

**FERNANDA PAULA DE CARVALHO**

**Avaliação da expressão gênica de vias pró-apoptóticas em células-tronco tumorais de linhagem de câncer de mama triplo-negativo tratadas com o fitoestrógeno genisteína, doxorrubicina e radiação ionizante**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutorado em Ciências.

Área de concentração: Genética.

Orientação: Prof. Dr. Houtan Noushmehr.

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

#### **FICHA CATALOGRÁFICA**

CARVALHO, Fernanda Paula.

Avaliação da expressão gênica de vias pró-apoptóticas em células-tronco tumorais de linhagem de câncer de mama triplo-negativo tratadas com o fitoestrógeno genisteína, doxorrubicina e radiação ionizante / Fernanda Paula de Carvalho; Orientador: Houtan Noushmehr. - Ribeirão Preto, 2016.

130 f. : il. 30 cm

Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão/USP, 2016.

1. Câncer de mama. 2. Genisteína. 3. Apoptose. 4. Células-tronco tumorais. 5. Expressão gênica.

### **APOIO E SUPORTE FINANCEIRO**

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP
- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP/USP
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP
- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – HCFMRP/USP

***Dedico este trabalho aos meus  
zelosos pais Fernando e Nilza.  
Obrigada por mudarem minha vida  
ao aceitarem ser minha família!***

## **Agradecimentos**

*To **Prof. Dr. Houtan Noushmehr**, my current supervisor, thanks you for the support and kindness in receiving me in his research group. It's of great importance the work being developed at OMICs group, and for me it is extremely rewarding to be part of this team now. Thank you so much!*

Ao **Prof. Dr. Daniel Guimarães Tiezzi**, meu orientador durante a maior parte deste trabalho, agradeço imensamente o apoio, a confiança e os valiosos ensinamentos, sobretudo, por me acolher com tanta simpatia e atenção. Não há palavras para descrever o quanto me sinto privilegiada por ter sido sua aluna! Obrigada por tudo!

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Catarina Satie Takahashi**, minha orientadora no início deste trabalho, agradeço pelo apoio, inspiração e ensinamentos que permitiram meu crescimento pessoal e acadêmico. Muito obrigada!

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Tirapelli** e ao **Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Jr.**, docentes responsáveis pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP/USP, agradeço pelo apoio, carinho e gentileza em oferecer o laboratório para a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior**, chefe do Departamento de Genética da FMRP/USP, pela atenção e apoio despendidos.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvana Giuliatti**, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP/USP, pela gentileza e cuidado.

Ao **Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares**, ex-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP/USP, pela simpatia e consideração.

Aos **Membros da Banca Examinadora**, pela disposição em analisar este trabalho e trazer importantes contribuições.

Às secretárias do Departamento de Genética **Susie Adriana Penha Nalon** e **Silvia Helena Costa**, pela grande ajuda, atenção e amizade.

Aos secretários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP/USP **Gabriela Sica Oliveira, Reinaldo Tavares, Suelen Bezerra e Rosane Casula** pelo apoio, carinho e bom humor.

Aos **funcionários e estagiários** da Central de Quimioterapia do HCFMRP/USP, pela gentileza em fornecer a droga doxorubicina.

Ao **Dr. Leonardo L. Amaral**, físico médico do Serviço de Radioterapia do HCFMRP/USP, à **Dr<sup>a</sup>. Ana Silvia Gouvêa de Lima**, especialista no Laboratório de Hematologia Experimental do HCFMRP/USP, e à **Dr<sup>a</sup>. Bárbara Santana**, especialista no Laboratório de Hematologia do HCFMRP/USP, agradeço pela disposição em ajudar na irradiação das culturas celulares.

À **Fabiana Rossetto de Moraes**, técnica no Centro de Citometria de Fluxo da FCFRP/USP, por ajudar na aquisição dos dados de Ciclo Celular e Apoptose, e nas análises usando o *software* ModFit®.

À **Denise B. Ferraz**, especialista no setor de Citometria de Fluxo do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP/USP, agradeço pela grande ajuda na padronização e aquisição das células-tronco tumorais utilizando FACS.

À equipe técnica formada por **Dr<sup>a</sup>. Renata Sicchieri, M.Sc. Luana Lourenço e Dr. Fermino Neto**, do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP/USP, agradeço não somente pelo suporte técnico e científico, os quais foram fundamentais para realizar este trabalho, mas principalmente pelo carinho, amizade e pela convivência alegre e divertida!

Aos experientes colegas **Rodolfo Serafim e Luís Fernando**, mestrandos da UNESP-Araraquara em colaboração com o Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP/USP, agradeço pela gentileza em fornecer iodeto de propídio, e pela disposição em tirar minhas dúvidas em vários experimentos. Aprendi muito com vocês!

À **Carmen Pontes**, pós-doutoranda do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP/USP, agradeço pelos conselhos e ensinamentos.

À **Camila Ferreira** e **Thatiane Malta**, pós-doutorandas do Laboratório OMIcs do Departamento de Genética da FMRP/USP, pela grande ajuda nos cálculos e na correção do texto.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, **Andressa Romualdo**, **Heriton Marcelo**, **Jairo Pinheiro**, **Lidiane Martins**, **Renata Collares** e **Vagner Schiavoni**, pelas piadas e histórias engraçadas... Pelas discussões políticas, filosóficas, econômicas e acadêmicas... Pelos momentos agradáveis tomando café!

Aos colegas do Laboratório OMIcs do Departamento de Genética da FMRP/USP, **André Pessoni**, **Cássio Henrique**, **Felipe Segato**, **Mikely Silva**, **Thais Sarraf**, **Tiago Chedraoui**, **Tiago Mendes** e **Victor Toledo**, pelo clima descontraído, pela disposição em ajudar, pelo *collegiality*!

Aos técnicos **Luiz Augusto Costa Júnior** e **Sueli Neves**, e colegas do Laboratório de Citogenética e Mutagenese do Departamento de Genética da FMRP/USP, **Ana Paula Montaldi**, **Andrés Felipe**, **Danilo Xavier**, **Flávia Donaires**, **Fernanda Caetano**, **Giovana Leandro**, **João Paulo**, **Leonardo Franchi**, **Paula Takahashi**, **Paulo Godoy**, **Verônica Santana** e **Willian Castillo**, pela boa convivência e cooperação no início deste trabalho.

A **Willian Abraham** e **Fernanda Marques** pela força, carinho, amizade e companheirismo dentro e fora do laboratório. Nunca conseguirei retribuir toda essa energia! Agradeço por ter amigos tão especiais como vocês! ♥

Às companheiras de apartamento, **Lidiane**, **Maria Alice** e **Vanessa**, por compartilharmos tantas histórias e momentos importantes das nossas vidas. Vocês são muito fofas!

Aos amigos **Mariza & Mike**, pela alegria, força e carinho que me impulsionaram nessa jornada.

A **Blanca Aquino** e **Dania Conde**, por nossa amizade “à distância” crescer cada vez mais! Agradeço pelas palavras de apoio e carinho, sempre!

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho,  
**MUITO OBRIGADA!**

CARVALHO, F. P. **Avaliação da expressão gênica de vias pró-apoptóticas em células-tronco tumorais de linhagem de câncer de mama triplo-negativo tratadas com o fitoestrógeno genisteína, doxorrubicina e radiação ionizante.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutor em Ciências (Genética).

Data:

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_.

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_.

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_.

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_.

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_.

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_.

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_.

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_.

## RESUMO

CARVALHO, F. P. **Avaliação da expressão gênica de vias pró-apoptóticas em células-tronco tumorais de linhagem de câncer de mama triplo-negativo tratadas com o fitoestrógeno genisteína, doxorrubicina e radiação ionizante.** 2016. 130 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 2016.

**Introdução:** A resistência do câncer de mama (CM) ao tratamento quimio/radioterápico convencional ainda representa um grande desafio, especialmente em carcinomas triplo-negativos, os quais não expressam receptores de estrogênio, receptores de progesterona e oncogene (*HER2*)/*neu*. Sabe-se que o grau de resistência do CM está fortemente associado à quantidade de células-tronco tumorais (CTTs), as quais podem ser detectadas por imunofenotipagem (CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>). As CTTs são quiescentes e apresentam inibição de vias pró-apoptóticas. Vários compostos naturais apresentam atividade antitumoral, dentre os quais o fitoestrógeno da soja genisteína (GEN) destaca-se como amplo inibidor de tirosino-quinases. Contudo os efeitos biológicos da GEN quanto à presença de CTTs ainda são pouco conhecidos, especialmente quando associada a outros quimioterápicos. **Objetivos:** Avaliar os efeitos citotóxicos do fitoestrógeno GEN em populações de CTTs e não-CTTs, aliado ao tratamento *in vitro* com radiação ionizante (RAD) e doxorrubicina (DXR) na linhagem de CM triplo-negativo MDA-MB-231. **Metodologia:** Foram empregados esquemas de pré-tratamento (GEN + DXR e GEN + RAD) e pós-tratamento (DXR + GEN e RAD + GEN), utilizando 1 - 5 µM de GEN por 24h, 1 ng/mL de DXR por 24h e 5 -10 Gy de RAD, sendo os experimentos realizados após 24h de irradiação. Ao final de cada tratamento, foram avaliados viabilidade celular, grau de sinergia, ciclo celular, apoptose e quantidade de células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>. Além disso, foi feita a aquisição de células CTTs e não-CTTs a fim de analisar a expressão gênica de vias apoptóticas. O estudo investigou os mesmos parâmetros na linhagem de CM hormônio-positivo MCF-7. **Resultados:** O tratamento com GEN 1 µM por 24h provocou apoptose significativa em MDA-MB-231 por bloqueio em fase G2/M, porém o aumento da dose também não alterou a viabilidade e a população CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>. Células MCF-7 mostraram-se resistentes à GEN, pela indução da fase S, mas foram sensíveis à RAD, pelo bloqueio em fase G0/G1. O aumento da dose de GEN nos tratamentos combinados com DXR produziu aumento na sinergia. O pré-tratamento GEN 5 µM + DXR 1 ng/mL induziu expressão de genes apoptóticos em células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>, mas não reduziu a viabilidade. **Conclusões:** Tratamentos combinados utilizando baixas doses de GEN e DXR em esquemas de pré e pós-tratamento são capazes de provocar apoptose e redução da viabilidade em células MDA-MB-231 sensíveis. Contudo, esses tratamentos parecem induzir a sinalização de mecanismos de sobrevivência em CTTs, incluindo supressão de vias apoptóticas. Nesse contexto, apenas os tratamentos que induzem bloqueio no ciclo celular, mas sem alterar a viabilidade, são capazes de afetar populações CTTs resistentes de MDA-MB-231.

## ABSTRACT

CARVALHO, F. P. **Evaluation of pro-apoptotic gene expression in cancer stem cells of triple-negative breast cancer cell line treated with the phytoestrogen genistein, doxorubicin and ionizing radiation.** 2016. 130 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 2016.

**Introduction:** Conventional chemo/radiotherapy breast cancer resistance still represents a major challenge, especially in triple-negative carcinomas, which do not express estrogen receptors, progesterone receptors and oncogene (HER2)/neu. It is known that the degree of breast cancer resistance is strongly associated with the amount of cancer stem cells, which can be detected by immunophenotyping (CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>). Cancer stem cells remain in G0/G1 phase for a long time, and exhibit inhibition of pro-apoptotic pathways. Several natural compounds have been studied, among which is the phytoestrogen genistein (GEN) from soy bean. The GEN acts as an ample tyrosine kinase inhibitor, and its antitumor activity has been pointed out in several studies. However, the biological effects of GEN in tumor stem cells are still poorly understood, especially when combined with other chemotherapy. **Objectives:** To assess the cytotoxic effects of GEN phytoestrogen in tumor stem and non-tumor stem sub-populations, combined with radiation (RAD) and doxorubicin (DXR) *in vitro* treatments in triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231. **Methodology:** We used pretreatment (GEN + DXR e GEN + RAD) and post-treatment (DXR + GEN e RAD + GEN) regimens using 1 - 5  $\mu$ M of GEN for 24 hours, 1 ng/ml DXR for 24 hours and 5 - 10 Gy of RAD, in which experiments were performed after 24 hours of irradiation. At the end of each treatment we assessed cell viability, coefficient of drug interaction, cell cycle, apoptosis and amount of CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> cells. Moreover, cancer stem cells and non-cancer stem cells sub-populations were sorted in order to study the gene expression of apoptotic pathways. This study also investigated the hormone-positive breast cancer cell line MCF-7. **Results:** GEN 1  $\mu$ M for 24 hours caused significant apoptosis in MDA-MB-231 by blocking the G2/M phase, but increasing the dose did not alter viability and CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> quantity. MCF-7 cells were resistant to GEN, by inducing S phase, but were also sensitive to the RAD, with G0/G1 block. Increasing the dose in GEN treatments combined with DXR produced increased synergistic effects. Pretreatment GEN 5  $\mu$ M + DXR 1 ng/ml induced superexpression of apoptotic genes in CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> cells, but did not reduce cell viability. **Conclusions:** Combined treatments using low doses of DXR and GEN in pre and post treatment schemes are able to trigger apoptosis and reduce viability of MDA-MB-231 responsive cells. However, these treatments appear to induce survival signaling mechanisms in cancer stem cells, including suppression apoptotic pathways. In this context, only treatments that induce cell cycle block, but without causing decrease in cell viability, are able to affect resistant tumor stem cells in MDA-MB-231.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**18S** - 18S ribossomal

**ANOVA** – Análise de Variância

**AIFM1** - *apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 1*

**AKT1** - *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*

**APAF1** - *apoptotic peptidase activating factor 1*

**BAD** - *BCL2-associated agonist of cell death*

**BAX** - *BCL2-associated X protein*

**CAS** - *Chemical Abstracts Service*

**CASP3** - *caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase*

**CASP7** - *caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase*

**CASP8** - *caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase*

**CASP9** - *caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase*

**CFLAR** - *CASP8 and FADD-like apoptosis regulator*

**CID** - coeficiente de interação entre drogas

**CM** - câncer de mama

**C<sub>T</sub>** - *threshold cycle*

**CTTs** – células-tronco tumorais

**CYCS** - cytochrome c, somatic

**D.O.** - densidade óptica

**DMSO** - dimetilsufóxido

**DXR** - doxorubicina

**EDTA** – ácido etileno diaminotetracético

**FACS** - *fluorescence-activated cell sorting*

**FADD** - *Fas (TNFRSF6)-associated via death domain*

**FAS** - *Fas cell surface death receptor*

**FASLG** - Fas ligand (TNF superfamily, member 6)

**GEN** - genisteína

**IC** – intervalo de confiança

**MTT** - *3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*

**ns** – estatisticamente não significativo

**PBS** - *phosphate buffered saline*

**PI** - iodeto de propídeo

**qPCR** - reação em cadeia da polimerase quantitativa

**qRT-PCR** – reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

**r.p.m.** – rotações por minuto

**RAD** – radiação ionizante

**RE** - receptor de estrógeno

**RE $\alpha$**  - receptor de estrógeno  $\alpha$

**RE $\beta$**  - receptor de estrógeno  $\beta$

**RP** - receptor de progesterona

**TP53** - tumor protein p53

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
1.1 Aspectos gerais do câncer de mama (CM) triplo-negativo .....	2
1.2 As Células-Tronco Tumorais (CTTs) .....	4
1.3 Integração entre Ciclo Celular e Apoptose .....	6
1.4 Propriedades biológicas do fitoestrógeno Genisteína (GEN).....	10
1.5 Doxorrubicina (DXR) e Radiação Ionizante (RAD) .....	12
1.6 Determinação da citotoxicidade in vitro e aquisição de CTTs .....	13
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1 Geral .....	16
2.2 Específicos .....	16
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1 Genisteína (GEN).....	18
3.2 Doxorrubicina (DXR) .....	18
3.3 Radiação (RAD) .....	18
3.4 Dimetilsufóxido (DMSO - Controle do solvente) .....	18
3.5 Linhagens celulares .....	18
3.6 Confluência Celular .....	19
3.7 Tratamentos.....	19
3.8 Ensaio de Viabilidade Celular .....	20
3.9 Análise da interação entre tratamentos in vitro .....	21
3.10 Ensaio do Ciclo Celular e Apoptose .....	22
3.11 Imunofenotipagem com anti-CD44 e anti-CD24 .....	22
3.12 FACS com anti-CD44 e anti-CD24 .....	23

3.13 PCR quantitativa em tempo real .....	23
3.14 Análises estatísticas .....	25
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
4.1 Confluência Celular .....	27
4.2 Viabilidade Celular .....	28
4.3 Interação entre os tratamentos GEN, DXR e RAD .....	34
4.4 Apoptose .....	38
4.5. Ciclo Celular.....	44
4.6 Contagem de células CD24-/CD44+.....	61
4.7 Correlação entre os dados e Regressão Linear .....	64
4.8 Tratamentos candidatos para a investigação da expressão gênica.....	71
4.9 Análise da expressão gênica.....	74
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>82</b>
5.1 Tratamentos isolados .....	82
5.2 Tratamentos combinados.....	84
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>89</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>104</b>

# ***Introdução***

---

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos gerais do câncer de mama (CM) triplo-negativo

O CM é a neoplasia mais incidente em mulheres, representando 25,2% do total de casos de câncer no mundo em 2012 (Ferlay *et al.*, 2015). No Brasil, o CM também é o mais incidente em mulheres de todas as regiões, exceto na Região Norte, onde o câncer do colo do útero ocupa a primeira posição. Para o ano de 2016, foram estimados 57.960 casos novos, que representam uma taxa de incidência de 56,2 casos por 100 mil mulheres (Inca, 2016). De acordo com o último levantamento feito no Brasil, em 2009, a taxa de mortalidade por CM representa a primeira causa de morte por câncer na população feminina brasileira, com 11,28 óbitos por 100 mil mulheres. As regiões Sul e Sudeste são as que apresentam as maiores taxas, com 12,7 e 12,62 óbitos por 100 mil mulheres, respectivamente (Ministério Da Saúde, 2013).

Por ser uma doença altamente heterogênea, o CM foi classificado de acordo com parâmetros clínicos, histopatológicos e moleculares (Weigelt *et al.*, 2008). Dentre tais parâmetros, os biomarcadores mais relevantes são: acometimento de linfonodos (Saez, Mcguire e Clark, 2006), tamanho tumoral (Rosen *et al.*, 1989), tipo/grau tumoral (Le Doussal *et al.*, 1989), invasão linfática e vascular (Neville *et al.*, 1992), além da presença de receptores hormonais e do oncogene (*HER2/neu*) (Borg *et al.*, 1990; Hammond *et al.*, 2010).

Os receptores hormonais são fundamentais no diagnóstico e manejo do CM. Por exemplo, o receptor de estrógeno  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) é um fator de transcrição nuclear ativado pelo estrógeno cuja função é regular o crescimento e a diferenciação de células epiteliais normais da mama. No entanto, a exposição prolongada aos hormônios circulantes parece contribuir para o desenvolvimento do CM, tal forma que, a menarca precoce, a menopausa tardia e a nuliparidade estão relacionadas a um aumento significativo no desenvolvimento da doença (Clarke, 2003; Keen e Davidson, 2003). Aproximadamente 70-80% de todos os tumores de mama expressam a proteína RE $\alpha$ , e são classificados como RE-positivos. Esses tumores costumam ter crescimento mais lento, são mais diferenciados, e estão associados com um prognóstico mais favorável (Grann *et al.*, 2005).

Além do RE $\alpha$ , outro importante biomarcador hormonal rotineiramente empregado na imunohistoquímica, é a presença de receptores de progesterona (RPs). Quando expressos, os RPs são ativados pela progesterona endógena e atuam na regulação de várias vias importantes em células normais, como a proliferação celular, que também é crucial no desenvolvimento do CM. No entanto, sabe-se que a expressão de RPs é regulada por RE $\alpha$ , assim, a presença de RPs geralmente indica que a via do estrógeno está intacta e funcional (Allred, 2010).

Juntamente com os receptores hormonais, a amplificação ou a superexpressão do oncogene *HER2/neu* apresenta uma importante consequência para evolução tumoral. Este gene codifica um receptor de tirosino-quinase envolvido na sinalização de fatores de crescimento. Assim, a amplificação deste receptor na membrana celular, em cerca de 30% dos tumores da mama, está relacionada com um pior prognóstico devido a proliferação aumentada, angiogênese e inibição de apoptose (Borg *et al.*, 1990; Paterson *et al.*, 1991). Dessa forma, *HER2/neu* tornou-se alvo terapêutico com o desenvolvimento do anticorpo monoclonal trastuzumab, ou seja, pacientes com tumores que superexpressam *HER2/neu* podem ser candidatas para o tratamento (Vogel *et al.*, 2002).

