

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EFEITO *IN VITRO* DA SUPLEMENTAÇÃO DO
GUARANÁ (*Paullinia cupana*) NA ATIVIDADE DE
QUIMIOTERÁPICOS USADOS NO TRATAMENTO DO
CÂNCER DE MAMA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Everaldo Hertz

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**EFEITO *IN VITRO* DA SUPLEMENTAÇÃO DO GUARANÁ
(*Paullinia cupana*) NA ATIVIDADE DE QUIMIOTERÁPICOS
USADOS NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA**

Everaldo Hertz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia (PPGF), Área de Ciências da Saúde, da Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial
para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

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

Santa Maria, RS, Brasil

2014

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

Hertz, Everaldo
Efeito in vitro da suplementação do guaraná (paullinia cupana) na atividade de quimioterápicos usados no tratamento do câncer de mama. / Everaldo Hertz.-2014.
60 p.; 30cm

Orientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2014

1. Células MCF7 2. Quimioterapia 3. Antifadigantes 4. Anticarcinogênicos I. Cruz, Ivana Beatrice Mânica da II. Título.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Everaldo Hertz. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: everaldohertz@gmail.com

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO *IN VITRO* DA SUPLEMENTAÇÃO DO GUARANÁ (*Paullinia
cupana*) NA ATIVIDADE DE QUIMIOTERÁPICOS USADOS NO
TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA**

elaborada por
Everaldo Hertz

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dr^a (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Guilherme Bergamaschi Bresciani, Dr (UFSM)

Liliane de Freitas Bauermann, Dr^a (UFSM)

Santa Maria, 24 de janeiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar em todos os momentos, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e, principalmente a sabedoria para administrar minha fé, determinação e trabalho.

Aos meus pais, Dione e Pedrinho, sou grato a Deus por ter me colocado num lar com amor, compreensão, bondade e honestidade. Por terem sido os melhores pais possíveis e terem me passado tantos valores inegociáveis. Aos meus irmãos e suas famílias, meu carinho infinito.

Agradeço especialmente a minha esposa Sandra e meus filhos Ivana e Francisco que são os maiores presentes que Deus poderia ter me dado nesta vida. Por todo amor, felicidade, carinho, compreensão, apoio, incentivo, dedicação encontrada na minha querida família que sempre farão parte de cada vitória.

Dedido este poema a minha esposa Sandra:

“Saberás que não te amo e que te amo
Posto que de dois modos é a vida
A palavra é uma asa do silêncio,
O fogo tem um metade de frio.

Eu te amo para começar a amar-te,
Para recomeçar o infinito
E para não deixar de amar-te nunca:
Por isso não te amo ainda.

Te amo e não te amo como se tivesse
Em minhas mãos as chaves da fortuna
E um incerto destino desafortunado.

Meu amor tem duas vidas para amar-te
Por isso te amo quando não te amo
E por isso te amo quando te amo.”

Pablo Neruda

A minha orientadora e amiga Ivana Beatrice Mânica da Cruz por acreditar em mim, me mostrar o caminho da ciência, transformar este estudo em momentos de alegria científica e, ser um dos melhores exemplos de profissional.

A todos os meus colegas do Laboratório de Biogenômica, que diretamente ou indiretamente contribuíram neste estudo, uma homenagem especial a Francine Cardoná e ao Alencar Machado, exemplos de ética, profissionalismo e sabedoria científica.

Dedico este poema a vocês:

“ Compreendi que viver é ser livre... que ter amigos é necessário... que lutar é manter-se vivo... que para ser feliz basta apenas querer... aprendi que o tempo cura... que mágoa passa... que decepção não mata...que hoje é reflexo de ontem... compreendi que podemos chorar sem derramar lágrimas... que os verdadeiros amigos permanecem... que dor fortalece...que vencer engrandece...aprendi que sonhar não é fantasiar...que pra sorrir tem que fazer alguém sorrir...que a beleza não está no que vemos, e sim no que sentimos...que o valor está na força da conquista...compreendi que as palavras têm força...que fazer é melhor que falar.. que o olhar não mente...que viver é aprender com os erros... aprendi que tudo depende da vontade...que o melhor é ser nós mesmos... que o segredo da vida é viver!

E uma das coisas que aprendi é que se deve viver apesar de. Apesar de, se deve comer. Apesar de, se deve amar. Apesar de, se deve morrer. Inclusive muitas vezes é o próprio apesar de que nos empurra para frente. Foi o apesar de, que me deu uma angústia que insatisfeita foi criadora de minha própria vida.”

Clarice Lispector

A todos os demais familiares, meus irmãos de vida: Nadir, Edmar, William, Daniele, Júlia, Johanns, Peter, Weslla, obrigado por fazer parte desta família incrível, batalhadora, afetuosa, amiga e divertida: amo todos vocês!

A vocês este poema:

“ Cantar de Amigo

O claro pão
Que repartimos
Dá-nos um título:
Companheiros.

A indagação
Que aprofundamos
Faz de nós, artesãos,

Camaradas.

O olhar sem visgo,
A voz precisa,
O gesto mundo,
Eis-nos: amigos.

Quantos que marcham pela vida
Como quem carrega uma estrada,
Terão amigo, companheiro e camarada? “

Geir Nuffer Campos

Aos meus amigos e colegas Carlos e Izabella Felin por todo apoio, amizade nesta estrada de trabalho e parceria, e toda equipe de Oncocentro (especial a Lourdes e Mariza), ofereço a vocês este poema:

“Amigo

Mal nos conhecemos
Inauguramos a palavra amigo.

Amigo é um sorriso
De boca em boca,
Um olhar bem limpo,
Uma casa, mesmo modesta, que se oferece,
Um coração pronto a pulsar
Na nossa mão!

Amigo (recondam-se, vocês aí, Escrupulosos detritos?)
Amigo é o contrário de inimigo!

Amigo é o erro corrigido,
Não o erro perseguido, explorado,
É a verdade partilhada, praticada.

Amigo é a solidão derrotada!

Amigo é uma grande tarefa,
Um trabalho sem fim,
Um espaço útil, um tempo fértil,
Amigo vai ser, é já uma grande festa!

Alexandre O'Neill

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO *IN VITRO* DA SUPLEMENTAÇÃO DO GUARANÁ (*Paullinia cupana*) NA ATIVIDADE DE QUIMIOTERÁPICOS USADOS NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

Autor: Everaldo Hertz

Orientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz
Santa Maria, 24 de janeiro de 2014.

A fadiga relacionada ao câncer (CRF) é um fenômeno comum em pacientes submetidos à quimioterapia e à radioterapia representando um impacto negativo sobre o estado funcional e a qualidade de vida. Algumas plantas apresentam propriedades tônicas e antifatigantes, como guaraná (*Paullinia cupana*) e um estudo anterior descreveu efeito positivo sobre a CRF de pacientes com câncer de mama, submetidas à quimioterapia. Apesar dos resultados positivos, indicando que o guaraná melhora o CRF, este fruto apresenta molécula bioactiva como cafeína e catequina, que podem influenciar no efeito de fármacos antitumorais. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar se o guaraná muda a viabilidade e o efeito antiproliferativo de sete agentes quimioterápicos atualmente utilizados no tratamento do câncer de mama, utilizando como modelo experimental *in vitro* a linhagem de células de câncer de mama MCF-7. As células foram expostas a concentrações de guaraná de 1, 5 e 10 µg/mL, com e sem quimioterápicos. Os principais resultados demonstraram um efeito antiproliferativo do guaraná em 5 10 µg/mL. A influência do guaraná sobre os efeitos quimioterápicos era dependente de fármacos. O efeito do guaraná na viabilidade de células MCF-7 foi heterogêneo e dependente de drogas. Diferente dos resultados obtidos após 24 horas de exposição, o guaraná mais todos os fármacos quimioterápicos mostraram um forte efeito antiproliferativo (> 40% de inibição de células) em células MCF-7, depois de 72 horas de exposição de 10 uM de gemcitabina, vinorelbina e metotrexato, 2 uM 5-fluoracil, 50 uM de paclitaxel, 200 nM de doxorubicina, e 5 mM de ciclofosfamida. Devido ao fato das drogas quimioterápicas serem afetadas pela adição de guaraná melhorando a atividade antiproliferativa, o uso terapêutico de guaraná contra CRF parece não afetar negativamente a quimioterapia. No entanto, protocolos *in vitro* apresentam limitações metodológicas que precisam ser consideradas e precisam ser realizadas investigações complementares *in vitro* e *in vivo* para avaliar se a administração de quimioterápico com guaraná é segura para pacientes com câncer de mama.

Palavras-chave: Células MCF7. Quimioterapia. Antifadigantes. Anticarcinogênicos.

ABSTRACT

Master Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

THE *IN VITRO* EFFECT OF SUPPLEMENTATION GUARANA (*Paullinia cupana*) IN CHEMOTHERAPEUTICS ACTIVITY IN THE BREAST CANCER TREATMENT

Author: Everaldo Hertz
Adviser: Ivana Beatrice Mânica da Cruz
Santa Maria, January 24, 2014.

Cancer related fatigue (CRF) is a common phenomenon in patients undergoing chemotherapy and radiotherapy representing a negative impact on functional status and quality of life. Some plants present tonic and antifatiguing properties, as guaraná (*Paullinia cupana*) and a previous study described positive effect on CRF of breast cancer patients submitted to chemotherapy. Despite the positive results indicating that guaraná improve CRF, this fruit present bioactive molecule as caffeine and catechin which can to influence the effect of antitumor drugs. Therefore, the aim of this study was to evaluate if guaraná changes the viability and antiproliferative effect of seven chemotherapeutic agents currently used in the breast cancer treatment using as *in vitro* experimental model MCF-7 breast cancer cell line. The cells were exposed at 1, 5 and 10 µg/mL guaraná concentrations with and without chemotherapeutics. The main results showed an antiproliferative effect of guaraná at 5 10 µg/mL. The guaraná influence on chemotherapeutic effects was drug-dependent. The guaraná effect on MCF-7 cells viability was heterogeneous and drug dependent. Different of the results found after 24 hours exposition, the guaraná plus all chemotherapeutic drugs showed a strong antiproliferative effect ($\geq 40\%$ of cell inhibition) on MCF-7 cells after 72 hours of exposition of 10 uM gemcitabine, vinorelbine and methotrexate, 2 uM 5-fluoracil, 50 uM paclitaxel, 200 nM doxorubicin, and 5mM cyclophosphamide. Because chemotherapeutic drugs were affected by guaraná addition most improve the antiproliferative activity, the therapeutic use of guaraná against CRF seems did not affect negatively the chemotherapy. However, *in vitro* protocols present methodological limitations that need to be considered and complementary *in vitro* and *in vivo* investigations need to be performed to evaluate whether chemotherapeutic plus guaraná administration is safe to breast cancer patients.

Keywords: Guaraná. Antitumoral. Chemotherapy. Breast cancer. Fatigue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais estágios da carcinogênese	11
Figura 2 – Principais estadiamentos no câncer de mama.....	14
Figura 3 – Classificação de agentes antineoplásicos.....	16
Figura 4 – Guaraná (<i>Paullinia cupana</i>) fruto amazônico em que o pó moído e torrado da semente é utilizado como energético	26

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Quimioterápicos utilizados na imunoterapia do câncer de mama e seus principais alvos terapêuticos genético-moleculares.....	18
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bcl2	– <i>B-cell lymphoma 2</i>
CCNS	– Ciclo-celular não específico
CCS	– Ciclo-celular específico
CRF	– <i>Cancer related fatigue</i>
CSCs	– <i>Cancer stem cells</i>
DNA	– <i>Deoxyribonucleic acid</i>
ECG	– Eletrocardiograma
EGCG	– Epigallocatequina-3-galato
FRC	– Fadiga relacionada ao câncer
FSH	– Hormônio folículo estimulante
HER	– Receptor do fator de crescimento epidérmico
LH	– Hormônio luteinizante
RNA	– <i>Ribonucleic acid</i>
VEGF	– <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Epidemiologia do câncer e mama	10
1.2 Biologia tumoral: processo de carcinogênese, seus estágios e classificações	10
1.2.1 Estágio de iniciação.....	11
1.2.2 Estágio de promoção.....	12
1.2.3 Estágio de progressão.....	13
1.3 Quimioterapia no câncer de mama	14
1.3.1 Trastuzumabe	19
1.3.2 Bisfosfonatos.....	19
1.3.3 Anastrozol	20
1.3.4 Capecitabina	20
1.3.5 Ciclofosfamida	21
1.3.6 Docetaxel	21
1.3.7 Doxorrubicina	22
1.3.8 Exemestano	22
1.3.9 Fluorouracil.....	22
1.3.10 Goserelina	23
1.3.11 Letrozol.....	23
1.3.12 Acetato de megestrol.....	23
1.3.13 Metotrexato	24
1.3.14 Paclitaxel	24
1.3.15 Tamoxifeno.....	24
1.4 A fadiga como efeito adverso associado a quimioterapia	25
1.5 O uso de suplementos antifadigantes – a exemplo do guaraná (<i>Paullinia cupana</i>)	26
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
ARTIGO 1	30
3 DISCUSSÃO	52
4 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer e mama

A cada ano mais de 1,1 milhões de mulheres são diagnosticadas em todo mundo com câncer de mama e 410 mil morrem da doença (NCI, 2009). É também o tipo de câncer mais prevalente nas mulheres brasileiras, após os tumores de pele não melanoma, respondendo a 22% dos novos casos a cada ano, com uma incidência anual de 52.680 (INCA, 2012). Como a detecção precoce e tratamento do câncer de mama é fundamental na sobrevivência destas pacientes, o prognóstico também está associado a fatores biológicos, principalmente, a regulação da apoptose por genes e oncogenes, que ainda não estão totalmente entendidos. No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61%. Os principais fatores de risco de câncer são: (1) envelhecimento. (2) fatores de risco relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, não ter tido filhos, idade da primeira gestação a termo acima dos trinta anos; (3) uso de anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal (INCA, 2012).

1.2 Biologia tumoral: processo de carcinogênese, seus estágios e classificações

Células saudáveis possuem um sistema controlado de proliferação e senescência celular que auxiliam na morfogênese e na manutenção da homeostase corporal do indivíduo adulto. Este sistema envolve uma série de mecanismos que se encontram desregulados nas células cancerosas (HASHIMOTO, 1996; LAUBENBACHER et al., 2009; STORY; KODYM, 1998). Uma vez que envolve modificações complexas, a biologia tumoral está relacionada com diversos estágios

a seguir comentados. A história natural da maioria dos tumores malignos pode ser dividida em 4 fases: (1) transformação maligna; (2) crescimento da célula transformada; (3) invasão local; e, (4) metástase.

O processo de carcinogênese, ou seja, da transformação maligna, em geral, dá-se lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa origine um tumor detectável. Este processo ocorre em vários estágios e resulta do acúmulo de alterações genéticas (Figura 1) (INCA, 2012).

