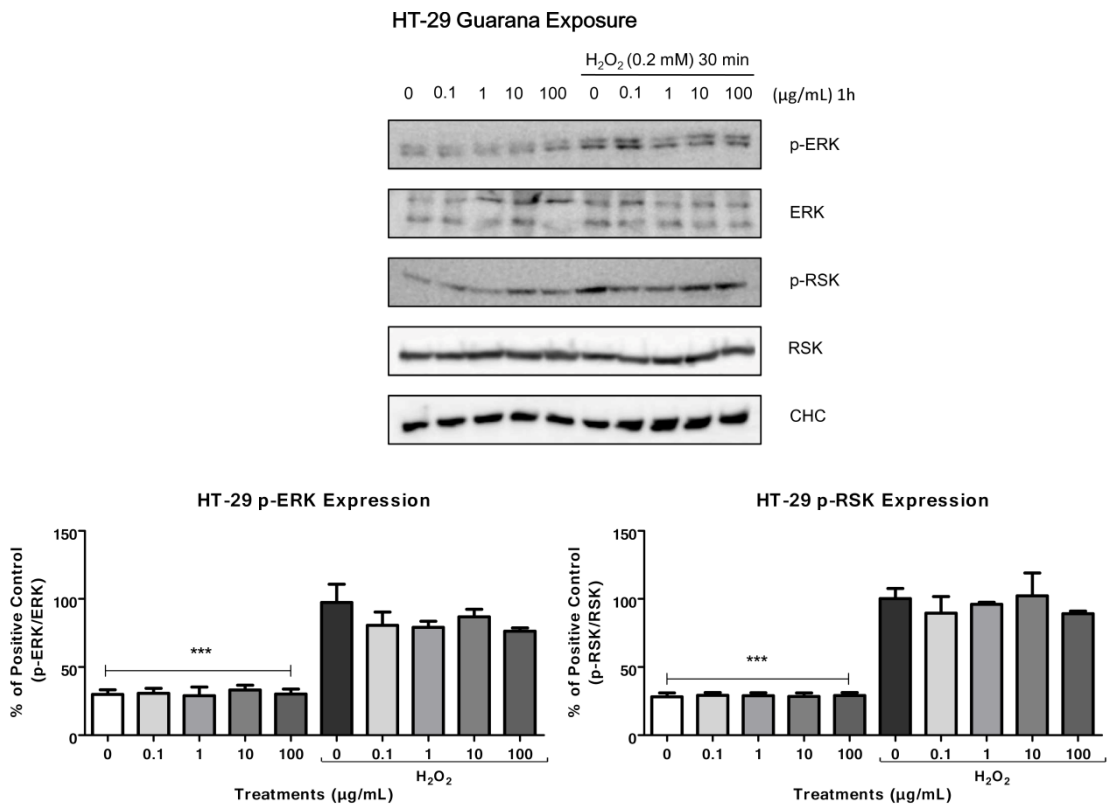


Figure 3

HT-29 Guarana Exposure

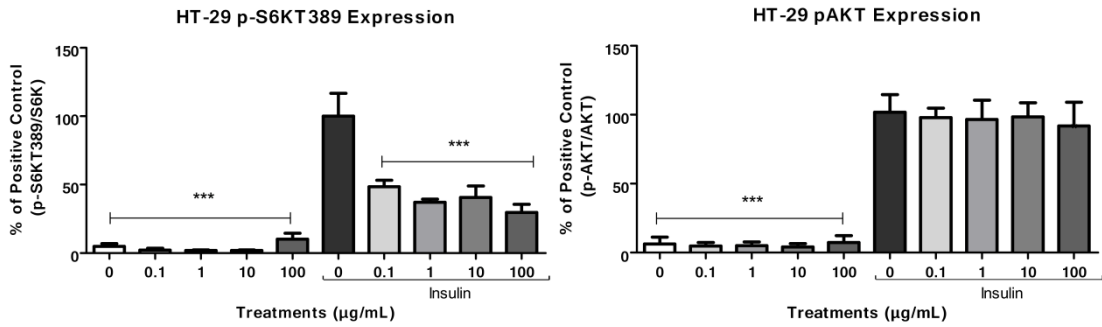
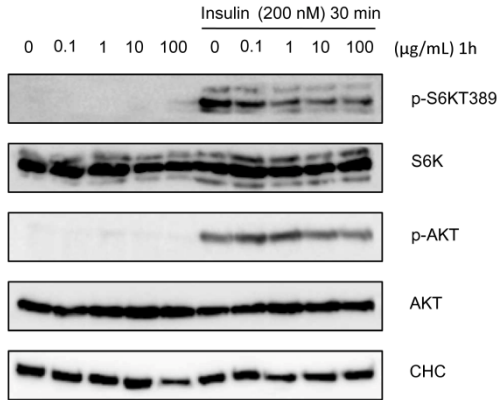


Figure 4

HT-29 Caffeine Exposure

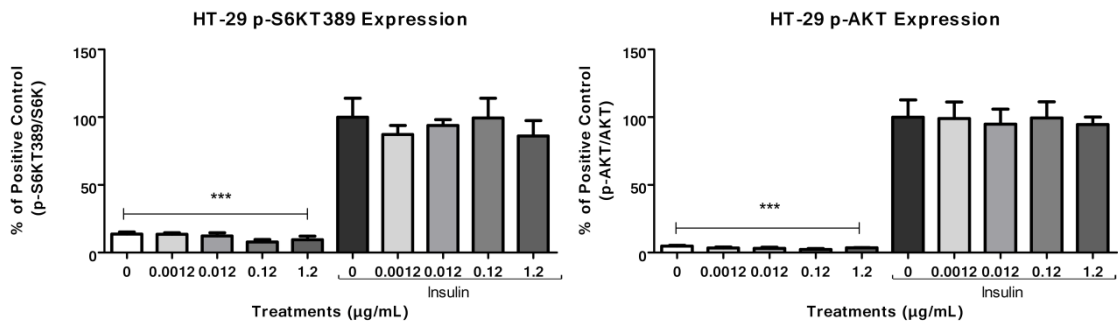
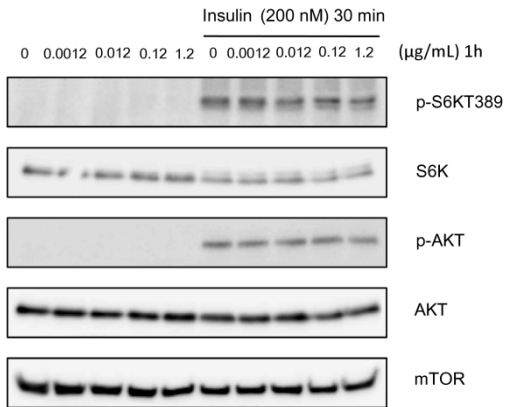
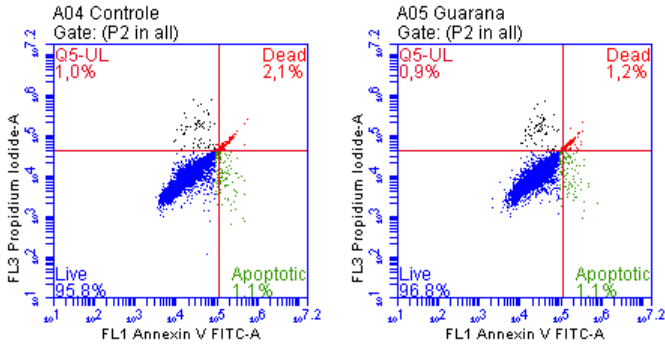
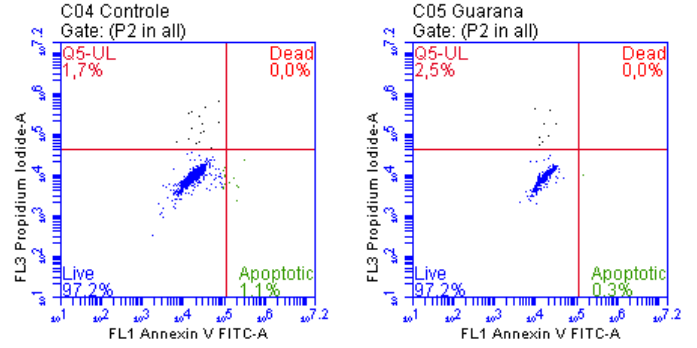


Figure 5

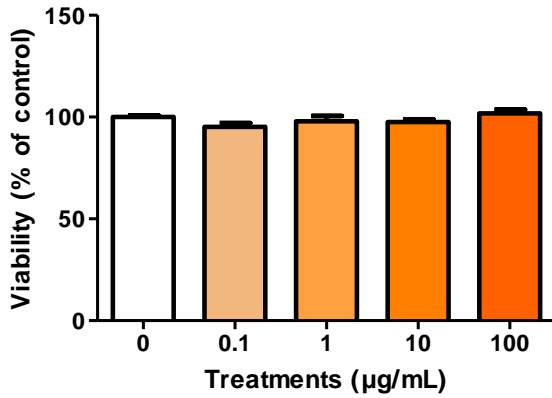
HFF-1



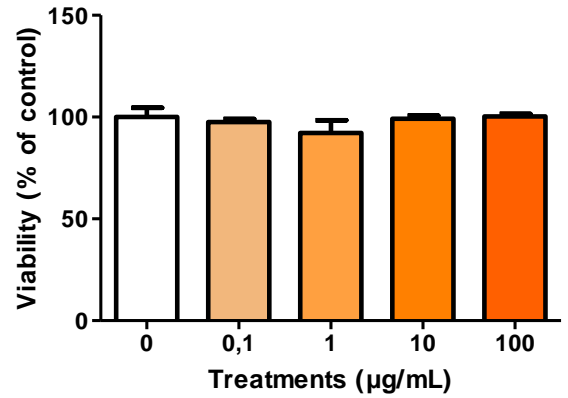
PBMC



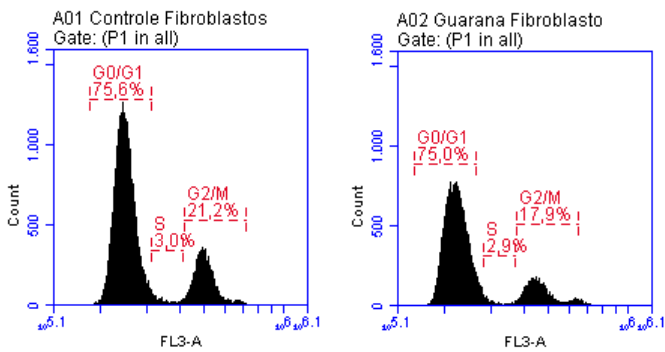
MTT Assay HFF1 48 h



MTT Assay PBMC 48 h



HFF-1



PBMC

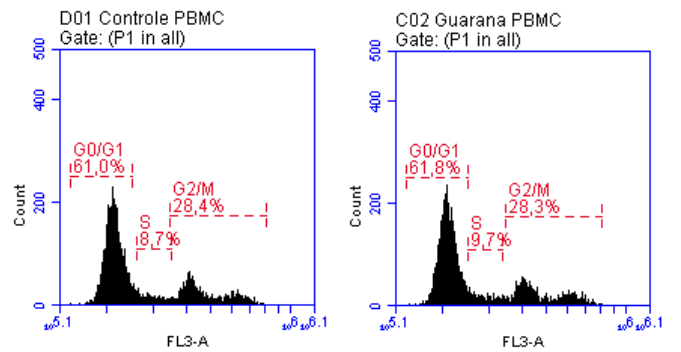


Figure 6

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

Guaraná, a high caffeine fruit that improves fatigue in patients undergoing chemotherapy, presents cytotoxic activity by inhibiting AKT/mTOR/S6K and MAPK Pathways in Breast Cancer Cell (MCF-7)

Journal:	<i>Journal of Natural Products</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Full Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Cadoná, Francine; Universidade Federal de Santa Maria, Morfologia Rosa, Jose; Universitat de Barcelona, Ciències Fisiològiques II Schneider, Taiane; Universitat de Barcelona, Ciències Fisiològiques II Cubillos-Rojas, Monica; Universitat de Barcelona, Ciències Fisiològiques II Sanchez-Tena, Susana; Universitat de Barcelona, Ciències Fisiològiques II Azzolin, Verônica; Universidade Federal de Santa Maria, Morfologia Assmann, Charles; Universidade Federal de Santa Maria, Morfologia Ribeiro, Euler; Universidade Aberta da Terceira Idade, Universidade do Estado do Amazonas da Cruz, Ivana; Universidade Federal de Santa Maria, Morfologia

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Guaraná, a high caffeine fruit that improves fatigue in patients undergoing chemotherapy, presents cytotoxic activity by inhibiting AKT/mTOR/S6K and MAPK Pathways in Breast Cancer Cell (MCF-7)

Francine C. Cadoná,^{†,‡} Jose Luis Rosa,[§] Taiane Schneider,[§] Monica Cubillos-Rojas,[§] Susana Sánchez-Tena,[§] Verônica F. Azzolin,^{‡,†} Charles E. Assmann,^{†,‡} Euler E. Ribeiro,^{||} and Ivana Beatrice M. da Cruz^{†,‡,‡*}

[†]*Post-Graduate Program in Biochemistry and Toxicology at Federal University of Santa Maria, Brazil*

[‡]*Laboratory of Biogenomic at Federal University of Santa Maria, Brazil*

[§]*Departament de Ciències Fisiològiques II, Campus de Bellvitge, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain*

[‡]*Post-Graduate Program in Pharmacology at Federal University of Santa Maria, Brazil*

^{||}*Third Age Open University, University of Amazonas State, Brazil; Post-Graduate Program in Gerontology, at the Federal University of Santa Maria, Brazil*

Corresponding author at: Av Roraima 1000, Buiding 19, Santa Maria-RS, Brazil, Zip Code: 97105900. Tel.: +55 55 32208163.
E-mail address: ibmcruz@hotmail.com (I.B.M. da Cruz).