Posteriormente, estudos de expressão gênica utilizando DNA *microarray* identificaram subtipos de CM que não eram conhecidos usando os métodos histopatológicos tradicionais (Perou *et al.*, 2000). Quatro subtipos foram identificados, sendo dois derivados de tumores RE-negativos (*basal-like* e HER2-positivo) e dois oriundos de tumores RE-positivos (luminal A e B) (Sørlie *et al.*, 2001). A respeito do subtipo *basal-like*, este é mais prevalente em portadoras da mutação *BRCA1* (Foulkes *et al.*, 2003), sendo composto quase inteiramente pelo fenótipo "triplo-negativo", ou seja, o tumor que não sofre marcação imunohistoquímica para REs, RPs e HER2 (Rakha *et al.*, 2006). Dando continuidade aos estudos, os avanços tecnológicos e a descoberta de outros perfis moleculares permitiram uma nova subdivisão, surgindo o subtipo *claudin-low*. Este foi caracterizado como triplo-negativo mesenquimal, e foi associado à baixa expressão das proteínas de junção aderente claudin 3, 4, 7 e da E-caderina (Herschkowitz *et al.*, 2007; Prat *et al.*, 2010).

Apesar dos avanços terapêuticos, ainda são poucas as alternativas para o tratamento dos tumores triplo-negativos. O carcinoma mamário triplo-negativo

representa cerca de 15% de todos os casos, é mais resistente, ocorre em mulheres jovens (com menos de 50 anos) e está associado com alto risco de recorrência, metástase e morte. O prognóstico ruim, associado à escassez de alvos terapêuticos, reflete na alta mortalidade atribuída ao fenótipo triplo-negativo (Cleator, Heller e Coombes, 2007).

Dessa forma, cresce a necessidade por novas estratégias, especialmente para os tumores triplo-negativos, e conseqüentemente abre-se uma grande área para aplicação de produtos naturais, dentre os quais estão os fitoestrógenos.

## **1.2 As Células-Tronco Tumorais (CTTs)**

O processo neoplásico é desencadeado geralmente pelo acúmulo de danos no DNA de uma única célula, que ao longo do tempo inativam genes supressores tumorais e ativam protooncogenes, levando a instabilidade celular e perda do controle replicativo (Hoeijmakers, 2001). No entanto, sabe-se que um tumor pode ser composto por vários clones com diferentes morfologias e comportamentos (Marusyk e Polyak, 2010).

A literatura aponta que a hipótese de células-tronco tumorais (CTTs) e o modelo de evolução clonal podem ser a explicação para a manutenção da heterogeneidade inter-tumoral e intra-tumoral em vários tipos de câncer, inclusive CM (Campbell e Polyak, 2007; Shackleton *et al.*, 2009). Segundo o modelo de evolução clonal, as células tumorais ao longo do tempo acumulam aleatoriamente inúmeras mutações e aberrações cromossômicas. No entanto, as células tumorais que apresentam vantagem seletiva sobre as células adjacentes proliferam gerando subpopulações mais agressivas. Dessa forma, a instabilidade genômica e a proliferação descontrolada favorecem a produção de células cada vez mais alteradas, e aceleram o surgimento de fenótipos mais resistentes (Greaves e Maley, 2012).

Por outro lado, a hipótese de CTTs estabelece que uma pequena fração de células tumorais, com propriedades semelhantes a células-tronco, podem ser as responsáveis pela iniciação, progressão e recorrência tumoral. Por definição,

as CTTs possuem capacidade de auto-renovação e diferenciação, levando ao desenvolvimento de todos os tipos celulares encontrados no tumor (Pardal, Clarke e Morrison, 2003),

Pesquisas recentes apontam que o surgimento de CTTs pode ocorrer por processos complexos, e ainda pouco conhecidos, como: mutações em células-tronco progenitoras teciduais, trans-diferenciação de células somáticas e transição epitélio-mesênquima em células tumorais (Bjerkvig *et al.*, 2005; Scheel e Weinberg, 2012; Ye e Weinberg, 2015). Além disso, a manutenção de CTTs envolve vários mecanismos, regulados por vias específicas com ativa participação de diversas tirosino-quinases (Hochgräfe *et al.*, 2010; Dittmer *et al.*, 2011; Tryfonopoulos *et al.*, 2011; Hinohara *et al.*, 2012). Conseqüentemente, vias envolvidas no controle da auto-renovação de CTTs podem participar nos processos de resistência tumoral intrínseca e adquirida, como a via *Notch* (Pannuti *et al.*, 2010), *Hedgehog* (Tanaka *et al.*, 2009), *Wnt/beta-catenina* (Khramtsov *et al.*, 2010), *platelet-derived growth factor* (PDGF) (Burstein *et al.*, 2008) e *epidermal growth factor* (EGF) (Del Vecchio *et al.*, 2012).

No CM, as CTTs exibem vários marcadores comuns a células-tronco normais. Utilizando imunofenotipagem é possível caracterizar as CTTs pela expressão de antígenos de superfície como CD44 e CD24, onde células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> apresentam elevada capacidade de iniciação e auto-renovação tumoral (Al-Hajj *et al.*, 2003). Outro importante aspecto descoberto posteriormente aponta que células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> exibem perfil de expressão gênica fortemente associado ao tipo de CM triplo-negativo *claudin-low* (Creighton *et al.*, 2009; Hennessy *et al.*, 2009).

De modo geral, a presença de CTTs em CM é muito variável. Alguns estudos caracterizaram diversas linhagens de CM utilizando marcação com anti-CD44 e anti-CD24 em cultivos em monocamada e observaram que a linhagem tumoral MDA-MB-231 (carcinoma triplo-negativo, mesenquimal, moderadamente metastático) e a linhagem tumoral MCF-7 (carcinoma hormônio-positivo, luminal, pouco metastático) apresentam, respectivamente, cerca de 90% e 1% de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>. Esses estudos descreveram que linhagens com elevada quantidade de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> apresentam aumento significativo em diversos indicadores

como proliferação, formação de colônia *in vitro*, adesão celular, migração, invasão *in vitro* (Sheridan *et al.*, 2006; Ricardo *et al.*, 2011).

Na prática clínica, o emprego de marcadores de CTTs ganha relevância devido às evidências de que a presença de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> em pacientes com CM reflete em um prognóstico desfavorável (Zhou *et al.*, 2010; Ablett, Singh e Clarke, 2012), e pode auxiliar na escolha do tratamento mais adequado para esses casos (Kakarala e Wicha, 2008).

### 1.3 Integração entre Ciclo Celular e Apoptose

O ciclo celular é um processo complexo que envolve numerosas proteínas reguladoras que direcionam a célula a passar por diferentes estágios, culminando na mitose e formação de duas células-filhas. Normalmente a regulação da proliferação, sobrevivência e morte celular permite que as células realizem divisões ordenadas até sua senescência (Mester e Redeuilh, 2008).

Dessa forma, o ciclo celular é morfológicamente subdividido em intérfase e mitose (fase M). A intérfase é composta pelas fases: quiescência (fase G<sub>0</sub>), *gap 1* (fase G<sub>1</sub>), síntese de DNA (fase S) e *gap 2* (fase G<sub>2</sub>). Em seguida, a célula entra em mitose. Contudo, sabe-se que grande parte das nossas células encontra-se em estágios não proliferativos ou quiescentes (Schafer, 1998; Vermeulen, Van Bockstaele e Berneman, 2003).

A progressão do ciclo celular é catalizada essencialmente por complexos contendo ciclinas, cdks (*cyclin-dependent kinases*) e CKIs (*cdk inhibitors*). Cdks são proteínas quinases ativadas em pontos específicos do ciclo celular, e sofrem modulação pelas ciclinas e CKIs (Lim e Kaldis, 2013).

A fim de assegurar que os eventos críticos em uma fase particular do ciclo celular sejam concluídos antes que uma nova fase seja iniciada, a célula ativa alguns pontos de verificação, conhecidos como *checkpoints*. Em cada fase, as células realizam uma auto-avaliação e decidem se devem prosseguir, pausar ou sair do ciclo celular (King e Cidlowski, 1998). Dessa forma, as células podem interromper ou bloquear o ciclo celular em resposta a diversos estímulos estressores, possibilitando que: o dano celular seja reparado; o sinal citotóxico exógeno seja

dissipado; ou que fatores de crescimento e nutrientes sejam restabelecidos, por exemplo (Pietenpol e Stewart, 2002). Por outro lado, o bloqueio no *checkpoint* pode também resultar na ativação de vias que sinalizam a apoptose, caso o dano celular não seja reparado de forma adequada. Dessa forma, os *checkpoints* impedem a formação de células geneticamente anormais responsáveis pela oncogênese (Kastan e Bartek, 2004).

Nesse contexto, a proteína p53 é uma peça fundamental, pois atua como um importante supressor tumoral. Sabe-se que a p53 funciona como um ponto central que integra vários processos biológicos como reparo do DNA, diferenciação celular, senescência, necrose, necroptose (necrose programada), autofagia e bloqueio do ciclo celular (Vousden e Prives, 2009; Maiuri *et al.*, 2010; Dashzeveg e Yoshida, 2015). Para isso, a p53 participa de múltiplos *checkpoints* no ciclo celular e direciona uma resposta celular específica para cada situação de estresse biológico, induzindo principalmente apoptose (Giono e Manfredi, 2006).

Além da p53, a família de proteínas-quinase Akt também é um importante grupo de reguladores do metabolismo celular, atuando na proliferação, sobrevivência, migração e oncogênese. De modo geral, as proteínas Akt controlam as transições G1/S e G2/M e normalmente induzem a progressão do ciclo celular (Xu *et al.*, 2012). Além disso, Akt é capaz de fosforilar e inibir proteínas pró-apoptóticas Bad e pró-caspase-9, atuando como um forte supressor da apoptose em diversas situações (Franke, 2008; Cheung e Testa, 2013).

Por definição, a apoptose é um processo fisiológico de morte celular programada. Do ponto de vista morfológico, é caracterizada por eventos de contração celular, fragmentação do DNA, condensação da cromatina e formação de vesículas sem perda da integridade da membrana, o que leva a ausência de resposta inflamatória (Yasuhara *et al.*, 2003; Elmore, 2007). Para isso, alterações no complexo de Golgi (Hicks e Machamer, 2005), retículo endoplasmático (Deniaud *et al.*, 2008) e mitocôndrias (Suen, Norris e Youle, 2008) acionam a cascata de ativação de caspases intracelulares.

Normalmente as caspases (*cystein-dependent aspartate-specific proteases*) estão presentes como enzimas precursoras inativas, tal modo que, a ativação pode ocorrer pelas vias extrínseca e intrínseca (Figura 1) (Creagh, Conroy e Martin, 2003; Fan *et al.*, 2005; Fiandalo e Kyprianou, 2012). Pela via extrínseca, a

apoptose é mediada por receptores TNF (*tumour necrosis factor*) presentes na membrana plasmática, e pela via intrínseca a apoptose é mediada pela mitocôndria. Em síntese, as vias ativam um grupo de caspases iniciadoras (caspase 8, 9 e 10) que convergem a sinalização para o mesmo grupo de caspases efetoras (caspase 3, 6 e 7) responsáveis pela proteólise (Hajra e Liu, 2004; Fulda e Debatin, 2006).

Inicialmente, a via extrínseca é ativada pela ligação de marcadores de morte FasL (*Fas-ligand*) a receptores de morte na membrana plasmática Fas, promovendo o recrutamento da proteína FADD (*FAS-associated protein with death domain*) (Sayers, 2011). Em seguida, FADD recruta e ativa caspase-8, a qual pode ativar caspase-3 ou desencadear a via intrínseca por meio da clivagem da proteína Bid (Kantari e Walczak, 2011; Crowder e El-Deiry, 2012). Contudo, FADD também pode sofrer inibição pela proteína c-FLIP [*Cellular FLICE (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme)-inhibitory protein*], a qual é codificada pelo gene *CFLAR* (Bagnoli, Canevari e Mezzanzanica, 2010).

Por outro lado, a via intrínseca geralmente ocorre em resposta a diversos agentes intra e extracelulares, tais como: hipóxia (Sendoel e Hengartner, 2014), choque térmico (Khalil *et al.*, 2011), espécies reativas de oxigênio (Wu e Bratton, 2013), irradiação ultravioleta (Salucci *et al.*, 2012), irradiação ionizante (Toruno *et al.*, 2014), danos no DNA (Roos e Kaina, 2013), ausência de fatores de crescimento (Mason e Rathmell, 2011) e vários compostos exógenos citotóxicos. Dessa forma, estímulos letais podem ativar membros da família de proteínas BH-3 (Bad, Bid, Bik, Bim, etc), responsáveis pela oligomerização Bak-Bax. Isto provoca a formação de canais nas membranas mitocondriais que permitem o efluxo de proteínas da mitocôndria para o citosol, dentre elas o citocromo c (Hüttemann *et al.*, 2011; Renault e Manon, 2011). O citocromo c liberado no citosol interage com Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor-1*) e pró-caspase-9, formando o complexo apoptossomo (Reubold e Eschenburg, 2012). Este ativa a caspase-9, que por sua vez ativa as caspases efetoras, levando à apoptose (Würstle, Laussmann e Rehm, 2012).

Em casos particulares, a apoptose também pode ser induzida por efetores independentes de caspases, como a proteína Aif (*apoptosis-inducing factor*). Esta é sintetizada na mitocôndria, liberada no citosol e translocada até o

núcleo, onde provoca a condensação da cromatina e degradação do DNA (Modjtahedi, Giordanetto e Kroemer, 2010).

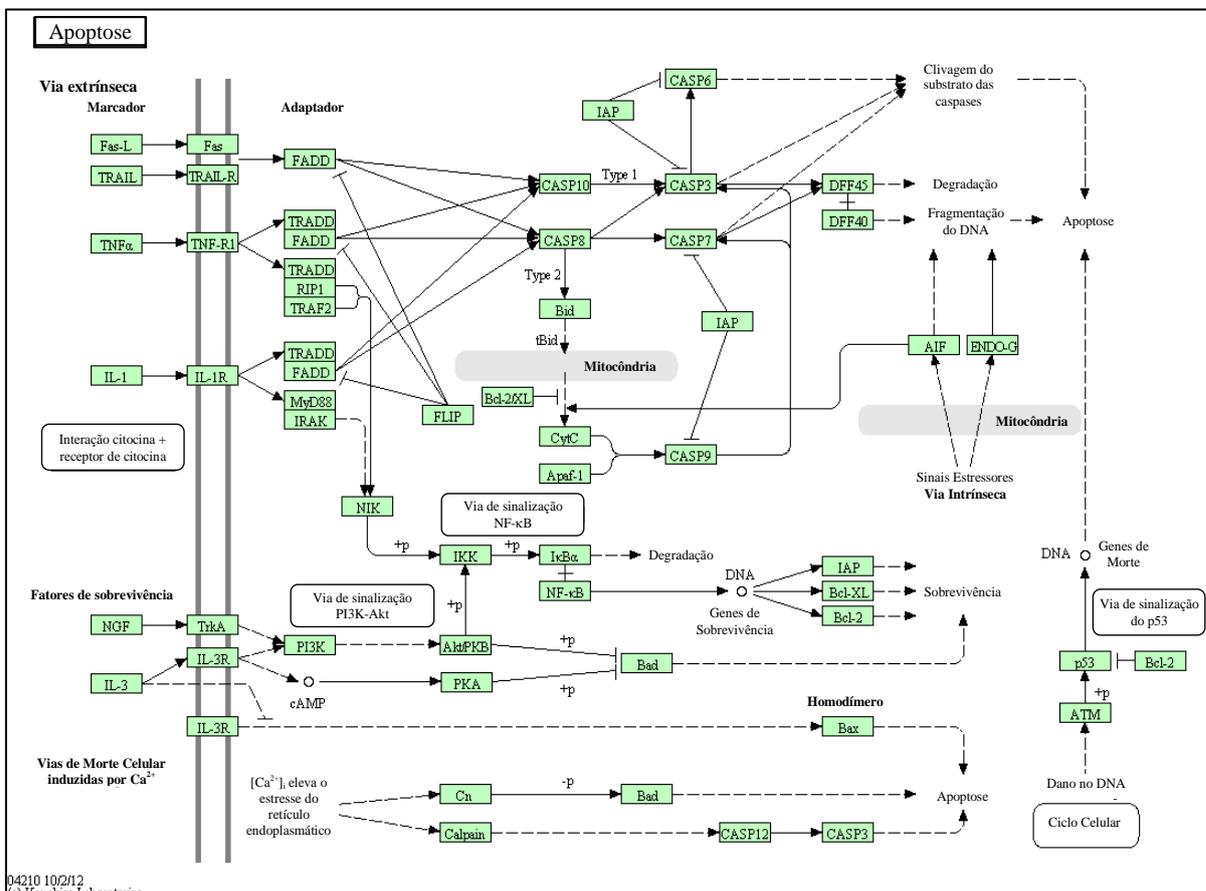


Figura 1: Esquema molecular da apoptose (Keeg Pathway Database, 2012).

A respeito das células-tronco, sabe-se que células saudáveis exibem mecanismos de reparo e apoptose extremamente conservados e orquestrados, garantindo a integridade genômica durante as divisões celulares nos processos de reposição tecidual e proliferação compensatória (Bergmann e Steller, 2010; Sperka, Wang e Rudolph, 2012). Além disso, células-tronco são mais resistentes a danos, pois durante a síntese de DNA assimétrica, a fita parental “imortal” sempre segrega com a célula-mãe, e não com a célula-filha diferenciada. Esse processo também é regulado pela p53 e previne o acúmulo de mutações associadas com a replicação ou agentes mutagênicos (Harfouche e Martin, 2010).

De modo semelhante, as CTTs são células quiescentes e apresentam baixa taxa de proliferação celular, fazendo com que se tornem refratárias aos quimioterápicos que atuam no bloqueio do ciclo celular (Blagosklonny, 2005).

Além disso, mecanismos antiapoptóticos relacionados a reguladores do ciclo celular em CTTs também podem ser fundamentais para a quimio/radorresistência (Chappell e Dalton, 2010). Harper *et al.* (2010) descreveram que o tratamento com diversos agentes quimioterápicos e radiação faz com que as CTTs permaneçam por mais tempo na fase G2, e concluíram que o *checkpoint* em G2 pode ser o responsável pelos processos que evitam a apoptose.

Dessa forma, o conhecimento sobre pontos de regulação celular intensifica a busca por drogas antitumorais capazes de elevar a taxa de morte em populações de CTTs resistentes, especialmente produtos naturais que bloqueiam o ciclo celular e ativam a cascata de apoptose.

#### 1.4 Propriedades biológicas do fitoestrógeno Genisteína (GEN)

Os fitoestrógenos são compostos naturais não-esteroidais estruturalmente similares ao hormônio  $17\beta$ -estradiol, e têm despertado grande interesse devido aos benefícios à saúde associados ao consumo da soja (Cederroth e Nef, 2009). Dentre os fitoestrógenos mais estudados está a isoflavona genisteína (GEN).

Atuando como agonista, a GEN interage com REs e desencadeia efeitos estrogênicos similares ao  $17\beta$ -estradiol no organismo. Por outro lado, agindo como antagonista, é capaz de bloquear REs, competindo com o estrógeno produzido endogenamente, de modo que, alguns dos efeitos farmacológicos da GEN são associados a sua atividade antiestrogênica (Miodini *et al.*, 1999).

Além de interagir com REs, a GEN também exerce efeitos inibitórios sobre uma grande variedade de proteínas quinase (Akiyama *et al.*, 1987) e histidinas quinase (Huang *et al.*, 1992). Em geral, a GEN atua como inibidor competitivo da adenosina trifosfato (ATP) na reação de fosforilação das quinases, entretanto, não compete com o substrato proteico. Dessa forma, seu amplo espectro de inibição sobre tirosino quinases é provavelmente atribuído ao domínio de ligação do ATP ser altamente conservado (Ullrich e Schlessinger, 1990; Levitzki e Gazit, 1995). Recentemente, Fang *et al.* (2016) realizaram um estudo fosfoproteômico com células MDA-MB-231 e apontaram que a GEN exerce efeitos antitumorais pela modulação

de 332 sítios de fosforilação em 226 proteínas envolvidas em vários processos biológicos como ciclo celular, replicação do DNA, mitose e resposta a dano no DNA.

Na literatura, diversos estudos apontam que a GEN apresenta atividade cardioprotetora, retarda a osteoporose e alivia sintomas da menopausa (Evans *et al.*, 2011; B Gencel *et al.*, 2012). Além disso, vários trabalhos destacam que a GEN apresenta propriedades apoptótica, antioxidante, e antitumoral em diversos tipos de câncer, tanto em estudos *in vivo* quanto *in vitro* (Sarkar e Li, 2002), e atua também inibindo angiogênese e metástase (Fotsis *et al.*, 1993; Shao *et al.*, 1998). Abordagens mais recentes apontam que a GEN também exerce efeitos antitumorais via regulação de miRNAs (Vira *et al.*, 2012; Srivastava *et al.*, 2015) e modulação epigenética (Aggarwal *et al.*, 2015; Li e Sarkar, 2015).