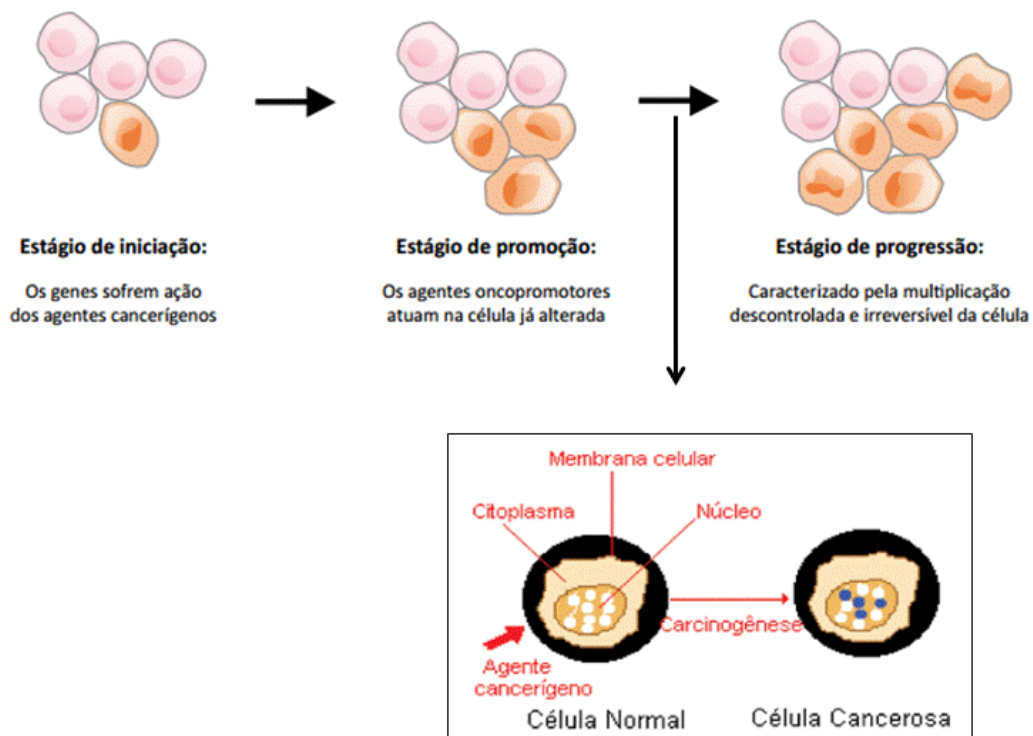


Figura 1 – Principais estágios da carcinogênese

Fonte: INCA, 2012; Spence et al., 2001.

1.2.1 Estágio de iniciação

É o primeiro estágio da carcinogênese. Essas alterações genéticas conhecidas como mutações podem ocorrer por ação de agentes ambientais, como substâncias químicas, radiação ou vírus. Este agente carcinogênico (agente oncoiniciador) é o que provoca modificações em alguns de seus genes. Nesta fase,

as células encontram-se geneticamente alteradas, porém, ainda não é possível se detectar clinicamente um tumor. Exemplos de substâncias químicas carcinógenas: sulfato de dimetila, metilnitrossuréia, cloreto de vinila, aflatoxinas, dimetilnitrosoamina e benzopireno.

Atualmente o câncer tem sido reconhecido como uma doença heterogênea com diversas hierarquias de populações de células que podem apresentar diferentes fenótipos. A maioria das células que constituem os tumores podem não ser totalmente tumorogênicas e somente uma pequena população destas células são realmente as responsáveis pela iniciação tumoral, crescimento e recidiva. Por este motivo, as células que iniciam o processo de carcinogênese são agora chamadas de células tronco tumorais (*cancer stem cells*, CSCs). Estas células possuem capacidade de autorenovação e também de diferenciação.

Várias rotas de sinalização estão envolvidas com o comportamento de autorenovação das células cancerosas, incluindo as rotas de sinalização Wnt/ β -catenina, Notch e Hedgehog, que também estão envolvidas na resistência a quimioterapia e radioterapia (FISHER et al., 2013; INCA, 2012; WANG et al., 2013).

1.2.2 Estágio de promoção

As células geneticamente alteradas sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. Portanto, a célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor. O período de latência varia com a intensidade do estímulo carcinogênico, com a presença ou ausência dos agentes oncoiniciadores, oncopromotores e oncoaceleradores, e com o tipo e localização primária do câncer. Assim, a suspensão do contato com um dado estímulo carcinogênico, muitas vezes, interrompe o processo carcinogênico nesse estágio (INCA, 2012).

1.2.3 Estágio de progressão

É o terceiro e último estágio e caracteriza-se pela multiplicação descontrolada, sendo um processo irreversível. O câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença. Os fatores que promovem a iniciação ou progressão da carcinogênese são chamados de carcinógenos (INCA, 2012).

De um modo geral a evolução do tumor maligno irá depender: (1) da velocidade do crescimento tumoral; (2) do órgão onde o tumor está localizado; (3) de fatores constitucionais de cada pessoa, incluindo variações genéticas que incidem sobre diversos aspectos do metabolismo energético, inflamatório, oxidativo, desintoxicador; (4) de fatores ambientais (INCA, 2012). Considerando estas características, os tumores podem, então, ser detectados em diferentes fases, quando a doença ainda não foi desenvolvida (fase pré-neoplásica), na fase microscópica ou pré-clínica, quando ainda não há sintomas e na fase clínica, quando os sintomas do câncer já apareceram (INCA, 2012).

Em termos clínicos o câncer é classificado de acordo com sua extensão, independente da fase em que se encontra. O método utilizado para essa classificação é denominado de estadiamento. No caso, o estadiamento pode ser clínico ou patológico, existindo regras bem estabelecidas e que estão em constante aperfeiçoamento, permitindo ao médico oncologista definir a terapêutica mais adequada para cada paciente (INCA, 2012).

Por este motivo, o estágio de um tumor reflete a sua taxa de crescimento, extensão da doença e o tipo de tumor e sua relação com o hospedeiro. Assim, para o estadiamento das neoplasias malignas se faz necessário considerar a localização do tumor, tipo histopatológico, produção de substâncias e manifestações clínicas do tumor. Além disto, o sexo, a idade, comportamentos e características biológicas do paciente também devem ser considerados. A Figura 2 apresenta uma visão geral dos principais estadiamentos do câncer de mama (INCA, 2012).

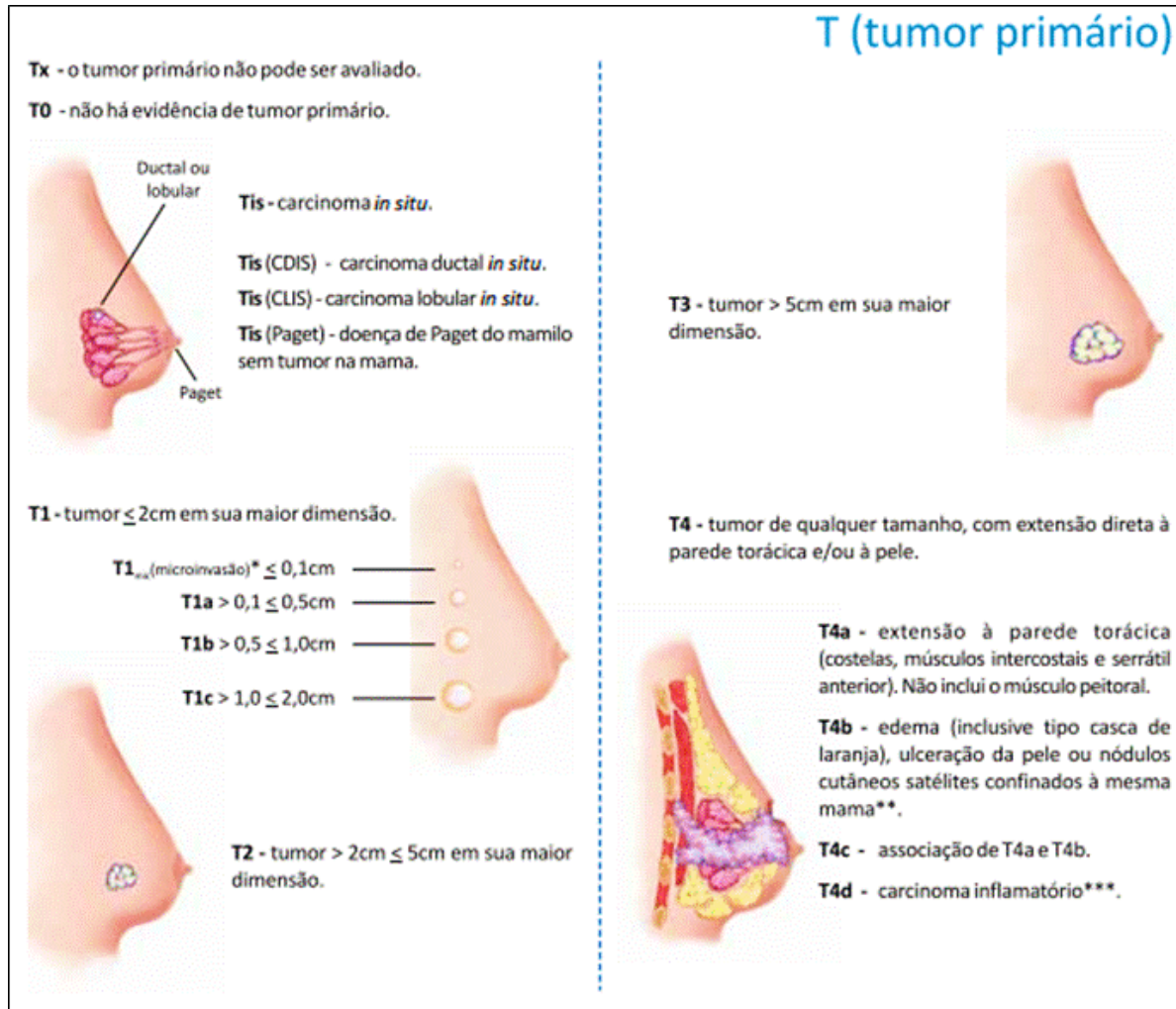


Figura 2 – Principais estadiamentos do câncer de mama.

Fonte: INCA, 2012.

1.3 Quimioterapia no câncer de mama

Existem três formas principais de tratamento do câncer: quimioterapia, radioterapia e cirurgia. Estes tratamentos podem ser utilizados em conjunto, variando apenas quanto à suscetibilidade dos tumores a cada uma das modalidades terapêuticas e à sequência mais adequada de sua administração (INCA, 2012). Considerando especificamente a quimioterapia, existem cinco finalidades no seu uso, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2012). A primeira é a quimioterapia prévia, neoadjuvante ou citorrredutora que é indicada para a redução de tumores *loco* e regionalmente avançados, quando estes são ainda irresssecáveis.

A segunda é a quimioterapia adjuvante ou profilática, que é indicada após a realização do tratamento cirúrgico curativo e quando o paciente já não possui nenhuma neoplasia maligna que seja detectável pelo exame físico ou pelos exames complementares. A terceira finalidade é a chamada quimioterapia curativa que tem por objetivo curar pacientes com neoplasias malignas, representando o tratamento principal. Ela pode ser feita com ou sem associação com cirurgia e radioterapia. O quarto tipo de quimioterapia é a chamada quimioterapia para controle temporário da doença, sendo indicada para o tratamento de tumores sólidos, avançados ou recidivados, ou mesmo para as neoplasias hematopoiéticas de evolução crônica. Este tipo de quimioterapia permite uma longa sobrevivência, de anos ou meses, mas, sem possibilidade de cura. O último tipo é a quimioterapia paliativa indicada para minimizar sinais e sintomas que comprometem a capacidade funcional do paciente. Este tipo não repercute obrigatoriamente na sobrevivência. A quimioterapia paliativa tem duração limitada já que o tumor não é curável.

A evolução do tratamento quimioterapêutico tem agido na redução na mortalidade causa-específica por câncer de mama, provavelmente, decorrente da utilização mundial do tratamento sistêmico adjuvante com quimioterapia (BERRY et al.; 2005; BINKLEY et al., 2012). Neste tratamento o racional é a destruição da doença micrometastática oculta, provável responsável pela recorrência do câncer de mama entre as mulheres tratadas com cirurgia e/ou radioterapia (BERRY et al., 2005). Ainda não se tem o conhecimento preciso do perfil de pacientes que realmente se beneficiam do tratamento adjuvante. Hoje, entretanto, tanto pacientes que se beneficiam, como aquelas que não se beneficiam (por terem tumor resistente) ou que não precisam de terapia adjuvante (por terem sido curadas com a cirurgia somente) são infelizmente tratadas. No futuro, estima-se que o perfil genético dos tumores não somente permitirá avaliar melhor o risco de recorrência ou redução do risco de recidiva, proporcionado pelo tratamento, mas, também, poderá auxiliar na seleção ideal das drogas a serem usadas na adjuvância (BINKLEY et al., 2012).

Segundo Calabresi e Chabner (2003), os quimioterápicos antineoplásicos podem ser classificados de acordo com o seu ponto de interferência no mecanismo de ação das diferentes etapas da síntese do DNA, transcrição e tradução (Figura 3).