ABSTRACT

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Previous investigations suggested that guaraná seems to improve fatigue of breast cancer patients undergoing chemotherapy and increases the *in vitro* cytotoxic effect of several chemotherapeutic drugs. However, the biological mechanism that guaraná modulates on breast cancer cells have not been elucidated so far. Therefore, the present investigation studied the *in vitro* effects of this supplement on mTOR and MAPKs signaling pathways. The study also evaluated the isolated caffeine effects at concentrations estimated to be found in the guaraná concentrations that present best antiproliferative effect on MCF-7 cells. First of all, an *in vitro* guaraná antiproliferative effects on MCF-7 breast cancer cells was confirmed by cell growth curve analysis and Clonogenic Assay. Guaraná and proportional caffeine concentrations effect on mTOR and on MAPKs modulation was evaluated by Western-blot after 1 hour of exposition. The results showed that the antiproliferative effect of guaraná was verified by cell curve and Clonogenic assays in all the concentrations tested. Guaraná and isolated caffeine modulated MAPKs (p38 and HSP27), mTORC1 (p-S6KT389) and mTORC2 (p-AKT) pathways. These results suggest that guaraná cytotoxic effect against MCF-7 cells do not involve only cytotoxic effect but also involve active modulation of energetic cell metabolism pathways.

1
2
3
4
5 Guaraná (*Paullinia cupana*) is an Amazonian fruit consumed since Pre-
6
7 Columbian times, it is composed by high levels of caffeine, catechins and other
8
9 bioactive molecules that contribute to several functional proprieties of guaraná,
10
11 such as antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, antiplatelet,
12
13 antidepressant, cytotoxic and energizing.^{1,2,3}
14
15

16
17 Since the guaraná is a highest caffeine fruit, it could be used as a
18
19 supplement to improve fatigue, meanly in patients undergoing chemotherapy.
20
21 The chemotherapy used for cancer treatment is considered aggressive and
22
23 responsible for several collateral effects, such as lose of hair and weight,
24
25 nausea and fatigue.⁴ Cancer-related fatigue (CRF) is the most frequent problem
26
27 reported by the patients undergoing chemotherapy.⁵ It is associated with
28
29 psychological phenomenon, such as pain, depression, sleep disturbance and
30
31 reduction of physical activities.⁶
32
33

34
35 The CRF can be treated with physical activity and antidepressant
36
37 medicines; however the CRF treatment continues unsatisfactory.⁷ Therefore,
38
39 the bioactive compounds that can be used to improve CFR have been
40
41 investigated. For this reason, Campos and collaborates (2011) preformed a
42
43 randomized study, double-blind, control placebo to analyze the guaraná effect
44
45 against CFR in breast patients undergoing chemotherapy. Powder guaraná in
46
47 100 mg was daily administrated; the results indicated a significant decrease of
48
49 CFR, as well as did not find a collateral effect, such as anxiety and sleep
50
51 disturbers.⁸
52
53

54
55 However, the interaction of guaraná with the chemotherapies is not
56
57 much clarified. Therefore, it instigated Hertz and collaborates (2014) to
58
59
60

1
2
3 investigate whether this association could interfere in the pharmacological
4 action of the chemotherapeutics. Therefore, an *in vitro* study using breast
5 cancer cell line (MCF-7) expose to different chemotherapeutics used in the
6 breast cancer treatment in association with guaraná extract in different
7 concentrations was performed. The results showed that in general the guaraná
8 increases the antiproliferative effect of the chemotherapeutics besides the
9 cytotoxic effect used isolated.⁹

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
There are a lot of studies that indicate the cytotoxic activity of guaraná in
several cancers.^{10,11,12,13} However, the causal mechanism of guaraná on cancer
cells is not well established. The guaraná could be associated with the
modulation of signaling pathways involved in the cell growth and survival that lot
of times are deregulated in cancer, such as Mitogen-activated Protein Kinases
(MAPKs) and Mammalian Target of Rapamycin (mTOR).

The mTOR and MAPKs signaling pathways are important to growth and
development cellular. These pathways, a lot of times are upregulated in cancer
process. Because of that, investigations involving molecules which could
inhibiter these pathways are considered target therapies.¹⁴

The MAPKs are active by reactive oxygen species (ROS)¹⁵. Since the
guaraná is considered an antioxidant fruit¹, it could inhibit ROS and modulate
this pathway. Besides, the bioactive molecules found in guaraná could regulate
the mTOR pathway, such as Miwa et al. (2012) described the cytotoxic effect of
caffeine by induction of apoptosis in osteosarcoma cells by inhibiting
AKT/mTOR/S6K, NF-KB and MAPK pathways.¹⁶

1
2
3 Therefore, the aim of this study was to analyze the cytotoxic mechanism
4 of guaraná extract in the main pathways that control cell proliferation and
5 survival, mTOR and MAPKs, in MCF-7 cells.
6
7
8
9

10 11 **RESULTS AND DISCUSSION** 12 13 14

15 16 **Guaraná decreased the colony formation and the cell growth curve.** 17

18 The antiproliferative effect of guaraná was analyzed by the Clonogenic Assay
19 and by the cell growth curve on the MCF-7 cell line (Figure 1). The
20 chemotherapeutic bleomycin was used as a cytotoxic control. The levels of cell
21 growth and the colony formation treated with bleomycin decreased when
22 compared to non treat cells ($p < 0.0001$). The guaraná significantly affected the
23 colony formation on MCF-7 (Figure 1a) in all of the concentrations tested when
24 compared to the non treated cells ($p < 0.0001$). The same results were found in
25 the cell proliferation curve (Figure 1b).
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 These results corroborated with previous investigations that described
37 the antiproliferative effect of the guaraná in cancer cells. Cadoná et al., (2015)
38 described that guaraná presents antiproliferative effect in colorectal cancer and
39 increased Oxaliplatin sensitivity by apoptosis pathway.¹³ Besides, Fukumasu et
40 al., (2008) reported that the guaraná, reduced cell proliferation and increased
41 apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice as well as the same
42 research team described the effect of the guaraná to increase the survival of
43 Ehrlich ascites carcinoma (EAC) bearing mice by decreasing cyclin-D1
44 expression and inducing a G0/G1 cell cycle arrest in EAC cells.^{12,11}
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Effect of Guaraná on MCF-7 MAPKs pathway.** We investigated the
4 effect of guaraná in the MAPKs pathway of MCF-7 cells by the analysis of p-p38
5 and its substrate p-HSP27, as well as p-ERK and its substrate p-RSK proteins
6 expression. The phosphorylation of this pathway is stimulated by ROS, because
7 of that the activation was performed by hydrogen peroxide solution (H₂O₂). As
8 can be seen in Figure 2 and Figure 3, the levels of phosphorylated protein on
9 expression of non treated cells and cell treated only with different guaraná
10 concentrations were significantly lower than H₂O₂ control (p<0.0001), whereas
11 total protein levels were not significantly modified. Besides, the expression
12 levels of the p-p38 decreased in all the guaraná concentrations tested in the
13 associated to H₂O₂ (p<0.0001 and p<0.001), the same occurred with its
14 substrate p-HSP27 (Figure 2). In the other hand, the levels of p-ERK and p-
15 RSK were not modified in none of guaraná concentrations in addition to H₂O₂
16 (Figure 3).
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 Natural products are being used to reduce the levels of the cell
35 proliferation in cancer cells. Studies suggest that the epigallocatechin-3-gallate
36 found in functional foods, such as in the guaraná and in the green tea, is able to
37 decrease the cell proliferation of cancer cells by regulating phosphoinositide-3
38 kinase/Akt (PI3K/Akt) and MAPK pathways in Epstein–Barr virus-positive
39 cancer cells.¹⁷
40
41
42
43
44
45
46
47

48 Besides, Zhou et al. (2016) reported that epigallocatechin-3-gallate
49 potentiates the antiproliferative activity of the chemotherapeutic sunitinib in
50 human cancer cells. The association of the epigallocatechin-3-gallate
51 potentiated the action of the chemotherapeutic by inhibiting the MAPK pathway
52 in breast cancer (MCF-7) and lung cancer (H460 and H1975) cell lines¹⁸.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Guaraná inhibited the mTOR pathways on MCF-7.** The effect of
4
5 several guaraná concentrations in the mTOR pathways was analyzed on MCF-
6
7 7 cells line. Since, the mTOR pathway is stimulated by metabolic stress, the
8
9 activation was performed by insulin in serum starved cells. The proteins levels
10
11 expression of non treated cells and cell treated only with different
12
13 concentrations of guaraná were significantly lower than insulin control
14
15 ($p < 0.0001$) (Figure 4). As can be seen in Figure 4, guaraná affected mTORC1 e
16
17 mTORC2 decreasing the expression of their substrate stimulated by insulin.
18
19 The guaraná significantly decreased the levels of mTORC1 substrate
20
21 phosphorylation, p-S6KT389, in all the concentrations tested when compare to
22
23 insulin control ($p < 0.001$). Moreover, the expression levels of the mTORC2
24
25 substrate phosphorylation, p-AKT, were also altered, but it was only significant
26
27 in the highest guaraná concentration (100 $\mu\text{g/mL}$) against insulin control
28
29 ($p < 0.001$).
30
31
32
33

34 Similar results also are described by Aller and collaborates (2011). They
35
36 reported that bioactive compounds, for instance, the epigallocatechin gallate
37
38 that it is found mainly in the green tea and in the guaraná, could inhibit the
39
40 mTOR pathway, because it can decrease the cell proliferation and AKT
41
42 phosphorylation in human lung carcinoma epithelial cell line A549 and human
43
44 breast cancer cell lines MDA-MB-231.¹⁹
45
46

47 Moreover, Liu et al. (2013) reported that the effects of (-)-
48
49 epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on the PI3K/AKT/mTOR pathway in
50
51 pancreatic cancer cells (PANC-1). This bioactive molecule, present in guaraná,
52
53 is able to inhibit the proliferation of PANC-1 cells and induced apoptosis
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 simultaneously by downregulating the expression of p-AKT and phospho-
4
5 mTOR.²⁰
6

7 **Caffeine: the main compound of guaraná modulated MAPKs**
8 **pathways on MCF-7.** We analyzed whether the main compound found in the
9 guaraná extract, caffeine, could affect the MAPKs pathways on MCF-7 in the
10 same way that guaraná, which was tested in the previous experiment. The
11 similar guaraná results were found in the caffeine isolated treatment. The
12 caffeine treatment stimulated by H₂O₂ stress decreased the p-p38 (p<0.0001)
13 and its substrate expression, p-HSP27, in the concentrations of 0.012 µg/mL
14 (p<0.005), 0.12 and 1.2 µg/mL (p<0.001) (Figure 5).
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25 The guaraná is considered a powerful antioxidant because presents a lot
26 of bioactive molecules, such as caffeine, catechin and theobromine.¹ The
27 interaction between antioxidants compounds and ROS could block the MAPKs
28 signaling pathways, since the proteins these pathways are depend on ROS.
29 This evidence could be attributed by the caffeine presents in the guaraná. Since
30 the results showed that caffeine is able to inhibit the expression the same
31 MAPKs proteins than guaraná, p-p38 and p-HSP27.
32
33
34
35
36
37
38
39

40 Moreover, the study performed by Dai et al., (2001) corroborated with our
41 results, they suggested that the caffeine could be a pharmacological inhibitor of
42 the MAPK cascade inducing mitochondrial dysfunction and apoptosis in human
43 leukemia cells.²¹ Besides, Ravi et al., (2008) also described the inhibitory effect
44 of caffeine in MAPK pathway by downregulated the expression of p38 in A2058
45 melanoma cells.²²
46
47
48
49
50
51
52

53 **Effect of caffeine in mTOR pathway on MCF-7.**The effect of
54 proportional caffeine concentrations found in guaraná extract was tested in
55
56
57
58
59
60