Shao *et al.* (1998) estudando linhagens de CM tratadas e implantadas *in vivo*, demonstraram que a GEN poderia reduzir o crescimento de células estrógeno-dependentes (MCF-7) e também estrógeno-independentes (MDA-MB-231), porém, tais efeitos foram mais evidentes somente em altas doses do fitoestrógeno, as quais não podem ser alcançadas *in vivo*.

Sabe-se que os níveis de GEN no plasma ou no soro a partir da ingestão de alimentos contendo soja ou suplementos é cerca de 0,5  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{M}$ . Considerando que parte da GEN pode estar ligada a proteínas séricas, provavelmente a GEN biologicamente ativa deve estar em concentrações nanomolares (King e Bursill, 1998; Watanabe *et al.*, 1998; Klein e King, 2007). Embora as concentrações fisiológicas de GEN alcancem apenas 5  $\mu\text{M}$ , grande parte da literatura ainda aposta em concentrações muito altas para estudar os efeitos da GEN frente ao câncer (Klein e King, 2007).

Além disso, os efeitos diretos da GEN em CTTs foram muito poucos explorados. Montales *et al.* (2012) investigaram se o consumo de GEN em camundongos pode alterar a quantidade de CTTs nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. Eles observaram que a GEN inibe a formação de mamoesferas, e esse processo envolve a via PTEN/PI3K/Akt, a qual já foi relacionada à regulação da auto-renovação de células-tronco por Korkaya *et al.* (2009).

Dessa forma, apesar das numerosas pesquisas a respeito dos efeitos da GEN sobre o CM, os benefícios que essas isoflavonas podem produzir no tratamento de carcinomas triplo-negativos ainda precisam ser mais explorados, dado

que, o efeito inibitório sobre tirosino-quinases utilizando doses fisiológicas de GEN pode representar uma propriedade potencialmente útil no combate às CTTs, especialmente quando combinado com outras drogas quimioterápicas.

### 1.5 Doxorrubicina (DXR) e Radiação Ionizante (RAD)

No estudo de esquemas terapêuticos alternativos para o combate ao câncer é conveniente investigar drogas e terapias já empregadas na prática clínica em conjunto com novos componentes.

Dentre as drogas mais utilizadas no tratamento de tumores metastáticos está a doxorrubicina (DXR). A DXR é um antibiótico antracíclico originalmente produzido por *Streptomyces peucetius var. caesius* destinado ao tratamento de vários tipos de câncer, e dentre seus efeitos colaterais mais importantes está cardiopatia (Yang *et al.*, 2014). Em geral, a DXR atua como intercalante no DNA, inibindo a topoisomerase II e formando ligações cruzadas de filamentos de DNA, sendo altamente citogenotóxica para tecidos com elevadas taxas de mitose e proliferação (Fornari *et al.*, 1994; Gewirtz, 1999). Além disso, sabe-se que a DXR produz espécies reativas de oxigênio que também podem atacar células normais e cancerígenas (Navarro *et al.*, 2006).

De modo semelhante, o emprego da radiação ionizante (RAD) no esquema terapêutico do CM também está bastante consolidado. Sabe-se que a exposição à RAD provoca principalmente quebras duplas no DNA, e também induz a produção de espécies reativas de oxigênio que levam ao estresse oxidativo (Little, 2006). Sabe-se também que a sensibilidade à RAD varia ao longo do ciclo celular. Geralmente as células estão mais sensíveis durante a fase G2/M com o *checkpoint*, seguida pela fase G1. A fase menos sensível é o período antes do final da fase S. Assim, a maioria dos agentes quimio-radioterápicos induz morte celular pelo bloqueio celular na fase G2/M (King, Jackson e Kirschner, 1994).

No entanto, diversos estudos apontam que CTTs de CM são altamente resistentes aos tratamentos quimio-radioterápicos convencionais (Debeb, Xu e Woodward, 2009; Chuthapisith *et al.*, 2010). Li e colaboradores (2008) observaram que amostras de *core-biopsy* obtidas de pacientes tratadas com quimioterapia

neoadjuvante utilizando DXR apresentaram aumento significativo na porcentagem de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> associado ao tratamento. Além disso, Yin & Glass (2011) isolaram células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e não- CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> de culturas primárias e culturas de linhagens (MCF-7 e MDA-MB-231) e apontaram que populações de CTTs são significativamente mais radio-resistentes do que as populações não-CTTs.

Nesse sentido, a pesquisa de produtos naturais com propriedades antitumorais pode gerar novas estratégias a serem exploradas no combate de CTTs resistentes, visto que compostos naturais geralmente oferecem menos toxicidade ao paciente do que os tratamentos convencionais (Li *et al.*, 2011). Para isso, estudos utilizando esquemas de pré-tratamento e pós-tratamento permitem avaliar se os compostos naturais proporcionam mais vantagens quando administrados antes ou após a radio-quimioterapia.

#### **1.6 Determinação da citotoxicidade in vitro e aquisição de CTTs**

A utilização de esquemas terapêuticos baseados na combinação de drogas tem grande importância na prática clínica. De modo geral, a combinação de drogas visa alcançar um efeito terapêutico sinérgico dos elementos, levando à redução da dose, da toxicidade ao paciente e da resistência. Dessa forma, a pesquisa por novos desenhos terapêuticos representa um grande desafio na oncologia (Dancey e Chen, 2006; Al-Lazikani, Banerji e Workman, 2012).

Na avaliação da sensibilidade de células tumorais frente aos tratamentos, o ensaio de Viabilidade Celular é uma importante ferramenta (Price e Mcmillan, 1990; Slavotinek, Mcmillan e Steel, 1994; Mueller, Kassack e Wiese, 2004). O teste é baseado na capacidade das células vivas metabolizarem um sal solúvel tetrazólio (MTT) em cristais de formazan por meio de enzimas desidrogenases mitocondriais. O método pode ser empregado na avaliação da citotoxicidade, proliferação e ativação celular em cultura de células aderentes (Mosmann, 1983).

Adicionalmente, no estudo de tratamentos combinados é essencial a avaliação da interação dos elementos administrados, ou seja, observar se os efeitos individuais são amplificados ou reduzidos quando as drogas são aplicadas em

conjunto. Para isso, o Coeficiente de Interação entre Drogas (CID) permite qualificar as interações como: adição, antagonismo, ou sinergia (Chou, 2006; 2010). Por definição, a interação é considerada aditiva ou nula quando o efeito resultante de duas substâncias A e B é simplesmente o somatório dos seus efeitos individuais; antagônica quando o efeito resultante é menor do que o somatório dos efeitos individuais; e sinérgica quando o efeito resultante é maior do que a somatória dos efeitos individuais (Berenbaum, 1989; Wagner e Ulrich-Merzenich, 2009).

Paralelamente, a investigação do ciclo celular e da apoptose é fundamental para a avaliação da citotoxicidade frente aos tratamentos. Um método bastante adotado é o ensaio de Ciclo Celular e Apoptose, o qual se baseia na evolução da síntese de DNA ao longo do ciclo celular. Para isso, a quantificação por citometria de fluxo utilizando células marcadas com iodeto de propídio (PI), um fluorocromo que se intercala no DNA estequiometricamente a cada quatro pares de bases, permite contar células em estágios diferenciados, distinguindo células em G0/G1, S e G2/M. Além disso, o ensaio possibilita estudar a ocorrência de células apoptóticas em estágio avançado, conhecidas como população sub-G1. Esta é caracterizada pela fragmentação e degradação do DNA, que é detectada pela quantidade de DNA inferior à quantidade observada na fase G0/G1 (Ormerod, 1998; Ormerod, 2002; Riccardi e Nicoletti, 2006).

A citometria de fluxo baseia-se em propriedades de fluorescência e dispersão de luz, e viabiliza a identificação e a contagem de células em diversas aplicações (Bergquist *et al.*, 2009), sendo fundamental também na detecção de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> por imunofenotipagem (Greve *et al.*, 2012).

Nesse contexto, a incorporação da citometria de fluxo a instrumentos de separação celular propiciou um grande aperfeiçoamento analítico levando ao surgimento de técnicas robustas, como o *fluorescence-activated cell sorting* (FACS). Dessa forma, a partir de uma suspensão celular heterogênea, o FACS permite analisar e separar células viáveis com alto grau de pureza, de acordo com a subpopulação desejada (Ibrahim e Van Den Engh, 2003), sendo amplamente utilizado na obtenção de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e não-CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>.

## ***Objetivos***

---

---

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

O presente projeto tem como objetivo principal investigar os efeitos inibitórios *in vitro* do fitoestrógeno genisteína sobre CTTs de CM triplo-negativo (linhagem MDA-MB-231), tanto em tratamento isolado, quanto em combinação com DXT e RAD. Além disso, busca-se também avaliar os mesmos efeitos em células de CM hormônio-positivas (linhagem MCF-7).

### 2.2 Específicos

- Avaliar a citotoxicidade dos tratamentos (GEN, DXT, RAD, GEN+DXT, DXR+GEN, GEN+RAD e RAD+GEN) utilizando os ensaios de Viabilidade Celular (MTT).
- Avaliar o grau de interação entre os elementos GEN, DXR e RAD nos tratamentos combinados por meio do CID obtido a partir da viabilidade celular.
- Avaliar o possível bloqueio do ciclo celular após os tratamentos utilizando o ensaio de Ciclo Celular (marcação com PI).
- Avaliar a proporção de células em apoptose avançada após os tratamentos utilizando o ensaio de Apoptose (marcação com PI).
- Avaliar a porcentagem de CTTs após os tratamentos utilizando a quantificação de células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> (imunofenotipagem com anti-CD24 e anti-CD44).
- Obter populações de CTTs e não-CTTs a partir de tratamentos efetivamente citotóxicos (FACS com anti-CD24 e anti-CD44).
- Avaliar a expressão de 15 alvos gênicos associados à indução de apoptose (*AIFM1*, *AKT1*, *APAF1*, *BAD*, *BAX*, *CASP3*, *CASP7*, *CASP8*, *CASP9*, *CFLAR*, *CYCS*, *FADD*, *FAS*, *FASLG* e *TP53*) por meio de qPCR com as populações de CTTs e não-CTTs.

## ***Materiais e Métodos***

---

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Genisteína (GEN)

Neste estudo, a GEN (4',5,7-trihidroxiisoflavona) ( $C_{15}H_{10}O_5$  - CAS: 446-72-0, Sigma) foi diluída em DMSO e mantida a  $-20^{\circ}\text{C}$  protegida da luz (solução estoque 100 mM). Foram utilizadas concentrações de 1  $\mu\text{g/mL}$ , 2,5  $\mu\text{g/mL}$  e 5  $\mu\text{g/mL}$  de GEN. A concentração máxima de DMSO em meio completo foi 0,1% por tratamento.

#### 3.2 Doxorubicina (DXR)

A solução reconstituída de cloridrato de DXR (Glenmark) foi diluída em meio completo e logo utilizada nos tratamentos. Foram estudadas concentrações de 1 ng/mL, 2 ng/mL e 5 ng/mL.

#### 3.3 Radiação (RAD)

Foram aplicadas doses únicas de 5 Gy e 10 Gy utilizando o irradiador *RS-2000 X-Ray* (Rad Source®).

#### 3.4 Dimetilsufóxido (DMSO - Controle do solvente)

Foi utilizada uma solução de DMSO 0,1% (CAS: 67-68-5 - Sigma) em meio completo como controle de solvente por 24h.

#### 3.5 Linhagens celulares

Foram utilizadas as linhagens tumorais MDA-MB-231 (carcinoma humano triplo-negativo, mesenquimal) e MCF-7 (carcinoma humano hormônio-positivo, luminal) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro, adquiridas pelo Prof. Dr. Daniel Guimarães Tiezzi (FMRP-USP). As células MDA-MB-231 foram

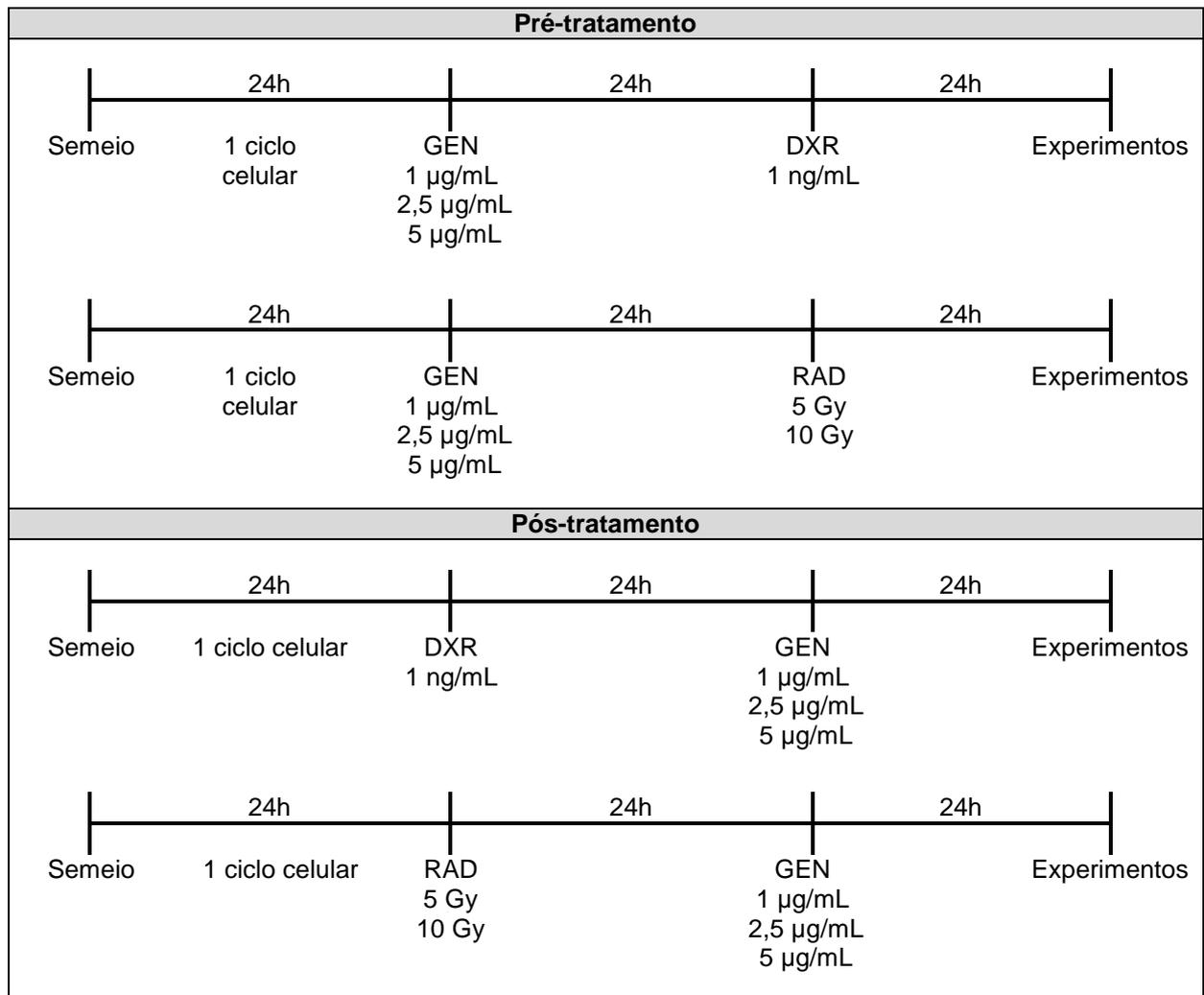
cultivadas em frascos de poliestireno sem ventilação (Kasvi) utilizando meio Lebovitz (Sigma), enquanto, as células MCF-7 foram cultivadas em frascos de poliestireno com ventilação (Kasvi) utilizando meio DMEM F12 (Gibco). Ambos os meios de cultivo foram suplementados com 1% de antibiótico (penicilina e streptomicina - Sigma) e 10% de soro bovino fetal (Gibco), e as culturas incubadas em estufa úmida a 5% de CO<sub>2</sub> e a 37°C, até atingirem o estado de semiconfluência para serem subcultivadas.

### **3.6 Confluência Celular**

Para observar a cinética de proliferação celular das linhagens recém-adquiridas, 1 milhão de células semiconfluentes foram semeadas em frascos de poliestireno com 25cm<sup>2</sup> (Kasvi) e incubadas em estufa úmida a 5% de CO<sub>2</sub> e a 37°C até atingirem 100% de confluência celular.

### **3.7 Tratamentos**

Na avaliação dos efeitos biológicos de cada composto, GEN, DXR e DMSO 0,1% foram testados em cultura por 24h e 48h. Já os ensaios com RAD foram realizados 24h após a irradiação. Na investigação dos tratamentos combinados, foram utilizadas doses de 1 ng/mL de DXR e 10 Gy de RAD para a linhagem MDA-MB-231. Para a linhagem MCF-7, foram utilizadas doses de 1 ng/mL de DXR e 5 Gy de RAD. Em ambas linhagens, DXR e RAD foram administradas em esquemas de pré-tratamento e pós-tratamento com GEN (Figura 2). Antes de cada tratamento as células foram lavadas com PBS.



**Figura 2:** Esquema de pré e pós-tratamentos utilizando GEN, DXR e RAD.

### 3.8 Ensaio de Viabilidade Celular

No ensaio de Viabilidade Celular foi empregada a metodologia descrita por Edmondson et al. (1988), onde as células foram semeadas em placas de 96 poços (20 mil células/poço) permanecendo nessas condições por 24h, lavadas com PBS, e então submetidas aos tratamentos. Ao final dos tratamentos, as células foram lavadas com PBS, sendo adicionado 100 µL de solução MTT [*brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio*] (5 mg/mL – Sigma), e incubadas por 4h em estufa úmida. Após o tombamento da placa, foram adicionados 100 µL de solução solubilizadora (10% triton-100x; 50% álcool isopropílico; 0,5% HCl; 35,5% água), deixando *overnight* em estufa úmida. Por fim, foi feita a leitura colorimétrica no instrumento *SpectraMax 190 Absorbance Microplate Reader*® (Molecular

Devices) a  $\lambda 570$  nm. A densidade óptica (D.O.) é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cada tratamento. Foram consideradas doses ideais os tratamentos que induziram pelo menos 65% de viabilidade. Foram inseridos controle não-tratado (Viabilidade 100%), controle de morte (Triton 100X 1%), controle do solvente (DMSO 0,1%) e controle do meio de cultura (Branco). A Viabilidade Celular foi calculada em relação ao Controle:

$$\% \text{ de Viabilidade Celular} = \frac{[(D.O. \text{ tratamento}) - (D.O. \text{ branco})] \times 100}{(D.O. \text{ controle}) - (D.O. \text{ branco})}$$

### 3.9 Análise da interação entre tratamentos in vitro

O coeficiente de interação entre drogas (CID) foi utilizado para analisar o caráter da interação dos elementos GEN, DXR e RAD nos tratamentos combinados. O cálculo do CID para cada tratamento combinado utilizou a seguinte fórmula:

$$CID = AB / (A \times B)$$

Onde.:

AB representa a taxa de viabilidade celular do tratamento combinado, em relação ao controle;

A e B representam as taxas de viabilidade celular dos tratamentos isolados, em relação ao controle;

A taxa de viabilidade celular do controle é igual a 1.

Dessa forma, as interações foram definidas como: efeito aditivo quando  $CID = 1$ , efeito antagônico quando  $CID > 1$ , efeito sinérgico quando  $CID < 1$  e efeito sinérgico significativo quando  $CID < 0,7$  (Chou, 2010; Wong *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2014).

### 3.10 Ensaio do Ciclo Celular e Apoptose

As células foram semeadas em placas de 12 poços utilizando meio completo (40 mil células/poço) e permaneceram nessas condições por 24h. Após a adesão das células, houve a lavagem com PBS e adição de meio sem soro bovino fetal, permanecendo nessas condições por 24h para a sincronização do ciclo celular. Em seguida, foram administrados os tratamentos. No final de cada ensaio, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas a 1200 r.p.m. por 5 minutos. Descartado o sobrenadante, o sedimento celular foi lavado com PBS e fixado com etanol 70% por pelo menos 30 minutos a 4°C. Após a fixação, as células foram centrifugadas a 2200 r.p.m. por 10 minutos. O *pellet* foi reidratado com 1 mL de PBS, centrifugado novamente, e ressuspensionado em 45 µL de PBS. Foram adicionados 5 µL de RNase (2 mg/mL - Sigma) e 50 µL de PI (100 µg/mL – Life Tech). Após 15 minutos de incubação a 37°C, as células foram lidas no citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences®). A fluorescência vermelha do PI foi observada por filtro de 585/42 nm, e a intensidade de fluorescência emitida foi mensurada em escala linear de 256 canais. Foram contadas pelo menos 10<sup>5</sup> células. A análise dos dados foi feita usando o *software* ModFit LT 3.3.11®.