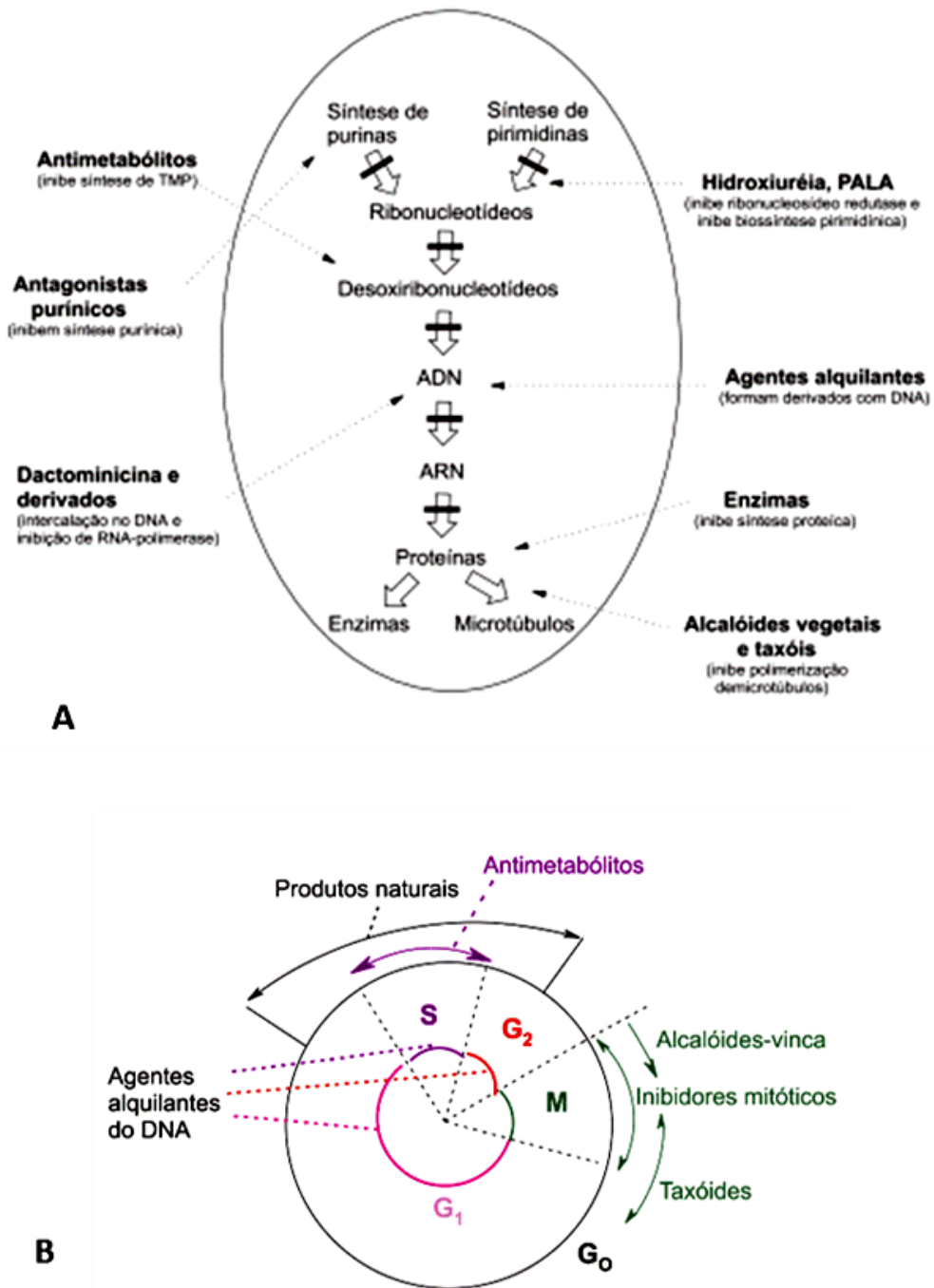


Figura 3 – Classificação de agentes antineoplásicos (A) com destaque aos momentos específicos do ciclo celular que eles atuam (B).

Fonte: Almeida et al., 2005; Calabresi; Chabner, 2003.

Existem diversos mecanismos que estão envolvidos na evolução de uma célula normal para uma célula potencialmente maligna. A maior parte deles interfere na divisão celular, portanto, o conhecimento do ciclo celular ou dos seus mecanismos é fundamental para que se entenda a etiologia do câncer (ALMEIDA

et al., 2005). De fato, na quimioterapia são descritos muitos alvos que podem ser estudados com o intuito de se estabelecer novos fármacos antitumorais, sendo que o DNA apresenta-se como um dos alvos mais estudados (KESKIN et al., 2000).

Muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular, e são denominados fármacos ciclo-celular específicos (CCS). Um segundo grupo de agentes, denominado fármacos ciclo-celular não específicos (CCNS), têm a capacidade de exterminar as células tumorais independentemente de estarem atravessando o ciclo (ALMEIDA et al., 2005). A célula que não está se replicando está na fase G0. Nesta fase, o DNA está super enovelado, com atividade nuclear baixa. Este estágio pode ser modificado para a fase G1, onde há a preparação da célula para a multiplicação, com a produção de constituintes celulares que serão essenciais para a nova célula que será gerada, além da preparação da síntese de DNA, que ocorrerá na fase S.

Nas fases G1 e S existem diversos mecanismos reguladores que irão afetar a multiplicação celular. Os fatores de crescimento, como os produtos dos oncogenes, ativam a multiplicação celular, enquanto que os controles de retroalimentação (*feedback*) são inibidores da multiplicação celular. Estes controles são, por exemplo, genes supressores tumorais, que interrompem a replicação celular quando há dano no DNA, para que ele seja reparado. Estes genes também podem induzir a apoptose, caso os danos genômicos sejam extensos (SALOMON, 2000). As interleucinas, dentre outras substâncias, também afetam a replicação celular, entretanto, seus mecanismos ainda são obscuros.

Na fase G2 há síntese de componentes para a mitose (divisão celular com a manutenção do número de cromossomos específico da espécie) como a produção do fuso mitótico que é produzido na fase M. Após a divisão do material nuclear há a citocinese (que é a separação da célula mãe, formando as duas células filhas com suas organelas e demais constituintes celulares), finalizando o ciclo de replicação celular (retorna à fase G0). A célula tumoral ou transformada não finaliza o ciclo de replicação celular (não retorna à fase G0), passando da fase M para a nova fase G1.

Assim, muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular, e são denominados fármacos ciclo-celular específicos (CCS). Um segundo grupo de agentes, denominados fármacos ciclo-celular não específicos (CCNS), têm a capacidade de exterminar as células tumorais

independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso no compartimento G0.

Na prática atual, há três modalidades de tratamento sistêmico que são largamente empregadas com terapia adjuvante no câncer de mama precoce, a saber: tratamento endócrino como, por exemplo, tamoxifeno, inibidores da aromatase ou supressão ovariana; terapia anti-HER 2 como, por exemplo, trastuzumabe e a quimioterapia sistêmica, cujas principais drogas estão descritas a seguir (BINKLEY et al., 2012; SALMONN, 2000). Para algumas classes de quimioterápicos se conhece os principais genes alvos envolvidos no controle do ciclo celular, diferenciação celular e/ou desencadeamento da apoptose. Esta especificidade ocorre porque tais quimioterápicos são anticorpos monoclonais e, portanto, o seu uso é conhecido como imunoterapia (SOLIMAN, 2013). O Quadro 1 apresenta alguns quimioterápicos utilizados na imunoterapia do câncer de mama (CRISCITELLO et al., 2012).

Quimioterápico	Alvo	Atividade metabólica
Trastuzumabe	HER2 (Epítipo IV)	O receptor do fator de crescimento epidérmico (HER2) está super expresso em aproximadamente de 15-20% de todos os tipos de câncer de mama. O trastuzumab é um anticorpo monoclonal que bloqueia o HER2.
Lapatinibe	EGFR e HER2	É um inibidor potente e reversível do ErbB1 e ErbB2, que são membros de um receptor da família das tirosinas - quinases, composto de quatro grupos relacionados proximamente (ErbB1 a ErbB4. Aprovado para uso no Brasil em 2009. Geralmente é indicado quando o tumor progrediu após o tratamento com trastuzumab.
Pertuzumabe	HER2 (Epítipo II)	É um anticorpo monoclonal recombinante humanizado utilizado em tratamento de câncer de mama agressivo, que combinado a outros medicamentos pode aumentar a sobrevida de pacientes atingidos Bloqueia o domínio II dos receptores HER2
Cetuximab	EFGR	É um anticorpo monoclonal que age na ligação ao do EFGR. Este é um receptor importante relacionado a resposta imune da pele humana. Entretanto, quando sofre mutação está relacionado com câncer e por este motivo a sua ativação deve ser impedida via quimioterápicos.
Bevacizumabe	VEGF-A	É um anticorpo monoclonal, que bloqueia a ação do VEGF (<i>vascular endothelial growth factor</i>). O VEGF está relacionado com a angiogênese e sua inibição impede o crescimento de células vasculares cancerígenas.

Quadro 1 – Quimioterápicos utilizados na imunoterapia do câncer de mama e seus principais alvos terapêuticos genético-moleculares

Fonte: Criscitello et al., 2012.

Na realidade, o tratamento quimioterápico do câncer, geralmente, envolve o uso de mais de um quimiofármaco. Assim, existem várias combinações de fármacos que compõem os protocolos para tratamento do câncer de mama. A seguir são comentados em maior detalhe os quimioterápicos mais utilizados no Brasil.

1.3.1 Trastuzumabe

Age nos tumores mais agressivos que possuem mutação genética no gene HER2 (são HER-2 positivos). O nome comercial deste quimiofármaco no Brasil é Herceptin.

O Trastuzumabe, no tratamento adjuvante do câncer de mama, demonstrou que a adição desse anticorpo aumenta a sobrevivência das pacientes de maneira significativa. O perfil de efeitos colaterais do trastuzumabe é bastante interessante, quando comparado ao dos quimioterápicos clássicos, uma vez que possui efeito adverso leve. O trastuzumabe pode causar febre e calafrios em alguns casos, mas, estes efeitos são transitórios e raramente graves. Diferentemente dos quimioterápicos clássicos, não causa depressão medular, alopecia, náuseas ou vômitos (CRISCITIELLO et al., 2012; SOARES, 2008).

1.3.2 Bisfosfonatos

Correspondem a um grupo de medicamentos utilizados em câncer de mama metastático, que ajudam a fortalecer os ossos e reduzir o risco de fraturas nos mesmos, que ficam enfraquecidos pela invasão de células advindas do câncer de mama. São exemplos o pamidronato e o ácido zoledrônico. Os mecanismos com que os bisfosfonados atuam na reabsorção óssea em nível celular envolvem, provavelmente, a inibição da formação ou recrutamento de osteoclastos, a partir de células precursoras imaturas, inibição da ativação de osteoclastos, inibição da atividade de osteoclastos maduros ou indução de apoptose. No caso do câncer de

mama os bisfosfonatos atuam com sua propriedade antitumoral que leva à inibição da adesão celular (VASCONCELLOS et al., 2004).

1.3.3 Anastrozol

Comercializado com o nome de Arimidex (ou Anastrozol) é um antineoplásico de categoria miscelânea. Este fármaco é um inibidor não esteroide específico da aromatase. É indicado no tratamento de câncer de mama localmente avançado ou metastático, em mulheres pós-menopáusicas com receptor hormonal positivo ou desconhecido ou em câncer de mama avançado em mulheres menopausadas com progressão de doença na vigência do tamoxifeno. O seu uso pode levar a efeitos colaterais dos quais se inclui ondas de calor, sensação de fraqueza, astenia, dor articular e enrijecimento, dor de cabeça, náusea e erupções cutâneas; comum – afinamento/queda dos cabelos, reações alérgicas leves, diarreia, vômito, sonolência, Síndrome do Túnel do Carpo, aumento das enzimas hepáticas e biliares, secura e sangramento vaginal, anorexia, aumento do nível de colesterol no sangue; incomum – coceira, dedo em gatilho; rara e muito rara – reações alérgicas graves (eritema multiforme, reações anafilactóides, Síndrome de Stevens-Johnson e angioedema) (SILVA et al., 2010).

1.3.4 Capecitabina

Antineoplásico de categoria antimetabólito, que funciona como um pró-fármaco do fluorouracil que é hidrolisado no fígado e tecidos. É indicado nas metástases do câncer de mama. As reações adversas associadas ao seu uso incluem: diarreia, perda de apetite, náuseas, vômitos, mucosite (feridas na boca), eritema, parestesias e edema da palma das mãos e planta dos pés.

1.3.5 Ciclofosfamida

Este fármaco é um antineoplásico cuja categoria pertence aos alquilantes. Seu mecanismo de ação ocorre pelo entrecruzamento da cadeia de DNA e RNA e inibição da síntese de proteínas das células. Entre os efeitos colaterais associados ao seu uso estão a febre, calafrios, dor de garganta, supressão gonadal (amenorreia), enjoos, confusão, cansaço, debilidade, tosse, dispneia, artralgia, hemorragia ou hematomas não habituais, náuseas, vômitos, perda de peso.

1.3.6 Docetaxel

Antineoplásico, alcalóide da vinca da família dos taxanos (de álcali, básico, com o sufixo oide, "semelhante a") é uma substância de caráter básico, derivada principalmente de plantas (mas, não somente, podendo ser, também, derivada de fungos, bactérias e, até mesmo, de animais) que contém, em sua fórmula, basicamente nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e carbono. Este quimioterápico age em nível dos microtúbulos da célula, onde se fixa às subunidades beta da tubulina e as estabiliza. O bloqueio da despolimerização dos microtúbulos altera a mitose e causa morte celular. A indicação do seu uso ocorre no tratamento de câncer de mama localmente avançado ou metastático, na adjuvância em casos de falha das antraciclinas. As reações adversas associadas ao seu uso são: fadiga, alterações cardiovasculares como a retenção de líquidos, inchaço periférico. Em nível gastrointestinal pode ocorrer anorexia, diarreia, dificuldade para engolir, esofagite, náusea, vômito, inflamação na boca. Em nível hematológico pode ocorrer diminuição de neutrófilos no sangue febril, diminuição de leucócitos no sangue, diminuição das plaquetas no sangue, anemia. Pode, também, ocasionar mialgia nos músculos esqueléticos e alopecia na pele (SILVA et al., 2010).

1.3.7 Doxorubicina

É um antibiótico antineoplásico que age na inibição da síntese do DNA e RNA, intercalando entre as bases, inibindo a topoisomerase. As reações adversas do seu uso incluem: reação alérgica, calafrios, infecções, dor no tórax, dor lombar, distensão abdominal, mal estar. Sistema digestivo: dispepsia, candidíase oral, ulceração na boca, esofagite, disfagia (dificuldade para engolir). Sistema metabólico e nutricional: edema periférico, desidratação.

1.3.8 Exemestano

Antineoplásico da categoria miscelânea que tem como ação ser um inativador esteroideiro irreversível da aromatase. É utilizado no tratamento do câncer de mama localmente avançado em mulheres menopausadas, cuja doença progrediu após terapia com tamoxifeno. Os efeitos adversos foram leves e moderados e a reação mais frequente foi rubor (SILVA et al., 2010; SOARES et al., 2008).

1.3.9 Fluorouracil

Antineoplásico antimetabólito cujo mecanismo de ação ocorre por ser análogo da pirimidina, que interfere na síntese do DNA bloqueando a metilação, inibindo a timidinosintetase. Entre as reações adversas associadas ao seu uso se inclui: anorexia, náusea, vômitos, estomatite, mucosite, diarreia. Raros: sangramento, dano hepatocelular.

1.3.10 Goserelina

É um antineoplásico da categoria miscelânea que age como “castração” química. Isto porque, após um aumento inicial do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH) a administração contínua resulta na supressão sustentada das gonadotrofinas coriônicas. Durante o tratamento com a goserelina podem ocorrer fogachos (ondas de calor), dificuldade para urinar, dor nos ossos e, às vezes, reações urticariformes na pele.

1.3.11 Letrozol

É um antineoplásico; inibidor não-esteroide da aromatase, utilizado no tratamento do câncer de mama avançado em mulheres na pós-menopausa. Os relatos de reações adversas mais frequentes nos estudos clínicos foram: fogachos, artralgia, náuseas e fadiga.