1
2
3 mTOR pathways on MCF-7. The caffeine inhibited the p-SK6 and the p-AKT
4
5 expression levels in similar concentrations of guaraná extract. The caffeine
6
7 inhibited the p-SK6 in all the tested concentrations ($p < 0.0001$) and decreased
8
9 the expression of p-AKT in the 0.12 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.001$) and 1.2 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.005$)
10
11 concentrations (Figure 6).
12

13
14 The investigation performed by Saiki et al., (2011) collaborated with our
15
16 results, because they related that caffeine is able to induce apoptosis by
17
18 enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition in cervical
19
20 cancer (HeLa).²³
21

22
23 In conclusion, the present study describes the cytotoxic effect of the
24
25 guaraná on MCF-7 cell line, which has been used to improve fatigue mainly in
26
27 breast cancer patients undergoing to chemotherapy treatment. The overall
28
29 results in this investigation indicated that guaraná presents some cytotoxic and
30
31 antiproliferative effect on MCF-7 cells by decreasing the colony formation, cell
32
33 growth curve and by inhibiting mTOR and MAPKs signaling pathways.
34

35
36 The guaraná was able to decrease the expression levels the substrate of
37
38 mTORC1 (p-SK6T389) and mTORC2 (p-AKT) as well as the MAPK (p-38 and
39
40 p-HSP27). The guaraná presented an important antiproliferative activity on
41
42 MCF-7. This effect is clarified by the analysis the main growth and development
43
44 cellular pathways, the MAPKs and mTOR, which showed an inhibition the
45
46 guaraná in some proteins since it presents high caffeine concentration and a
47
48 significant antioxidants bioactive compounds synergism.
49

50
51 Therefore, this investigation is important to report the potential cytotoxic
52
53 activity of the guaraná, as well as the main molecule that contribute to this
54
55 action, the caffeine. Moreover, this study described the causal mechanism that
56
57
58
59
60

1
2
3 the guaraná modulate, mTOR and MAPKs. This functional food could improve
4
5 the cancer therapies, meanly the resistant tumors, as well as improve collateral
6
7 effects of the traditional chemotherapies.
8
9

10 11 12 **EXPERIMENTAL SECTION** 13 14

15
16 **Chemicals.** All reagents and solvents used were of analytical grade.
17
18 Insulin, (Sigma-Aldrich); H₂O₂ (Panreac); Bleomycin (Calbio Chem); anti-mTOR,
19
20 anti-P-T389-S6K1 (1A5), anti-P-S380-RSK and anti-PT180/Y182-p38, anti-
21
22 Phospho-Hsp27 (Ser15), anti-p-ERK (42/44), anti-p-AKT (Ser473), anti-AKT
23
24 antibodies (Cell Signaling Technology); anti-S6K1, (C-18) and anti-RSK1 (C-
25
26 21), anti-p38 (C-20), anti-HSP27 (M-20), antibodies (Santa Cruz
27
28 Biotechnology); anti-ERK (Upstate Biotechnology); anti-CHC BD (Transduction
29
30 Laboratories).
31
32

33
34 **Plant Material.** The guaraná is part of a project previously authorized by
35
36 Brazil Environmental Ministry to access the components of genetic patrimony in
37
38 national territory (n^o 010547/2013-4) according to Brazilian legislation (n^o 2186-
39
40 16). A hydroalcoholic extract was produced by the guaraná powder (~4 kg). It
41
42 was obtained from Western EMBRAPA, a Brazilian governmental, nonprofit
43
44 enterprise dedicated to agricultural investigations located in Maués City (03° 23'
45
46 01" S, 57° 43' 07" W, Amazonas, Brazil). The guaraná extract production was
47
48 performed conform previously described in the study of Bittencourt and
49
50 collaborates (2011).¹ Based on the small solubility of guaraná powder by the
51
52 standard means of alcohol and water (70:30) to 100 mL of extraction fluid
53
54 prepared at a concentration of 300 mg/mL. After 21 days of extraction, the
55
56
57
58
59
60

1
2
3 preparation was centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes, and the supernatant
4 was isolated. The resulting solution was lyophilized to determine xanthine and
5 catechin compositions. The main bioactive compounds present in the guaraná
6 extract were determined by the chromatographic analysis performed on a HPLC
7 machine.²⁴ From these procedures, it was possible to determine that the extract
8 used in this study has 12.240 mg/g of caffeine, 6.733 mg/g of theobromine, and
9 4.336 mg/g total catechins. The *in vitro* assays were performed using
10 lyophilized extract diluted directly in culture medium. Furthermore, the solution
11 was sterilized by filtration (0.22 μm diameter).
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

22
23 **Cell Culture.** The MCF-7 cell line was cultured in Dulbecco's Modified
24 Eagle Media (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS), supplemented with
25 1% penicillin/streptomycin and glutamine. The cells were cultured at 37°C in a
26 humidified atmosphere of 5% CO₂ and they were expanded by obtaining the
27 optimal amount for the experiments.
28
29
30
31
32

33
34 **Growth Curve and Clonogenic Assay.** For the growth curve were used
35 2000 MCF-7 cell/well in the six well plates. The treatments were performed with
36 different guaraná concentrations (0.1; 1; 10; 100 $\mu\text{g/mL}$) and was used a
37 chemotherapeutic, bleomycin, for the cytotoxic control in the concentration of 10
38 $\mu\text{g/mL}$. The cells were counting by the automatic cell counting Scepter
39 (Millipore). The cells were dyed by Violet Cristal 0.2 % (in ethanol 2%) during 30
40 minutes for 37 °C and it was repeated everyday during 7 days. The dye was
41 dissolved with Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 1% and the absorbance was
42 measured by 550 nm wavelength. For the Clonogenic Assay were used 500
43 MCF-7 cell/well in triplicate in the six well plates. The colonies were incubated
44 until formatted 50 cells for colony (approximately 10-15 days). After that, the
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 colonies were dyed by Violet Cristal and the number of colonies was counted by
4
5 the software ImageJ.²⁵
6

7 **Treatments to analyze mTOR and MAPKs signaling pathways.** Cell
8
9 suspension was placed in 6 well plates. After cell attachment, the cultures were
10
11 treated with different concentrations of guaraná extract (0.1; 1; 10 e 100 µg/mL)
12
13 and proportional caffeine concentrations found in the guaraná extract (0.0012;
14
15 0.012; 0.12; 1.2 µg/mL) for 1 hour, after that the cells were exposed to H₂O₂ (0.4
16
17 mM) for 30 min for activating the MAPK pathway. The mTOR pathway was
18
19 analyzed in the culture by deprived of serum overnight and then incubated with
20
21 200 nM insulin for 30 min after the 1 hour of guaraná and caffeine exposition.
22
23
24

25 **Cell lysate and immunoblotting.** The cells previously treaded were
26
27 harvested and lysed in NP40 lysis buffer pH 7.5 (TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM,
28
29 NP40 0.5, 50 mMNaF, 1 mM sodium vanadate, 1 mMphenylmethylsulfonyl
30
31 fluoride, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pepstatin A, 50 mM β-
32
33 glycerophosphate, 100 µg/ml benzamidine) during 15 minutes at 4 °C and
34
35 centrifuged at 13.000 rpm at 4 °C for 10 min. Posteriorly, the proteins of each
36
37 sample were measured and equality separated by electrophoresis. The proteins
38
39 were analyzed by different molecular weights in the same gel by the Tris-
40
41 Acetate PAGE systems.²⁶ Subsequences to electrophoresis, the proteins were
42
43 transferred to nitrocellulose membranes (Protran nitrocellulose membrane,
44
45 Whatman). Membranes were blocked with 10 % milk and overnight incubated
46
47 with specific primary antibodies. After that, the membranes were incubated with
48
49 the specific secondary antibody and the protein expressions were analyzed
50
51 through of a gel documentation system (LAS-3000 Fujifilm). The levels of
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 proteins expression were equalized with respect to CHC, mTOR or total protein
4
5 levels and expressed as a percentage of positive control.
6

7 **Statistical analysis.** All experiments were performed of at least three
8
9 independent replicates. The data were expressed as mean \pm standard deviation
10
11 (SD). The data were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA)
12
13 followed by the Dunnett Test or Tukey post hoc tests. The statistical tests were
14
15 performed using GraphPad Prism Software.
16
17
18
19

20 **ACKNOWLEDGMENTS**

21
22
23
24
25 We are grateful to the Biogenomic Lab and the Universitat de Barcelona,
26
27 specialty to the research team of Professor José Luis Rosa Lopez for helping us
28
29 with data collection. This study was partially supported by Spanish Ministerio de
30
31 Ciencia e Innovación Grant BFU2011-22498 to J.L.R. Moreover, the study was
32
33 supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas (FAPEAM),
34
35 Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGs) and
36
37 Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq).
38
39
40
41
42

43 **REFERENCES**

- 44
45
46
47 (1) Bittencourt, L. S.; Machado, D. C.; Machado, M. M.; Santos, G. F. F. Dos;
48
49 Algarve, T. D.; Marinowic, D. R.; Ribeiro, E. E.; Soares, F. A. A.;
50
51 Barbisan, F.; Athayde, M. L.; Cruz, I. B. M. *FOOD Chem. Toxicol.* **2013**,
52
53 *53*, 119–125.
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 (2) Santa Maria, a; Lopez, a; Diaz, M. M.; Muñoz-Mingarro, D.; Pozuelo, J.
4
5 M. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1998**, 39 (3), 164–167.
6
7 (3) Mattei, R.; Dias, R. .; Espínola, E. .; Carlini, E. .; Barros, S. B. . J.
8
9 *Ethnopharmacol.* **1998**, 60 (2), 111–116.
10
11 (4) De Almeida, V. L.; Leitão, A.; Barrett Reina, L. D. C.; Montanari, C. A.;
12
13 Donnici, C. L.; Lopes, M. T. P. *Quim. Nova.* **2005**, 28 (1), 118–129.
14
15 (5) Weis, J. *Expert Rev. pharmacoeconomics {&} outcomes Res.* **2011**, 11
16
17 (4), 441–446.
18
19 (6) Byar, K. L.; Berger, A. M.; Bakken, S. L.; Cetak, M. a. *Oncol. Nurs.*
20
21 *Forum.* **2006**, 33 (1), E18–E26.
22
23 (7) Berry, D. a; Cronin, K. a; Plevritis, S. K.; Fryback, D. G.; Clarke, L.; Zelen,
24
25 M.; Mandelblatt, J. S.; Yakovlev, A. Y.; Habbema, J. D. F.; Feuer, E. J. *N.*
26
27 *Engl. J. Med.* **2005**, 353 (17), 1784–1792.
28
29 (8) Campos, a R.; Barros, a I. S.; Albuquerque, F. a a; M Leal, L. K. a; Rao,
30
31 V. S. N. *Phytother. Res.* **2005**, 19 (5), 441–443.
32
33 (9) Hertz, E.; Cadoná, F. C.; Machado, A. K.; Azzolin, V.; Holmrich, S.;
34
35 Assmann, C.; Ledur, P.; Ribeiro, E. E.; Cezimbra, O.; Filho, D. E. S. **2015**,
36
37 37–43.
38
39 (10) Fukumasu, H.; Avanzo, J. L.; Nagamine, M. K.; Barbuto, J. A.; Rao, K. V;
40
41 Veterinária, M.; Imunologia, D. De; Biomédicas, I. D. C. **2008**, 41 (3), 4–9.
42
43 (11) Fukumasu, H.; Latorre, A. O.; Zaidan-dagli, M. L. **2011**, 16 (November
44
45 2009), 11–16.
46
47 (12) Fukumasu, H.; Avanzo, J. L.; Nagamine, M. K.; Barbuto, J. a.; Rao, K. V.;
48
49 Dagli, M. L. Z. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **2008**, 41 (4), 305–310.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 (13) Cadoná, F.C.; Machado, A.K.; Azzolin, V.F.; Barbisan, F.; Dornelles, E.B.;
4
5 Glanzner, W.; Gonçalves, P.B.; Assmann, C.E.; Ribeiro, E.E.; da Cruz IB.
6
7 *Anticancer Agents Med Chem.* **2015**, *in press*.
8
9
10 (14) Beck, J. T. **2015**, 3629–3638.
11
12 (15) Wang, X.; Liu, J. Z.; Hu, J. X.; Wu, H.; Li, Y. L.; Chen, H. L.; Bai, H.; Hai,
13
14 C. X. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51* (2), 539–551.
15
16 (16) Miwa, S.; Sugimoto, N.; Yamamoto, N.; Shirai, T.; Nishida, H.; Hayashi,
17
18 K.; Kimura, H.; Takeuchi, a; Igarashi, K.; Yachie, a; Tsuchiya, H.
19
20 *Anticancer Res.* **2012**, *32*, 3643–3649.
21
22 (17) Luo X.; Yu X.; Liu S.; Deng Q.; Liu X.; Peng S.; Li H; Liu J.; Cao Y. *Oncol*
23
24 *Rep.* **2015**, *34*, 547-54.
25
26 (18) Zhou Y.; Tang J.; Du Y.; Ding J.; Liu J.Y. *Tumour Biol.* **2016**, *in press*
27
28 (19) Aller, G. S. Van; Carson, J. D.; Tang, W.; Peng, H.; Zhao, L.; Copeland,
29
30 R. A.; Tummino, P. J.; Luo, L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**,
31
32 *406* (2), 194–199.
33
34 (20) Liu S.; Wang X.J.; Liu Y.; Cui Y.F. *Am J Chin Med.* 2013; 41(3):629-42.
35
36 (21) Dai Y.; Yu C.; Singh V.; Tang L.; Wang Z.; McInistry R.; Dent P.; Grant S.
37
38 *Cancer Res.* **2001**, *61*(13), 5106-15.
39
40 (22) Ravi, D.; Muniyappa, H.; Das, K. C. *Mol. Cell. Biochem.* **2008**, *308* (1-2),
41
42 193–200.
43
44 (23) Saiki, S.; Sasazawa, Y.; Imamichi, Y.; Kawajiri, S.; Fujimaki, T.; Tanida, I.;
45
46 Kobayashi, H.; Sato, F.; Sato, S.; Ishikawa, K. I.; Imoto, M.; Hattori, N.
47
48 *Autophagy.* **2011**, *7* (2), 176–187.
49
50 (24) Reynertson, K. A.; Balick, M. J.; Lee, R.; Raynor, W.; Pelep, Y.; Kennelly,
51
52 E. J. **2005**, *102*, 269–274.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 (25) Cubillos-rojas, M.; Amair-pinedo, F.; Peiró-jordán, R.; Bartrons, R.;
4
5 Ventura, F.; Rosa, J. L. **2014**, 289 (21), 14782–14795.
6