### 3.11 Imunonofenotipagem com anti-CD44 e anti-CD24

As células foram semeadas em placas de 6 poços (50 mil células/poço), permanecendo nessas condições por 24h, e então submetidas aos tratamentos. Ao final, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas a 1200 r.p.m. por 5 minutos e ressuspensionadas em 200 µL de PBS. As células foram incubadas com os anticorpos anti-CD44-APC (BD Pharmingen™) e anti-CD24-PE (BD Pharmingen™) por 20 minutos a temperatura ambiente no escuro e lavadas com PBS. Além disso, foi preparado um tubo controle não-tratado contendo anticorpos IgG-APC (BD Pharmingen™) e IgG-PE (BD Pharmingen™) para calibração da citometria. Por fim, as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences®). Foram contadas pelo menos 10<sup>6</sup> células. A aquisição dos dados foi realizada usando o *software* FlowJo® (TreeStar, USA).

### 3.12 FACS com anti-CD44 e anti-CD24

As células foram semeadas em discos de cultura (4 milhões de células/disco), permanecendo nessas condições por 24h, e então submetidas aos tratamentos. De modo semelhante à imunofenotipagem, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas a 1200 r.p.m. por 5 minutos e ressuspensas em 200  $\mu$ L de PBS. As células foram incubadas com os anticorpos anti-CD44-APC (BD Pharmingen™) e anti-CD24-PE (BD Pharmingen™) por 20 minutos a temperatura ambiente no escuro e lavadas com PBS. Além disso, foi preparado um tubo controle não-tratado contendo anticorpos IgG-APC (BD Pharmingen™) e IgG-PE (BD Pharmingen™) para calibração da citometria. Por fim as populações CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> e não-CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> foram obtidas utilizando o equipamento FACS Aria (BD Biosciences®). Foram adquiridas pelo menos  $2 \times 10^5$  células de cada população.

### 3.13 PCR quantitativa em tempo real

O RNA total foi extraído utilizando TRIzol® (Life Tech), quantificado utilizando o NanoDrop 2000® (Thermo Scientific), e estocado a -80° C até o momento da análise. Em seguida, para a obtenção do cDNA, foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa utilizando o kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription*® (Applied Biosystems), no equipamento *GeneAmp*® *PCR System 9700* (Applied Biosystems). As condições de reação foram 25 °C por 10 min, 37 °C por 2 h, 85 °C por 5 min e 4 °C por  $\infty$ . A partir do cDNA obtido das amostras, foi realizada a amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR) com a utilização do kit comercial *Taqman*® *Universal PCR Master Mix* (Life Tech), no equipamento *7500 FAST Real-Time PCR System*® (Applied Biosystems). As condições de reação foram 50 °C por 20 seg e 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 seg e 60 °C por 1 min. Foram quantificadas a expressão de 15 alvos gênicos utilizando *primers* específicos já inventariados (Tabela 1), adquiridos em placas *TaqMan*® *Array Human 96-well FAST Plate* (Life Tech). O  $C_T$  (*threshold cycle*) foi calculado utilizando 25 ng de cDNA, obtidas a partir de três amostras de cada tratamento. O gene 18S ribossomal foi utilizado como controle do RNA endógeno, onde cada amostra foi normalizada de acordo com a quantidade de 18S. O  $C_T$  foi definido pelos

números de ciclos no qual o sinal fluorescente gerado pela clivagem do *probe* ultrapassa um valor fixo durante a fase log da curva de amplificação que esteja acima da linha basal (*threshold*). Com base no método de Quantificação Relativa (Livak e Schmittgen, 2001) foi realizado o cálculo da expressão relativa de cada gene usando a seguinte equação:

$$\text{Quantidade Relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Tabela 1: Lista de alvos gênicos investigados, agrupados de acordo com a função na apoptose.

Gene	Nome do Gene	Função	Ensaio (Life Tech®)
18S	18S ribossomal	Controle endógeno	Hs99999901_s1
TP53	tumor protein p53	Checkpoint (supressor tumoral)	Hs01034249_m1
AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	Checkpoint (oncogene)	Hs00178289_m1
APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1	Via intrínseca	Hs00559441_m1
BAD	BCL2-associated agonist of cell death	Via intrínseca	Hs00188930_m1
BAX	BCL2-associated X protein	Via intrínseca	Hs00180269_m1
CYCS	cytochrome c, somatic	Via intrínseca	Hs01588973_m1
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	Via extrínseca	Hs01116280_m1
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	Via extrínseca	Hs00538709_m1
FAS	Fas cell surface death receptor	Via extrínseca	Hs00531110_m1
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	Via extrínseca	Hs00181225_m1
CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	Caspase iniciadora	Hs01018151_m1
CASP9	caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	Caspase iniciadora	Hs00154260_m1
CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	Caspase efetora	Hs00234387_m1
CASP7	caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase	Caspase efetora	Hs00169152_m1
AIFM1	apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 1	Efeto independente	Hs00377585_m1

### 3.14 Análises estatísticas

Os cultivos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. Foram realizadas comparações quanto à linhagem tumoral (MDA-MB-231 e MCF-7), quanto às doses de tratamento (GEN 1  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M e 5  $\mu$ M; DXR 1 ng/mL, 5 ng/mL e 10 ng/mL; RAD 5 Gy e 10 Gy), quanto ao tipo de tratamento (GEN, DXR, RAD, GEN+DXR, DXR+GEN, GEN+RAD, RAD+GEN, DMSO1% e controle não-tratado), quanto ao tempo de tratamento (24h e 48h), e quanto a proporção de CTTs (CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> e não-CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>). Nas análises foram aplicados testes de Análise de Variância (*one-way* ANOVA), teste de Dunnett, teste de Tukey, teste *t* Student, correlação linear de *Pearson* e regressão linear. Foram empregadas razões de probabilidade calculadas com intervalo de confiança (IC) de 95% utilizando o *software* Prism versão 5.1 (GraphPad Software®).

## ***Resultados***

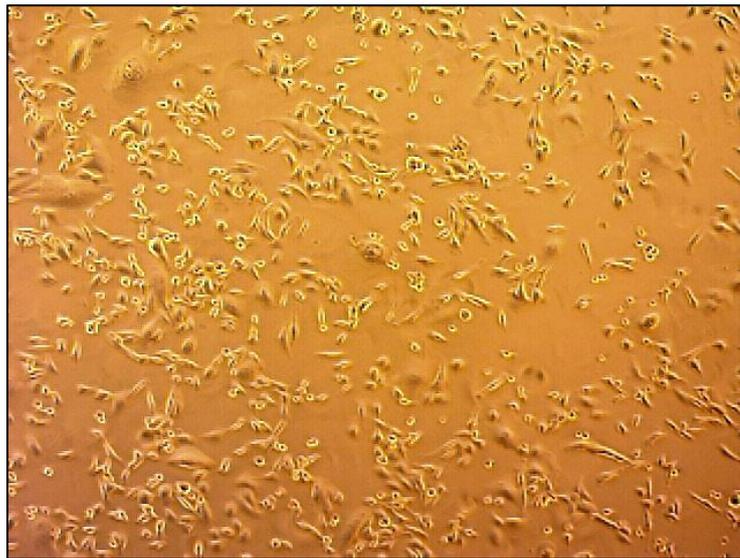
---

---

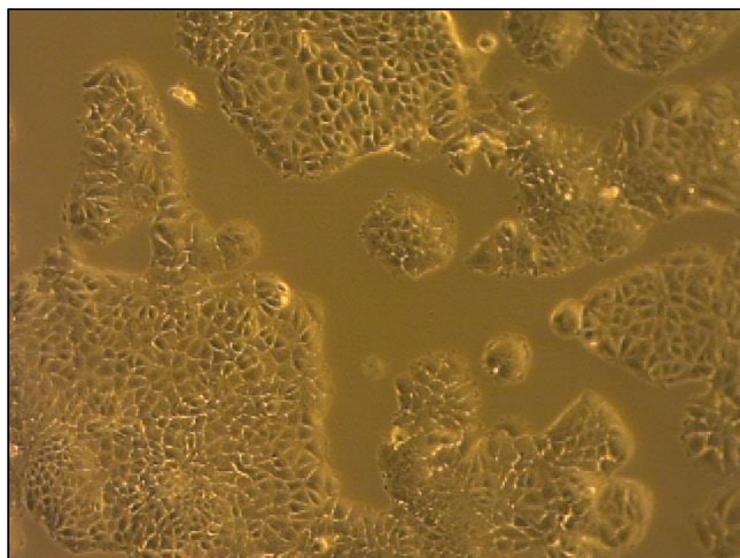
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Confluência Celular

Após o semeio das células sem quaisquer tratamentos (tempo 0 dias), foi observado que o tempo de cultivo necessário para as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 atingirem 70% de confluência foram 3 e 4 dias, respectivamente (Figuras 3 e 4). Já a confluência total foi obtida em 4 e 5 dias de cultivo, respectivamente.



**Figura 3:** Linhagem MDA-MB-231 com 70% de confluência celular após 72h de cultivo. Aumento de 200x.



**Figura 4:** Linhagem MCF-7 com 70% de confluência celular após 96h de cultivo. Aumento de 200x.

#### 4.2 Viabilidade Celular

Foram utilizados esquemas de tratamento isolado e combinado para as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, seguida da avaliação da viabilidade celular pela redução do MTT. Foram realizados tratamentos de 24h e 48h utilizando GEN (1  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M e 5  $\mu$ M) e 24h utilizando DXR (1 ng/mL, 2 ng/mL e 5 ng/mL). Os experimentos com RAD (5 Gy e 10 Gy) foram realizados após 24h da irradiação.

Para a linhagem MDA-MB-231, foi observado que apenas os tratamentos GEN 1  $\mu$ M 24h, GEN 1  $\mu$ M 48h, RAD 10 Gy e DXR 1 ng/mL + GEN 5  $\mu$ M reduziram a viabilidade significativamente em comparação ao controle de vida ( $P1 < 0,001$ ) (Tabela 2).

Tabela 2: Análise da Viabilidade Celular na linhagem MDA-MB-231 comparando Tratamentos em relação aos Controles.

Tratamentos	Viabilidade (X% $\pm$ DP)	P1	P2	P3
Controle de Vida	100 $\pm$ 0	-	-	-
Controle de Morte	1,27 $\pm$ 0,95	<0,001*	-	-
DMSO 0,1%	100,70 $\pm$ 5,5	ns	<0,001*	-
1 $\mu$ M GEN 24h	81,87 $\pm$ 5,26	<0,001*	<0,001*	<0,001*
2,5 $\mu$ M GEN 24h	96,06 $\pm$ 2,45	ns	<0,001*	ns
5 $\mu$ M GEN 24h	102,30 $\pm$ 2,19	ns	<0,001*	ns
1ng/mL DXR 24h	111,20 $\pm$ 2,03	<0,001*	<0,001*	<0,001*
2ng/mL DXR 24h	113,20 $\pm$ 2,37	<0,001*	<0,001*	<0,001*
5ng/mL DXR 24h	117,70 $\pm$ 2,71	<0,001*	<0,001*	<0,001*
1 $\mu$ M GEN 48h	88,04 $\pm$ 3,23	<0,001*	<0,001*	<0,001*
2,5 $\mu$ M GEN 48h	99,69 $\pm$ 2,26	ns	<0,001*	ns
5 $\mu$ M GEN 48h	106,80 $\pm$ 4,67	ns	<0,001*	ns
5Gy RAD 24h	126,20 $\pm$ 4,31	<0,001*	<0,001*	<0,001*
10Gy RAD 24h	78,39 $\pm$ 9,87	<0,001*	<0,001*	<0,001*
GEN 1 $\mu$ M 24h+DXR 1ng/mL 24h	98,58 $\pm$ 3,37	ns	<0,001*	ns
GEN 2,5 $\mu$ M 24h+DXR 1ng/mL 24h	102,10 $\pm$ 3,04	ns	<0,001*	ns
GEN 5 $\mu$ M 24h+DXR 1ng/mL 24h	101,20 $\pm$ 2,45	ns	<0,001*	ns
DXR 1ng/mL 24h+GEN 1 $\mu$ M 24h	128,10 $\pm$ 2,74	<0,001*	<0,001*	<0,001*
DXR 1ng/mL 24h+GEN 2,5 $\mu$ M 24h	126,20 $\pm$ 3,04	<0,001*	<0,001*	<0,001*
DXR 1ng/mL 24h+GEN 5 $\mu$ M 24h	81,82 $\pm$ 3,16	<0,001*	<0,001*	<0,001*
GEN 1 $\mu$ M 24h+RAD 10Gy 24h	103,20 $\pm$ 4,49	ns	<0,001*	ns
GEN 2,5 $\mu$ M 24h+RAD 10Gy 24h	141,80 $\pm$ 2,91	<0,001*	<0,001*	<0,001*
GEN 5 $\mu$ M 24h+RAD 10Gy 24h	140,60 $\pm$ 2,60	<0,001*	<0,001*	<0,001*
RAD 10Gy 24h+GEN 1 $\mu$ M 24h	109,10 $\pm$ 4,05	<0,01*	<0,001*	<0,05*
RAD 10Gy 24h+GEN 2,5 $\mu$ M 24h	143,40 $\pm$ 8,94	<0,001*	<0,001*	<0,001*
RAD 10Gy 24h+GEN 5 $\mu$ M 24h	134,40 $\pm$ 5,37	<0,001*	<0,001*	<0,001*

P: Teste One-Way ANOVA e Comparação de Dunnett com  $\alpha=0,05$ ; X%  $\pm$  DP: Média%  $\pm$  Desvio Padrão; 1: Tratamentos versus Controle de Vida; 2: Tratamentos versus Controle de Morte; 3: Tratamentos versus DMSO 0,1%; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Os tratamentos com DXR e os pós-tratamentos DXR 1 ng/mL + GEN 1  $\mu$ M e DXR 1 ng/mL + GEN 2,5  $\mu$ M provocaram aumento significativo na viabilidade celular da MDA-MB-231 em relação com controle ( $P1 < 0,05$ ). A dose de RAD 5 Gy e os demais tratamentos combinados com RAD também elevaram a viabilidade celular significativamente ( $P1 < 0,05$ ) (Tabela 2).

Comparando as viabilidades produzidas em cada dose de GEN (Tabela 3), foi observado que houve diferenças significativas nos tratamentos por 24h ( $P1$ ,  $P2$  e  $P3 < 0,05$ ), assim como nos tratamentos por 48h ( $P1$  e  $P2 < 0,05$ ), tal modo que, o aumento na dose de GEN provoca aumento na viabilidade da MDA-MB-231 em 24h e 48h ( $P1$ ,  $P2$  e  $P3 < 0,05$ ) (Tabela 3).

Tabela 3: Análise da Viabilidade% em MDA-MB-231 de acordo com a dose de GEN, DXR e RAD.

Tempo	Viabilidade com GEN (X% $\pm$ DP)			P1	P2	P3
	1 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M	5 $\mu$ M			
24h	81,87 $\pm$ 5,26	96,06 $\pm$ 2,45	102,30 $\pm$ 2,19	<0,001*	<0,001*	<0,05*
48h	88,04 $\pm$ 3,23	99,69 $\pm$ 2,26	106,80 $\pm$ 4,67	<0,001*	<0,001*	<0,01*
Tempo	Viabilidade com DXR (X% $\pm$ DP)			P4	P5	P6
	1 ng/mL	2 ng/mL	5 ng/mL			
24h	111,20 $\pm$ 2,03	113,20 $\pm$ 2,37	117,70 $\pm$ 2,71	ns	<0,001*	<0,05*
Tempo	Viabilidade com RAD (X% $\pm$ DP)			P7		
	5 Gy	10 Gy				
24h	126,20 $\pm$ 4,31	78,39 $\pm$ 9,87	<0,001*			

P: Teste-t não-pareado, Teste One-Way ANOVA e Teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X%  $\pm$  DP: Média%  $\pm$  Desvio Padrão; 1: GEN 1 $\mu$ M versus GEN 2,5 $\mu$ M; 2: GEN 1 $\mu$ M versus GEN 5 $\mu$ M; 3: GEN 2,5 $\mu$ M versus GEN 5 $\mu$ M; 4: DXR 1ng/mL versus DXR 2ng/mL; 5: DXR 1ng/mL versus DXR 5ng/mL; 6: DXR 2ng/mL versus DXR 5ng/mL; 7: RAD 5Gy versus RAD 10Gy; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

A análise da viabilidade celular em relação ao tempo de tratamento apontou diferença significativa nas doses de GEN 1  $\mu$ M e 2,5  $\mu$ M ( $P < 0,05$ ), onde o aumento do tempo de exposição à GEN elevou a taxa de viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231 (Tabela 4).

Tabela 4: Análise da Viabilidade% em células MDA-MB-231 de acordo com o tempo de tratamento com GEN.

GEN	Viabilidade (X% $\pm$ DP)		P
	24h	48h	
1 $\mu$ M	81,87 $\pm$ 5,26	88,04 $\pm$ 3,23	0,0345*
2,5 $\mu$ M	96,06 $\pm$ 2,45	99,69 $\pm$ 2,26	0,0235*
5 $\mu$ M	102,30 $\pm$ 2,19	106,80 $\pm$ 4,67	0,0562

P: Teste-t não-pareado com  $\alpha=0,05$ ; X%  $\pm$  DP: Média%  $\pm$  Desvio Padrão; \*: estatisticamente significativo.

Comparando as viabilidades produzidas em cada dose de GEN (Tabela 5) foi observado que não houve diferença estatística nas viabilidades celulares nos pré-tratamentos combinados com DXR na linhagem MDA-MB-231. Além disso, os pós-tratamentos DXR 1 ng/mL + GEN 1  $\mu$ M e DXR 1 ng/mL + GEN 2,5  $\mu$ M também não produziram diferenças na viabilidade celular, entretanto, o aumento da dose de GEN em DXR 1 ng/mL + GEN 5  $\mu$ M reduziu significativamente a viabilidade da MDA-MB-231 para 81,82% ( $p < 0,001$ ) (Tabela 5).

Quanto aos tratamentos combinados com RAD, a dose de GEN 1  $\mu$ M em ambos pré e pós-tratamentos apresentou redução significativa na viabilidade em relação as doses de 2,5  $\mu$ M e 5  $\mu$ M ( $p < 0,001$ ) (Tabela 5).

Tabela 5: Análise da Viabilidade% na linhagem MDA-MB-231 comparando a variação da dose de GEN nos tratamentos combinados.

Tratamentos	Viabilidade em GEN (X% $\pm$ DP)			P1	P2	P3
	1 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M	5 $\mu$ M			
(GEN 24h+DXR 24h)	98,58 $\pm$ 3,37	102,1 $\pm$ 3,04	101,2 $\pm$ 2,45	ns	ns	ns
(DXR 24h+GEN 24h)	128,1 $\pm$ 2,74	126,2 $\pm$ 3,04	81,82 $\pm$ 3,16	ns	<0,001*	<0,001*
(GEN 24h+RAD 24h)	103,2 $\pm$ 4,49	141,8 $\pm$ 2,91	140,6 $\pm$ 2,60	<0,001*	<0,001*	ns
(RAD 24h+GEN 24h)	109,1 $\pm$ 4,05	143,4 $\pm$ 8,94	134,4 $\pm$ 5,37	<0,001*	<0,001*	ns

P: Teste One-Way ANOVA com  $\alpha=0,05$  e Teste de Tukey; X%  $\pm$  DP: Média%  $\pm$  Desvio Padrão; 1: GEN 1 $\mu$ M versus GEN 2,5 $\mu$ M; 2: GEN 1 $\mu$ M versus GEN 5 $\mu$ M; 3: GEN 2,5 $\mu$ M versus GEN 5 $\mu$ M; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

A análise dos pré-tratamentos em relação aos pós-tratamentos em MDA-MB-231 apresentou diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) (Tabela 6), exceto nos tratamentos combinados com RAD nas doses de GEN 1  $\mu$ M e 2,5  $\mu$ M.

Tabela 6: Análise da Viabilidade comparando Tratamentos combinados na linhagem MDA-MB-231.

Doses	Viabilidade (X% $\pm$ DP)		p
	pré-tratamento (GEN 24h + DXR 24h)	pós-tratamento (DXR 24h + GEN 24h)	
1 $\mu$ M	98,58 $\pm$ 3,37	128,10 $\pm$ 2,74	<0,001*
2,5 $\mu$ M	102,10 $\pm$ 3,04	126,20 $\pm$ 3,04	<0,001*
5 $\mu$ M	101,20 $\pm$ 2,45	81,82 $\pm$ 3,16	<0,001*
Doses	Viabilidade (X% $\pm$ DP)		p
	pré-tratamento (GEN 24h + RAD 24h)	pós-tratamento (RAD 24h + GEN 24h)	
1 $\mu$ M	103,20 $\pm$ 4,49	109,10 $\pm$ 4,05	ns
2,5 $\mu$ M	141,80 $\pm$ 2,91	143,40 $\pm$ 8,94	ns
5 $\mu$ M	140,60 $\pm$ 2,60	134,40 $\pm$ 5,37	<0,05*

P: Teste One-Way ANOVA com  $\alpha=0,05$  e Teste de Tukey; X%  $\pm$  DP: Média%  $\pm$  Desvio Padrão; p: GEN+DXR versus DXR+GEN; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Para a linhagem MCF-7, foi observado que todos os tratamentos com irradiação reduziram significativamente a viabilidade em comparação ao controle de vida ( $P1 < 0,001$ ). No entanto, os tratamentos isolados ou combinados com DXR não provocaram redução na taxa de viabilidade, exceto o pós-tratamento DXR 1 ng/mL + GEN 5  $\mu$ M, o qual resultou em expressiva morte celular ( $P1 < 0,001$ ). De modo geral, os tratamentos com GEN induziram significativa elevação na viabilidade celular na MCF-7 (Tabela 7).