1.3.12 Acetato de megestrol

É um antineoplásico hormonal, estimulante do apetite que age como um proetágeno sintético, com ação antiestrogênica, por competição nos receptores. Nas reações adversas a este quimioterápico observa-se: aumento de peso associado ao aumento de peso. Poderão surgir inflamação vascular, obstrução da artéria pulmonar (fatal em alguns casos – por embolia) náuseas e vômitos, edema, sangramento uterino espontâneo. Também dispneia, dor torácica, insuficiência cardíaca, hipertensão, fogachos, alteração do humor, face cushingóide, exacerbação tumoral (com ou sem hipercalemia), hiperglicemia, alopecia, síndrome do túnel de carpo, diarreia, letargia e erupções cutâneas. Também foram relatadas constipação

e retenção urinária, nos pacientes que receberam altas doses de acetato de megestrol nos estudos clínicos.

1.3.13 Metotrexato

É um antineoplásico, antimetabólito análogo dos folatos, que inibe a síntese do DNA, ligando irreversivelmente a dihidrofolato redutase. Muitas reações adversas são inevitáveis e representam sua ação farmacológica; por exemplo, leucopenia e trombocitopenia, que são empregadas como indicadores da eficácia da medicação e facilitam o ajuste da dose individual. Requerem atenção médica somente se persistem ou são incômodos: anorexia, náuseas e vômitos. São de incidência mais frequente e requerem atenção médica: melena, hematêmese, diarreia, hematuria, artralgias e edemas.

1.3.14 Paclitaxel

Antineoplásico, alcaloide da família dos taxanos que age através do impedimento da migração dos microtúbulos, por aumentar a ação da tubulina, inibindo a divisão celular. Possui reações adversas importantes como leucopenia, trombocitopenia, anemia, bradicardia durante a infusão, hipotensão durante a infusão, episódios cardiovasculares severos; ECG anormal, neuropatia periférica, mialgia/artralgia. Reações gastrointestinais incluem náuseas e vômitos, diarreia, mucosite, alopecia; hepáticas (pacientes com linha de base normal): elevação da bilirrubina, da fosfatase alcalina.

1.3.15 Tamoxifeno

Antineoplásico, antiestrogênico que se liga competitivamente aos receptores estrogênicos nos tumores e tecidos alvos, produzindo um complexo que diminui a

síntese do DNA e inibe os efeitos estrogênicos. As mais frequentes reações adversas associadas ao tamoxifeno são fogachos, náusea e vômitos, que podem ocorrer em até um quarto das pacientes, não sendo, no entanto, bastante graves para justificar a interrupção do tratamento. Menos frequentes são as hemorragias ou corrimentos vaginais, as irregularidades menstruais e as erupções cutâneas.

1.4 A fadiga como efeito adverso associado a quimioterapia

Um dos efeitos associados à quimioterapia do câncer, incluindo o câncer de mama, é a fadiga. A fadiga relacionada com o câncer é definida como uma sensação subjetiva persistente de cansaço e exaustão, relacionada com o câncer ou seu tratamento e que não é proporcional a atividades que são usualmente realizadas pelos pacientes (SALIGAN; KIM, 2012). O fato é que a fadiga tem um grande impacto na qualidade de vida do paciente acometido por câncer.

A prevalência de fadiga relacionada com o câncer pode ser alta, atingindo até 70-80% dos pacientes, dependendo do tipo de tratamento (CAMPOS et al., 2011). A fadiga tem sido tratada com sucesso com intervenções não farmacológicas, como a terapia cognitivo-comportamental, exercícios, acupuntura, entre outras modalidades. No entanto, a fadiga moderada e grave pode exigir a adição de tratamentos farmacológicos. Uma meta-análise recente relatou que o metilfenidato e a eritropoietina, este último para tratar a anemia induzida pela quimioterapia, parecem oferecer algum benefício aos pacientes fadigados, mas, o tratamento para a fadiga relacionada ao câncer continua insatisfatório (BERRY et al., 2005).

As causas da fadiga parecem ser relacionadas com fatores ambientais, genéticos, fisiológicos e psicológicos, que têm um papel importante na oxigenação, sinalização neuromuscular e no funcionamento do eixo hipotálamo-adrenal-hipofisiário. Muitos estudos sugerem que a elevação de marcadores inflamatórios (principalmente citocinas inflamatórias), que ocorre ao longo da progressão do câncer e também durante a quimioterapia, poderia estar relacionada com a fadiga, principalmente nos estágios iniciais do câncer (SALIGAN; KIM, 2012).

1.5 O uso de suplementos antifadigantes – a exemplo do guaraná (*Paullinia cupana*)

Em indivíduos saudáveis, a fadiga é considerada uma resposta protetora contra o estresse físico e mental e, frequentemente, é aliviada quando o indivíduo descansa. Ao contrário, em pacientes portadores de câncer a fadiga pode ser severa, debilitante e impactar nas atividades de vida diária e na qualidade de vida. Dada a sua natureza multidimensional é difícil uma definição específica de fadiga associada ao câncer. Por este motivo, estudos têm sido conduzidos para averiguar o efeito do tratamento com fármacos específicos que possam minimizar paliativamente a fadiga dos pacientes com câncer ou que estão em quimioterapia. Peuckmann et al. (2010), a partir de uma meta análise de estudos relacionados ao tratamento da fadiga no câncer, chegaram à conclusão de que ainda não se pode recomendar um fármaco específico para tais pacientes. Deste modo, são necessários estudos adicionais e que também busquem identificar fármacos ou produtos naturais que possam minimizar a fadiga relacionada ao câncer.

Com base nestes pressupostos, um estudo recente sugeriu que a administração do guaraná (Figura 4), um fruto amazônico, poderia minimizar os efeitos fadigantes de mulheres com câncer de mama submetidas à quimioterapia (CAMPOS et al., 2010, 2011).



Figura 4 – Guaraná (*Paullinia cupana*) fruto amazônico em que o pó moído e torrado da semente é utilizado como energético

Fonte: Campos et al., 2011.

O guaraná (*Paullinia cupana*) é uma planta nativa da bacia Amazônica. Extratos de sementes torradas têm sido usados em medicamentos e bebidas, desde os tempos pré-colombianos, como estimulantes, afrodisíacos e tonificantes. As propriedades estimulantes do guaraná são relacionadas à presença de cafeína, que compreende 2,5 a 5% do peso seco do extrato, bem como a presença de outros alcalóides como a teofilina e teobromina em pequenas quantidades. As propriedades psicoativas do guaraná têm sido atribuídas a um elevado teor de saponinas e taninos, sendo este último, possivelmente, o responsável pelas propriedades antioxidantes da planta. Em seres humanos, um pequeno estudo randomizado com placebo, utilizando 75mg de guaraná por dia, demonstrou efeitos favoráveis sobre a memória e cognição (SMITH; ATROCH, 2010). Os resultados sobre as propriedades funcionais do guaraná sugerem que seu consumo está vinculado a efeitos biológicos benéficos associados à prevenção de doenças crônicas não transmissíveis. Estudos realizados em modelos experimentais descreveram que o guaraná tem efeito antiplaquetário, antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório e também antitumoral (SMITH; ATROCH, 2010). Uma investigação epidemiológica conduzida por Krewer et al., (2011) também sugeriu que idosos, que habitualmente ingerem guaraná, possuíam menor prevalência de doenças crônico-degenerativas como doenças cardiovasculares, obesidade, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, diabetes mellitus 2 e câncer.

Entretanto, seu consumo deve ser moderado e dependente de orientações médicas em caso dos indivíduos que já apresentem morbidades ou consumam determinados tipos de medicamentos. Uma vez que o guaraná tem sido consumido desde a era pré-colombiana pelos povos amazônicos, o quanto este alimento possui um impacto positivo na chamada “dieta amazônica” é uma questão que precisa ser investigada a partir da integração de estudos populacionais com estudos laboratoriais controlados (SMITH; ATROCH, 2010).

Dois estudos do tipo ensaio clínico foram conduzidos em mulheres que realizavam radioterapia e também mulheres que realizavam quimioterapia e que foram suplementadas com guaraná. Os estudos mostraram que o extrato seco de guaraná administrado na dose de 75 mg/dia, para os pacientes em radioterapia, e de 50 mg/duas vezes ao dia, para pacientes em regime quimioterápico, minimizou a fadiga física e mental destes pacientes (CAMPOS et al., 2010, 2011).

Apesar dos efeitos positivos na fadiga dos pacientes em quimioterapia não existem estudos sobre a potencial interação do guaraná com os quimioterápicos. A este respeito existem poucos estudos. Considerando especificamente o guaraná, uma investigação com ratos tratados concomitantemente com guaraná e almidarona, utilizado no tratamento das arritmias cardíacas, mostrou interação uma vez que a biodisponibilidade da almidarona diminuiu significativamente nos ratos que foram suplementados com guaraná (RODRIGUES et al., 2012). Portanto, estudos complementares para averiguar se o guaraná possui algum tipo de interação com quimioterápicos, podendo influenciar na sua ação antitumoral, necessitam ser conduzidos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* o efeito da suplementação de diferentes concentrações do guaraná na atividade de quimioterápicos usados no tratamento do câncer de mama utilizando as células neoplásicas mamárias MCF-7 como modelo experimental.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o efeito do guaraná na viabilidade celular na taxa de proliferação celular das células MCF7;
- Analisar a influência do guaraná na atividade antitumoral de quimioterápicos que agem na síntese do DNA das células MCF7;
- Analisar a influência do guaraná na atividade antitumoral de quimioterápicos que são inibidores mitóticos das células MCF7;
- Determinar se a influência do guaraná envolve modulação diferencial do metabolismo oxidativo.

ARTIGO 1¹

Os resultados obtidos a partir do presente estudo, junto com a respectiva metodologia são apresentados sob a forma de manuscrito submetido à revista *International Journal of Oncology*.

The influence of guaraná (*Paullinia cupana*) on MCF7 breast cancer cells response to chemotherapeutic drugs

Everaldo Hertz
Francine Carla Cadoná
Alencar Kolinski Machado
Verônica Azzolin
Sabrina Holmrich
Charles Assmann
Pauline Ledur
Euler Esteves Ribeiro
Ivana Beatrice Mânica da Cruz

¹ Artigo submetido à revista *International Journal of Oncology*

THE INFLUENCE OF GUARANÁ (*Paullinia cupana*) ON MCF7 BREAST CANCER CELLS RESPONSE TO CHEMOTHERAPIC DRUGS

Everaldo Hertz¹, Francine Carla Cadoná², Alencar Kolinski Machado¹, Verônica Azzolin¹, Sabrina Holmrich², Charles Assmann³, Pauline Ledur¹, Euler Esteves Ribeiro,⁴ Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,2,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 21, Santa Maria-RS, Brazil. Zipcode: 97105-900.

² Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, Santa Maria-RS, Brazil. Zipcode: 97105-900.

³ Laboratório de Biogenômica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria-RS, Brazil. Zipcode: 97105-900.

⁴ Universidade Aberta da Terceira Idade, Universidade do Estado do Amazonas

Corresponding author: Ivana BM da Cruz. Av Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria-RS, Brazil, Zip Code 97105-900. Phone/Fax: 55-55-32208163, email: ibmcruz@hotmail.com

Key-words: guaraná, antitumoral, chemotherapy, breast cancer, fatigue

Running title: Hertz et al: guaraná effect on breast cancer chemotherapeutic drugs

Abstract

Cancer related fatigue (CRF) is a common phenomenon in patients undergoing chemotherapy and radiotherapy representing a negative impact on functional status and quality of life. Some plants present tonic and anti-fatiguing properties, as guaraná (*Paullinia cupana*) and a previous study described positive effect on CRF of breast cancer patients submitted to chemotherapy. Despite the positive results indicating that guaraná improve CRF, this fruit present bioactive molecule as caffeine and catechin which can to influence the effect of anti-tumor drugs. Therefore, the aim of this study was to evaluate if guaraná changes the viability and antiproliferative effect of seven chemotherapeutic agents currently used in the breast cancer treatment using as *in vitro* experimental model MCF-7 breast cancer cell line. The cells were exposed at 1, 5 and 10 µg/mL guaraná concentrations with and without chemotherapeutics. The main results showed an antiproliferative effect of guaraná at 5 10 µg/mL. The guaraná influence on chemotherapeutic effects was drug-dependent. The guaraná effect on MCF-7 cells viability was heterogeneous and drug-dependent. Different of the results found after 24 hours exposition, the guaraná plus all chemotherapeutic drugs showed a strong antiproliferative effect ($\geq 40\%$ of cell inhibition) on MCF-7 cells after 72 hours of exposition of 10 uM gemcitabine, vinorelbine and methotrexate, 2 uM 5-fluoracil, 50 uM paclitaxel, 200 nM doxorubicin, and 5mM cyclophosphamide. Because chemotherapeutic drugs were affected by guaraná addition most improve the antiproliferative activity, the therapeutic use of guaraná against CRF seems did not affect negatively the chemotherapy. However, *in vitro* protocols present methodological limitations that need to be considered and complementary *in vitro* and *in vivo* investigations need to be performed to evaluate whether chemotherapeutic plus guaraná administration is safe to breast cancer patients.

Introduction

Cancer related fatigue (CRF) prevalence, is a common phenomenon in patients undergoing cytotoxic chemotherapy and radiotherapy with 59-100% prevalence depending on the clinical status of the disease (1). The CRF is also associated with other physical and psychology symptoms, such as pain, sleep disturbance, low physical activity, and depression (2,3) representing a negative impact on functional status and quality of life (4).

Patients with moderate or severe fatigue may benefit from both non-pharmacological and pharmacological interventions including use of psychostimulants as methylphenidate and dexmethylphenidate, modafinil and erythropoietin-stimulating agents when patients with chemotherapy present anemia and hemoglobin levels < 10 g/dL (5). However, the CRF remains unsatisfactory and is important to search for new strategies to minimize this condition.

As some plants used by indigenous communities present tonic and anti-fatiguing properties, investigation to determine their effects on CRF are useful. This is the case of guaraná (*Paullinia cupana*), an Amazon fruit that is commercialized in herbal and energetic beverages due their stimulant properties reported since pre-Columbian period (6).

Since the guaraná is broadly consumed Campos and collaborators performed a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled crossover study to evaluated the effect of guaraná o CRF. The authors supplemented breast cancer patients undergoing systemic chemotherapy with 100 mg/day guaraná powder and found a significant improve on CRF. The study also reported no occurrence of toxic adverse effects as well as sleep disturbs or anxiety and depression in the patients

supplemented with guaraná. For this reason, the authors suggested that guaraná could to be an effective, inexpensive and nontoxic alternative for the CRF treatment (7). A complementary study was also recently published showing that a purified dry extract of guaraná also is effective in treating CRF patients with various solid tumors also treated with chemotherapy (8).