7 (26) Cubillos-rojas, M.; Amair-pinedo, F.; Tato, I.; Bartrons, R.; Ventura, F.;
8
9 Rosa, J. L. **2012**, 869, 205–213.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

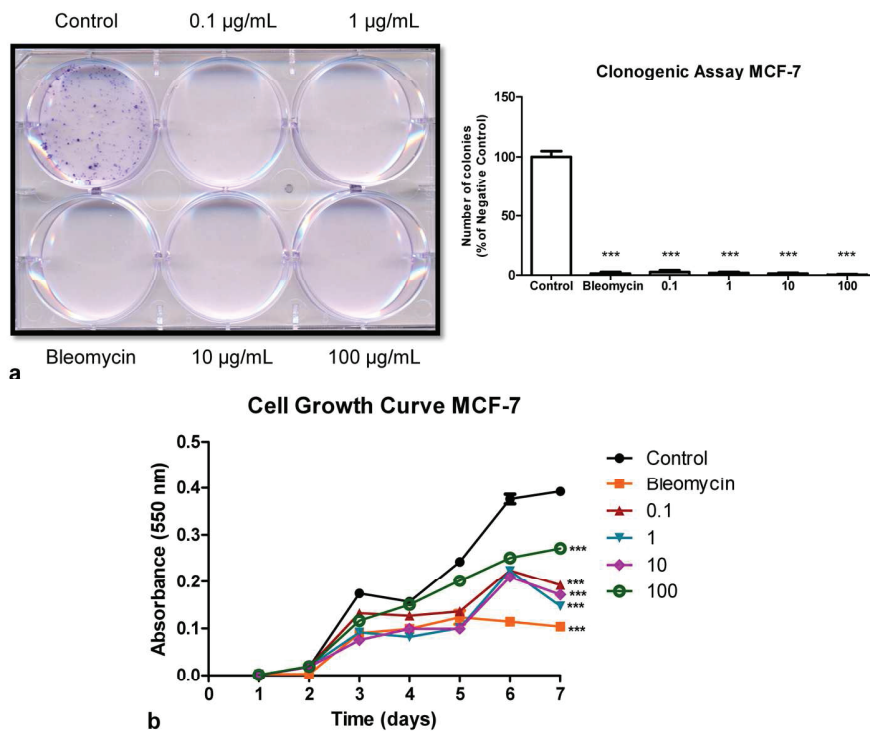


Figure 1. Cell proliferation curve during 7 days of MCF-7 cell exposed to different guaraná concentrations (0.1; 1; 10 e 100 µg/ml) and the positive control, bleomycin (a). Colony formation assay were performed of MCF-7 cell exposed to guaraná concentrations (0.1; 1; 10 e 100 µg/ml) and bleomycin (10 µg/mL) (b). The results were compared with negative control (only cells). N=3, ***(p<0.0001).
172x141mm (300 x 300 DPI)

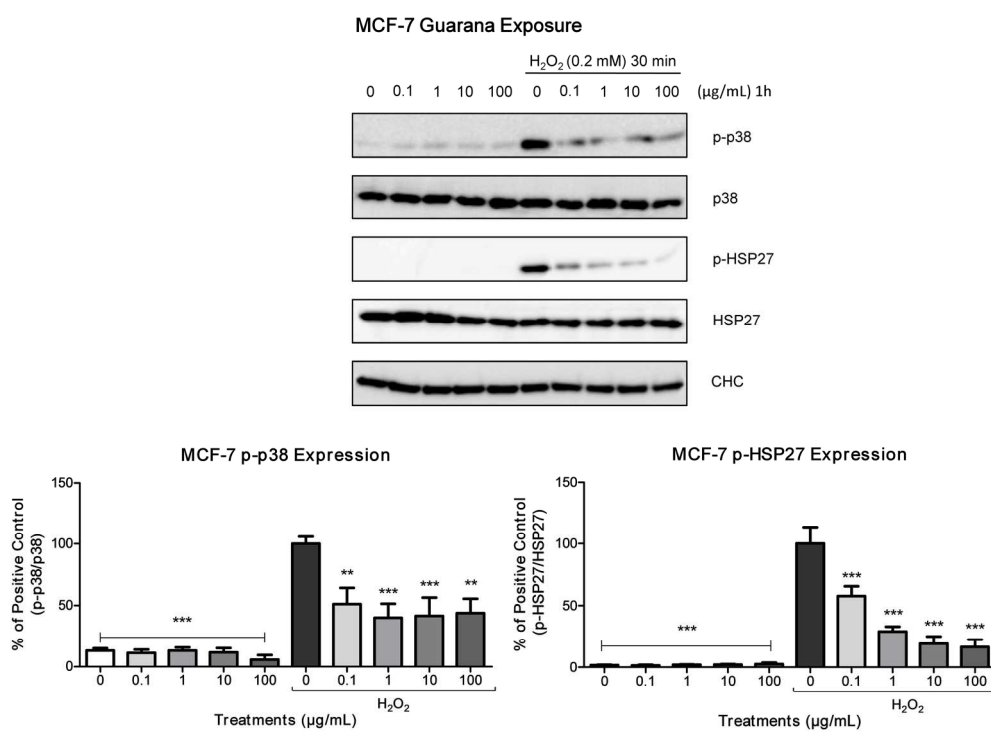


Figure 2. Lysates from MCF-7 exposed to different guaraná concentrations were analyzed by immunoblotting with antibodies against the p-p38, p38, p-HSP27, p-HSP27 and CHC proteins. N=3, ***($p < 0.0001$) and **($p < 0.001$).

188x139mm (300 x 300 DPI)

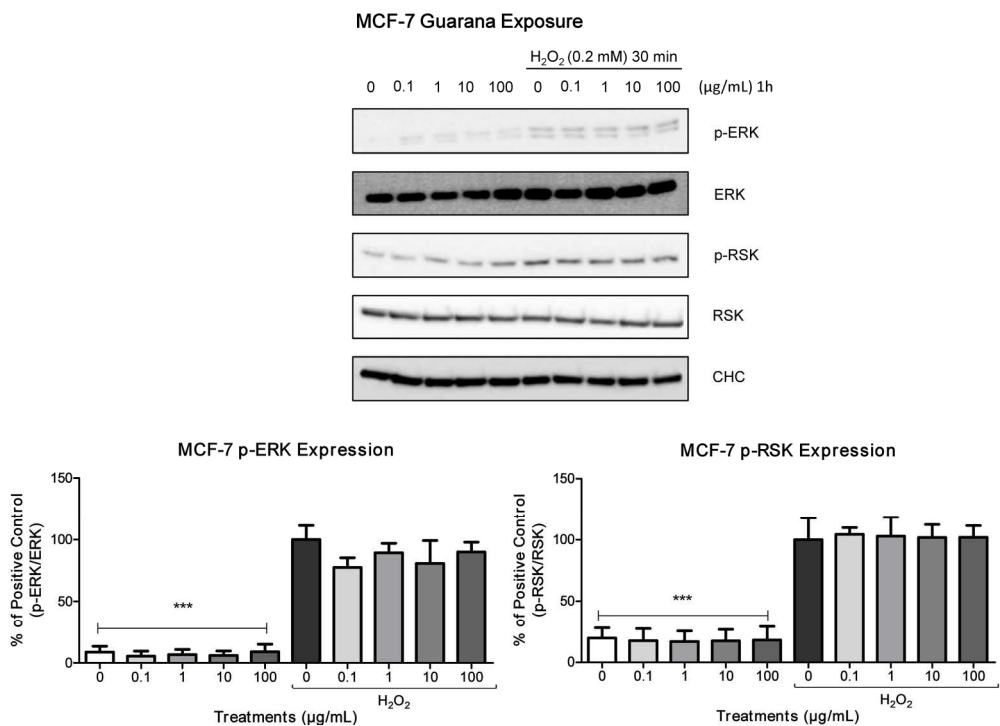


Figure 3. Lysates from MCF-7 exposed to different guaraná concentrations were analyzed by immunoblotting with antibodies against the p-ERK, ERK, p-RSK, RSK and CHC proteins. N=3.
186x135mm (300 x 300 DPI)

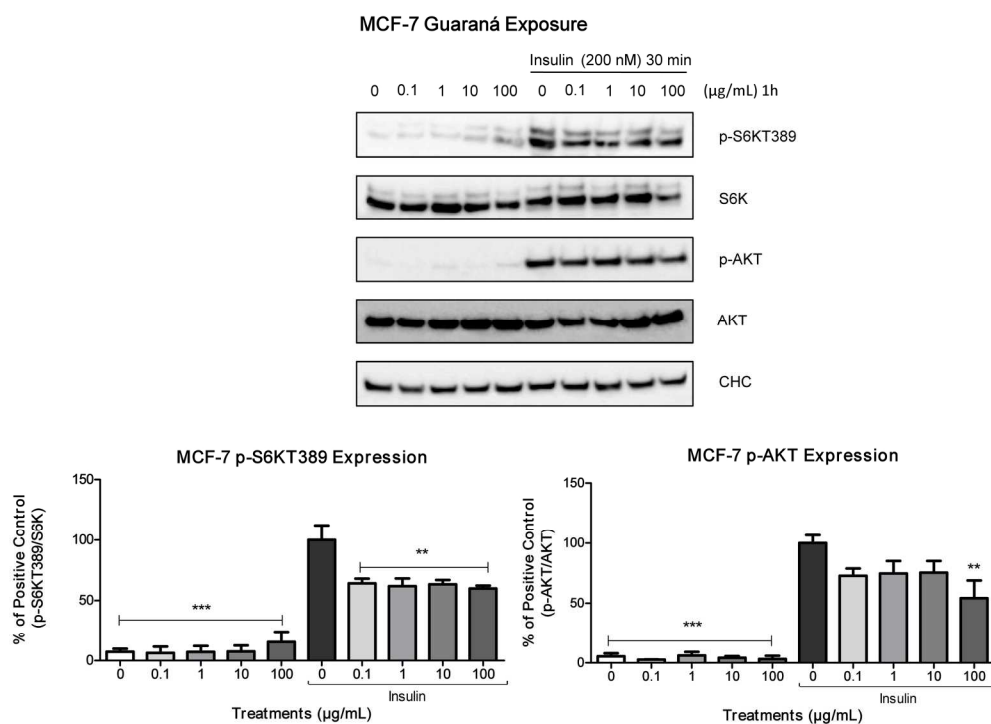


Figure 4. Lysates from MCF-7 exposed to different guaraná concentrations were analyzed by immunoblotting with antibodies against the p-S6KT389, S6K, p-AKT, AKT and CHC proteins. N=3, **($p < 0.001$).
185x135mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