Tabela 7: Análise da Viabilidade Celular na linhagem MCF-7 comparando Tratamentos em relação aos Controles.

Tratamentos	Viabilidade (X% $\pm$ DP)	P1	P2	P3
Controle de Vida	100% $\pm$ 0	-	-	-
Controle de Morte	0,84 $\pm$ 0,74	<0,001*	-	-
DMSO 0,1%	101,80 $\pm$ 1,29	ns	<0,001*	-
1 $\mu$ M GEN 24h	104,30 $\pm$ 2,77	ns	<0,001*	ns
2,5 $\mu$ M GEN 24h	118,30 $\pm$ 1,25	<0,001*	<0,001*	<0,001*
5 $\mu$ M GEN 24h	116,90 $\pm$ 1,34	<0,001*	<0,001*	<0,001*
1ng/mL DXR 24h	107,10 $\pm$ 2,11	<0,01*	<0,001*	ns
2ng/mL DXR 24h	113,50 $\pm$ 1,54	<0,001*	<0,001*	<0,001*
5ng/mL DXR 24h	104,60 $\pm$ 1,56	ns	<0,001*	ns
1 $\mu$ M GEN 48h	195,00 $\pm$ 3,95	<0,001*	<0,001*	<0,001*
2,5 $\mu$ M GEN 48h	182,80 $\pm$ 8,54	<0,001*	<0,001*	<0,001*
5 $\mu$ M GEN 48h	180,00 $\pm$ 5,47	<0,001*	<0,001*	<0,001*
5Gy RAD 24h	84,36 $\pm$ 1,27	<0,001*	<0,001*	<0,001*
10Gy RAD 24h	73,34 $\pm$ 2,87	<0,001*	<0,001*	<0,001*
GEN 1 $\mu$ M 24h+DXR 1ng/mL 24h	100,70 $\pm$ 2,07	ns	<0,001*	ns
GEN 2,5 $\mu$ M 24h+DXR 1ng/mL 24h	101,10 $\pm$ 1,20	ns	<0,001*	ns
GEN 5 $\mu$ M 24h+DXR 1ng/mL 24h	101,50 $\pm$ 1,67	ns	<0,001*	ns
DXR 1ng/mL 24h+GEN 1 $\mu$ M 24h	101,70 $\pm$ 1,20	ns	<0,001*	ns
DXR 1ng/mL 24h+GEN 2,5 $\mu$ M 24h	99,96 $\pm$ 1,30	ns	<0,001*	ns
DXR 1ng/mL 24h+GEN 5 $\mu$ M 24h	64,91 $\pm$ 4,15	<0,001*	<0,001*	<0,001*
GEN 1 $\mu$ M 24h+RAD 5Gy 24h	83,48 $\pm$ 1,95	<0,001*	<0,001*	<0,001*
GEN 2,5 $\mu$ M 24h+RAD 5Gy 24h	88,56 $\pm$ 0,71	<0,001*	<0,001*	<0,001*
GEN 5 $\mu$ M 24h+RAD 5Gy 24h	85,07 $\pm$ 1,63	<0,001*	<0,001*	<0,001*
RAD 5Gy 24h+GEN 1 $\mu$ M 24h	82,38 $\pm$ 1,76	<0,001*	<0,001*	<0,001*
RAD 5Gy 24h+GEN 2,5 $\mu$ M 24h	90,91 $\pm$ 0,82	<0,001*	<0,001*	<0,001*
RAD 5Gy 24h+GEN 5 $\mu$ M 24h	88,24 $\pm$ 1,18	<0,001*	<0,001*	<0,001*

P: Teste One-Way ANOVA e Comparação de Dunnett com  $\alpha=0,05$ ; X%  $\pm$  DP: Média%  $\pm$  Desvio Padrão; 1: Tratamentos versus Controle de Vida; 2: Tratamentos versus Controle de Morte; 3: Tratamentos versus DMSO 0,1%; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Os tratamentos isolados com GEN 1  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M e 5  $\mu$ M por 24h apresentaram respectivamente 104,30%, 118,30% e 116,90% de viabilidade celular na MCF-7, sendo observado que GEN 1  $\mu$ M não diferiu significativamente do

controle de vida (Tabela 8), porém o aumento da dose para 2,5  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$  provocou aumento significativo na viabilidade celular ( $P1 < 0,001$ ) (Tabela 8). As mesmas doses de GEN por 48h produziram respectivamente viabilidades de 195,00%, 182,80% e 180,00%, onde o aumento da dose provocou tendência de diminuição da viabilidade celular ( $P1 < 0,001$ ) (Tabela 8).

Tabela 8: Análise da Viabilidade % em MCF-7 de acordo com a dose de GEN, DXR e RAD.

Tempo	Viabilidade com GEN (X% $\pm$ DP)			P1	P2	P3
	1 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$			
24h	104,30 $\pm$ 2,77	118,30 $\pm$ 1,25	116,90 $\pm$ 1,34	<0,001*	<0,001*	ns
48h	195,00 $\pm$ 3,95	182,80 $\pm$ 8,54	180,00 $\pm$ 5,47	<0,05*	<0,01*	ns
Tempo	Viabilidade com DXR (X% $\pm$ DP)			P4	P5	P6
	1 ng/mL	2 ng/mL	5 ng/mL			
24h	107,10 $\pm$ 2,11	113,50 $\pm$ 1,54	104,60 $\pm$ 1,56	<0,001*	ns	<0,001*
Tempo	Viabilidade com RAD (X% $\pm$ DP)		P7			
	5 Gy	10 Gy				
24h	84,36 $\pm$ 1,27	73,34 $\pm$ 2,70	<0,001*			

P: Teste-t não-pareado, Teste One-Way ANOVA e Teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X%  $\pm$  DP: Média%  $\pm$  Desvio Padrão; 1: GEN 1 $\mu\text{M}$  versus GEN 2,5 $\mu\text{M}$ ; 2: GEN 1 $\mu\text{M}$  versus GEN 5 $\mu\text{M}$ ; 3: GEN 2,5 $\mu\text{M}$  versus GEN 5 $\mu\text{M}$ ; 4: DXR 1ng/mL versus DXR 2ng/mL; 5: DXR 1ng/mL versus DXR 5ng/mL; 6: DXR 2ng/mL versus DXR 5ng/mL; 7: RAD 5Gy versus RAD 10Gy; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Comparando a viabilidade celular em relação à dose de GEN (Tabela 9), foi observado que o aumento na concentração não afeta a viabilidade no pré-tratamento com DXR nas células MCF-7. Por outro lado, no pós-tratamento o aumento da concentração para GEN 5  $\mu\text{M}$  reduziu significativamente a viabilidade para 64,91% ( $P2$  e  $P3 < 0,001$ ). Comparando os tratamentos irradiados foram observadas variações significativas principalmente em relação à dose GEN 2,5  $\mu\text{M}$  ( $P1$  e  $P3 < 0,01$ ) (Tabela 9).

Tabela 9: Análise da Viabilidade% na linhagem MCF-7 comparando a variação da dose de GEN nos tratamentos combinados.

Tratamentos	Viabilidade em GEN (X% $\pm$ DP)			P1	P2	P3
	1 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$			
(GEN 24h+DXR 24h)	100,7 $\pm$ 2,07	101,1 $\pm$ 1,20	101,5 $\pm$ 1,67	ns	ns	ns
(DXR 24h+GEN 24h)	101,7 $\pm$ 1,20	99,96 $\pm$ 1,30	64,91 $\pm$ 4,15	ns	<0,001*	<0,001*
(GEN 24h+RAD 24h)	83,48 $\pm$ 1,95	88,56 $\pm$ 0,71	85,07 $\pm$ 1,63	<0,001*	ns	<0,01*
(RAD 24h+GEN 24h)	82,38 $\pm$ 1,76	90,91 $\pm$ 0,82	88,24 $\pm$ 1,18	<0,001*	<0,001*	<0,01*

P: Teste One-Way ANOVA com  $\alpha=0,05$  e Teste de Tukey; X%  $\pm$  DP: Média%  $\pm$  Desvio Padrão; 1: GEN 1 $\mu\text{M}$  versus GEN 2,5 $\mu\text{M}$ ; 2: GEN 1 $\mu\text{M}$  versus GEN 5 $\mu\text{M}$ ; 3: GEN 2,5 $\mu\text{M}$  versus GEN 5 $\mu\text{M}$ ; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

A análise dos pré-tratamentos em relação aos pós-tratamentos em MCF-7 apresentou diferenças estatisticamente significativas (Tabela 10). O pós-tratamento DXR + GEN 5  $\mu$ M provocou morte significativa em comparação ao pré-tratamento ( $p < 0,001$ ). Por outro lado, os pré-tratamentos GEN 2,5  $\mu$ M + 10 Gy e GEN 2,5  $\mu$ M + 10Gy induziram ligeira redução na viabilidade em comparação com os respectivos pós-tratamentos ( $p < 0,01$ ) (Tabela 10).

Tabela 10: Análise da Viabilidade comparando Tratamentos combinados na linhagem MCF-7.

Doses	Viabilidade (X% $\pm$ DP)		p
	pré-tratamento (GEN 24h + DXR 24h)	pós-tratamento (DXR 24h + GEN 24h)	
1 $\mu$ M	100,70 $\pm$ 2,07	101,70 $\pm$ 1,20	ns
2,5 $\mu$ M	101,10 $\pm$ 1,20	99,96 $\pm$ 1,30	ns
5 $\mu$ M	101,50 $\pm$ 1,67	64,91 $\pm$ 4,15	<b>&lt;0,001*</b>
Doses	Viabilidade (X% $\pm$ DP)		p
	pré-tratamento (GEN 24h + RAD 24h)	pós-tratamento (RAD 24h + GEN 24h)	
1 $\mu$ M	83,48 $\pm$ 1,95	82,38 $\pm$ 1,76	ns
2,5 $\mu$ M	88,56 $\pm$ 0,71	90,91 $\pm$ 0,82	<b>&lt;0,01*</b>
5 $\mu$ M	85,07 $\pm$ 1,63	88,24 $\pm$ 1,18	<b>&lt;0,01*</b>

P: Teste One-Way ANOVA com  $\alpha=0,05$  e Teste de Tukey; X%  $\pm$  DP: Média%  $\pm$  Desvio Padrão; p: GEN+DXR versus DXR+GEN; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Analisando as diferenças na viabilidade entre as linhagens celulares (Tabela 11), foi observado que células MDA-MB-231 apresentaram viabilidade significativamente menor do que células MCF-7 após os tratamentos isolados com GEN por 24h e 48h ( $P < 0,001$ ). Além disso, foi apontado que células MCF-7 sofrem intensa morte celular na dose de RAD 5 Gy, ao contrário das células MDA-MB-231 ( $P < 0,001$ ). Não houve diferenças significativas quanto aos pré-tratamentos para ambas as linhagens, entretanto, células MDA-MB-231 apresentaram significativo aumento na viabilidade associado ao pós-tratamento ( $P < 0,001$ ) (Tabela 11).

Tabela 11: Análise da Viabilidade% comparando as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7.

Tratamentos	Viabilidade (X% ± DP)		P
	MDA-MB-231	MCF-7	
Controle de Vida	100% ± 0	100% ± 0	1,000
Controle de Morte	1,27 ± 0,95	0,84 ± 0,74	0,642
DMSO 0,1%	100,70% ± 5,5	101,80 ± 1,29	0,408
1µM GEN 24h	81,87 ± 5,26	104,30 ± 2,77	<0,001*
2,5µM GEN 24h	96,06 ± 2,45	118,30 ± 1,25	<0,001*
5µM GEN 24h	102,30 ± 2,19	116,90 ± 1,34	<0,001*
1ng/mL DXR 24h	111,20 ± 2,03	107,10 ± 2,11	0,006*
2ng/mL DXR 24h	113,20 ± 2,37	113,50 ± 1,54	0,779
5ng/mL DXR 24h	117,70 ± 2,71	104,60 ± 1,56	<0,001*
1µM GEN 48h	88,04 ± 3,23	195,00 ± 3,95	<0,001*
2,5µM GEN 48h	99,69 ± 2,26	182,80 ± 8,54	<0,001*
5µM GEN 48h	106,80 ± 4,67	180,00 ± 5,47	<0,001*
5Gy RAD 24h	126,20 ± 4,31	84,36 ± 1,27	<0,001*
10Gy RAD 24h	78,39 ± 9,87	73,34 ± 2,87	0,256
GEN 1µM 24h+DXR 1ng/mL 24h	98,58 ± 3,37	100,70 ± 2,07	0,221
GEN 2,5µM 24h+DXR 1ng/mL 24h	102,10 ± 3,04	101,10 ± 1,20	0,465
GEN 5µM 24h+DXR 1ng/mL 24h	101,20 ± 2,45	101,50 ± 1,67	0,820
DXR 1ng/mL 24h+GEN 1µM 24h	128,10 ± 2,74	101,70 ± 1,20	<0,001*
DXR 1ng/mL 24h+GEN 2,5µM 24h	126,20 ± 3,04	99,96 ± 1,30	<0,001*
DXR 1ng/mL 24h+GEN 5µM 24h	81,82 ± 3,16	64,91 ± 4,15	<0,001*

P: Teste-t não-pareado com  $\alpha=0,05$ , X% ± DP: Média% ± Desvio Padrão; \*: estatisticamente significativo.

#### 4.3 Interação entre os tratamentos GEN, DXR e RAD

A investigação dos efeitos da interação entre os componentes GEN, DXR e RAD nos tratamentos combinados utilizou os resultados de Viabilidade Celular em MDA-MB-231 e MCF-7. Dessa forma, a partir do cálculo do CID, as interações foram definidas como: efeito aditivo quando CID = 1; efeito antagônico quando CID > 1; efeito sinérgico quando CID < 1 e efeito sinérgico significativo quando CID < 0,7 (Figura 6).

Em MDA-MB-231, a análise dos tratamentos combinados em relação aos tratamentos isolados apresentou diferenças estatisticamente significativas na viabilidade celular (Tabela 12), sendo observado que nos tratamentos combinados com DXR, a dose de GEN 5 µM exerceu efeitos sinérgicos em ambos pré e pós-tratamentos (CID <1). Além disso, no tratamento GEN 2,5 µM + DXR houve adição (CID <1, estatisticamente não significativo) (Tabela 12). Por outro lado, nas combinações expostas à radiação, os efeitos de GEN em combinação com RAD

---

apresentaram atividades antagônicas (CID >1), tal modo que, a morte celular induzida pelo tratamento isolado com RAD é superior aos tratamentos combinados com GEN (*P5, P6, P7 e P8* <0,001).

A análise dos tratamentos combinados em relação aos tratamentos isolados em MCF-7 apresentou diferenças estatisticamente significativas na viabilidade celular (Tabela 13). De modo geral, os efeitos de GEN em combinação com RAD ou DXR apresentaram atividades sinérgicas em todas as doses testadas (CID <1), com destaque para o pós-tratamento DXR + GEN 5 µM, que obteve forte sinergia na redução da viabilidade celular (CID <0,7). No entanto, a respeito dos tratamentos irradiados, a morte celular induzida pelos tratamentos combinados com GEN não superou o tratamento isolado com 5 Gy (*P5, P6, P7 e P8* <0,001) (Tabela 13).

Tabela 12: Avaliação dos efeitos da interação entre os componentes GEN, DXR e RAD na linhagem MDA-MB-231 por meio do CID.

Dose	Viabilidade (X% ± DP)			P1	P2	CID (X ± DP)	P9
	pré (GEN 24h + DXR 24h)	GEN 24h	DXR 24h (1 ng/mL)				
1 µM	98,58 ± 3,37	81,87 ± 5,26		<0,001*	<0,001*	1,08 ± 0,05	<0,001*
2,5 µM	102,10 ± 3,04	96,06 ± 2,45	111,20 ± 2,03	<0,01*	<0,001*	0,96 ± 0,02	ns
5 µM	101,20 ± 2,45	102,30 ± 2,19		ns	<0,001*	0,89 ± 0,02	<0,001*
Dose	pós (DXR 24h + GEN 24h)	GEN 24h	DXR 24h (1 ng/mL)	P3	P4	CID (X ± DP)	P9
1 µM	128,10 ± 2,74	81,87 ± 5,26		<0,001*	<0,001*	1,41 ± 0,09	<0,001*
2,5 µM	126,20 ± 3,04	96,06 ± 2,45	111,20 ± 2,03	<0,001*	<0,001*	1,18 ± 0,02	<0,001*
5 µM	81,82 ± 3,16	102,30 ± 2,19		<0,001*	<0,001*	0,72 ± 0,01	<0,001*
Dose	pré (GEN 24h + RAD 24h)	GEN 24h	RAD (10 Gy)	P5	P6	CID (X ± DP)	P9
1 µM	103,20 ± 4,49	81,87 ± 5,26		<0,001*	<0,001*	1,63 ± 0,23	<0,001*
2,5 µM	141,80 ± 2,91	96,06 ± 2,45	78,39 ± 9,87	<0,001*	<0,001*	1,91 ± 0,24	<0,001*
5 µM	140,60 ± 2,60	102,30 ± 2,19		<0,001*	<0,001*	1,78 ± 0,22	<0,001*
Dose	pós (RAD 24h + GEN 24h)	GEN 24h	RAD (10 Gy)	P7	P8	CID (X ± DP)	P9
1 µM	109,10 ± 4,05	81,87 ± 5,26		<0,001*	<0,001*	1,73 ± 0,25	<0,001*
2,5 µM	143,40 ± 8,94	96,06 ± 2,45	78,39 ± 9,87	<0,001*	<0,001*	1,92 ± 0,19	<0,001*
5 µM	134,40 ± 5,37	102,30 ± 2,19		<0,001*	<0,001*	1,69 ± 0,18	<0,001*

P: Teste One-Way ANOVA com  $\alpha=0,05$  e Teste de Tukey; X% ± DP: Média% ± Desvio Padrão; CID: Coeficiente de Interação entre Drogas; 1: GEN+DXR versus GEN 24h; 2: GEN+DXR versus DXR 24h; 3: DXR+GEN versus GEN 24h; 4: DXR+GEN versus DXR 24h; 5: GEN+RAD versus GEN 24h; 6: GEN+RAD versus RAD 24h; 7: RAD+GEN versus GEN 24h; 8: RAD+GEN versus RAD 24h; 9: CID versus Controle=1; CID = 1: efeito aditivo; CID > 1: efeito antagônico; CID < 1: efeito sinérgico. ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Tabela 13: Avaliação dos efeitos da interação entre os componentes GEN, DXR e RAD na linhagem MCF-7 por meio do CID.