The guaraná effect on CRF probably is related to its chemical composition that includes higher content of purinic alkaloid caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) when compared to other species as including coffee (*Coffea arabica*), tea (*Camellia sinensis*) and yerba-mate (*Ilex paraguariensis*). In addition to caffeine, other purinic alkaloids were found in smaller proportions including theobromine and theophylline (6) and other chemical molecules as tannins, proanthocyanidins with a higher prevalence of catechins and epicatechins (9).

Despite the better results suggesting guaraná effect on CRF of breast cancer patients, the bioactive molecules present in guaraná could also affect the chemotherapy efficacy. The potential antitumoral influence of catechins on breast cancer cells has being extensively described in the literature (10,11). However, the influence of caffeine is more controversial (12). For example, an investigation showed lowering the toxicity of the drug to the MCF-7 breast cancer cells treated with anti-drugs intercalating into DNA. The authors postulated that attenuation on anti-tumor cytotoxicity is related to capacity of caffeine also to intercalate into DNA (13). On the other hand, a study also performed in MCF-7 breast cancer cells treated with paclitaxel described that caffeine supplementation increased the apoptosis induction triggered by the chemotherapeutic drug (14). A recent study also showed that co-

treatment with anticancer agents and 6-selenocaffeine, caffeine chemically modified showed altered the MCF-7 cell viability (15).

Considering these evidences is relevant to test if guaraná could to affects the effect of anti-tumor drugs. Therefore, the aim of this study was to evaluate if guaraná changes the viability and antiproliferative effect of seven chemotherapeutic agents currently used in the breast cancer treatment using as *in vitro* experimental model MCF-7 breast cancer cell line.

Material and Methods

Chemicals. Analytical grade chemicals and reagents were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). The MCF-7 cell line was obtained from American Type Culture Collection (ATCC®). The RPMI 1640 medium culture, fetal bovine serum, heat-inactivated horse serum, penicillin, and streptomycin were purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA); Vacutainer® by BD Diagnostics (Plymouth, UK).

Guaraná extract. The guaraná powder used in the present study was supplied by Western Agropecuary Research Brazilian Enterprise (EMBRAPA), a non-profit Brazilian governmental sector that offer technical support to guaraná production in the Amazonas State. The bioactive compounds present in guaraná powder used were previously determined and described (16). The extract presented 12.240 mg/g of caffeine, 6.733 mg/g of theobromine, 4.336 mg/g total catechins. The concentration of condensed tannin was 16 mg/g. To perform the *in vitro* assay described here, the lyophilized extract was diluted in distilled water and prepared at a concentration of 200 mg/mL. The mixture was infused for 7 min by boiling,

centrifuged (1500 rpm, 15 min) and filtered. The solution was sterilized by filtration (0.20 µM), diluted in distilled water and added in cell culture medium to obtain 1, 5 and 10 µg/mL guaraná concentrations. These concentrations were chosen considering that *in vivo* guaraná supplementation of breast cancer patients was relatively lower 100 mg/day.

Cell culture. MCF-7 cells were cultured in Dulbecco's modified essential medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM l-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acids, 100 units/ml penicillin, and 100 g/ml streptomycin at pH 7.2 in a 5% CO₂ incubator at 37°C. Cell viability was measured using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) cell proliferation assay (17). Cells (1 x 10⁵ cells) were seeded in a 96 well plaque in 200 µL complete culture medium. After overnight adhesion, the medium was exchanged to media containing the treatments with anti-tumor drugs and different guaraná extract concentrations. All experiments were performed in triplicate.

Anti-tumor and guaraná co-administration treatments. The influence of three guaraná concentrations on cytotoxic and antiproliferative effect of seven anti-tumor agents currently used in breast cancer therapy in MCF-7 cells was tested here. Figure 1 shows the main cell cycle action of the chemotherapics.

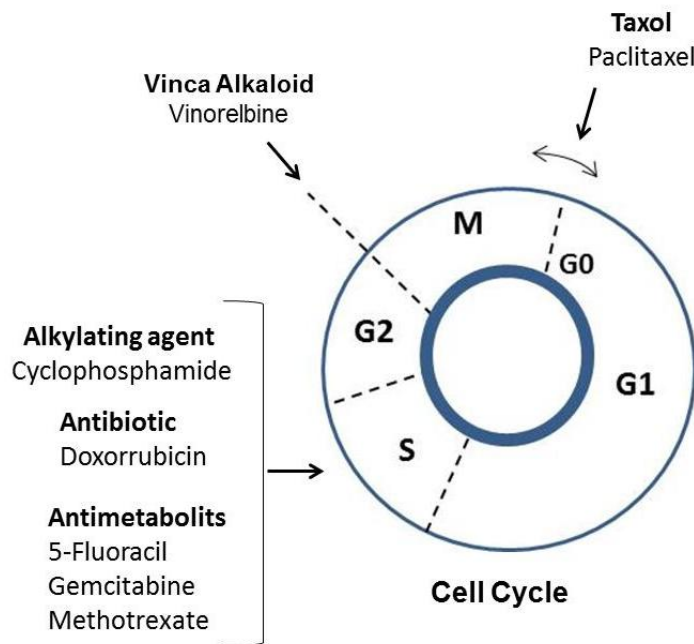


Figure 1 – Chemotherapics used to breast cancer treatments and their cell cycle action

The choice of anti-tumor agents was performed considering previous studies which show cytotoxic effect against MCF-7 breast cancer cell: cyclophosphamide, a nitrogen mustard alkylating agent that forms irreversible DNA crosslinks leading to cell death (18); doxorubicin, a anthracic antibiotic that also presents intercalating DNA effect; 5-fluoracil, a pyrimidine analog that belongs to the family of antimetabolites drugs causing irreversible inhibition of thymidylate synthase and, in consequence cell cycle arrest and apoptosis (19); paclitaxel, a mitotic inhibitor at target tubulin causing defects in mitotic spindle assembly and chromosome segregation (20); vinorelbine, a semi-synthetic vinca alkaloid that has also anti-mitotic effect (21); gemcitabine, a nucleoside analog which add a "faulty" nucleoside during DNA synthesis leading to , cell apoptosis (22); methotrexate, a folic acid analogue that prevents the purine and pyrimidine synthesis leading to inhibition of

DNA, RNA and protein synthesis (23). Based in previous studies which tested the effect of these chemotherapeutic on MCF-7 cells the concentrations of these antitumor agents were: 10 μ M gemcitabine (22), vinorelbine and methotrexate (24), 2 μ M 5-fluoracil (25); 50 μ M paclitaxel (26); 200 nM doxorubicin (19) and 5mM cyclophosphamide (27).

Viability and cell proliferation analysis.

To evaluate the effect of co-administration of guaraná and anti-tumor agents the viability and cell proliferation was determined using the MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay in a similar way described by Fukui et al that studied the effect of resveratrol and paclitaxel co-administration on viability of several cancer cell lines (27) with slight modifications. Ten μ L of MTT (at 5 mg/mL) was added to each well at a final concentration of 500 μ g/mL. After, the mixture in each well was incubated for 1h. The MTT is reduced by mitochondrial dehydrogenase in living cells to produce insoluble purple formazan crystal that is quantitatively measured after its removal from inside cells by 100 μ L DMSO adding (18). However, before the DMSO addition, the treatment samples into 96-well plate were visualized by optic microscopy (400 x) and photographed. The images show living cells with purple formazan and dying cells without this molecule. The absorbance was read at 560 nm. The relative cell viability and/or proliferation of anti-tumor agent and guaraná treatments were expressed as a percentage of the control well that was not treated with drugs. To evaluate the guaraná co-administration on chemotherapeutics effect the results were expressed as a percentage of the each agent tumor agent without guaraná addition. All experiments were performed in triplicate.

Statistical analysis.

The different treatments were compared using Oneway analysis of variance followed by Tukey *post hoc* test. All tests with $p \leq 0.05$ were considered significant

Results

Initially the effect of chemotherapics on MCF-7 viability and cell proliferation was determined to confirm that their concentrations were effective to decrease the viability and cell proliferation (Figure 2). As expected, all chemical drugs tested here decreased significantly the MCF-7 cell viability as well as cell proliferation ($p < 0.01$). The viability effect was similar among all chemotherapics used in the present study. However, the effect on cell proliferation was drug-dependent. Paclitaxel and cyclophosphamide were the chemotherapics that inhibited strongly the MCF-7 cell proliferation ($> 70\%$) when compared to control untreated cell and the others drugs.

The guaraná extract produced from seed toasted used in all protocols had high caffeine content (12.3 mg/g) and also presented theobromine (6.8 mg/g) and total catechins (4.3 mg/g) (Figure 3A, B). Therefore, three low dose of guaraná (1, 5 and 10 $\mu\text{g/mL}$) were choosing to test the effect of this extract on anti-tumor drugs. The isolated effect of guaraná was evaluated before to test its action on MCF-7 cells response to chemotherapic drugs. As can see in Figure 3, the three guaraná concentrations tested here did not present action against MCF-7 cell viability at 24 hours of exposition. On the other hand, an significant effect on MCF-7 cell proliferation was observed in cells exposed to guaraná at 5 and 10 $\mu\text{g/mL}$ concentrations ($p \leq 0.01$).

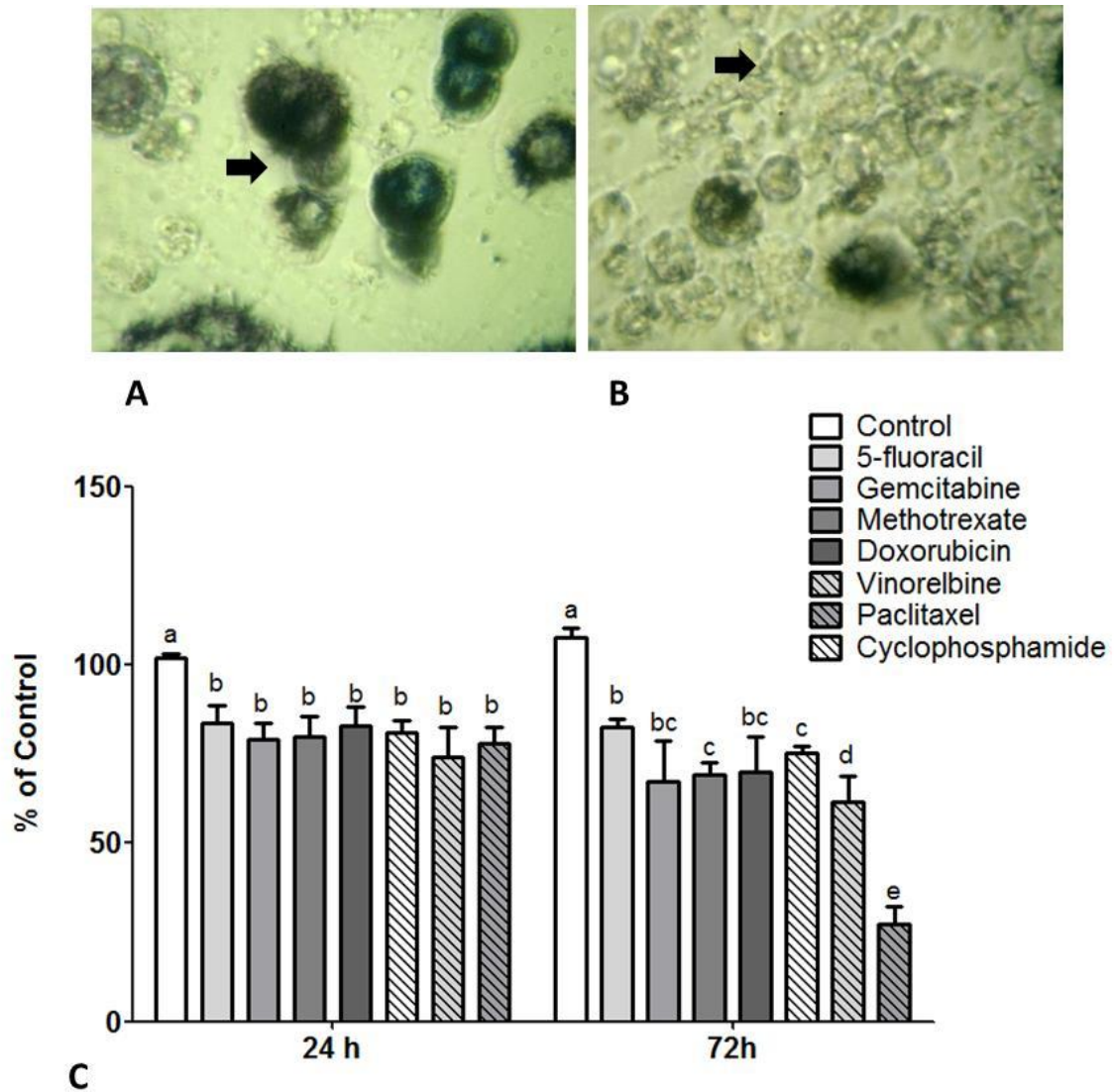


Figure 2 – Chemotherapeutics effect on MCF-7 viability (24 hours) and cell proliferation (72 h). (A) Microphotography of untreated viable MCF-7 cells showing the reaction between MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide that produces formazan, an insoluble molecule with purple color (arrow). (B) Microphotography of dying MCF-7 cells exposed to paclitaxel, showing lower formazan production; (C) MCF-7 viability and cell proliferation of cells exposed to several chemotherapy drugs (data presented as % of control group). Different letters indicate statistical differences at $p < 0.05$ determined by one-way analysis of variance followed by *post hoc* Tukey test.