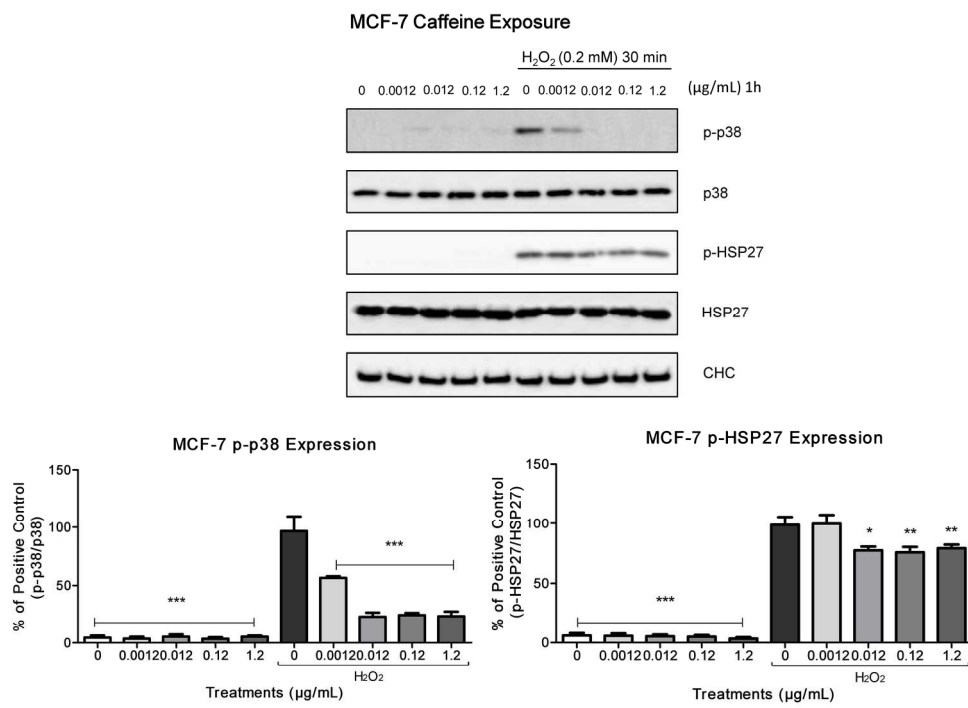


Figure 5. Lysates from MCF-7 exposed to different caffeine concentrations were analyzed by immunoblotting. Antibodies against the p-p38, p38, p-HSP27, pHSP27 and CHC proteins. N=3, ***($p < 0.0001$), **($p < 0.001$) and * ($p < 0.005$).
187x135mm (300 x 300 DPI)

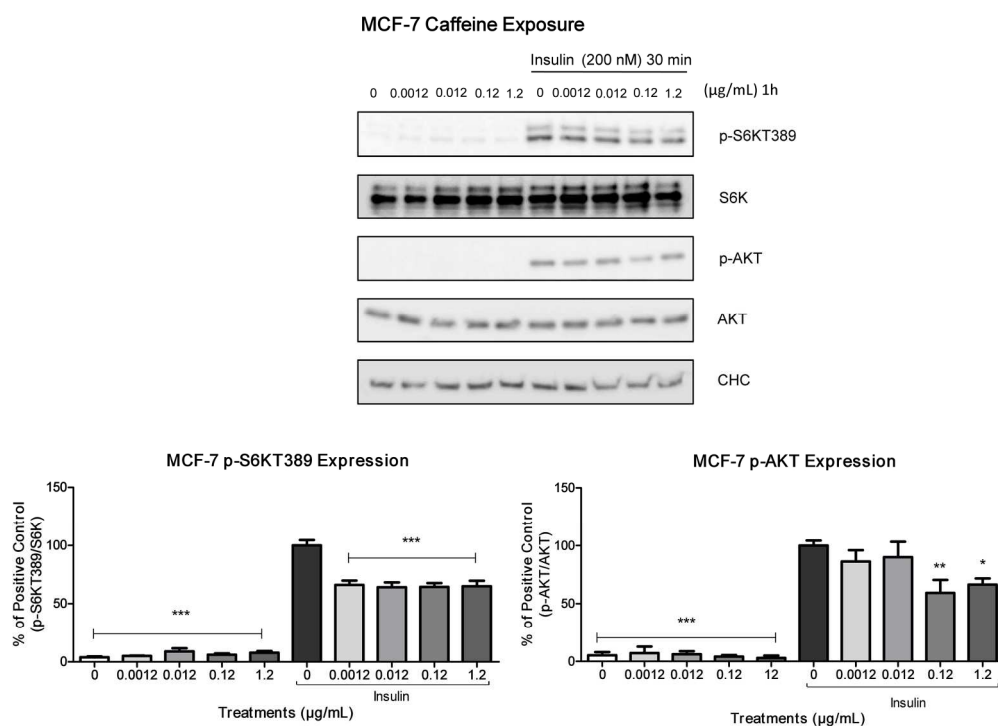


Figure 6. Lysates from MCF-7 exposed to different caffeine concentrations were analyzed by immunoblotting. Antibodies against the p-S6KT389, S6K, p-AKT, AKT and CHC proteins. N=3, ***($p < 0.0001$), **($p < 0.001$) and * ($p < 0.005$).
186x135mm (300 x 300 DPI)

4 DISCUSSÃO

O conjunto dos resultados descritos nesse estudo sugere que o guaraná, assim como, as suas principais moléculas bioativas, cafeína, teobromina e catequina, apresentam efeito antitumoral nas linhagens celulares HT-29 e MCF-7. Além disso, o guaraná e os seus constituintes mais prevalentes, são capazes de potencializar a ação de um dos principais fármacos utilizados no tratamento quimioterápico de câncer colorretal, Oxaliplatina, na linhagem celular HT-29. Por outro lado, como esperado, o guaraná não é capaz de gerar citotoxicidade em células normais, já que os resultados encontrados utilizando células saudáveis, HFF-1 e CMSPs, expostas ao guaraná, indicaram que o extrato não alterou parâmetros de viabilidade, apoptose e ciclo celular, garantindo assim, a segurança do extrato.

O potencial anticarcinogênico do guaraná descrito nesse trabalho vai ao encontro do que foi relatado em investigações prévias, como, por exemplo, no estudo de Fukumasu e colaboradores (2011), que descreveram o efeito antiproliferativo do guaraná em carcinoma de Ascite de Ehrlich em ratos. Adicionalmente, essa atividade do guaraná, condiz com o que foi postulado em estudos anteriores para hepatocarcinogênese em ratos (FUKUMASU et al., 2006) e metástases pulmonares de melanoma (B16/F10) também em ratos (FUKUMASU et al., 2008).

O efeito antitumoral do guaraná contra as HT-29, descrito nessa investigação, foi principalmente associado em maior parte às moléculas de cafeína e de catequina. Confirmando esse resultado, foi sugerido que a cafeína, bem como, as catequinas são capazes de prevenir o desenvolvimento do CCR (SALDANHA; KALA; TOLLEFSBOL, 2014). A relação anticarcinogênica entre a ingestão de bebidas cafeinadas e esse tipo de câncer é uma hipótese que tem sido estudada, porém ainda é pouco esclarecida. Por isso, Puangpraphant e colaboradores (2011) levantaram essa questão e indicaram que o consumo de erva mate, rica em cafeína, poderia ser capaz de estimular a apoptose e assim, diminuir a proliferação de células humanas de CCR.

Já a teobromina apresentou um efeito mais atenuado em comparação com a cafeína e a catequina nesse estudo. Isso pode ser elucidado pelo fato das metaxantinas, como a teobromina, que são encontradas em alimentos comuns da dieta humana, como, por exemplo, o cacau, quando ingeridas, essas moléculas são

endogenamente processadas pelas células do fígado e geram como o produto final a cafeína. Ainda que, foi sugerido anteriormente que o cacau apresenta ação protetora contra doenças cardiovasculares e o câncer (KIM et al., 2014; SUGIMOTO et al., 2014), não há estudos descrevendo a ação antitumoral da teobromina em células de CCR.

Um dos mecanismos antitumorais causais do guaraná aqui estudado foi a modulação da rota da apoptose, já que, geralmente, essa via de sinalização encontra-se inibida no câncer. Por isso, foi analisado se o guaraná e os seus principais constituintes poderiam ser capazes de aumentar os eventos apoptóticos, assim como, modular a expressão de genes associados com essa rota.

Os resultados encontrados sugeriram que o guaraná é capaz de ativar tanto a apoptose precoce quanto a tardia, nas células HT-29. O mesmo foi encontrado para concentrações proporcionais dos principais constituintes do guaraná. A ativação da apoptose pela ação antitumoral do guaraná também foi relatada em metástases pulmonares de melanoma (B16/F10) em modelo experimental de ratos (FUKUMASU et al., 2008) e em células de carcinoma de ascite de Ehrlich também em ratos (FUKUMASU et al., 2011).

Corroborando com essa hipótese estudos prévios mostraram o efeito antitumoral da cafeína na indução da apoptose em linhagem de células humanas de glioblastoma (U251) (SUN et al., 2015). Além disso, outros estudos também descreveram a ação antitumoral da catequina pela sua ação pró-apoptótica em células humanas de leucemia promielocítica aguda (HL-60) (SAIKO et al., 2015).

Nesse estudo também foram realizadas análises da expressão de quatro genes envolvidos na via da apoptose, a fim de confirmar o efeito pró-apoptótico do guaraná e suas moléculas bioativas encontrado na primeira análise pela citometria de fluxo. A determinação dos genes foi estipulada para contemplar tanto a apoptose intrínseca, que envolve a modulação da mitocôndria e do p53, quanto a extrínseca, mediada por receptores.

A via extrínseca da apoptose é estimulada por receptores extracelulares, que quando ativados pelos seus respectivos ligantes, geram a ativação das caspases, as quais são sintetizadas como proteínas inativas. As caspases 8 e 9 são consideradas as iniciadoras do processo apoptótico e ativam as caspases efetoras, como a 3 e a 7, através de clivagem proteolítica e exercem a sua função na via intrínseca (MCILWAIN; BERGER; MAK, 2013). A via intrínseca está envolvida com a

ativação da p53 e a modulação mitocondrial. A proteína p53 é um importante supressor tumoral, por isso é crucial que a sua função esteja precisamente regulada. A célula responde ao estresse celular aumentando os níveis da p53 para que essa proteína induza a síntese de fatores pró-apoptóticos, como a diminuição da expressão do Bcl-2, gene anti-apoptótico, e aumento do Bax, gene pró-apoptótico.

Diante disso, foi analisado o efeito regulatório do guaraná e dos seus compostos, determinando a expressão dos genes da p53, da Bax e da Bcl-2, que estão diretamente envolvidos na via intrínseca da apoptose e da caspase 8, que está mais fortemente ligada com a via extrínseca. A caspase 3 foi investigada já que ela está envolvida nas duas vias.

O aumento da p53 devido à exposição das HT-29 ao guaraná indica que o extrato tem efeitos mais agudos na rota intrínseca apoptótica, via aumento na regulação do gene p53 que é fundamental no controle da apoptose celular. Já a exposição à catequina ativou a expressão de todos os genes, com exceção a razão Bax/Bcl-2, que apresentou uma similar expressão com as células não tratadas, o que indica que esse tratamento inicia a sua ação na rota extrínseca da apoptose.

Ainda, foi analisado se o guaraná e seus principais constituintes influenciariam no ciclo celular a fim de barrá-lo, já que as células cancerígenas têm um ciclo extremamente rápido e descontrolado. O guaraná apresentou maior ação em 24 horas de tratamento e a cafeína demonstrou o mesmo efeito do guaraná, porém em nível menor. Os resultados sugeriram um atraso na fase S e G2/M do ciclo. Essa ação indica que o guaraná poderia estar interferindo em processos de síntese protéica envolvidos em restaurar possíveis danos celulares e genotóxicos gerados pelo extrato, já que Wang e colaboradores (2015) sugeriram que a cafeína é capaz de gerar danos ao material genético de células tumorais, acarretando na paralisação do ciclo celular e apoptose.

Muitas moléculas bioativas encontradas na mesma matriz nutricional de alimentos podem gerar propriedades biológicas similares, no entanto, efeitos semelhantes não necessariamente envolvem os mesmos mecanismos causais. Por isso, análises a fim de identificar o mecanismo causal da ação inibitória do crescimento e proliferação celular do guaraná, assim como, das suas principais moléculas bioativas também foram realizadas.

Uma vez que já foi relatado que muitas moléculas bioativas presentes no guaraná, como a cafeína e a epigallocatequina, poderiam inibir a rota do mTOR, já

que é uma molécula central no controle do crescimento e proliferação celular, do metabolismo e da angiogênese (MIWA et al., 2012), foi testado nesse estudo se o guaraná, assim como o seu maior componente, a cafeína, poderiam ser capazes de inibir essa rota em células tumorais HT-29 e MCF-7.

Nas células HT-29 o guaraná inibiu significativamente a rota do mTOR, atuando particularmente na via do mTORC1, pela diminuição da expressão do seu substrato, p-S6KT389. É sabido que perda da funcionalidade de p53 que a comete a maioria dos cânceres, como o CCR, promove a ativação do mTORC1 (HASTY et al., 2013). Então, já que o guaraná foi capaz de superexpressar o gene da p53, poderia inibir a o mTORC1 por essa via, pois o p53 é considerado um antagonista desse complexo do mTOR.