Dose	Viabilidade (X% ± DP)			P1	P2	CID (X ± DP)	P9
	pré (GEN 24h + DXR 24h)	GEN 24h	DXR 24h (1 ng/mL)				
1 µM	100,70 ± 2,07	104,30 ± 2,77		<0,05*	<0,001*	0,90 ± 0,02	<0,001*
2,5 µM	101,10 ± 1,20	118,30 ± 1,25	107,10 ± 2,11	<0,001*	<0,001*	0,80 ± 0,01	<0,001*
5 µM	101,50 ± 1,67	116,90 ± 1,34		<0,001*	<0,05*	0,81 ± 0,01	<0,001*
Dose	pós (DXR 24h + GEN 24h)	GEN 24h	DXR 24h (1 ng/mL)	P3	P4	CID (X ± DP)	P9
1 µM	101,70 ± 1,20	104,30 ± 2,77		ns	<0,001*	0,91 ± 0,03	<0,001*
2,5 µM	99,96 ± 1,30	118,30 ± 1,25	107,10 ± 2,11	<0,001*	<0,001*	0,79 ± 0,01	<0,001*
5 µM	64,91 ± 4,15	116,90 ± 1,34		<0,001*	<0,001*	0,52 ± 0,02	<0,001*
Dose	pré (GEN 24h + RAD 24h)	GEN 24h	RAD (5 Gy)	P5	P6	CID (X ± DP)	P9
1 µM	83,48 ± 1,95	104,30 ± 2,77		<0,001*	ns	0,95 ± 0,02	<0,001*
2,5 µM	88,56 ± 0,71	118,30 ± 1,25	84,36 ± 1,27	<0,001*	<0,001*	0,89 ± 0,02	<0,001*
5 µM	85,07 ± 1,63	116,90 ± 1,34		<0,001*	ns	0,86 ± 0,01	<0,001*
Dose	pós (RAD 24h + GEN 24h)	GEN 24h	RAD (5 Gy)	P7	P8	CID (X ± DP)	P9
1 µM	82,38 ± 1,76	104,30 ± 2,77		<0,001*	ns	0,94 ± 0,02	<0,001*
2,5 µM	90,91 ± 0,82	118,30 ± 1,25	84,36 ± 1,27	<0,001*	<0,001*	0,91 ± 0,01	<0,001*
5 µM	88,24 ± 1,18	116,90 ± 1,34		<0,001*	<0,001*	0,89 ± 0,01	<0,001*

P: Teste *One-Way* ANOVA com  $\alpha=0,05$  e Teste de Tukey; X% ± DP: Média% ± Desvio Padrão; 1: GEN+DXR *versus* GEN 24h; 2: GEN+DXR *versus* DXR 24h; 3: DXR+GEN *versus* GEN 24h; 4: DXR+GEN *versus* DXR 24h; 5: GEN+RAD *versus* GEN 24h; 6: GEN+RAD *versus* RAD 24h; 7: RAD+GEN *versus* GEN 24h; 8: RAD+GEN *versus* RAD 24h; 9: CID *versus* Controle=1; CID = 1: efeito aditivo; CID > 1: efeito antagônico; CID < 1: efeito sinérgico; CID < 0,7: efeito fortemente sinérgico; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

#### 4.4 Apoptose

Foram utilizados esquemas de tratamento isolado e combinado para as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, realizando tratamentos de 24h com GEN (1  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M e 5  $\mu$ M) e 24h utilizando DXR (1 ng/mL). Os experimentos com RAD (5 Gy e 10 Gy) foram realizados após 24h da irradiação. Após cada tratamento, foi feita a avaliação da porcentagem de apoptose por meio da marcação do DNA com PI e leitura em citômetro de fluxo. Células em apoptose avançada estão em fase Sub-G1.

Para a linhagem MDA-MB-231, foi observado que dentre os tratamentos isolados, apenas GEN 1  $\mu$ M por 24h provocou aumento significativo na apoptose em relação ao controle ( $P1 < 0,001$ ). Além disso, as doses de GEN 1  $\mu$ M e 5  $\mu$ M nos pré e pós-tratamentos com DXR também induziram apoptose estatisticamente significativa em comparação ao controle ( $P1 < 0,05$ ). De modo geral, os tratamentos combinados com RAD provocaram forte elevação na taxa de apoptose em relação ao controle, exceto os pré-tratamentos com GEN 1  $\mu$ M e 5  $\mu$ M ( $P1 < 0,001$ ) (Tabela 14).

Tabela 14: Análise da Apoptose na linhagem MDA-MB-231 comparando Tratamentos em relação aos Controles.

Tratamentos	Apoptose (X% $\pm$ DP)	P1	P2
Controle	0,11 $\pm$ 0,19	-	-
DMSO 0,1%	0,91 $\pm$ 1,81	ns	-
1 $\mu$ M GEN 24h	13,10 $\pm$ 4,38	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>
2,5 $\mu$ M GEN 24h	0,38 $\pm$ 0,65	ns	ns
5 $\mu$ M GEN 24h	0,76 $\pm$ 0,94	ns	ns
1ng/mL DXR 24h	2,96 $\pm$ 3,54	ns	ns
10Gy RAD 24h	1,09 $\pm$ 1,88	ns	ns
GEN 1 $\mu$ M 24h+DXR 1ng/mL 24h	9,24 $\pm$ 3,46	<b>&lt;0,05*</b>	ns
GEN 2,5 $\mu$ M 24h+DXR 1ng/mL 24h	2,81 $\pm$ 4,70	ns	ns
GEN 5 $\mu$ M 24h+DXR 1ng/mL 24h	9,25 $\pm$ 3,23	<b>&lt;0,05*</b>	ns
DXR 1ng/mL 24h+GEN 1 $\mu$ M 24h	12,59 $\pm$ 2,35	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>
DXR 1ng/mL 24h+GEN 2,5 $\mu$ M 24h	0,0 $\pm$ 0,0	ns	ns
DXR 1ng/mL 24h+GEN 5 $\mu$ M 24h	9,60 $\pm$ 3,78	<b>&lt;0,01*</b>	<b>&lt;0,01*</b>
GEN 1 $\mu$ M 24h+RAD 10Gy 24h	1,50 $\pm$ 2,59	ns	ns
GEN 2,5 $\mu$ M 24h+RAD 10Gy 24h	30,47 $\pm$ 16,45	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>
GEN 5 $\mu$ M 24h+RAD 10Gy 24h	4,49 $\pm$ 3,79	ns	ns
RAD 10Gy 24h+GEN 1 $\mu$ M 24h	26,29 $\pm$ 6,05	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>
RAD 10Gy 24h+GEN 2,5 $\mu$ M 24h	17,61 $\pm$ 1,96	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>
RAD 10Gy 24h+GEN 5 $\mu$ M 24h	16,93 $\pm$ 3,07	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>

P: Teste One-Way ANOVA e Comparação de Dunnett com  $\alpha=0,05$ ; X%  $\pm$  DP: Média%  $\pm$  Desvio Padrão; 1: Tratamentos *versus* controle; 2: Tratamentos *versus* DMSO 0,1%; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Comparando a taxa de apoptose em relação à dose de GEN (Tabela 15), foi observado que o aumento da concentração provocou redução significativa na apoptose de células MDA-MB-231 ( $P1$  e  $P2 < 0,001$ ). Analisando os pré-tratamentos GEN + DXR, não houve diferenças estatísticas na taxa de apoptose em relação à dose de GEN. No entanto, o pós-tratamento DXR + GEN 2,5  $\mu\text{M}$  apresentou forte redução na apoptose em relação as doses de GEN 1  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$  ( $P1$  e  $P3 < 0,001$ ). A respeito dos tratamentos combinados com RAD, foi observado que o pré-tratamento com GEN 2,5  $\mu\text{M}$  induziu taxas de apoptose significativamente maiores em relação às demais doses em células MDA-MB-231 ( $P1$  e  $P3 < 0,01$ ). O mesmo efeito foi observado no pós-tratamento com GEN 1  $\mu\text{M}$  ( $P1$  e  $P2 < 0,05$ ) (Tabela 15).

Tabela 15: Análise da Apoptose% na linhagem MDA-MB-231 comparando a variação da dose de GEN nos tratamentos.

Tratamentos	Apoptose em GEN (X% $\pm$ DP)			P1	P2	P3
	1 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$			
GEN 24h	13,10 $\pm$ 4,38	0,38 $\pm$ 0,65	0,76 $\pm$ 0,94	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>	ns
GEN 24h + DXR 24h	9,24 $\pm$ 3,46	2,81 $\pm$ 4,70	9,25 $\pm$ 3,23	ns	ns	ns
DXR 24h + GEN 24h	12,59 $\pm$ 2,35	0,0 $\pm$ 0,0	9,60 $\pm$ 3,78	<b>&lt;0,01*</b>	ns	<b>&lt;0,01*</b>
GEN 24h + RAD 24h	1,50 $\pm$ 2,59	30,47 $\pm$ 16,45	4,49 $\pm$ 3,79	<b>&lt;0,01*</b>	ns	<b>&lt;0,01*</b>
RAD 24h + GEN 24h	26,29 $\pm$ 6,05	17,61 $\pm$ 1,96	16,93 $\pm$ 3,07	<b>&lt;0,05*</b>	<b>&lt;0,05*</b>	ns

P: Teste One-Way ANOVA e Teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X%  $\pm$  DP: Média%  $\pm$  Desvio Padrão; 1: GEN 1 $\mu\text{M}$  versus GEN 2,5 $\mu\text{M}$ ; 2: GEN 1 $\mu\text{M}$  versus GEN 5 $\mu\text{M}$ ; 3: GEN 2,5 $\mu\text{M}$  versus GEN 5 $\mu\text{M}$ ; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Na análise dos tratamentos combinados em relação aos tratamentos isolados em células MDA-MB-231 (Tabela 16), foi observado que o pós-tratamento DXR + GEN 1  $\mu\text{M}$  apresentou aumento significativo da apoptose em relação ao tratamento isolado com DXR ( $P5 < 0,01$ ). Além disso, os pré e pós-tratamento com GEN 5  $\mu\text{M}$  também provocaram aumento significativo da taxa de apoptose de células MDA-MB-231 em comparação aos tratamentos isolados GEN 5  $\mu\text{M}$  e DXR 1 ng/mL ( $P2$  e  $P4 < 0,01$ ). A respeito dos tratamentos irradiados, os pós-tratamentos apresentaram taxas de apoptose significativamente maiores que os tratamentos isolados GEN e RAD ( $P9$  e  $P10 < 0,01$ ) (Tabela 16).

Tabela 16: Análise da Apoptose% comparando Tratamentos combinados e Tratamentos isolados na linhagem MDA-MB-231.

Doses	Apoptose (X% ± DP)				P1	P2	P3	P4	P5
	(pré-tratamento)	(pós-tratamento)	GEN 24h	DXR 24h (1 ng/mL)					
	GEN 24h + DXR 24h	DXR 24h + GEN 24h							
1µM	9,24 ± 3,46	12,59 ± 2,35	13,10 ± 4,38		ns	ns	ns	ns	<0,01*
2,5µM	2,81 ± 4,70	0,0 ± 0,0	0,38 ± 0,65	2,96 ± 3,54	ns	ns	ns	ns	ns
5µM	9,25 ± 3,23	9,60 ± 3,78	0,76 ± 0,94		ns	<0,01*	ns	<0,01*	ns

Doses	Apoptose (X% ± DP)				P6	P7	P8	P9	P10
	(pré-tratamento)	(pós-tratamento)	GEN 24h	RAD 24h (10 Gy)					
	GEN 24h + RAD 24h	RAD 24h + GEN 24h							
1µM	1,50 ± 2,59	26,29 ± 6,05	13,10 ± 4,38		<0,001*	<0,05*	ns	<0,05*	<0,001*
2,5µM	30,47 ± 16,45	17,61 ± 1,96	0,38 ± 0,65	1,09 ± 1,88	ns	<0,05*	<0,05*	<0,01*	<0,01*
5µM	4,49 ± 3,79	16,93 ± 3,07	0,76 ± 0,94		<0,001*	ns	ns	<0,001*	<0,001*

P: Teste One-Way ANOVA e Teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X% ± DP: Média% ± Desvio Padrão; 1: GEN+DXR versus DXR+GEN; 2: GEN+DXR versus GEN 24h; 3: GEN+DXR versus DXR 24h; 4: DXR+GEN versus GEN 24h; 5: DXR+GEN versus DXR 24h; 6: GEN+RAD versus RAD+GEN; 7: GEN+RAD versus GEN 24h; 8: GEN+RAD versus RAD 24h; 9: RAD+GEN versus GEN 24h; 10: RAD+GEN versus RAD 24h; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Comparando as taxas de apoptose na linhagem MCF-7, foi observado que todos os tratamentos isolados apresentaram aumento significativo em comparação ao controle ( $P1 < 0,05$ ) (Tabela 17). O mesmo efeito foi observado nos tratamentos combinados com DXR ( $P1 < 0,05$ ), exceto nos tratamentos GEN 5  $\mu\text{M}$  + DXR e DXR + GEN 1  $\mu\text{M}$ . Dentre os tratamentos irradiados, apenas GEN 5  $\mu\text{M}$  + RAD e RAD + GEN 2,5  $\mu\text{M}$  apresentaram aumento significativo da apoptose em relação ao controle ( $P1 < 0,05$ ) (Tabela 17).

Tabela 17: Análise da Apoptose% na linhagem MCF-7 comparando Tratamentos em relação aos Controles.

Tratamentos	Apoptose (X% $\pm$ DP)	P1	P2
Controle	0,56 $\pm$ 0,66	-	-
DMSO 0,1%	2,64 $\pm$ 2,03	ns	-
1 $\mu\text{M}$ GEN 24h	27,34 $\pm$ 12,66	<0,001*	<0,01*
2,5 $\mu\text{M}$ GEN 24h	14,76 $\pm$ 2,39	<0,05*	ns
5 $\mu\text{M}$ GEN 24h	26,48 $\pm$ 4,59	<0,01*	<0,01*
1ng/mL DXR 24h	20,04 $\pm$ 14,38	<0,05*	<0,05*
5Gy RAD 24h	17,68 $\pm$ 8,65	<0,05*	ns
GEN 1 $\mu\text{M}$ 24h+DXR 1ng/mL 24h	25,41 $\pm$ 4,82	<0,05*	<0,05*
GEN 2,5 $\mu\text{M}$ 24h+DXR 1ng/mL 24h	37,42 $\pm$ 25,32	<0,001*	<0,01*
GEN 5 $\mu\text{M}$ 24h+DXR 1ng/mL 24h	7,31 $\pm$ 5,39	ns	ns
DXR 1ng/mL 24h+GEN 1 $\mu\text{M}$ 24h	2,91 $\pm$ 1,57	ns	ns
DXR 1ng/mL 24h+GEN 2,5 $\mu\text{M}$ 24h	29,62 $\pm$ 6,87	<0,001*	<0,001*
DXR 1ng/mL 24h+GEN 5 $\mu\text{M}$ 24h	15,98 $\pm$ 4,10	<0,01*	<0,01*
GEN 1 $\mu\text{M}$ 24h+RAD 5Gy 24h	2,90 $\pm$ 3,45	ns	ns
GEN 2,5 $\mu\text{M}$ 24h+RAD 5Gy 24h	1,03 $\pm$ 1,81	ns	ns
GEN 5 $\mu\text{M}$ 24h+RAD 5Gy 24h	24,98 $\pm$ 12,55	<0,05*	<0,05*
RAD 5Gy 24h+GEN 1 $\mu\text{M}$ 24h	5,94 $\pm$ 3,25	ns	ns
RAD 5Gy 24h+GEN 2,5 $\mu\text{M}$ 24h	55,30 $\pm$ 8,26	<0,001*	<0,001*
RAD 5Gy 24h+GEN 5 $\mu\text{M}$ 24h	6,47 $\pm$ 1,92	ns	ns

P: Teste One-Way ANOVA e Comparação de Dunnett com  $\alpha=0,05$ ; X%  $\pm$  DP: Média%  $\pm$  Desvio Padrão; 1: Tratamentos *versus* Controle; 2: Tratamentos *versus* DMSO 0,1%; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Analisado as taxas de apoptose produzidas em cada dose de GEN (Tabela 18), foi observado que a variação na concentração não produz diferenças estatísticas nos tratamentos isolados com GEN e os tratamentos combinados com DXR na linhagem MCF-7. No entanto, nos pós-tratamentos, o aumento da dose de GEN provocou forte indução de apoptose, principalmente na concentração de GEN 2,5  $\mu\text{M}$  ( $P1$ ,  $P2$  e  $P3 < 0,05$ ). Nos tratamentos combinados com RAD, houve destaque do tratamento 5 Gy + GEN 2,5  $\mu\text{M}$ , o qual apresentou taxas de apoptose

significativamente mais altas em relação às demais doses ( $P1$  e  $P3 < 0,001$ ). Além disso, nos pré-tratamentos GEN + 5 Gy, o aumento da dose para GEN 5  $\mu\text{M}$  também provocou aumento significativo da apoptose em relação as doses de GEN 1  $\mu\text{M}$  e 2,5  $\mu\text{M}$  ( $P2$  e  $P3 < 0,01$ ) (Tabela 18).

Tabela 18: Análise da Apoptose% na linhagem MCF-7 comparando a variação da dose de GEN nos tratamentos.

Tratamentos	Apoptose em GEN (X% $\pm$ DP)			P1	P2	P3
	1 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$			
GEN 24h	27,34 $\pm$ 12,66	14,76 $\pm$ 2,39	26,48 $\pm$ 4,59	ns	ns	ns
GEN 24h + DXR 24h	25,41 $\pm$ 4,82	37,42 $\pm$ 25,32	7,31 $\pm$ 5,39	ns	ns	ns
DXR 24h + GEN 24h	2,91 $\pm$ 1,57	29,62 $\pm$ 6,87	15,98 $\pm$ 4,10	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,05*</b>	<b>&lt;0,05*</b>
GEN 24h + RAD 24h	2,90 $\pm$ 3,45	1,03 $\pm$ 1,81	24,98 $\pm$ 12,55	ns	<b>&lt;0,01*</b>	<b>&lt;0,01*</b>
RAD 24h + GEN 24h	5,94 $\pm$ 3,25	55,30 $\pm$ 8,26	6,47 $\pm$ 1,92	<b>&lt;0,001*</b>	ns	<b>&lt;0,001*</b>

P: Teste One-Way ANOVA e Teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X%  $\pm$  DP: Média%  $\pm$  Desvio Padrão; 1: GEN 1 $\mu\text{M}$  versus GEN 2,5 $\mu\text{M}$ ; 2: GEN 1 $\mu\text{M}$  versus GEN 5 $\mu\text{M}$ ; 3: GEN 2,5 $\mu\text{M}$  versus GEN 5 $\mu\text{M}$ ; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Na análise dos tratamentos combinados em relação aos tratamentos isolados na linhagem MCF-7 (Tabela 19), foi observado que, de modo geral, os tratamentos combinados com DXR não apresentam aumento significativo na taxa de apoptose em relação aos tratamentos. Além disso, não houve diferenças estatísticas entre pré e pós-tratamentos, exceto em GEN 1  $\mu\text{M}$  + DXR, o qual apresentou taxa de apoptose significativamente maior que DXR + GEN 1  $\mu\text{M}$  ( $P1 < 0,05$ ) (Tabela 19).

A respeito dos tratamentos irradiados, não houve diferenças estatísticas entre tratamentos isolados e combinados com GEN 5  $\mu\text{M}$ . Por outro lado, os tratamentos combinados com GEN 1  $\mu\text{M}$  apresentaram apoptose significativamente menor do que os tratamentos isolados ( $P7, P8, P9$  e  $P10 < 0,05$ ). Além disso, a dose GEN 2,5  $\mu\text{M}$  apresentou diferenças estatísticas entre todos os tratamentos, com destaque para o pós-tratamento RAD + GEN 2,5  $\mu\text{M}$ , o qual provocou a taxa de apoptose mais elevada em células MCF-7 ( $P6, P7, P8, P9$  e  $P10 < 0,05$ ) (Tabela 19).

Tabela 19: Análise da Apoptose% comparando Tratamentos combinados e Tratamentos isolados na linhagem MCF-7.

Doses	Apoptose (X% ± DP)				P1	P2	P3	P4	P5
	(pré-tratamento)	(pós-tratamento)	GEN 24h	DXR 24h (1 ng/mL)					
	GEN 24h + DXR 24h	DXR 24h + GEN 24h							
1µM	25,41 ± 4,82	2,91 ± 1,57	27,34 ± 12,66		<0,05*	ns	ns	<0,05*	ns
2,5µM	37,42 ± 25,32	29,62 ± 6,87	14,76 ± 2,39	20,04 ± 14,38	ns	ns	ns	ns	ns
5µM	7,31 ± 5,39	15,98 ± 4,10	26,48 ± 4,59		ns	<0,01*	ns	<0,05*	ns

Doses	Apoptose (X% ± DP)				P6	P7	P8	P9	P10
	(pré-tratamento)	(pós-tratamento)	GEN 24h	RAD 24h (5 Gy)					
	GEN 24h + RAD 24h	RAD 24h + GEN 24h							
1µM	2,90 ± 3,45	5,94 ± 3,25	27,34 ± 12,66		ns	<0,01*	<0,05*	<0,01*	<0,05*
2,5µM	1,03 ± 1,81	55,30 ± 8,26	14,76 ± 2,39	17,68 ± 8,65	<0,001*	<0,01*	<0,05*	<0,001*	<0,001*
5µM	24,98 ± 12,55	6,47 ± 1,92	26,48 ± 4,59		ns	ns	ns	ns	ns

P: Teste One-Way ANOVA e Teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X% ± DP: Média% ± Desvio Padrão; 1: GEN+DXR versus DXR+GEN; 2: GEN+DXR versus GEN 24h; 3: GEN+DXR versus DXR 24h; 4: DXR+GEN versus GEN 24h; 5: DXR+GEN versus DXR 24h; 6: GEN+RAD versus RAD+GEN; 7: GEN+RAD versus GEN 24h; 8: GEN+RAD versus RAD 24h; 9: RAD+GEN versus GEN 24h; 10: RAD+GEN versus RAD 24h; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Analisando as diferenças na apoptose entre as linhagens celulares (Tabela 20), foi observado que, após os tratamentos isolados, células MDA-MB-231 apresentaram taxas significativamente mais baixas em relação às células MCF-7 ( $P < 0,03$ ), exceto no tratamento com GEN 1  $\mu\text{M}$ , o qual não houve diferenças estatísticas ( $P = 0,1393$ ).