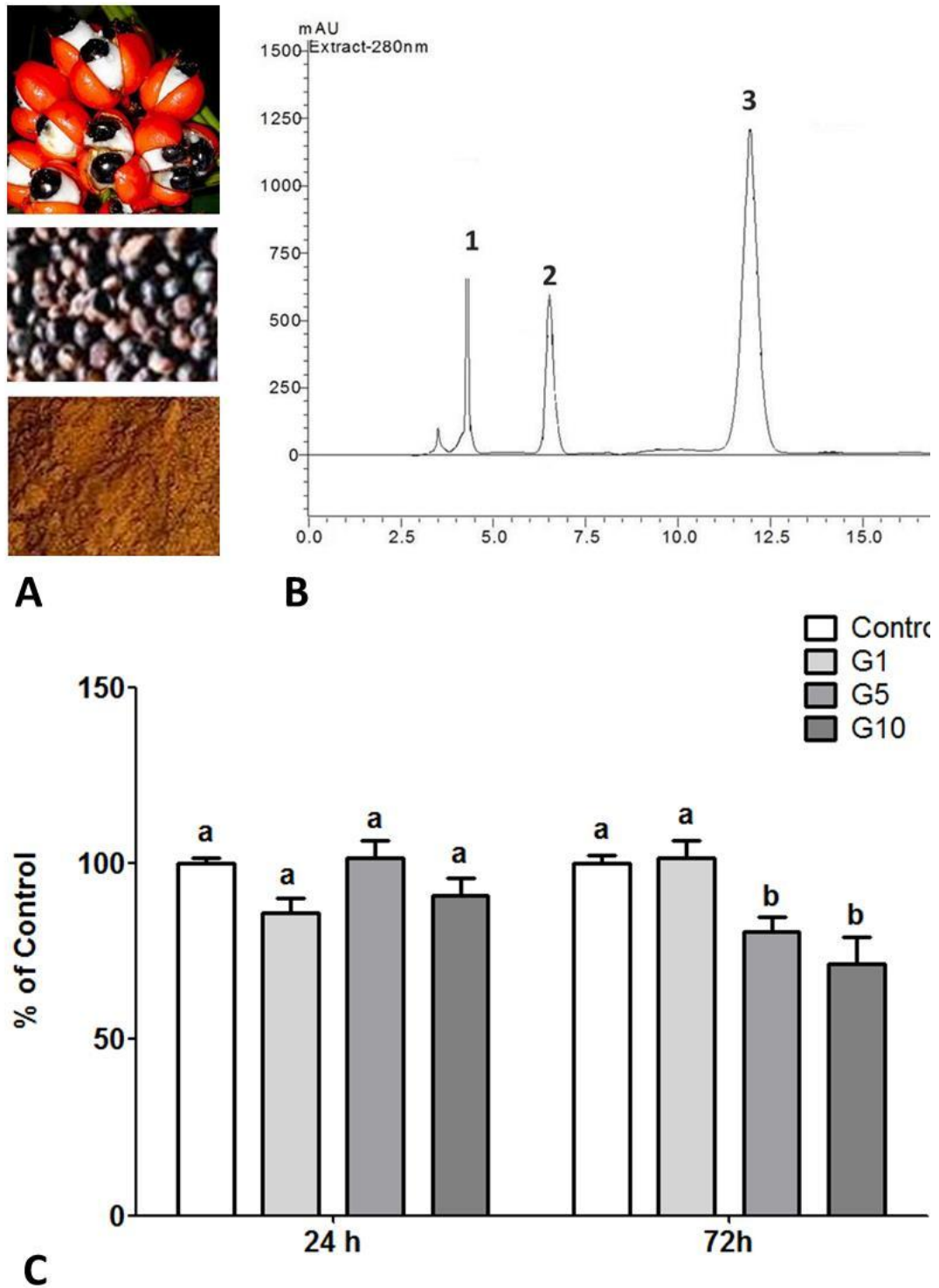


Figure 3 – Guaraná effect on MCF-7 breast cancer cell lines. (A) guaraná powder is produced from toasted and triturate seeds; (B) Chromatography of guaraná hydro-alcoholic extract showing three peaks (1) theobromine; (2) catechins, (3) caffeine; (C) effect of guaraná at different concentrations (1, 5, and 10 µg/mL) in MCF-7 viability (measured after 24 hours exposition) and cell proliferation (measured after 72 hours exposition). Different letters indicate statistical differences at $p < 0.05$ determined by one-way analysis of variance followed by *post hoc* Tukey test.

From these data, the effect of guaraná on the action of chemotherapics in the MCF-7 cells was finally evaluated and the results are presented in Figures 4 and 5. The guaraná did not affect the viability MCF-7 response to cyclophosphamide, gemcitabine paclitaxel after 24 hours exposition (Figure 4 A, B and C). The presence of different guaraná concentrations increased significantly the cytotoxicity caused by 5-fluoracil after 24 h exposition. 5-fluoracil plus guaraná at 5 or 10 $\mu\text{g/mL}$ concentrations killed approximately 50% of MCF-7 cells when compared to untreated control group (Figure 4D).

At contrary, when compared to negative and positive control groups the guaraná increased significantly the MCF-7 cell viability in the methotrexate (Figure 5A), doxorubicin (Figure 5B) and vinorelbine (Figure 5C) treatments, mainly at 5 and 10 $\mu\text{g/mL}$ concentrations concentrations.

Different of the results found after 24 hours exposition, the guaraná plus all chemotherapeutic drugs showed a strong antiproliferative effect on MCF-7 cells after 72 hours of exposition ($p \leq 0.01$). This effect was more intense when cells were exposed to all guaraná concentrations and paclitaxel. The cell proliferation fell around 80% when compared to untreated control group. Cyclophosphamide plus guaraná at 5 $\mu\text{g/mL}$ also was effective to decreased $> 80\%$ MCF-7 cell population when compared to control group (Figure 4 A). In the other antitumor drugs the presence of guaraná inhibited the cell proliferation around 40-50% when compared to negative control groups.

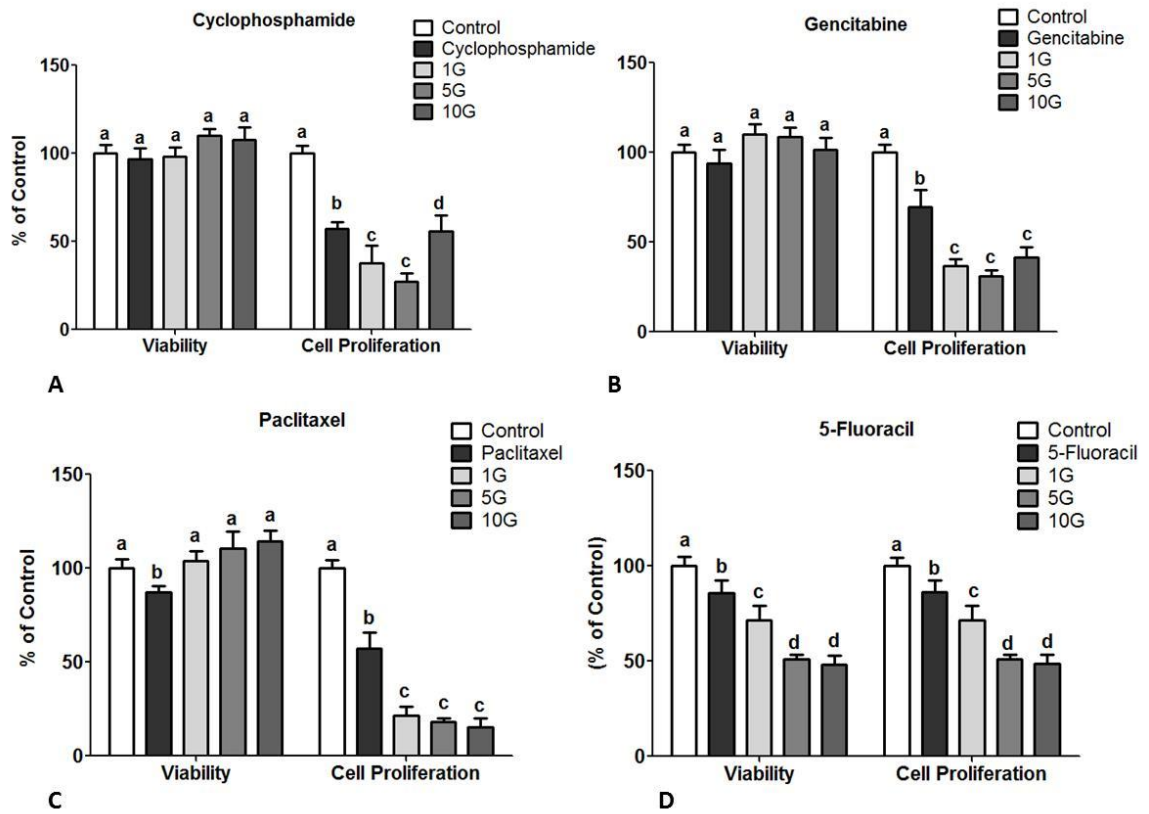


Figure 4 – Guarana effect on antitumoral activity of MCF-7 cells exposed to different chemotherapies. (Guarana concentrations: 1G=1 µg/mL, 5G= 5µg/mL, 10G= 10 µg/mL). Different letters indicate statistical differences at $p < 0.05$ determined by one-way analysis of variance followed by *post hoc* Tukey test

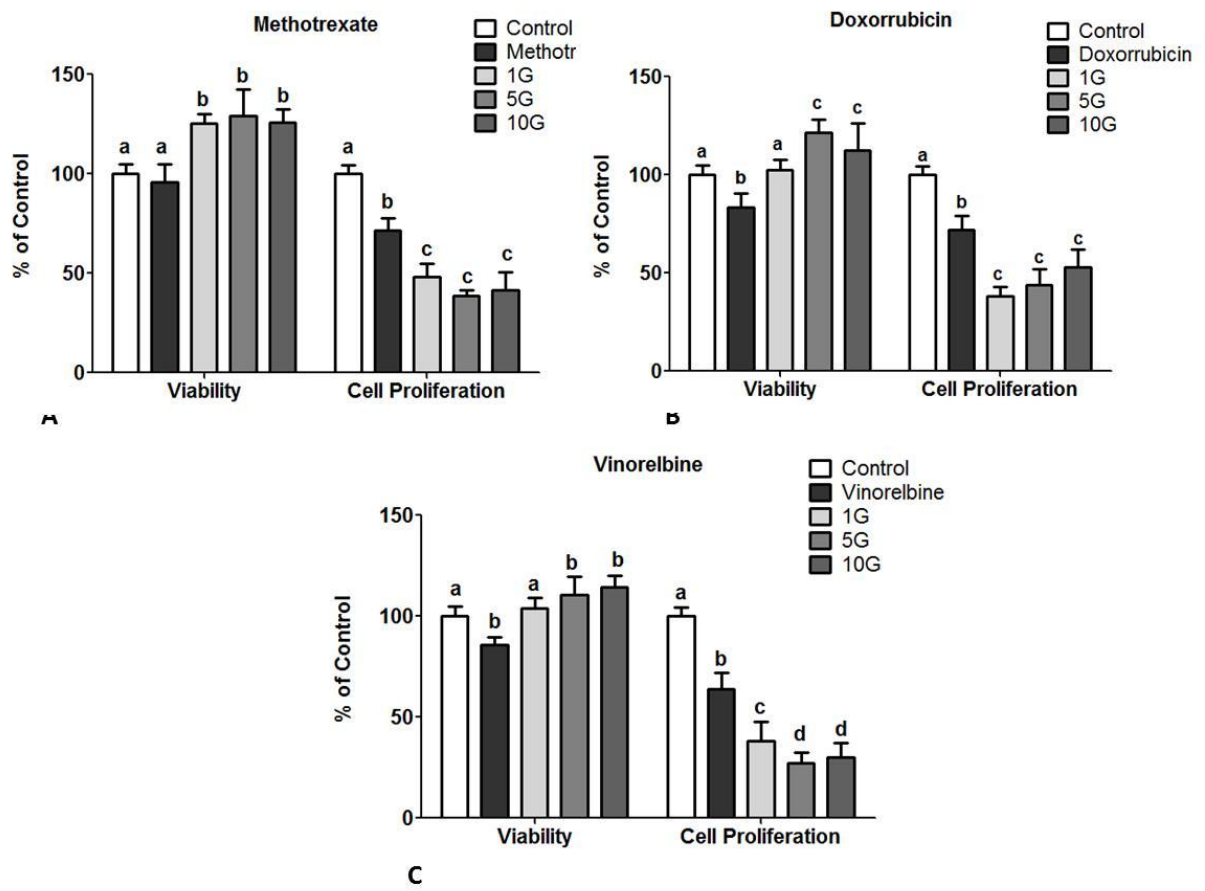


Figure 5 – Guaraná effect on antitumoral activity of MCF-7 cells exposed to different chemotherapics. (Guaraná concentrations: 1G=1 µg/mL, 5G= 5µg/mL, 10G= 10 µg/mL). Different letters indicate statistical differences at $p < 0.05$ determined by one-way analysis of variance followed by *post hoc* Tukey test.

Discussion

The study performed here showed that guaraná at low concentrations is able to modulate differentially the MCF-7 cell proliferation as well as to influence the antitumor properties of seven chemotherapeutic currently used in the breast cancer therapy. In general, the guaraná intensified the antiproliferative effects of all drugs, although the effect on initial cell viability has being more heterogeneous.

Historically, the natural products have being source in development of several antitumor molecules. Plants, marine organisms as well as microorganisms have

originated > 60% of drugs used in current cancer therapy (28). On the other hand, it seems like that plants also can be used to treated adverse effects caused by chemotherapics such as CRF. However, this effect has being less explored than its anticancer action. For this reason, studies searching plants that could minimize CRF are relevant.

This is the case of guaraná, that presents some biological properties described in the literature as anti-inflammatory (29), antidepressive (30), panicolitic effect (31) as well as energetic effect (6) that could help to minimize CRF effect as showed in two previous studies (7,8). However, the literature also has described guaraná antitumoral activity using animal and cell as experimental models (32-34). Since, previous studies suggested that guaraná can be used to improvement CRF collateral effect caused by chemotherapy is relevant the evaluation performed here.

Considering that guaraná is richest in caffeine and also presents catechin in its composition we perform a literature review about the potential effect of caffeine and catechin in MCF-7 cells as well as the effect of these molecules on antitumor drugs response of these cells.

The MCF-7 is a cell line derived by invasive breast ductal carcinoma which presents estrogen and progesterone receptors as well as proliferative response in the presence of progesterone. This cell line can be selected to antitumor resistance involving overexpression of ABCG2 that confers multidrug resistance to tumor cells by extruding a broad variety of chemotherapeutic agents (35). Caffeine the most widely used neuroactive compound in human diet has antiproliferative activity and the ability to induce cell cycle arrest and apoptosis (x).

However, the caffeine effect on anti-tumor drugs seems cell line and drug dependent. Considering MCF-7 the lineage used in the present study, investigations showed caffeine effect on apoptosis enhancing caused by paclitaxel exposition (36), increase in cytotoxic chemotherapeutic effect of alkylating drugs as cyclophosphamide (37) and that caffeine and other xanthines including theophylline, and dyphylline can dramatically decrease ABCG2 protein in MCF-7/MX100 sub-line that presents high breast cancer drug-resistant (x).

On the other hand, Hill, Moriarity and Setzer (38) reported which caffeine can attenuate the cytotoxic effect of intercalating anti-tumor drugs as doxorubicin. The study described a possible interceptor role of caffeine on DNA cancer cells. In fact, we found here a significant increase in MCF-7 cells viability after 24 hours of doxorubicin exposition plus 5 and 10 µg/mL guaraná concentrations. However, this potential procarcinogenic effect was strongly attenuated after 72 hours of exposition. This, apparent contradictory effect can be caused by other bioactive molecules present in guaraná composition, as catechin.

A previous study performed by Seeram, Zhang and Nair (39) described that several catechin and anthocyanin molecules are able to inhibited the proliferation of the cancer cell including MCF-7 line (40). The catechins effect seems to involve the ability of these molecules to increase the expression of pro-apoptotic gene such as caspase-3, -8, -9 and other genes related to apoptotic pathway (40).