Porém, a cafeína testada em concentrações proporcionais ao do extrato não apresentou o mesmo efeito que o guaraná, sugerindo que nessas concentrações o efeito inibitório da via seja gerado por um sinergismo dos demais compostos. Essa resposta poderia ser explicada pelo fato de que, muitas vezes, pode haver um sinergismo de outras moléculas presentes no extrato que atuem diminuindo a atividade do composto isolado, por isso, frequentemente, os resultados encontrados utilizando o extrato com um todo podem diferir quando for analisado o composto isolado (MERIGUI et al., 2007). D'Angelo e colaboradores (2014) também relataram uma resposta antitumoral gerada pela interação entre diferentes moléculas bioativas, foi descrito que a epigallocatequina-3-galato associada com outras biomoléculas exerce um efeito antitumoral nas células de CCR pela inibição do mTOR.

Além da via do mTOR, outra rota de interesse terapêutico por estar superexpressada em diversos cânceres é a das MAPKs, que regula a expressão de muitos genes associados com a sobrevivência, proliferação e morte celular. Pelo fato dessa via ser controlada pelas EROs e ainda, do guaraná ser considerado um excelente antioxidante (BITTENCOURT et al., 2013), foi analisado nessa investigação se o guaraná poderia atuar diminuindo a proliferação celular por meio dessa rota.

Apesar de Wang e colaboradores (2013) haverem mostrado que moléculas presentes no guaraná, como as catequinas, apresentam efeito antiproliferativo em células de carcinoma de ovário humano, pela modulação das MAPKs, principalmente a p38, os resultados encontrados nesse estudo indicam que o

guaraná não apresenta ação modulatória nessa via, nas células HT-29, em nenhuma concentração testada.

Também, foi analisado nesse estudo se o guaraná poderia interferir na formação de colônias tumorais. Os resultados sugeriram que o guaraná é capaz de inibir o crescimento das colônias das células HT-29 na maior concentração testada. Sun e colaboradores (2015) também sugeriram que a cafeína é capaz de inibir a formação de colônias tumorais em células humanas de glioblastoma (Sun et al., 2015). Pelo fato de o guaraná ser um alimento rico em cafeína, esse efeito talvez pudesse ser atribuído a essa molécula bioativa.

Outra linhagem celular bastante estudada pelo fato de ser bastante agressiva e resistente a alguns quimioterápicos tradicionais é a MCF-7. Um estudo prévio postulou que o guaraná apresenta efeito antiproliferativo nessas células (HERTZ et al., 2014), porém os mecanismos de ação antitumoral do guaraná contra essa linhagem celular ainda estavam poucos esclarecidos. Para isso, nesse estudo foi analisado se o guaraná poderia inibir a formação de colônias tumorais e a proliferação das células, assim como, a via de sinalização do mTOR e das MAPKs, duas rotas alvos de terapias antitumorais.

Os resultados indicaram que o guaraná é capaz de inibir a formação de colônias das células MCF-7 em todas as concentrações testadas. Ainda, o guaraná mostrou uma importante ação modulatória na rota das MAPKs, inibindo o p-p38 e o seu substrato, p-HSP27. A cafeína também apresentou uma importante participação na regulação dessa via, já que inibiu o p-p38 e o p-HSP27, muito similar ao guaraná.

Esses resultados vão ao encontro do que foi relatado por Miwa e colaboradores (2012), sugerindo que a cafeína é capaz de induzir apoptose em células de osteosarcoma pela inibição das MAPKs. Além disso, estudos prévios já relataram o efeito inibitório da p-p38 pela epigallocatequina, molécula presente no guaraná, em células humanas de carcinoma de ovário (WANG et al., 2014).

No entanto, o guaraná não foi capaz de inibir a expressão das MAPKs p-ERK. Esse fato pode ser esclarecido já que Kyaw e colaboradores (2001) sugeriram que a proteína p-p38 é mais sensível a antioxidantes do que a p-ERK. Dessa forma, como o guaraná é destacado pela sua ação antioxidante, poderia ser explicado porque o extrato inibiu somente a proteína p-p38 nas concentrações utilizadas.

Ainda, os resultados encontrados nesse estudo indicaram que o guaraná é capaz de inibir a rota do mTOR, tanto regulando o mTORC1, p-S6KT389, quanto o

mTORC2, p-AKT, na linhagem de células MCF-7. Adicionalmente, a cafeína também mostrou ação inibitória nessas rotas, atuando de forma semelhante ao guaraná, o que indicou uma possível contribuição dessa molécula no mecanismo regulador do guaraná nessa via.

Glenn e colaboradores (2011) descreveram a ação antitumoral da epigallocatequina, através da redução da proliferação celular e inibição da fosforilação do p-AKT em células de câncer de pulmão (A549) e câncer de mama (MDA-MB-231). Adicionalmente, a teobromina, outra molécula encontrada no guaraná, foi descrita como um importante inibidor do crescimento de células de glioblastoma pela regulação negativa da p-AKT (SUGIMOTO et al., 2014).

Adicionalmente, Dong e colaboradores (2015) descreveram o efeito modulatório da cafeína no bloqueio da progressão de células de hepatocarcinoma, através da inibição da via do mTOR, por meio da diminuição da expressão da p-AKT. Além disso, Zhou e colaboradores (2010) também demonstraram a ação inibitória da cafeína na rota do mTOR, como alto potencial terapêutico para diversos tipos de cânceres.

Outro aspecto importante da utilização do guaraná é como um agente antifadigante, destacado pelo seu grande poder energético, principalmente para minimizar os efeitos colaterais da quimioterapia, como foi demonstrado por Campos e colaboradores (2011), em um estudo realizado em pacientes com câncer de mama submetidos a tratamento quimioterápico (CAMPOS et al., 2011). Porém, há poucos estudos sobre esse consumo dietético e a resposta no tratamento quimioterápico. O guaraná poderia interferir na quimioterapia, potencializando ou diminuindo ação dos fármacos? Para responder a essa hipótese, Hertz e colaboradores (2014) investigaram se o guaraná poderia intervir na ação dos principais fármacos utilizados no tratamento desse tipo de câncer. Os resultados encontrados nessa pesquisa indicaram que o guaraná diminuiu as taxas de crescimento e proliferação celular e ainda potencializou a eficácia de alguns fármacos (HERTZ et al., 2014).

Já que Hertz e colaboradores (2014) sugeriram que o guaraná seria capaz de potencializar a ação de alguns fármacos utilizados no câncer de mama, foi investigado no presente estudo se o guaraná poderia apresentar efeito semelhante em outro tipo de linhagem celular, a qual é bastante resistente aos tradicionais fármacos utilizados para o tratamento quimioterápico, as células HT-29.

Para responder a essa questão, as células HT-29 foram expostas ao guaraná, assim como, aos seus principais constituintes em concentrações proporcionais ao encontrado no extrato, concomitantemente, a um dos principais fármacos utilizado no tratamento desse tipo de câncer, a Oxaliplatina.

Inicialmente, as HT-29 foram expostas a Oxaliplatina para que fosse estipulada a concentração necessária para reduzir a viabilidade em torno de 50 % das células, ou seja, a dose letal mediana (DL_{50}), para ser utilizada em associação ao guaraná. A DL_{50} foi determinada em 20 $\mu\text{mol/L}$, esse resultado corroborou com a pesquisa realizada anteriormente por Oliveira e colaboradores (2014), que relataram o efeito do extrato da *Uncaria tomentosa* para desencadear a apoptose em associação com a Oxaliplatina em células HT-29 (OLIVEIRA et al., 2014). Entretanto, muitos experimentos realizados nesse estudo, não indicaram precisamente 50% de citotoxicidade gerados pela exposição das células HT-29 à Oxaliplatina. Esse fato pode ser esclarecido por dois pontos específicos, primeiro, sabe-se que há 95% de intervalo de confiança da DL_{50} calculada pela regressão de *Probit* e segundo, há evidências de resistência tumoral das HT-29 tratadas com Oxaliplatina já previamente relatadas (LIN et al., 2012).

Apesar dessa variação, os resultados encontrados nesse estudo indicaram que o guaraná interagiu com a Oxaliplatina significativamente diminuindo a proliferação celular, aumentando a indução da parada do ciclo e a apoptose. Esse efeito pode ser particularmente associado com a presença de cafeína e de catequina, já que as células expostas à Oxaliplatina em associação com a cafeína ou a combinação Oxaliplatina e catequina indica um resultado similar, apesar de ter havido uma variação na intensidade de resposta.

Outra hipótese importante investigada nesse estudo, busca responder se o guaraná poderia afetar a sensibilidade da Oxaliplatina. Os resultados sugeriram que essa associação não é capaz de diminuir a atividade antitumoral do fármaco nas células HT-29. Ao contrário disso, esse sinergismo é responsável por gerar um aumento do efeito antiproliferativo desse quimioterápico em todas as concentrações testadas de guaraná, principalmente pelo fato da cafeína e da catequina terem tido um significativo papel para a produção desse efeito. Esses resultados corroboram com o estudo realizado por Hertz e colaboradores (2014).

Essa propriedade do guaraná em aumentar a ação dos fármacos poderia ser atribuída aos seus constituintes bioativos, já que há muitas investigações que

descreveram que alguns compostos presentes no guaraná são capazes de potencializar a atividade antitumoral de alguns quimioterápicos. Como, por exemplo, Mayr e colaboradores (2015) relataram o sinergismo da catequina com o quimioterápico cisplatina. Essa associação gerou um bloqueio do ciclo das células tumorais, diminuindo a viabilidade celular e assim, melhorando a resposta do tratamento do câncer de trato biliar.

Além disso, outra investigação realizada por Bimonte e colaboradores (2015), indicou que a catequina em associação com o quimioterápico bleomicina gerou um eficiente sinergismo para a inibição do crescimento celular na linhagem de células de câncer pancreático (MiaPaCa-2). A combinação da catequina com a bleomicina foi capaz de diminuir a proliferação celular por meio do bloqueio do ciclo na fase S e despolarização da membrana plasmática e ainda, houve uma aumento da apoptose e dano no DNA (BIMONTE et al., 2015).

Adicionalmente, os resultados encontrados nesse estudo sugerem que a cafeína além de apresentar atividade antitumoral exerceu uma significativa melhora na atividade quimioterápica. Confirmando esses dados, Nataka e colaboradores (2015), relataram o poder da cafeína em potencializar o tratamento quimioterápico contra osteosarcoma.

Ainda, está descrito na literatura o efeito da cafeína em associação com a cisplatina. Esse sinergismo foi capaz de aumentar a promoção da apoptose em células de câncer de pulmão e assim, reduzir a resistência das células tumorais ao quimioterápico. A presença da cafeína aumentou a expressão da caspase 3 pela cisplatina nas linhagens de câncer de pulmão HTB182 e CRL5985. Também, esse sinergismo gerou redução nos níveis de proliferação celular e alterações no ciclo da célula (WANG et al., 2015).

O efeito sinérgico potencializador da cafeína com alguns quimioterápicos poderia ser explicado pelo fato dessa molécula bioativa ser capaz de inibir a atividade de duas proteínas quinases, ATM e ATR, que são essenciais para a proteção do genoma e a checagem da sua integridade durante o ciclo celular. Assim, a cafeína conseguiria potencializar a ação genotóxica do quimioterápico, aumentando a sua atividade antitumoral (TSABAR et al., 2015).

De acordo com os resultados encontrados nessa pesquisa e no que está descrito na literatura, moléculas bioativas antioxidantes, como a cafeína, catequina e teobromina, podem não apenas prevenir o desenvolvimento de processos tumorais

como também apresentar efeitos antiproliferativos em diferentes tipos de cânceres. Ainda, esses compostos poderiam promover uma melhor atividade dos fármacos utilizados no tratamento quimioterápico, reduzindo assim a resistência tumoral.

Essa ação pode ser obtida por esses constituintes de forma isolada, ou apenas em resposta ao sinergismo gerado pela associação com outras moléculas bioativas. Muitos resultados encontrados nesse estudo corroboraram com o relatado em pesquisas prévias, sugerindo que o guaraná apresenta uma eficiente ação antitumoral e, além disso, seria capaz de diminuir a resistência quimioterápica, por meio do aumento da sensibilidade das células tumorais.

Por isso, o guaraná poderia ser um potente agente terapêutico com o intuito de inibir a proliferação celular, bem como, melhorar o tratamento quimioterápico, tanto potencializando a ação dos fármacos quanto melhorando a fadiga e outros efeitos colaterais gerados pela quimioterapia e assim, promover uma melhor qualidade de vida e recuperação dos pacientes.

5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo foi analisado o efeito *in vitro* do extrato hidroalcoólico de guaraná referente à sua ação antitumoral em células de CCR e de câncer de mama e ainda, na atividade quimioterápica em células de CCR.