Além disso, os tratamentos combinados GEN 1  $\mu\text{M}$  + DXR e DXR + GEN 2,5  $\mu\text{M}$  produziram taxas de apoptose significativamente mais baixas em células MDA-MB-231 em relação a MCF-7. Por outro lado, o pós-tratamento DXR + GEN 1  $\mu\text{M}$  induziu aumento estatisticamente significativo da apoptose em células MDA-MB-231 em relação a MCF-7 ( $P < 0,05$ ). Os tratamentos combinados com GEN 5  $\mu\text{M}$  não produziram diferenças estatísticas nas taxas de apoptose entre as linhagens estudadas (Tabela 20).

Tabela 20: Análise da Apoptose% comparando as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7.

Tratamentos	Apoptose (X% $\pm$ DP)		P
	MDA-MB-231	MCF-7	
Controle	0,11 $\pm$ 0,19	0,56 $\pm$ 0,66	0,2411
DMSO 0,1%	0,91 $\pm$ 1,81	2,64 $\pm$ 2,03	0,2519
1 $\mu\text{M}$ GEN 24h	13,10 $\pm$ 4,38	27,34 $\pm$ 12,66	0,1393
2,5 $\mu\text{M}$ GEN 24h	0,38 $\pm$ 0,65	14,76 $\pm$ 2,39	<b>&lt;0,0001*</b>
5 $\mu\text{M}$ GEN 24h	0,76 $\pm$ 0,94	26,48 $\pm$ 4,59	<b>&lt;0,0001*</b>
1ng/mL DXR 24h	2,96 $\pm$ 3,54	20,04 $\pm$ 14,38	<b>0,0375*</b>
GEN 1 $\mu\text{M}$ 24h+DXR 1ng/mL 24h	9,24 $\pm$ 3,46	25,41 $\pm$ 4,82	<b>0,0099*</b>
GEN 2,5 $\mu\text{M}$ 24h+DXR 1ng/mL 24h	2,81 $\pm$ 4,70	37,42 $\pm$ 25,32	0,0805
GEN 5 $\mu\text{M}$ 24h+DXR 1ng/mL 24h	9,25 $\pm$ 3,23	7,31 $\pm$ 5,39	0,6071
DXR 1ng/mL 24h+GEN 1 $\mu\text{M}$ 24h	12,59 $\pm$ 2,35	2,91 $\pm$ 1,57	<b>0,0041*</b>
DXR 1ng/mL 24h+GEN 2,5 $\mu\text{M}$ 24h	0,0 $\pm$ 0,0	29,62 $\pm$ 6,87	<b>0,0189*</b>
DXR 1ng/mL 24h+GEN 5 $\mu\text{M}$ 24h	9,60 $\pm$ 3,78	15,98 $\pm$ 4,10	0,0897

P: Teste-t pareado e não-pareado com  $\alpha=0,05$ , X%  $\pm$  DP: Média%  $\pm$  Desvio Padrão; \*: estatisticamente significativo.

#### 4.5. Ciclo Celular

Foram utilizados esquemas de tratamento isolado e combinado para as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, aplicando GEN (1  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$ ) por 24h e DXR (1 ng/mL) por 24h. Os experimentos com RAD (5 Gy em MCF-7 e 10 Gy em MDA-MB-231) foram realizados após 24h da irradiação. Em seguida, foi feita a

avaliação da porcentagem de células nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular por meio da marcação do DNA com PI e leitura por citometria fluxo.

Foi observado que células MDA-MB-231 controle apresentaram níveis de fases G0/G1, S e G2/M respectivamente 50,31 %, 43,89 % e 5,80 %, sendo  $G0/G1 > S > G2/M$  ( $P1, P2$  e  $P3 < 0,001$ ). Analisando as diferenças entre os valores das fases G0/G1, S e G2/M em cada tratamento (Tabela 21), foi observado que a fase G0/G1 foi estatisticamente maior que as fases S e G2/M em todos os tratamentos isolados ( $P1$  e  $P2 < 0,01$ ), exceto em RAD 24h, onde a fase G0/G1 foi estatisticamente menor do que as fases S e G2/M ( $P1$  e  $P2 < 0,01$ ). Além disso, a fase G2/M em RAD 24h foi significativamente maior do que as fases G0/G1 e S ( $P2$  e  $P3 < 0,001$ ). Nos tratamentos isolados com GEN 2,5  $\mu\text{M}$  e DXR 1 ng/mL, a fase G2/M foi significativamente menor do que as fases G0/G1 e S ( $P2$  e  $P3 < 0,001$ ) (Tabela 21).

A respeito dos tratamentos combinados com DXR, de modo geral, não houve diferenças estatísticas entre fases S e G2/M. Por outro lado, nos tratamentos irradiados GEN 1  $\mu\text{M}$  + 10 Gy e GEN 5  $\mu\text{M}$  + 10 Gy foi observado forte aumento de células na fase G2/M em relação a fase G0/G1 e S ( $P2$  e  $P3 < 0,05$ ) (Tabela 21).

Comparando as fases G0/G1 em relação ao controle na linhagem MDA-MB-231, foi observado que apenas os tratamentos irradiados variaram significativamente. Os tratamentos RAD 10 Gy, GEN 1  $\mu\text{M}$  + 10 Gy e GEN 5  $\mu\text{M}$  + 10 Gy provocaram redução, enquanto GEN 2,5  $\mu\text{M}$  + 10 Gy induziu aumento significativo da fase G1/G0 ( $P1 < 0,001$ ) (Tabela 22).

Comparando as fases S relação ao controle, vários tratamentos induziram significativa diminuição, especialmente os pré-tratamentos irradiados ( $P1 < 0,05$ ). Por outro lado, comparando as fases G2/M relação ao controle, de modo geral, os tratamentos induziram significativa elevação na proporção celular ( $P1 < 0,05$ ) (Tabela 22).

Tabela 21: Análise das fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular na linhagem MDA-MB-231.

Tratamentos	Fase G0/G1 (X% ± DP)	Fase S (X% ± DP)	Fase G2/M (X% ± DP)	P1	P2	P3
Controle	50,31 ± 1,93	43,89 ± 1,74	5,80 ± 0,65	<0,001*	<0,001*	<0,001*
DMSO 0,1%	48,87 ± 1,54	47,34 ± 2,68	3,57 ± 2,91	ns	<0,001*	<0,001*
1µM GEN 24h	51,76 ± 0,22	24,19 ± 2,30	24,05 ± 2,22	<0,001*	<0,001*	ns
2,5µM GEN 24h	49,02 ± 2,76	32,89 ± 4,89	18,09 ± 2,45	<0,01*	<0,001*	<0,01*
5µM GEN 24h	54,46 ± 2,21	25,47 ± 4,85	20,08 ± 3,02	<0,001*	<0,001*	ns
1ng/mL DXR 24h	49,57 ± 10,04	33,27 ± 9,30	17,16 ± 8,98	<0,05*	<0,001*	<0,05*
10Gy RAD 24h	10,47 ± 2,52	26,85 ± 3,83	62,68 ± 4,62	<0,01*	<0,001*	<0,001*
GEN 1µM 24h+DXR 1ng/mL 24h	47,97 ± 3,38	23,16 ± 2,80	28,86 ± 3,77	<0,001*	<0,01*	ns
GEN 2,5µM 24h+DXR 1ng/mL 24h	50,18 ± 2,74	31,69 ± 19,09	18,13 ± 16,43	ns	ns	ns
GEN 5µM 24h+DXR 1ng/mL 24h	45,21 ± 1,59	25,02 ± 4,60	29,77 ± 3,65	<0,01*	<0,01*	ns
DXR 1ng/mL 24h+GEN 1µM 24h	46,16 ± 2,78	26,35 ± 3,52	27,49 ± 2,12	<0,001*	<0,001*	ns
DXR 1ng/mL 24h+GEN 2,5µM 24h	50,70 ± 3,75	36,03 ± 9,64	13,27 ± 11,61	ns	<0,01*	<0,05*
DXR 1ng/mL 24h+GEN 5µM 24h	43,96 ± 2,85	25,77 ± 3,14	30,27 ± 0,41	<0,001*	<0,01*	ns
GEN 1µM 24h+RAD 10Gy 24h	13,93 ± 3,70	21,26 ± 1,98	64,81 ± 3,04	ns	<0,001*	<0,001*
GEN 2,5µM 24h+RAD 10Gy 24h	84,19 ± 7,21	15,78 ± 7,25	0,03 ± 0,05	<0,001*	<0,001*	<0,05*
GEN 5µM 24h+RAD 10Gy 24h	13,38 ± 1,77	21,11 ± 1,60	65,50 ± 0,17	<0,01*	<0,001*	<0,001*
RAD 10Gy 24h+GEN 1µM 24h	39,96 ± 24,67	26,93 ± 14,72	33,11 ± 39,00	ns	ns	ns
RAD 10Gy 24h+GEN 2,5µM 24h	56,68 ± 6,83	36,38 ± 7,47	6,95 ± 1,92	<0,01*	<0,001*	<0,001*
RAD 10Gy 24h+GEN 5µM 24h	59,58 ± 6,82	34,10 ± 11,08	6,33 ± 5,03	<0,01*	<0,001*	<0,01*

P: Teste One-Way ANOVA e Teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X% ± DP: Média% ± Desvio Padrão; 1: Fase G0/G1 versus Fase S; 2: Fase G0/G1 versus Fase G2/M; 3: Fase S versus Fase G2/M; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Tabela 22: Análise das Fases do Ciclo Celular na linhagem MDA-MB-231 comparando Tratamentos em relação aos Controles.

Tratamentos	Fase G0/G1 (X% ± DP)	P1	P2	Fase S (X% ± DP)	P1	P2	Fase G2/M (X% ± DP)	P1	P2
Controle	50,31 ± 1,93	-	-	43,89 ± 1,74	-	-	5,80 ± 0,65	-	-
DMSO 0,1%	48,87 ± 1,54	ns	-	47,34 ± 2,68	ns	-	3,57 ± 2,91	ns	-
1µM GEN 24h	51,76 ± 0,22	ns	ns	24,19 ± 2,30	<0,001*	<0,001*	24,05 ± 2,22	<0,001*	<0,001*
2,5µM GEN 24h	49,02 ± 2,76	ns	ns	32,89 ± 4,89	ns	<0,05*	18,09 ± 2,45	<0,05*	<0,05*
5µM GEN 24h	54,46 ± 2,21	ns	ns	25,47 ± 4,85	<0,001*	<0,001*	20,08 ± 3,02	<0,01*	<0,01*
1ng/mL DXR 24h	49,57 ± 10,04	ns	ns	33,27 ± 9,30	<0,05*	<0,01*	17,16 ± 8,98	<0,05*	<0,01*
10Gy RAD 24h	10,47 ± 2,52	<0,001*	<0,001*	26,85 ± 3,83	<0,01*	<0,01*	62,68 ± 4,62	<0,001*	<0,001*
GEN 1µM 24h+DXR 1ng/mL 24h	47,97 ± 3,38	ns	ns	23,16 ± 2,80	<0,05*	<0,05*	28,86 ± 3,77	<0,001*	<0,001*
GEN 2,5µM 24h+DXR1ng/mL 24h	50,18 ± 2,74	ns	ns	31,69 ± 19,09	ns	ns	18,13 ± 16,43	ns	<0,05*
GEN 5µM 24h+DXR 1ng/mL 24h	45,21 ± 1,59	ns	ns	25,02 ± 4,60	<0,05*	<0,05*	29,77 ± 3,65	<0,001*	<0,001*
DXR 1ng/mL 24h+GEN 1µM 24h	46,16 ± 2,78	ns	ns	26,35 ± 3,52	<0,01*	<0,05*	27,49 ± 2,12	<0,001*	<0,001*
DXR 1ng/mL 24h+GEN2,5µM 24h	50,70 ± 3,75	ns	ns	36,03 ± 9,64	ns	ns	13,27 ± 11,61	ns	ns
DXR 1ng/mL 24h+GEN 5µM 24h	43,96 ± 2,85	ns	ns	25,77 ± 3,14	<0,01*	<0,05*	30,27 ± 0,41	<0,001*	<0,001*
GEN 1µM 24h+RAD 10Gy 24h	13,93 ± 3,70	<0,001*	<0,001*	21,26 ± 1,98	<0,05*	<0,01*	64,81 ± 3,04	<0,001*	<0,001*
GEN 2,5µM 24h+RAD 10Gy 24h	84,19 ± 7,25	<0,001*	<0,001*	15,78 ± 7,25	<0,05*	<0,05*	0,03 ± 0,05	ns	ns
GEN 5µM 24h+RAD 10Gy 24h	13,38 ± 1,77	<0,001*	<0,001*	21,11 ± 1,60	<0,05*	<0,01*	65,50 ± 0,17	<0,001*	<0,001*
RAD 10Gy 24h+GEN 1µM 24h	39,96 ± 24,67	ns	ns	26,93 ± 14,72	ns	<0,05*	33,11 ± 39,00	ns	ns
RAD 10Gy 24h+GEN 2,5µM 24h	56,68 ± 6,83	ns	ns	36,38 ± 7,47	ns	ns	6,95 ± 1,92	ns	ns
RAD 10Gy 24h+GEN 5µM 24h	59,58 ± 6,82	ns	ns	34,10 ± 11,08	ns	ns	6,33 ± 5,03	ns	ns

P: Teste One-Way ANOVA e Comparação de Dunnett com  $\alpha=0,05$ ; X% ± DP: Média% ± Desvio Padrão; 1: Tratamentos *versus* Controle; 2: Tratamentos *versus* DMSO 0,1%; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Analisando a quantidade de células encontradas na fase G0/G1 na linhagem MDA-MB-231, de acordo com cada dose de GEN (Tabela 23), foi observado que apenas a dose de GEN 2,5  $\mu$ M produz diferenças estatísticas em relação às doses GEN 1  $\mu$ M e 5  $\mu$ M no tratamento isolado com GEN ( $P_3 < 0,05$ ). O mesmo efeito foi encontrado na fase G2/M ( $P_1$  e  $P_3 < 0,001$ ) no pré-tratamento GEN 2,5  $\mu$ M + 10 Gy ( $P_1$  e  $P_3 < 0,001$ ).

Tabela 23: Análise das Fases do Ciclo Celular na linhagem MDA-MB-231 comparando a variação da dose de GEN nos tratamentos.

Tratamentos	Fase G0/G1 em GEN (X% $\pm$ DP)			P1	P2	P3
	1 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M	5 $\mu$ M			
GEN 24h	51,76 $\pm$ 0,22	49,02 $\pm$ 2,76	54,46 $\pm$ 2,21	ns	ns	<0,05*
GEN 24h + DXR 24h	47,97 $\pm$ 3,38	50,18 $\pm$ 2,74	45,21 $\pm$ 1,59	ns	ns	ns
DXR 24h + GEN 24h	46,16 $\pm$ 2,78	50,70 $\pm$ 3,75	43,96 $\pm$ 2,85	ns	ns	ns
GEN 24h + RAD 24h	13,93 $\pm$ 3,70	84,19 $\pm$ 7,21	13,38 $\pm$ 1,77	<0,001*	ns	<0,001*
RAD 24h + GEN 24h	39,96 $\pm$ 24,67	56,68 $\pm$ 6,83	59,58 $\pm$ 6,82	ns	ns	ns
Tratamentos	Fase S em GEN (X% $\pm$ DP)			P1	P2	P3
	1 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M	5 $\mu$ M			
GEN 24h	24,19 $\pm$ 2,30	32,89 $\pm$ 4,89	25,47 $\pm$ 4,85	ns	ns	ns
GEN 24h + DXR 24h	23,16 $\pm$ 2,80	31,69 $\pm$ 19,09	25,02 $\pm$ 4,60	ns	ns	ns
DXR 24h + GEN 24h	26,35 $\pm$ 3,52	36,03 $\pm$ 9,64	25,77 $\pm$ 3,14	ns	ns	ns
GEN 24h + RAD 24h	21,26 $\pm$ 1,98	15,78 $\pm$ 7,25	21,11 $\pm$ 1,60	ns	ns	ns
RAD 24h + GEN 24h	26,93 $\pm$ 14,72	36,38 $\pm$ 7,47	34,1 $\pm$ 11,08	ns	ns	ns
Tratamentos	Fase G2/M em GEN (X% $\pm$ DP)			P1	P2	P3
	1 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M	5 $\mu$ M			
GEN 24h	24,05 $\pm$ 2,22	18,09 $\pm$ 2,45	20,08 $\pm$ 3,02	ns	ns	ns
GEN 24h + DXR 24h	28,86 $\pm$ 3,77	18,13 $\pm$ 16,43	29,77 $\pm$ 3,65	ns	ns	ns
DXR 24h + GEN 24h	27,49 $\pm$ 2,12	13,27 $\pm$ 11,61	30,27 $\pm$ 0,41	ns	ns	ns
GEN 24h + RAD 24h	64,81 $\pm$ 3,04	0,03 $\pm$ 0,05	65,50 $\pm$ 0,17	<0,001*	ns	<0,001*
RAD 24h + GEN 24h	33,11 $\pm$ 39,0	6,95 $\pm$ 1,92	6,33 $\pm$ 5,03	ns	ns	ns

P: Teste One-Way ANOVA e Teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X%  $\pm$  DP: Média%  $\pm$  Desvio Padrão; 1: GEN 1 $\mu$ M versus GEN 2,5 $\mu$ M; 2: GEN 1 $\mu$ M versus GEN 5 $\mu$ M; 3: GEN 2,5 $\mu$ M versus GEN 5 $\mu$ M; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Na análise dos tratamentos combinados em relação aos tratamentos isolados na linhagem MDA-MB-231, foi observado que os tratamentos combinados com DXR reduziram significativamente a fase G0/G1 em relação ao tratamento com GEN 5  $\mu$ M isolado ( $P_2$  e  $P_4 < 0,01$ ). Por outro lado, foi observado que os tratamentos combinados com RAD 10 Gy não provocaram diminuição na fase G0/G1, tal modo que, o tratamento isolado com RAD foi o mais efetivo na redução de células G0/G1 ( $P_8$  e  $P_{10} < 0,001$ ) (Tabela 24).

Tabela 24: Análise da %Fase G0/G1 comparando Tratamentos combinados e Tratamentos isolados na linhagem MDA-MB-231.

Doses	Fase G0/G1 (X% ± DP)				P1	P2	P3	P4	P5
	(pré-tratamento)	(pós-tratamento)	GEN 24h	DXR 24h (1 ng/mL)					
	GEN 24h + DXR 24h	DXR 24h + GEN 24h							
1µM	47,97 ± 3,38	46,16 ± 2,78	51,76 ± 0,22		ns	ns	ns	ns	ns
2,5µM	50,18 ± 2,74	50,70 ± 3,75	49,02 ± 2,76	49,57 ± 10,04	ns	ns	ns	ns	ns
5µM	45,21 ± 1,59	43,96 ± 2,85	54,46 ± 2,21		ns	<0,01*	ns	<0,001*	ns

Doses	Fase G0/G1 (X% ± DP)				P6	P7	P8	P9	P10
	(pré-tratamento)	(pós-tratamento)	GEN 24h	RAD 24h (10 Gy)					
	GEN 24h + RAD 24h	RAD 24h + GEN 24h							
1µM	13,93 ± 3,70	39,96 ± 24,67	51,76 ± 0,22		ns	<0,05*	ns	ns	ns
2,5µM	84,19 ± 7,21	56,68 ± 6,83	49,02 ± 2,76	10,47 ± 2,52	<0,01*	<0,001*	<0,001*	ns	<0,001*
5µM	13,38 ± 1,77	59,58 ± 6,82	54,46 ± 2,21		<0,001*	<0,001*	ns	ns	<0,001*

P: Teste One-Way ANOVA e Teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X% ± DP: Média% ± Desvio Padrão; 1: GEN+DXR *versus* DXR+GEN; 2: GEN+DXR *versus* GEN 24h; 3: GEN+DXR *versus* DXR 24h; 4: DXR+GEN *versus* GEN 24h; 5: DXR+GEN *versus* DXR 24h; 6: GEN+RAD *versus* RAD+GEN; 7: GEN+RAD *versus* GEN 24h; 8: GEN+RAD *versus* RAD 24h; 9: RAD+GEN *versus* GEN 24h; 10: RAD+GEN *versus* RAD 24h; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Tabela 25: Análise da %Fase S comparando Tratamentos combinados e Tratamentos isolados na linhagem MDA-MB-231.