Similar study that evaluated specifically the effect of (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) the main catechin presents in green tea on a breast carcinoma cell line resistant to tamoxifen (MCF-7Tam cells) showed cell growth inhibition and dose-dependent apoptosis. After 100 microg/ml EGCG exposition for 24 hours, the Bax

expression increased and Bcl2 expression decrease (41). A recent study also reported that microRNA expression of MCF-7 cells can be affected by green tea, a food richest in catechin and caffeine resulting in carcinogenesis decrease (42). A recent study also reported that microRNA overexpression of MCF-7 cells can be decreased after treatment with polyphenol-60, a catechin obtained from green tea which is a food richest in catechin and caffeine (42). This mechanism of action could to explain the antitumoral effect of these molecules on MCF-7 breast cancer cells.

Despite the evidences showing catechin effects on MCF-7 cells we did not able to find previous studies investigating the effect of these molecules on anti-tumor drug's efficacy. Therefore, a complementary investigation to evaluate if the guaraná has effect on chemotherapeutic action is related to catechin apoptotic and antitumoral genes modulation need to be performed.

Since all chemotherapeutic drugs were affected by guaraná addition most improve the antiproliferative activity after 72 hours of exposition, the therapeutic use of guaraná against CRF seems did not affect negatively the chemotherapy. However, *in vitro* protocols present methodological limitations that need to be considered in the interpretations of results. Complementary *in vitro* investigations evaluating the gene modulation of metabolic routes involved with carcinogenesis as well as studies in animal models could help us to confirm the results described here.

References

1. Weiss J. Cancer-related fatigue: prevalence, assessment and treatment strategies. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* 11(4):441-6, 2011 Aug.
2. Byar KL, Berger AM, Bakken SL, et al. Impact of adjuvant breast cancer chemotherapy on fatigue, other symptoms, and quality of life. *Oncol Nurs Forum* 33: 18-26, 2006.

3. de Jong N, Courtens AM, Abu-Saad HH, et al. Fatigue in patients with breast cancer receiving adjuvant chemotherapy: A review of the literature. *Cancer Nurs* 25:283–297, 2005.
4. Saligan LN, Kim HS. A systematic review of the association between immunogenomic markers and cancer-related fatigue. *Brain Behav Immun*. 2012 26:830-48, 2012.
5. Campos MP, Hassan BJ, Riechelmann R, Del Giglio A. Cancer-related fatigue: a review. *Rev Assoc Med Bras* 57:211-9, 2011
6. Schimpl FC, da Silva JF, Gonçalves JF, Mazzafera P. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *J Ethnopharmacol* 150:14-31, 2013.
7. de Oliveira Campos MP, Riechelmann R, Martins LC, Hassan BJ, Casa FB, Del Giglio A. Guarana (*Paullinia cupana*) improves fatigue in breast cancer patients undergoing systemic chemotherapy. *J Altern Complement Med* 17:505-12, 2011.
8. Del Giglio AB, Cubero Dde I, Lerner TG, Guariento RT, de Azevedo RG, Paiva H, Goldman C, Carelli B, Cruz FM, Schindler F, Pianowski L, Matos LL, Giglio AD. 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* 10:325-34, 2013.
9. Basile, A., Ferrara, L., Pezzo, M.D., Mele, G., Sorbo, S., Bassi, P., Montesano, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *Journal of Ethnopharmacology* 102: 32-36, 2005.
10. Valcic S, Timmermann BN, Alberts DS, Wächter GA, Krutzsch M, Wymer J, Guillén JM. Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on the growth of four selected human tumor cell lines. *Anticancer Drugs* 7:461-8, 1996.
11. Wu AH, Butler LM. Green tea and breast cancer. *Mol Nutr Food Res* 55:921-30, 2011.
12. Jiang W, Wu Y, Jiang X. Coffee and caffeine intake and breast cancer risk: an updated dose-response meta-analysis of 37 published studies. *Gynecol Oncol* 129:620-9, 2013.
13. Hill GM, Moriarity DM, Setzer WN. Attenuation of cytotoxic natural product DNA intercalating agents by caffeine. *Sci Pharm*.79:729-47, 2011.
14. Saunders DE, Lawrence WD, Christensen C, Wappler NL, Ruan H, Deppe G. Paclitaxel-induced apoptosis in MCF-7 breast-cancer cells. *Int J Cancer*. 70:214-20, 1997.
15. Martins IL, Miranda JP, Oliveira NG, Fernandes AS, Gonçalves S, Antunes AM. Synthesis and biological activity of 6-selenocaffeine: potential modulator of chemotherapeutic drugs in breast cancer cells. *Molecules*. 18:5251-64, 2013.
16. Bittencourt LS, Machado DC, Machado MM, Santos GF, Algarve TD, Marinowic DR, Ribeiro EE, Soares FA, Barbisan F, Athayde ML, Cruz IB. The protective

- effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. *Food Chem Toxicol.* 53:119-25, 2013.
17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63, 1983.
 18. Trebunova M, Laputkova G, Slaba E, Lacjakova K, Verebova A. Effects of docetaxel, doxorubicin and cyclophosphamide on human breast cancer cell line MCF-7. *Anticancer Res* 32:2849-54, 2012.
 19. Major PP, Egan EM, Sargent L, Kufe DW. Modulation of 5-FU metabolism in human MCF-7 breast carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 8:87-91, 1982.
 20. Matsuoka H, Furusawa M, Tomoda H, Seo Y. Difference in cytotoxicity of paclitaxel against neoplastic and normal cells. *Anticancer Res* 14:163-7, 1994.
 21. Sugiyama K, Shimizu M, Akiyama T, Ishida H, Okabe M, Tamaoki T, Akinaga S. Combined effect of navelbine with medroxyprogesterone acetate against human breast carcinoma MCF-7 cells in vitro. *Br J Cancer* 77:1737-43, 1998.
 22. Zeybek ND, Inan S, Ekerbicer N, Vatansever HS, Karakaya J, Muftuoglu SF. The effects of Gemcitabine and Vinorelbine on inducible nitric oxide synthase (iNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) distribution of MCF-7 breast cancer cells. *Acta Histochem,* 113(1):62-7, 2011.
 23. Barros S, Mencia N, Rodríguez L, Oleaga C, Santos C, Noé V, Ciudad CJ. The redox state of cytochrome c modulates resistance to methotrexate in human MCF7 breast cancer cells. *PLoS One* 8:e63276, 2013.
 24. Hattangadi DK, DeMasters GA, Walker TD, Jones KR, Di X, Newsham IF, Gewirtz DA. Influence of p53 and caspase 3 activity on cell death and senescence in response to methotrexate in the breast tumor cell. *Biochem Pharmacol.* 68:1699-708, 2004.
 25. Patterson AV, Zhang H, Moghaddam A, Bicknell R, Talbot DC, Stratford IJ, Harris AL. Increased sensitivity to the prodrug 5'-deoxy-5-fluorouridine and modulation of 5-fluoro-2'-deoxyuridine sensitivity in MCF-7 cells transfected with thymidine phosphorylase. *Br J Cancer* 72:669-75, 1995.
 26. Fukui M, Yamabe N, Zhu BT. Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Eur J Cancer.* 46:1882-91, 2010.
 27. Singh N, Nigam M, Ranjan V, Zaidi D, K, Sharma S, Chaturvedi R, Shankar R, Kumar S, Sharma R, Mitra K, Balapure AK, Rath SK. Resveratrol as an adjunct therapy in cyclophosphamide-treated MCF-7 cells and breast tumor explants. *Cancer Sci* 102:1059-67, 2011.
 28. Crag GM and Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol* 100: 72-79, 2005.

29. Campos AR, Barros AI, Santos FA, Rao VS. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. *Phytother Res* 17:1199-202, 2003.
30. Otobone FJ, Sanches AC, Nagae R, Martins JV, Sela VR, de Mello JC, Audi EA. Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. *Phytother Res* 21:531-5, 2003.
31. Roncon CM, Biesdorf de Almeida C, Klein T, de Mello JC, Audi EA. Anxiolytic effects of a semipurified constituent of guaraná seeds on rats in the elevated T-maze test. *Planta Med* 77:236-41, 2011.
32. Fukumasu H, Latorre AO, Zaidan-Dagli ML. *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* 25:11-6, 2011.
33. Fukumasu H, Avanzo JL, Nagamine MK, Barbuto JA, Rao KV, Dagli ML. *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* 41:305-10, 2008.
34. Fukumasu H, da Silva TC, Avanzo JL, de Lima CE, Mackowiak II, Atroch A, de Souza Spinosa H, Moreno FS, Dagli ML. Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.* 233:158-64, 2006.
35. Ifergan I, Shafran A, Jansen G, Hooijberg JH, Scheffer GL, Assaraf YG. Folate deprivation results in the loss of breast cancer resistance protein (ABCG2) expression: a role for BCRP in cellular folate homeostasis. *J Biol Chem* 279: 25527–34, 2004.
36. Saunders DE, Lawrence WD, Christensen C, Wappler NL, Ruan H, Deppe G. Paclitaxel-induced apoptosis in MCF-7 breast-cancer cells *Int J Cancer.* 70:214-20, 1997.
37. Teicher BA, Holden SA, Herman TS, Epelbaum R, Pardee AB, Dezube B. Efficacy of pentoxifylline as a modulator of alkylating agent activity in vitro and in vivo. *Anticancer Res* 11:1555-60, 1991.
38. Hill GM, Moriarity DM, Setzer WN. Attenuation of cytotoxic natural product DNA intercalating agents by caffeine. *Sci Pharm* 79:729-47, 2011.
39. Seeram NP, Zhang Y, Nair MG. Inhibition of proliferation of human cancer cells and cyclooxygenase enzymes by anthocyanidins and catechins. *Nutr Cancer* 46:101-6, 2003.
40. Alshatwi AA. Catechin hydrate suppresses MCF-7 proliferation through TP53/Caspase-mediated apoptosis. *J Exp Clin Cancer Res.* 17;29:16, 2010.

41. Farabegoli F, Papi A, Bartolini G, Ostan R, Orlandi M. (-)-Epigallocatechin-3-gallate downregulates Pg-P and BCRP in a tamoxifenresistant MCF-7 cell line. *Phytomedicine* 17:356-62, 2010.
42. Fix LN, Shah M, Efferth T, Farwell MA, Zhang B. MicroRNA expression profile of MCF-7 human breast cancer cells and the effect of green tea polyphenon-60.

3 DISCUSSÃO

O estudo realizado mostrou que guaraná em baixas concentrações é capaz de modular a proliferação celular em células MCF-7, bem como para influenciar as propriedades antitumorais de sete quimioterápicos atualmente utilizados na terapia do câncer da mama. Em geral, o guaraná intensificou os efeitos antiproliferativos de todos os fármacos, apesar de o efeito sobre a viabilidade celular inicial ter sido mais heterogêneo.

Historicamente, as plantas, organismos marinhos, bem como microrganismos, têm sido a origem no desenvolvimento de várias moléculas antitumorais, cerca de 60% dos fármacos no tratamento do câncer atualmente. Por outro lado, parece que as plantas também podem ser utilizadas para minimizar os efeitos adversos causados pelo tratamento com quimioterápicos, tais como a FRC. No entanto, este efeito tem sido menos explorado do que sua ação anticancerígena. Por esta razão, são relevantes os estudos que investigam por plantas que poderiam minimizar o FRC.

Este é o caso de guaraná, que apresenta algumas propriedades biológicas descritas na literatura como anti-inflamatório (FUKUMASU et al., 2006), antidepressivos (IFERGAN et al., 2004), efeito ansiolítico (RONCON et al., 2011) assim como efeito energético (CAMPOS et al., 2011) que podem ajudar a minimizar o efeito da FRC como mostrado na dois estudos anteriores (DEL GIGLIO et al., 2013 OLIVEIRA CAMPOS et al., 2011). No entanto, a literatura também descreveu a atividade antitumoral guaraná utilizando animais e células como modelos experimentais (HILL; MORIARITY; SETZER, 2011; SEERAM; ZHANG; NAIR, 2003; TEICHER et al., 1991). Desde então, os estudos anteriores sugeriram que guaraná pode ser utilizado para tratar efetivamente a FRC, pois os efeitos colaterais causados pela quimioterapia são relevantes.

Considerando-se que o guaraná é rico em cafeína e catequina na sua composição, realizou-se uma revisão da literatura sobre o potencial efeito da cafeína e da catequina em células MCF-7, bem como o efeito dessas moléculas na resposta associada às drogas antitumorais nestas células. O MCF-7 é uma linha celular derivada de carcinoma da mama ductal invasivo, que apresenta receptores de

estrogênio e progesterona, bem como da resposta proliferativa, na presença de progesterona.

Esta linhagem de células apresentou uma resistência antitumoral envolvendo a super expressão de ABCG2 que confere sobrevivência às células tumorais quando expostas a múltiplas drogas, através da extrusão de uma ampla variedade de agentes quimioterápicos (ALSHATWI, 2010).

A cafeína, o composto neuroativo mais amplamente utilizado na dieta humana, tem uma atividade antiproliferativa e a capacidade para induzir a parada do ciclo celular e apoptose (VALCIC, 1996). No entanto, o efeito da cafeína juntamente com as drogas antitumorais parece ser dependente do tipo de fármaco.

Considerando-se a linhagem de células MCF-7 utilizada no presente estudo, os resultados mostraram um efeito sinérgico da cafeína na apoptose, causada pela exposição conjunta ao fármaco paclitaxel (JIANG; WU; JIANG, 2013), aumento no efeito citotóxico de fármacos alquilantes como ciclofosfamida (MOSMANN, 1983), e que a cafeína e outras xantinas, incluindo teofilina e a difilina, podem diminuir drasticamente a proteína ABCG2 em MCF-7/MX100 sub linha que apresenta elevada resistência a fármacos no câncer de mama (JIANG; WU; JIANG, 2013) .

Por outro lado, Hill, Moriarity e Setzer (2011) relataram que a cafeína pode atenuar o efeito citotóxico, intercalando fármacos antitumorais, como a doxorrubicina. O estudo descreveu um possível papel interceptor da cafeína no DNA em células de câncer.

Na verdade, verificou-se aqui um aumento significativo na viabilidade celular da linhagem de células MCF-7, após 24 horas de exposição à doxorrubicina na presença das concentrações de 5 e 10 ug/mL do guaraná. No entanto, este potencial efeito pró-carcinógeno foi fortemente atenuado após 72 horas de exposição. Este aparente efeito contraditório pode ser causado por outras moléculas bioativas presentes na composição de guaraná, como as catequinas ou também por um atraso no processo de apoptose que geralmente é desencadeado pelos fármacos aqui testados.

Um estudo anterior, realizado por Seeram, Zhang e Nair (2003) descreveu que várias moléculas de catequinas e antocianinas são capazes de inibir a proliferação de células cancerígenas, incluindo MCF-7 linha.