Assim, com base nos resultados descritos nessa investigação, podem ser feitas as seguintes conclusões sobre a atividade do guaraná e dos seus principais constituintes:

1) Na atividade antitumoral e quimioterápica em células HT-29:

- O guaraná apresentou atividade anticarcinogênica em diferentes concentrações, sendo 100 µg/mL a mais efetiva para a redução dos níveis tanto de viabilidade quanto de proliferação celular;
- A cafeína, teobromina e catequina, também apresentaram uma potencial atividade antitumoral, reduzindo os níveis de viabilidade celular, principalmente no período de proliferação (72 horas);
- O estímulo da apoptose, bem como, o aumento da expressão de genes associados com essa via foram modulados pelo guaraná e os seus principais constituintes;
- O guaraná, assim como, as suas moléculas bioativas potencializaram a ação da Oxaliplatina, reduzindo a proliferação celular, aumentando a indução da parada do ciclo e apoptose celular.
- O efeito antitumoral do guaraná foi particularmente associado com a cafeína e a catequina, assim como, a associação com a Oxaliplatina;
- Os resultados sugeriram que o uso terapêutico antifadigante do guaraná poderia ser mantido, já que além de apresentar ação antitumoral é capaz de potencializar a atividade quimioterápica.

2) No efeito antiproliferativo e na modulação da via mTOR e MAPKs em células HT-29 e MCF-7:

- O efeito antiproliferativo do guaraná divergiu de acordo com o tipo de linhagem celular;

- Nas células MCF-7 o guaraná diminuiu o crescimento celular em todas as concentrações testadas. Entretanto, essa ação antiproliferativa foi observada somente nas maiores concentrações na linhagem celular HT-29;
- O guaraná evitou a formação de colônias de células MCF-7 em todas as concentrações testadas, no entanto, apenas impediu as células HT-29 de gerarem colônias na concentração mais alta;
- O guaraná foi capaz de modular tanto a rota do mTOR quanto a das MAPKs nas células MCF-7, diminuindo a expressão de proteínas envolvidas nessas vias.
- Nas células HT-29 o guaraná apenas apresentou ação regulatória na rota do mTOR, não agindo sobre a via das MAPKs;
- A cafeína em concentrações proporcionais as encontradas no extrato apresentou efeitos similares ao guaraná nas células MCF-7, indicando que a ação modulatória do guaraná possa ser atribuída à presença dessa molécula na sua constituição;
- Na linhagem celular HT-29, a cafeína não apresentou atividade em nenhuma via testada, sugerindo que o efeito do guaraná possa ser devido ao sinergismo dos seus demais compostos ativos.
- O guaraná não gerou danos citotóxicos a células saudáveis, somente agiu em linhagens tumorais, garantindo a segurança do extrato.
- Esses dados sugerem que o guaraná poderia ser um grande agente terapêutico, para a utilização como um adjuvante no tratamento contra a proliferação tumoral, principalmente, em células resistentes aos quimioterápicos tradicionais, pelo fato de modular rotas desreguladas e assim barrar o crescimento descontrolado do câncer.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ANGELO P. C. et al. Brazilian Amazon Consortium for Genomic Research (REALGENE). Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rainforest: the seeded-fruit transcriptome. **Plant Cell Rep.**, v. 27, n. 1, p. 117-24, 2008.

ANTUNES E. et al. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by the herbal medicine Catuama and its constituents. **Phytother. Res.**, v. 15, n. 5, p. 416-21, 2001.

BARLOW, W. E. et al. Prospective breast cancer risk prediction model for women undergoing screening mammography. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 17, n. 98, p.1204-14, 2006.

BASILE A. et al. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **J. of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 32-6, 2005.

BECK, J. T. Potential role for mammalian target of rapamycin inhibitors as first-line therapy in hormone receptor-positive advanced breast cancer. **Onco. Targets Ther.**, v. 8, p. 3629-38, 2015.

BÉRUBÉ-PARENT S. et al. Effects of encapsulated green tea and Guarana extracts containing a mixture of epigallocatechin-3-gallate and caffeine on 24 h energy expenditure and fat oxidation in men. **Br. J. Nutr.**, v. 94, n. 3, p. 432-6, 2005.

BIMONTE, S. et al. Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate and bleomycin on human pancreatic cancer MiaPaca-2 cell growth. **Infect. Agent. Cancer.**, v. 10, n. 22, 2015.

BITTENCOURT L. S. et al. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Food Chem. Toxicol.**, v. 53, p.119-25, 2013.

BOYER, J., Pharmacogenomic identification of novel determinants of response to chemotherapy in colon cancer. **Cancer Res.**, v. 66, p. 2765–77, 2006.

BUDIHARDJO, I. et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 15, p. 269-90, 1999.

CAMPOS A. R. et al. Acute effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) on mouse behaviour in forced swimming and open field tests. **Phytother. Res.**, v. 19, n. 5, p. 441-3, 2005.

CAMPOS, M. P. et al. Cancer-related fatigue: a review. **Ver. Assoc. Med. Bras.**, v. 57, n. 2, p. 211-9, 2011.

CARGNELLO M.; ROUX P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 75, n. 1, p. 50-83, 2011.

CHANEY, S. G. et al., Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 53, p. 3–11, 2005.

CHEN, L. et al. Autophagy inhibition contributes to the synergistic interaction between EGCG and doxorubicin to kill the hepatoma Hep3B cells. **PLoS One.**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2014.

COOPER, G. M. **The Cell: A Molecular Approach**. 2. ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.

D'ANGELO, L. et al. A combination of eicosapentaenoic acid-free fatty acid, epigallocatechin-3-gallate and proanthocyanidins has a strong effect on mTOR signaling in colorectal cancer cells. **Carcinogenesis.**, v. 35, n. 10, p. 2314–20, 2014.

DA FONSECA C. A. et al. Genotoxic and mutagenic effects of guarana (*Paullinia cupana*) in prokaryotic organisms. **Mutat. Res.**, v. 321, n. 3, p. 165-73, 1994.

DE OLIVEIRA, L. Z. et al. Effect of *Uncaria tomentosa* Extract on Apoptosis Triggered by Oxaliplatin Exposure on HT29 Cells. **Evid. Based. Complement. Alternat. Med.**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

DEL GIGLIO, A. B. et al. Purified dry extract of *Paullinia cupana* (guaraná) (PC-18) for chemotherapy-related fatigue in patients with solid tumors: an early discontinuation study. **J. Diet. Suppl.**, v. 10, n. 10, p. 325-34, 2013.

DESAGHER, S; MARTINOU, J. C. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol.**, v. 10, n. 9, p. 369-76, 2000.

DHILLON, A. S. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene.**, v. 26, p. 3279–3290, 2007.

DIMRI, G. P. What has senescence got to do with cancer. **Cancer Cell.**, v. 7, n. 6, p. 505–512, 2005.

DONG, S. et al. Low Concentration of Caffeine Inhibits the Progression of the Hepatocellular Carcinoma via Akt Signaling Pathway. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 15, n. 4, p. 484-92, 2015.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicol. Pathol.**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

ERBAS, B. et al. The natural history of ductal carcinoma in situ of the breast: a review. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 97, n. 2, p.135-44, 2006.

FARIA, M. H. G.; RABENHORST, S. H. B. Impacto do oncogene C-MYC no câncer. **Rev. Bras. de Cancerol.**, v. 52, n. 2, p.165-171, 2006.

FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. A. Genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v.61, n. 5, p. 759-767, 1990.

FENG Z. et al. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 102, n. 23, p. 8204-9, 2005.

FUKUMASU H. et al. Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, the guaraná, on mouse hepato carcinogenesis. **Cancer Lett.**, v. 233, n. 1, p. 158-64, 2006.

FUKUMASU H. et al. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 41, n. 4, p. 305-10, 2008.

FUKUMASU H. et al. Protective effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, n. 6, p. 862-7, 2006.

FUKUMASU H.; LATORRE A. O.; Z Aidan-DAGLI M. L. *Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*, guaraná, increases survival of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) bearing mice by decreasing cyclin-D1 expression and inducing a G0/G1 cell cycle arrest in EAC cells. **Phytother. Res.**, v. 25, n 1, p. 11-6, 2010.

GARATTINI, S. Pharmacokinetics in cancer chemotherapy. **Eur. J. Cancer.**, v. 43, p. 271–282, 2007.

GERIYOL, P.; BASAVANNEPPA, H. B.; DHANANJAYA, B. L. Protecting effect of caffeine against vinblastine (an anticancer drug) induced genotoxicity in mice. **Drug Chem. Toxicol.**, v. 38, n. 2, p. 188-95, 2015.

GOURDIER, I. et al., Drug specific resistance to oxaliplatin is associated with apoptosis defect in a cellular model of colon carcinoma. **FEBS Lett.**, v. 529, p. 232–6, 2002.

GUERTIN, D. A.; SABATINI, D. M. Defining the role of mTOR in cancer. **Cancer Cell.**, v. 12, n. 1, p. 9-22, 2007.

GUIMARAES, R. M. et al. Increase income and mortality of colorectal cancer in Brazil, 2001-2009. **Arq. Gastroenterol.** v. 50, n.1, p. 64-69, 2013.

HABR-GAMA, A. Câncer colorretal: a importância de sua prevenção. **Arq. Gastroenterol.** v. 42, n. 1, p. 2-3, 2005.

HALLER C. A., JACOB P., BENOWITZ N. L., Short-term metabolic and hemodynamic effects of ephedra and guarana combinations. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 77, n. 6, p. 560-71, 2005.

HANAHAN D; WEINBERG R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HASKELL C. F. et al. A double-blind, placebo-controlled, multi-dose evaluation of the acute behavioural effects of guaraná in humans. **J. Psychopharmacol.**, v. 21, n. 1, p.65-70, 2007.

HASTY P., SHARP Z. D., CURIEL T. J., CAMPISI J. mTORC1 and p53: clash of the gods? **Cell Cycle**. v. 12, n. 1, p. 20-5, 2013.

HENGARTNER, MO. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-76, 2000.

HOLOHAN, C. et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 13, n. 10, p. 714-26, 2013.

ILAGAN, E.; BRENDAN, D. Emerging Role of mTOR in the Response to Cancer Therapeutics. **Trends in Cancer**, v. 2, n. 5, p. 241–251, 2016.

INCA – Ministério da Saúde – Instituto Nacional do Câncer – **Números**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dmdc/2015/numeros.asp>>. Acesso em: 22 de dezembro de 2015.

INCA – Ministério da Saúde – Instituto Nacional do Câncer – **Números**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal>>. Acesso em: 03 de março de 2016.

INCA – Ministério da Saúde – Instituto Nacional do Câncer – **Números**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em: 03 de março de 2016.

INCA – Ministério da Saúde – Instituto Nacional do Câncer – **Prevenção**. Disponível em:<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal/prevencao>>. Acesso em: 03 de março de 2016.

INCA – Ministério da Saúde – Instituto Nacional do Câncer – **Diagnóstico**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal/diagnostico>>. Acesso em: 03 de março de 2016.

INCA – Ministério da Saúde – Instituto Nacional do Câncer – **Sintomas**. Disponível em:<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal/sintomas>>. Acesso em: 03 de março de 2016.

INCA – Ministério da Saúde – Instituto Nacional do Câncer – **Sintomas**. Disponível em:<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/sintomas>>. Acesso em: 03 de março de 2016.

INCA – Ministério da Saúde – Instituto Nacional do Câncer – **Deteção precoce**. Disponível em:<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/detecao_precoce>. Acesso em: 03 de março de 2016.

INCA – Ministério da Saúde – Instituto Nacional do Câncer – **Prevenção**. Disponível em:<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama+/prevencao>>. Acesso em: 03 de março de 2016.

INCA. **ABC do Câncer**, Abordagens Básicas para o Controle do Câncer. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

JEGGO, P. A.; PEARL, L. H.; CARR, A. M. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. **Nat. Rev. Cancer.**, n. 16, v. 1, p. 35-42, 2016.

JIANG, L. et al. Overexpression of miR-126 sensitizes osteosarcoma cells to apoptosis induced by epigallocatechin-3-gallate. **World J. Surg. Oncol.**, v. 12, n. 383, 2014.

JIMOH F. O., SOFIDIYA M. O., AFOLAYAN A. J. Antioxidant properties of the methanol extracts from the leaves of *Paullinia pinnata*. **J. Med. Food**, v. 10, n. 4, p. 707-11, 2007.

JIPPO T. et al. Inhibitory effects of guarana seed extract on passive cutaneous anaphylaxis and mast cell degranulation. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 73, n. 9, p. 2110-2, 2009.

KENNEDY D. O. et al. Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with Panax ginseng. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 79, n. 3, p. 401-11, 2004.

KIM, J. et al. Cocoa phytochemicals: recent advances in molecular mechanisms on health. **Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.**, v. 54, n. 11, p. 1458-72. 2014.

KYAW M., YOSHIZUMI M., TSUCHIYA K., KIRIMA K., TAMAKI T. Antioxidants inhibit JNK and p38 MAPK activation but not ERK 1/2 activation by angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells. **Hypertens Res.** v. 24, n. 3, p. 251-61, 2001.