O efeito das catequinas parece envolver a capacidade destas moléculas para

aumentar a expressão de genes pró-apoptóticos tais como as caspases 3, 8, 9 e outros genes relacionados com a via de apoptose (ALSHATWI, 2010). Estudo semelhante, avaliou especificamente o efeito da epigallocatequina-3-galato (EGCG), principal catequina presente no chá verde em uma linha de células de carcinoma da mama resistente ao tamoxifeno (células MCF - 7Tam) mostraram a inibição do crescimento celular e dose-dependente apoptose . Depois de 100 mcg /ml EGCG em uma exposição por 24 horas, houve a expressão aumentada do Bax e diminuição da expressão do Bcl2 (FARABEGOLI et al., 2010).

Um estudo recente relatou também que a expressão de micro RNA de células MCF-7 pode ser afetada por chá verde, um alimento mais rico em catequina e cafeína resultando em diminuição da carcinogênese (VALCIC et al., 1996). Nesta mesma linha de estudos foi relatado, também, que a superexpressão de microRNA de células MCF-7 pode ser reduzido após tratamento com o polifenol-60, uma catequina obtida a partir de chá verde, que é um alimento rico em catequina e cafeína (ESMANN et al., 2004). Este mecanismo de ação poderia explicar o efeito antitumoral destas moléculas em células MCF-7 de câncer de mama. Apesar das evidências dos efeitos das catequinas em células MCF-7 não se encontrou em estudos anteriores que investigassem o efeito dessas moléculas sobre a eficácia dos quimioterápicos.

Portanto, uma investigação complementar para avaliar se o guaraná tem efeito sobre a ação dos quimioterápicos está relacionada com as catequinas e modulação apoptótica e antitumoral necessita ser investigada.

Como todos os quimioterápicos foram afetados pela adição de guaraná, melhorando a atividade antiproliferativa destes após 72 horas de exposição, o uso terapêutico de guaraná contra a FRC parece não afetar negativamente a quimioterapia. No entanto, protocolos *in vitro* apresentam limitações metodológicas que precisam ser consideradas nas interpretações dos resultados. Investigações complementares *in vitro* que avaliem a modulação gênica de vias metabólicas envolvidas com a carcinogênese, bem como estudos em modelos animais poderiam ajudar a confirmar os resultados descritos aqui.

4 CONCLUSÃO

Este estudo investigou o efeito *in vitro* do guaraná sobre a ação tumoral de sete quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer de mama em células MCF-7.

Os resultados mostraram que:

- o guaraná, independente dos quimioterápicos, possui ação antitumoral nas células MCF-7;
- o efeito do guaraná na viabilidade das células MCF-7 expostas aos quimioterápicos foi heterogêneo e dependente do tipo de fármaco;
- o guaraná potencializou o efeito antiproliferativo de todos os quimioterápicos testados;

O conjunto dos resultados indicou que o guaraná interage com os quimioterápicos e esta questão tem que ser considerada caso o mesmo seja utilizado no tratamento da fadiga causada pela quimioterapia, como foi proposto por trabalhos prévios publicados na literatura.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, G. M.; DUARTE, T. L.; STEWARD, W. P.; JONES, G. D. Detection of oxaliplatin-induced DNA crosslinks in vitro and in cancer patients using the alkaline comet assay. **DNA Repair** (Amst), v. 5, n. 2, p. 219-25, 2006.

ALSHATWI, A. A. Catechin hydrate suppresses MCF-7 proliferation through TP53/Caspase-mediated apoptosis. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 17, n. 29, p. 167, 2010.

ASH, S. J.; COSTA, J.; EMANUEL, J. R. PicoGreen quantification of DNA: effective evaluation of samples pré- or post-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 2623-5, 1996.

BARROS, S.; MENCIA, N.; RODRÍGUEZ, L.; OLEAGA, C.; SANTOS, C.; NOÉ, V.; CIUDAD, C. J. The redox state of cytochrome c modulates resistance to methotrexate in human MCF7 breast cancer cells. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63276, 2013.

BASS, D. A.; PARCE, J. W.; DECHATELET, L. R.; SZEJDA, P.; SEEDS, M. C.; THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **The Journal of Immunology**, v. 130, p. 1910-7, 1983.

BERRY, D. A.; CRONIN, K. A.; PLEVRITIS, S. K. Effect of screening and adjuvant therapy and mortality from breast cancer. **N Engl J Med**, v. 353, p. 1784-92, 2005.

BINKLEY, J. M.; HARRIS, S. R.; LEVANGIE, P. K.; PEARL, M.; GUGLIELMINO, J.; KRAUS, V.; ROWDEN, D. Patient perspectives on breast cancer treatment side effects and the prospective surveillance model for physical rehabilitation for women with breast cancer. **Cancer**, v. 118, n. 8 (Suppl), p. 2207-16, 2012.

BITTENCOURT, L. S.; MACHADO, D. C.; MACHADO, M. M.; SANTOS, G. F.; ALGARVE, T. D.; MARINOWIC, 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 sodium nitroprusside. **Food Chem Toxicol**, v. 53, p. 119-25, 2013.

CAMPOS, M. P.; HASSAN, B. J.; RIECHELMANN, R.; DEL GIGLIO, A. Cancer-related fatigue: a review. **Rev Assoc Med Bras**, v. 57, n. 2, p. 211-9, 2011.

CHABNER, B. A.; CALABRESI, P. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. (Eds.). **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 1995, p. 903-49.

CHABNER, B. A.; LONGO, L. **Cancer chemotherapy and biotherapy**. 2. ed., Filadélfia: Lippincott-Raven, 1996.

COSTA KREWER, C.; RIBEIRO, E. E.; RIBEIRO, E. A.; MORESCO, R. N.; UGALDE MARQUES DA ROCHA, M. I.; SANTOS MONTAGNER, G. F.; MACHADO, M. M.; VIEGAS, K.; BRITO, E.; CRUZ, I. B. Habitual intake of guaraná and metabolic morbidities: an epidemiological study of an elderly amazonian population. **Phytother Res**, Feb., 2011.

COSTA MIRANDA, V.; TRUFELLI, D. C.; SANTOS, J.; CAMPOS, M. P.; NOBUO, M.; COSTA MIRANDA, M.; SCHLINDER, F.; RIECHELMANN, R.; DEL GIGLIO, A. Effectiveness of guaraná (*Paullinia cupana*) for postradiation fatigue and depression: results of a pilot double-blind randomized study. **J Altern Complement Med**, v. 15, n. 4, p. 431-3, Apr 2009.

CRISCITIELLO, C.; METZGER-FILHO, O.; SAINI, K. S.; CASTRO JR, G.; DIAZ, M.; LA GERCHE, A.; AZAMBUJA, E.; PICCART-GEBHART, M. J. Targeted therapies in breast cancer: are heart and vessels also being targeted? **Breast Cancer Res**, v. 14, n. 3, p. 209, 2012.

ESSMANN, F.; ENGELS, I. H.; TOTZKE, G.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; JÄNICKE, R. U. Apoptosis resistance of MCF-7 breast carcinoma cells to ionizing radiation is independent of p53 and cell cycle control but caused by the lack of caspase-3 and a caffeine-inhibitable event. **Cancer Res**, a.1, v. 64, n. 19, p. 7065-72, 2004.

FARABEGOLI, F.; PAPI, A.; BARTOLINI, G.; OSTAN, R.; ORLANDI, M. (-)-Epigallocatechin-3-gallate downregulates Pg-P and BCRP in a tamoxifen resistant MCF-7 cell line. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 356-62, 2010.

FISHER, R.; PUSZTAI, L.; SWANTON, C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. **Br J Cancer**, v. 108, n. 3, p. 479-85, 2013.

FOTEDAR, R.; DIEDERICH, L.; FOTEDAR, A. Apoptosis and the cell cycle. **Prog Cell Cycle Res**, v. 2, p. 147-63, 1996.

HÁ, T. T. N.; HUYNH, N. T.; MURAO, L. A.; LUAN, N. T. P.; THUY, T. T.; TUAN, H. M.; NGA, C. T. P.; TUONG, V. V.; DAT, T. V.; KIKUCHI, M.; YASUNAMI, M.; MORITA, K.; HUONG, V. T. Q.; HIRAYAMA, K. Elevated Levels of Cell-free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. **Plos One**, v. 6, p. 1-7, 2011.

HASHIMOTO, Y. A brief overview of apoptosis. **Hum Cell**, v. 9, n. 3, p. 194-6, 1996.

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

KESKIN, O.; BAHAR, I.; JERNIGAN, R. L.; BEUTLER, J.A.; SHOEMAKER, R.H.; SAUSVILLE, E.A.; COVELL, D.G. Characterization of anticancer agents by their growth inhibitory activity and relationships to mechanism of action and structure. **Anticancer Drug Des**, v. 15, n. 2, p. 79-98, 2000.

LAUBENBACHER, R.; HOWER, V.; JARRAH, A.; TORTI, S. V.; SHULAEV, V.; MENDES, P.; TORTI, F. M.; AKMAN, S. A systems biology view of cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1796, n. 2, p. 129-39, Dec. 2009.

MAJOR, P. P.; EGAN, E. M.; SARGENT, L.; KUFER, D. W. Modulation of 5-FU metabolism in human MCF-7 breast carcinoma cells. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 8, n. 1, p. 87-91, 1982.

MATSUOKA, H.; FURUSAWA, M.; TOMODA, H.; SEO, Y. Difference in cytotoxicity of paclitaxel against neoplastic and normal cells. **Anticancer Res**, v. 14, n. 1A, p. 163-7, 1994.

PATTERSON, A. V.; ZHANG, H.; MOGHADDAM, A.; BICKNELL, R.; TALBOT, D. C.; STRATFORD, I. J.; HARRIS, A. L. Increased sensitivity to the prodrug 5'-deoxy-5-fluorouridine and modulation of 5-fluoro-2'-deoxyuridine sensitivity in MCF-7 cells transfected with thymidine phosphorylase. **Br J Cancer**, v. 72, n. 3, p. 669-75, 1995.

PEUCKMANN, V.; ELSNER, F.; KRUMM, N.; TROTTENBERG, P.; RADBRUCH, L. Pharmacological treatments for fatigue associated with palliative care. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 10, n. 11, Nov. 2010.

RODRIGUES, M.; ALVES, G.; LOURENÇO, N.; FALCÃO, A. Herb-Drug Interaction of *Paullinia cupana* (Guarana) Seed Extract on the Pharmacokinetics of Amiodarone in Rats. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2012, p. 428560, 2012.

RONCON, C. M.; BIESDORF, D. E.; ALMEIDA, C.; KLEIN, T.; DE MELLO, J. C.; AUDI, E. A. Anxiolytic effects of a semipurified constituent of guaraná seeds on rats in the elevated T-maze test. **Planta Med.** v. 77, n. 3, p. 236-41, 2011.

SALEHI, H.; MIDDENDORP, E.; PANAYOTOV, I.; COLLART DUTILLEUL, P. Y.; VEGH, A. G.; RAMAKRISHNAN, S.; GERGELY, C.; CUISINIER, F. Confocal Raman data analysis enables identifying apoptosis of MCF-7 cells caused by anticancer drug paclitaxel. **J Biomed Opt**, v. 18, n. 5, p. 56010, May 2013.

SALIGAN, L. N.; KIM, H. S. A systematic review of the association between immunogenomic markers and cancer-related fatigue. **Brain Behav Immun**, v. 26, n. 6, p. 830-48, 2012.

SALMONM, S. E. In: KATZUNG, B. G. (Ed.). **Farmacología Básica & Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 629-55.

SEERAM, N. P.; ZHANG, Y.; NAIR, M. G. Inhibition of proliferation of human cancer cells and cyclooxygenase enzymes by anthocyanidins and catechins. **Nutr Cancer**, v. 46, n. 1, p. 101-6, 2003.

SINGH, N.; NIGAM, M.; RANJAN, V.; ZAIDI, D.; GARG, V. K.; SHARMA, S.; CHATURVEDI, R.; SHANKAR, R.; KUMAR, S.; SHARMA, R.; MITRA, K.; BALAPURE, A. K.; RATH, S. K. Resveratrol as an adjunct therapy in cyclophosphamide-treated MCF-7 cells and breast tumor explants. **Cancer Sci**, v. 102, n. 5, p. 1059-67, 2011.

SMITH, N.; ATROCH, A. L. Guaraná's Journey from Regional Tonic to Aphrodisiac and Global Energy Drink. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 7, n. 3, p. 279-82, Sep. 2010.

SOLIMAN, H. Immunotherapy strategies in the treatment of breast cancer. **Cancer Control**, v. 20, n. 1, p. 17-21, 2013.

SPENCE, R. A. J.; JONHSTON, P. G. In: JONHSTON, P. G. (Ed.). **Oncology**. Oxford: Oxford University Press, 2001, p. 1-14, 121-32.

STORY, M.; KODYM, R. Signal transduction during apoptosis; implications for cancer therapy. **Front Biosci**, v. 23, n. 3, p. d365-75, 1998.

SUGIYAMA, K.; SHIMIZU, M.; AKIYAMA, T.; ISHIDA, H.; OKABE, M.; TAMAOKI, T.; AKINAGA, S. Combined effect of navelbine with medroxyprogesterone acetate against human breast carcinoma MCF-7 cells in vitro. **Br J Cancer**, v. 77, n. 11, p. 1737-43, 1998.

TREBUNOVA, M.; LAPUTKOVA, G.; SLABA, E.; LACJAKOVA, K.; VEREBOVA, A. Effects of docetaxel, doxorubicin and cyclophosphamide on human breast cancer cell line MCF-7. **Anticancer Res**, v. 32, n. 7, p.: 2849-54, 2012.

VALCIC, S.; TIMMERMANN, B. N.; ALBERTS, D. S.; WÄCHTER, G. A.; KRUTZSCH, M.; WYMER, J.; GUILLÉN, J. M. Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on the growth of four selected human tumor cell lines. **Anticancer Drugs**, v. 7, n. 4, p. 461-8, 1996.

VILLUNGER, A.; STRASSER, A. Does "death receptor" signaling play a role in tumorigenesis and cancer therapy? **Oncol Res**, v. 10, n. 11-12, p. 541-50, 1998.

WANG, K.; WU, X.; WANG, J.; HUANG, J. Cancer stem cell theory: therapeutic implications for nanomedicine. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 899-908, 2013.

ZEYBEK, N. D.; INAN, S.; EKERBICER, N.; VATANSEVER, H. S.; KARAKAYA, J.; MUFTUOGLU, S. F. The effects of Gemcitabine and Vinorelbine on inducible nitric oxide synthase (iNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) distribution of MCF-7 breast cancer cells, 2009. **Acta Histochem**, v. 113, n. 1, p. 62-7, 2011.