KREWER C. C. et al. Habitual Intake of Guaraná and Metabolic Morbidities: An Epidemiological Study of an Elderly Amazonian Population. **Phytother. Res.**, v. 25, n. 9, p. 1367-74, 2011.

KRISHNA, M.; NARANG, H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 65, n. 22, p. 3525-44, 2008.

LAPLANTE M.; SABATINI D. M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell.** v. 149, n. 2, p. 274-93, 2012.

LEELAWAT, K. Inhibition of PI3K increases oxaliplatin sensitivity in cholangiocarcinoma cells. **Cancer Cell Int.**, v. 9, n. 3, 2009.

LEITE R. P. et al. Protective Effect of Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) Pre-treatment on Cadmium-Induced Damages in Adult Wistar Testis. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 141, n. 1-3, p. 262-74, 2010.

LIMA W. P. et al. Lipid metabolism in trained rats: effect of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation. **Clin. Nutr.**, v. 24, n.6, p. 1019-28, 2005.

LIN, Y.L. et al. KRAS mutation is a predictor of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cells. **PLoS One.**, v. 7, n. 11, p. 1-11, 2012.

MA, X. M.; BLENIS, J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 10, n. 5, p. 307-18, 2009.

MA, Y. C. Epigallocatechin gallate inhibits the growth of human lung cancer by directly targeting the EGFR signaling pathway. **Oncol. Rep.**, v. 31, n.3, p. 1343-9, 2014.

MANSILLA, S.; BATALLER, M.; PORTUGAL, J. Mitotic catastrophe as a consequence of chemotherapy. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v.6, n. 6, p. 589–602, 2006.

MATTEI R. et al. Guarana (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidants activity *in vitro*. **J. of Ethnopharmacology**, v. 60, n. 2, p. 111-6, 1998.

MAYR, C. et al. The green tea catechin epigallocatechin gallate induces cell cycle arrest and shows potential synergism with cisplatin in biliary tract cancer cells. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 15, n. 194, 2015.

MCILWAIN, D.R.; BERGER, T.; MAK, T.W. Caspase functions in cell death and disease. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 5, n. 4, p. 86-56, 2013.

MERIGHI, S. et al. Caffeine inhibits adenosine-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, and interleukin-8 expression in hypoxic human colon cancer cells. **Mol. Pharmacol.** v. 72, n. 2, p. 395-406, 2007.

Ministério da Saúde; Mensagem aos médicos. Câncer Fundamentos, Secretária de Assistência Médica-Divisão Nacional de Câncer; Brasília, 1971, p. 7-47

MIWA, S. Caffeine induces apoptosis of osteosarcoma cells by inhibiting AKT/mTOR/S6K, NF- κ B and MAPK pathways. **Anticancer Res.**, v. 32, n. 9, p. 3643-9, 2012.

MOSELEY, V. R. et al. Green tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate, contributes to the degradation of DNMT3A and HDAC3 in HCT 116 human colon cancer cells. **Anticancer Res.**, v. 33, n. 12, p. 5325-33, 2013.

MOSES, M. A. et al. The heat shock protein 90 inhibitor, (-)-epigallocatechin gallate, has anticancer activity in a novel human prostate cancer progression model. **Cancer Prev. Res. (Phila)**., v. 8, n. 3, 249-57, 2015.

MURPHY, M., LEVINE, A. J. Tumor suppressor genes. In Mendelsohn J, et al(eds) The molecular Basis of cancer, 2^aed. Philadelphia: WS Saunders, 2001.p 95- 114.

NAKAMURA, T. et al. Coffee prevents proximal colorectal adenomas in Japanese men: a prospective cohort study. **Eur. J. Cancer Prev.** 2015, *in press*.

NAKATA, H. Development of tumor-specific caffeine-potentiated chemotherapy using a novel drug delivery system with Span 80 nano-vesicles. **Oncol. Rep.**, v. 33, n. 4, p. 1593-8, 2015.

OLIVEIRA, S. S. et al. Paullinia cupana for control of hot flashes in breast cancer patients: a pilot study. **Einstein (Sao Paulo)**., v. 11, n. 4, p. 435-8 2013.

OTOBONE F. J. et al. Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. **Phytother. Res.**, v. 21, n. 6, p. 531-5, 2007.

PALMA, C. G. et al. Guarana (*Paullinia cupana*) Improves Anorexia in Patients with Advanced Cancer. **J. Diet. Suppl.**, v. 13, n. 2, p. 221-31, 2016.

PINHEIRO C. E. et al. Effect of guaraná and Stévia Rebaudiana Bertoni (leaves) extracts, and stevioside, on the fermentation and synthesis of extra cellular insoluble polysaccharides of dental plaque. **Rev. Odontol. Univ. Sao Paulo**, v. 1, n. 4, p. 9-13, 1987.

PINHO, V. F. S.; COUTINHO, E. S. F. Variáveis associadas ao câncer de mama em usuárias de unidades básicas de saúde. **Cad. Saúde Pública**, v. 23, n. 5, p. 1061-1069, 2007.

PORTELLA R. L. et al. Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: an in vitro and in vivo study. **Lipids Health Dis.**, v. 12, n. 12, p. 1-9, 2013.

HELENA PÓPULO, H., LOPES J.M., SOARES, AP. The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. **Int J Mol Sci.**, v. 12, n. 2, p. 1886–1918, 2012.

POTENTAS, E., WITKOWSKA, A. M., ZUJKO, M. E. Mediterranean diet for breast cancer prevention and treatment in postmenopausal women. **Prz. Menopauzalny.**, v. 14, n. 4, p. 247-53, 2015.

PUANGPRAPHANT, S. et al. Dicafeoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF- κ B nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells. **Mol. Nutr. Food. Res.**, v. 55, n. 10, p. 1509-22, 2011.

RAGUZ, S.; YAGÜE, E. Resistance to chemotherapy: new treatments and novel insights into an old problem. **Br. J. Cancer**, v. 99, n.3, p. 387-91, 2008.

REID, M.E. et al. Smoking Exposure as a Risk Factor for Prevalent and Recurrent Colorectal Adenomas. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 12, n. 10, p.1006-1011, 2003.

REX, D.K. Colorectal Cancer Screening. **A. S. G. E.**, v. 14, n. 4, 2007.

ROBBINS; COTRAN. **Patologia**: bases patológicas das doenças. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 185-187.

SADZUKA, Y. et al. Caffeine-Biochemical Modulator of Axdriamycin. **Cancer Science**, v. 86, p. 594-599, 1995.

SAEED, N. M. et al. Epigallocatechin-3-gallate pretreatment attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: A mechanistic study. **Biochem. Pharmacol.** v. 95, n. 3, p. 145-55, 2015.

SAHA, D.; ROMAN, C.; BEAUCHAMP, D. New Strategies for Colorectal Cancer Prevention and Treatment. **World J. Sur.**, v.26, n. 7, p.762-766, 2002.

SAIKO, P. et al. Epigallocatechin gallate, ellagic acid, and rosmarinic acid perturb dNTP pools and inhibit de novo DNA synthesis and proliferation of human HL-60 promyelocytic leukemia cells: Synergism with arabinofuranosylcytosine. **Phytomedicine**, v. 22, n. 1, p. 213-22, 2015.

SALDANHA, S. N.; KALA, R.; TOLLEFSBOL, T. O. Molecular mechanisms for inhibition of colon cancer cells by combined epigenetic-modulating epigallocatechingallate and sodium butyrate. **Exp. Cell Res.**, v. 324, n. 1, p. 40-53, 2014.

SCHIMPL F. C. et al. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **J. of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p 14–31, 2013.

SEETHARAM, R.; SOOD, A.; GOEL, S. Oxaliplatin: pre-clinical perspectives on the mechanisms of action, response and resistance. **E. Cancer Medical Science**, v.3, n. 153, 2009.

SHEN, X. et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits cell growth, induces apoptosis and causes S phase arrest in hepatocellular carcinoma by suppressing the AKT pathway. **Int. J. Oncol.**, v. 44, n. 3, p. 791-6, 2014.

SHIMIZU, M. et al. Chemopreventive potential of green tea catechins in hepatocellular carcinoma. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 16, n. 3, p. 6124-39, 2015.

SONODA, J. I. et al. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate, attenuates the cell viability of human non-small-cell lung cancer A549 cells via reducing Bcl-xL expression. **Exp. Ther. Med.**, v. 8, n. 1, p. 59-63, 2014.

SPENCE, R. A. J. et al. Cancer chemotherapy and biotherapy; 2a . ed., Lippincott-Raven: Filadélfia, 1996.

SUBBIAH, M. T.; YUNKER R. Studies on the nature of anti-platelet aggregatory factors in the seeds of the Amazonian Herb Guarana (*Paullinia cupana*). **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, v. 78, n. 2, p. 96-101, 2008.

SUGIMOTO, N. et al. Theobromine, the primary methylxanthine found in *Theobroma cacao*, prevents malignant glioblastoma proliferation by negatively regulating phosphodiesterase-4, extracellular signal-regulated kinase, Akt/mammalian target of rapamycin kinase, and nuclear factor-kappa. **B. Nutr. Cancer**, v. 66, n. 3, p. 419-23, 2014.

SUGIMOTO, N. et al. Theobromine, the primary methylxanthine found in *Theobroma cacao*, inhibits malignant glioblastoma cell growth by negatively regulating Akt/mammalian target of rapamycin kinase (LB836). **The FASEB Journal**, v. 28, n.1, 2014.

SUN F. et al. Caffeine-induced nuclear translocation of FoxO1 triggers Bim-mediated apoptosis in human glioblastoma cells. **Tumour. Biol.**, 2015, *in press*.

THOMAS, G.M.; HUGANIR, R.L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 5, n. 3, p.173-83, 2014.

TOYOMURA, K. et al. Relation of cigarette smoking and alcohol use to colorectal adenomas by subsite: The self-defense forces health study. **Cancer Sci.**, v.95, n.1, p.72-76, 2004.

TSABAR, M. et al. Caffeine impairs resection during DNA break repair by reducing the levels of nucleases Sae2 and Dna2. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 43, n. 14, p. 6889-901, 2015.

TSUCHIYA, T. et al. Apoptosis induction by p38 MAPK inhibitor in human colon cancer cells. **Hepatogastroenterology.**, v. 55, n. 84, p. 930-5, 2008.

VAN ALLER, G. S. et al., Epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea, is a dual phosphoinositide-3-kinase/mTOR inhibitor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 406, n. 2, p. 194-9, 2011.

VIJAYAKUMARAN, R. et al. Regulation of Mutant p53 Protein Expression. **Front. Oncol.**, v. 5, n. 284, p. 1-8, 2015.

WALLACE, K. et al. Effect of Calcium Supplementation on the Risk of Large Bowel Polyps. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 96, n. 12, p.921-925, 2004.

WANG G. et al. The effect of caffeine on cisplatin-induced apoptosis of lung cancer cells. **Exp. Hematol. Oncol.**, v. 4, n. 5, 2015.

WANG, F. et al. Epigallocatechin 3 gallate inhibits the proliferation and migration of human ovarian carcinoma cells by modulating p38 kinase and matrix metalloproteinase 2. **Mol. Med. Rep.**, v. 9, n. 3, p. 1085-9, 2014.

YAMAGUTI-SASAKI E. et al. Antioxidant capacity and *in vitro* prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1950-63, 2007.

YANG, S. Y. et al. Inhibition of the p38 MAPK pathway sensitises human colon cancer cells to 5-fluorouracil treatment. **Int. J. Onc.**, v. 38, n. 6, p. 1695-702, 2011.

ZAFFARONI, N., PENNATI, M., DAIDONE, M. G. Survivin as a target for new anticancer interventions. **J. Cell Mol. Med.**, v. 9, n. 2, p. 360-72, 2005.

ZAPPONI, A. L. B.; TOCANTINS, F. R.; VARGENS, O. M. C. A detecção precoce do câncer de mama no contexto Brasileiro. **Rev. Enferm. Uerj.**, v. 20, n. 3, p. 386-90, 2012.

ZHANG, Y. et al. Epigallocatechin-3-gallate induces the apoptosis of hepatocellular carcinoma LM6 cells but not non-cancerous liver cells. **Int. J. Mol. Med.**, v. 35, n. 1, p. 117-24, 2015.

ZHENG, M. et al. Rheb phosphorylation is involved in p38-regulated/activated protein kinase-mediated tumor suppression in livercancer. **Oncol. Lett.**, v. 10, n. 3, p. 1655-1661, 2015.

ZHOU, H.; LUO, Y.; HUANG, S. Updates of mTOR inhibitors. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 10, n. 7, p. 571-81, 2010.

ZOU, P. et al., Epigallocatechin-3-gallate protects against cisplatin nephrotoxicity by inhibiting the apoptosis in mouse. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 7, n. 8, p. 4607-16, 2014.