Doses	Fase S (X% ± DP)				P1	P2	P3	P4	P5
	(pré-tratamento)	(pós-tratamento)	GEN 24h	DXR 24h (1 ng/mL)					
	GEN 24h + DXR 24h	DXR 24h + GEN 24h							
1µM	23,16 ± 2,80	26,35 ± 3,52	24,19 ± 2,30		ns	ns	ns	ns	ns
2,5µM	31,69 ± 19,09	36,03 ± 9,64	32,89 ± 4,89	33,27 ± 9,30	ns	ns	ns	ns	ns
5µM	25,02 ± 4,60	25,77 ± 3,14	25,47 ± 4,85		ns	ns	ns	ns	ns

Doses	Fase S (X% ± DP)				P6	P7	P8	P9	P10
	(pré-tratamento)	(pós-tratamento)	GEN 24h	RAD 24h (10 Gy)					
	GEN 24h + RAD 24h	RAD 24h + GEN 24h							
1µM	21,26 ± 1,98	26,93 ± 14,72	24,19 ± 2,30		ns	ns	ns	ns	ns
2,5µM	15,78 ± 7,25	36,38 ± 7,47	32,89 ± 4,89	26,85 ± 3,83	<0,05*	<0,05*	ns	ns	ns
5µM	21,11 ± 1,60	34,10 ± 11,08	25,47 ± 4,85		ns	ns	ns	ns	ns

P: Teste One-Way ANOVA e Teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X% ± DP: Média% ± Desvio Padrão; 1: GEN+DXR *versus* DXR+GEN; 2: GEN+DXR *versus* GEN 24h; 3: GEN+DXR *versus* DXR 24h; 4: DXR+GEN *versus* GEN 24h; 5: DXR+GEN *versus* DXR 24h; 6: GEN+RAD *versus* RAD+GEN; 7: GEN+RAD *versus* GEN 24h; 8: GEN+RAD *versus* RAD 24h; 9: RAD+GEN *versus* GEN 24h; 10: RAD+GEN *versus* RAD 24h; ns: estatisticamente não significativo.

Analisando os tratamentos combinados em relação aos tratamentos isolados quanto à fase S na linhagem MDA-MB-231 (Tabela 25), foi observado que o pré-tratamento GEN 2,5  $\mu\text{M}$  foi significativamente menor que os demais tratamentos ( $P6$  e  $P7 < 0,05$ ).

Analisando os tratamentos combinados em relação aos tratamentos isolados quanto à fase G2/M na linhagem MDA-MB-231 (Tabela 26), foi observado que os tratamentos combinados com DXR elevaram significativamente a fase G2/M em relação ao tratamento com GEN 5  $\mu\text{M}$  isolado ( $P2$  e  $P4 < 0,01$ ). Por outro lado, foi observado que os tratamentos combinados com RAD 10 Gy não provocaram aumento na fase G2/M, tal modo que, o tratamento isolado com RAD 10 Gy também foi o mais efetivo ( $P8$  e  $P10 < 0,001$ ) (Tabela 26).

Em células MCF-7, o controle não-tratado apresentou níveis de fases G0/G1, S e G2/M respectivamente 59,22%, 32,88% e 7,90%, sendo  $G0/G1 > S > G2/M$  ( $P1$ ,  $P2$  e  $P3 < 0,001$ ). Analisando as diferenças entre os valores das fases G0/G1, S e G2/M em cada tratamento (Tabela 27), foi observado que a fase S foi estatisticamente maior que as fases G0/G1 e G2/M em todos os tratamentos isolados ( $P1$  e  $P2 < 0,01$ ), exceto em RAD 24h, o qual a fase G0/G1 foi estatisticamente maior ( $P1$  e  $P2 < 0,01$ ).

A respeito dos tratamentos combinados, não houve diferenças estatísticas entre fases S e G2/M nas doses de GEN 1  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$ . (Tabela 27).

Comparando as fases G0/G1 relação ao controle na linhagem MCF-7 (Tabela 28), foi observado que os tratamentos isolados provocaram aumento significativo na fase S ( $P1 < 0,01$ ), exceto em RAD 5 Gy, onde a fase S apresentou forte redução ( $P1 < 0,001$ ). Nos tratamentos combinados com DXR, os pré-tratamentos não mostraram diferenças estatísticas em relação ao controle. Já os pós-tratamentos e os tratamentos irradiação, de modo geral, apresentaram forte aumento na fase G0/G1 e redução na fase S ( $P1 < 0,05$ ) (Tabela 28).

Tabela 26: Análise da %Fase G2/M comparando Tratamentos combinados e Tratamentos isolados na linhagem MDA-MB-231.

Doses	Fase G2/M (X% ± DP)				P1	P2	P3	P4	P5
	(pré-tratamento)	(pós-tratamento)	GEN 24h	DXR 24h (1 ng/mL)					
	GEN 24h + DXR 24h	DXR 24h + GEN 24h							
1µM	28,86 ± 3,77	27,49 ± 2,12	24,05 ± 2,22		ns	ns	ns	ns	ns
2,5µM	18,13 ± 16,43	13,27 ± 11,61	18,09 ± 2,45	17,16 ± 8,98	ns	ns	ns	ns	ns
5µM	29,77 ± 3,65	30,27 ± 0,41	20,08 ± 3,02		ns	<0,01*	ns	<0,01*	ns

Doses	Fase G2/M (X% ± DP)				P6	P7	P8	P9	P10
	(pré-tratamento)	(pós-tratamento)	GEN 24h	RAD 24h (10 Gy)					
	GEN 24h + RAD 24h	RAD 24h + GEN 24h							
1µM	64,81 ± 3,04	33,11 ± 39,00	24,05 ± 2,22		ns	<0,01*	ns	ns	ns
2,5µM	0,03 ± 0,05	6,95 ± 1,92	18,09 ± 2,45	62,68 ± 4,62	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
5µM	65,50 ± 0,17	6,33 ± 5,03	20,08 ± 3,02		<0,001*	<0,001*	ns	<0,001*	<0,001*

P: Teste One-Way ANOVA e Teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X% ± DP: Média% ± Desvio Padrão; 1: GEN+DXR *versus* DXR+GEN; 2: GEN+DXR *versus* GEN 24h; 3: GEN+DXR *versus* DXR 24h; 4: DXR+GEN *versus* GEN 24h; 5: DXR+GEN *versus* DXR 24h; 6: GEN+RAD *versus* RAD+GEN; 7: GEN+RAD *versus* GEN 24h; 8: GEN+RAD *versus* RAD 24h; 9: RAD+GEN *versus* GEN 24h; 10: RAD+GEN *versus* RAD 24h; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Tabela 27: Análise das Fases G0/G1, S e G2/M do Ciclo Celular na linhagem MCF-7.

Tratamentos	Fase G0/G1 (X% ± DP)	Fase S (X% ± DP)	Fase G2/M (X% ± DP)	P1	P2	P3
Controle	59,22 ± 0,94	32,88 ± 1,95	7,90 ± 1,93	<0,001*	<0,001*	<0,001*
DMSO 0,1%	61,98 ± 0,70	29,58 ± 5,30	8,44 ± 5,72	<0,001*	<0,001*	<0,001*
1µM GEN 24h	39,94 ± 0,72	55,43 ± 4,34	4,63 ± 4,26	<0,01*	<0,001*	<0,001*
2,5µM GEN 24h	34,96 ± 8,04	62,33 ± 10,31	2,71 ± 3,72	<0,001*	<0,001*	<0,001*
5µM GEN 24h	31,41 ± 11,73	68,45 ± 11,85	0,14 ± 0,12	<0,01*	<0,05*	<0,001*
1ng/mL DXR 24h	40,14 ± 6,76	57,88 ± 6,97	1,97 ± 3,42	<0,05*	<0,001*	<0,001*
5Gy RAD 24h	78,35 ± 0,42	4,95 ± 1,74	16,70 ± 1,59	<0,001*	<0,001*	<0,001*
GEN 1µM 24h+DXR 1ng/mL 24h	74,97 ± 5,49	19,40 ± 1,29	5,62 ± 4,19	<0,001*	<0,001*	<0,05*
GEN 2,5µM 24h+DXR 1ng/mL 24h	60,31 ± 2,41	33,34 ± 4,12	6,35 ± 3,14	<0,001*	<0,001*	<0,001*
GEN 5µM 24h+DXR 1ng/mL 24h	57,27 ± 17,75	36,86 ± 21,94	5,88 ± 6,44	ns	<0,01*	ns
DXR 1ng/mL 24h+GEN 1µM 24h	71,53 ± 0,71	18,30 ± 4,65	10,17 ± 4,72	<0,001*	<0,001*	ns
DXR 1ng/mL 24h+GEN 2,5µM 24h	55,61 ± 1,63	34,91 ± 2,41	9,48 ± 3,67	<0,001*	<0,001*	<0,001*
DXR 1ng/mL 24h+GEN 5µM 24h	69,51 ± 1,28	17,85 ± 3,09	12,64 ± 2,02	<0,001*	<0,001*	ns
GEN 1µM 24h+RAD 5Gy 24h	79,61 ± 3,74	7,51 ± 4,16	12,88 ± 1,88	<0,001*	<0,001*	ns
GEN 2,5µM 24h+RAD 5Gy 24h	88,05 ± 1,47	9,98 ± 1,52	1,97 ± 2,58	<0,001*	<0,001*	<0,001*
GEN 5µM 24h+RAD 5Gy 24h	76,93 ± 5,13	19,12 ± 6,11	3,96 ± 4,57	<0,001*	<0,001*	<0,01*
RAD 5Gy 24h+GEN 1µM 24h	71,79 ± 5,34	15,13 ± 3,71	13,09 ± 6,93	<0,001*	<0,001*	ns
RAD 5Gy 24h+GEN 2,5µM 24h	69,40 ± 3,65	24,54 ± 4,16	6,06 ± 3,09	<0,001*	<0,001*	<0,001*
RAD 5Gy 24h+GEN 5µM 24h	74,55 ± 2,47	11,13 ± 5,39	14,32 ± 4,13	<0,001*	<0,001*	ns

P: Teste One-Way ANOVA e Teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X% ± DP: Média% ± Desvio Padrão; 1: Fase G0/G1 versus Fase S; 2: Fase G0/G1 versus Fase G2/M; 3: Fase S versus Fase G2/M; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Tabela 28: Análise das Fases do Ciclo Celular na linhagem MCF-7 comparando Tratamentos em relação aos Controles.

Tratamentos	Fase G0/G1 (X% ± DP)	P1	P2	Fase S (X% ± DP)	P1	P2	Fase G2/M (X% ± DP)	P1	P2
Controle	59,22 ± 0,94	-	-	32,88 ± 1,95	-	-	7,90 ± 1,93	-	-
DMSO 0,1%	61,98 ± 0,70	ns	-	29,58 ± 5,30	ns	-	8,44 ± 5,72	ns	-
1µM GEN 24h	39,94 ± 0,72	<0,01*	<0,01*	55,43 ± 4,34	<0,01*	<0,01*	4,63 ± 4,26	ns	ns
2,5µM GEN 24h	34,96 ± 8,04	<0,001*	<0,001*	62,33 ± 10,31	<0,001*	<0,001*	2,71 ± 3,72	ns	ns
5µM GEN 24h	31,41 ± 11,73	<0,001*	<0,001*	68,45 ± 11,85	<0,001*	<0,001*	0,14 ± 0,12	<0,05*	<0,05*
1ng/mL DXR 24h	40,14 ± 6,76	<0,01*	<0,01*	57,88 ± 6,97	<0,01*	<0,01*	1,97 ± 3,42	ns	ns
5Gy RAD 24h	78,35 ± 0,42	<0,01*	<0,05*	4,95 ± 1,74	<0,001*	<0,01*	16,70 ± 1,59	<0,05*	<0,05*
GEN 1µM 24h+DXR 1ng/mL 24h	74,97 ± 5,49	ns	ns	19,40 ± 1,29	ns	ns	5,62 ± 4,19	ns	ns
GEN 2,5µM 24h+DXR 1ng/mL 24h	60,31 ± 2,41	ns	ns	33,34 ± 4,12	ns	ns	6,35 ± 3,14	ns	ns
GEN 5µM 24h+DXR 1ng/mL 24h	57,27 ± 17,75	ns	ns	36,86 ± 21,94	ns	ns	5,88 ± 6,44	ns	ns
DXR 1ng/mL 24h+GEN 1µM 24h	71,53 ± 0,71	<0,001*	<0,01*	18,30 ± 4,65	<0,001*	<0,05*	10,17 ± 4,72	ns	ns
DXR 1ng/mL 24h+GEN 2,5µM 24h	55,61 ± 1,63	ns	<0,05*	34,91 ± 2,41	ns	ns	9,48 ± 3,67	ns	ns
DXR 1ng/mL 24h+GEN 5µM 24h	69,51 ± 1,28	<0,01*	<0,05*	17,85 ± 3,09	<0,001*	<0,01*	12,64 ± 2,02	ns	ns
GEN 1µM 24h+RAD 5Gy 24h	79,61 ± 3,74	<0,01*	<0,05*	7,51 ± 4,16	<0,01*	<0,05*	12,88 ± 1,88	ns	ns
GEN 2,5µM 24h+RAD 5Gy 24h	88,05 ± 1,47	<0,001*	<0,001*	9,98 ± 1,52	<0,05*	<0,05*	1,97 ± 2,58	ns	ns
GEN 5µM 24h+RAD 5Gy 24h	76,93 ± 5,13	<0,05*	ns	19,12 ± 6,11	ns	ns	3,96 ± 4,57	ns	ns
RAD 5Gy 24h+GEN 1µM 24h	71,79 ± 5,34	<0,001*	<0,001*	15,13 ± 3,71	<0,001*	<0,001*	13,09 ± 6,93	ns	ns
RAD 5Gy 24h+GEN 2,5µM 24h	69,40 ± 3,65	<0,001*	<0,01*	24,54 ± 4,16	<0,05*	ns	6,06 ± 3,09	ns	ns
RAD 5Gy 24h+GEN 5µM 24h	74,55 ± 2,47	<0,001*	<0,001*	11,13 ± 5,39	<0,001*	<0,001*	14,32 ± 4,13	ns	ns

P: Teste One-Way ANOVA e Comparação de Dunnett com  $\alpha=0,05$ ; X% ± DP: Média% ± Desvio Padrão; 1: Tratamentos versus Controle; 2: Tratamentos versus DMSO 0,1%; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Comparando a proporção de células MCF-7 em cada fase do ciclo de acordo com a dose de GEN, foi observado que a variação da concentração em GEN 24h e em GEN + DXR não provocou variações estatísticas. Por outro lado, houve diferenças significativas nos tratamentos DXR + GEN e nos tratamentos irradiados, sendo observado principalmente diferenças na dose de GEN 2,5  $\mu\text{M}$  em relação às doses GEN 1  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$  ( $P1$  e  $P3 < 0,05$ ) (Tabela 29).

Tabela 29: Análise das Fases do Ciclo Celular na linhagem MCF-7 comparando a variação da dose de GEN nos tratamentos.

Tratamentos	Fase G0/G1 em GEN (X% $\pm$ DP)			P1	P2	P3
	1 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$			
GEN 24h	39,94 $\pm$ 0,72	34,96 $\pm$ 8,04	31,41 $\pm$ 11,73	ns	ns	ns
GEN 24h + DXR 24h	74,97 $\pm$ 5,49	60,31 $\pm$ 2,41	57,27 $\pm$ 17,75	ns	ns	ns
DXR 24h + GEN 24h	71,53 $\pm$ 0,71	55,61 $\pm$ 1,63	69,51 $\pm$ 1,28	<b>&lt;0,001*</b>	ns	<b>&lt;0,001*</b>
GEN 24h + RAD 24h	79,61 $\pm$ 3,74	88,05 $\pm$ 1,47	76,93 $\pm$ 5,13	<b>&lt;0,05*</b>	ns	<b>&lt;0,01*</b>
RAD 24h + GEN 24h	71,79 $\pm$ 5,34	69,40 $\pm$ 3,65	74,55 $\pm$ 2,47	ns	ns	ns
Tratamentos	Fase S em GEN (X% $\pm$ DP)			P1	P2	P3
	1 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$			
GEN 24h	55,43 $\pm$ 4,34	62,33 $\pm$ 10,31	68,45 $\pm$ 11,85	ns	ns	ns
GEN 24h + DXR 24h	19,40 $\pm$ 1,29	33,34 $\pm$ 4,12	36,86 $\pm$ 21,94	ns	ns	ns
DXR 24h + GEN 24h	18,30 $\pm$ 4,65	34,91 $\pm$ 2,41	17,85 $\pm$ 3,09	<b>&lt;0,001*</b>	ns	<b>&lt;0,001*</b>
GEN 24h + RAD 24h	7,51 $\pm$ 4,16	9,98 $\pm$ 1,52	19,12 $\pm$ 6,11	ns	<b>&lt;0,05*</b>	<b>&lt;0,05*</b>
RAD 24h + GEN 24h	15,13 $\pm$ 3,71	24,54 $\pm$ 4,16	11,13 $\pm$ 5,39	<b>&lt;0,05*</b>	ns	<b>&lt;0,01*</b>
Tratamentos	Fase G2/M em GEN (X% $\pm$ DP)			P1	P2	P3
	1 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$			
GEN 24h	4,63 $\pm$ 4,26	2,71 $\pm$ 3,72	0,14 $\pm$ 0,12	ns	ns	ns
GEN 24h + DXR 24h	5,62 $\pm$ 4,19	6,35 $\pm$ 3,14	5,88 $\pm$ 6,44	ns	ns	ns
DXR 24h + GEN 24h	10,17 $\pm$ 4,72	9,48 $\pm$ 3,67	12,64 $\pm$ 2,02	ns	ns	ns
GEN 24h + RAD 24h	12,88 $\pm$ 1,88	1,97 $\pm$ 2,58	3,96 $\pm$ 4,57	<b>&lt;0,01*</b>	<b>&lt;0,01*</b>	ns
RAD 24h + GEN 24h	13,09 $\pm$ 6,93	6,06 $\pm$ 3,09	14,32 $\pm$ 4,13	ns	ns	ns

P: Teste One-Way ANOVA e Teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X%  $\pm$  DP: Média%  $\pm$  Desvio Padrão; 1: GEN 1 $\mu\text{M}$  versus GEN 2,5 $\mu\text{M}$ ; 2: GEN 1 $\mu\text{M}$  versus GEN 5 $\mu\text{M}$ ; 3: GEN 2,5 $\mu\text{M}$  versus GEN 5 $\mu\text{M}$ ; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Analisando os tratamentos combinados em relação aos tratamentos isolados quanto à fase G0/G1 na linhagem MCF-7 (Tabela 30), foi observado que os tratamentos combinados com DXR elevaram significativamente a fase G0/G1 em relação aos tratamentos isolados GEN 24h e DXR 1ng/mL 24h ( $P2$ ,  $P3$ ,  $P4$  e  $P5 < 0,05$ ). No entanto, não houve diferenças entre pré e pós-tratamentos nas combinações com DXR. Além disso, foi observado que tratamentos combinados com RAD apresentaram elevação significativa da fase G0/G1 em relação ao tratamento isolado com GEN 24h ( $P7$  e  $P9 < 0,001$ ) (Tabela 30).

Tabela 30: Análise da proporção de células em Fase G0/G1 comparando Tratamentos combinados e Tratamentos isolados na linhagem MCF-7.

Doses	Fase G0/G1 (X% ± DP)				P1	P2	P3	P4	P5
	(pré-tratamento)	(pós-tratamento)	GEN 24h	DXR 24h (1 ng/mL)					
	GEN 24h + DXR 24h	DXR 24h + GEN 24h							
1 µM	74,97 ± 5,49	71,53 ± 0,71	39,94 ± 0,72		ns	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
2,5 µM	60,31 ± 2,41	55,61 ± 1,63	34,96 ± 8,04	40,14 ± 6,76	ns	<0,001*	<0,01*	<0,001*	<0,01*
5 µM	57,27 ± 17,75	69,51 ± 1,28	31,41 ± 11,73		ns	ns	ns	<0,05*	<0,05*
Doses	Fase G0/G1 (X% ± DP)				P6	P7	P8	P9	P10
	(pré-tratamento)	(pós-tratamento)	GEN 24h	RAD 24h (5 Gy)					
	GEN 24h + RAD 24h	RAD 24h + GEN 24h							
1 µM	79,61 ± 3,74	71,79 ± 5,34	39,94 ± 0,72		ns	<0,001*	ns	<0,001*	ns
2,5 µM	88,05 ± 1,47	69,40 ± 3,65	34,96 ± 8,04	78,35 ± 0,42	<0,001*	<0,001*	<0,01*	<0,001*	<0,01*
5 µM	76,93 ± 5,13	74,55 ± 2,47	31,41 ± 11,73		ns	<0,001*	ns	<0,001*	ns

P: Teste One-Way ANOVA e Teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X% ± DP: Média% ± Desvio Padrão; 1: GEN+DXR versus DXR+GEN; 2: GEN+DXR versus GEN 24h; 3: GEN+DXR versus DXR 24h; 4: DXR+GEN versus GEN 24h; 5: DXR+GEN versus DXR 24h; 6: GEN+RAD versus RAD+GEN; 7: GEN+RAD versus GEN 24h; 8: GEN+RAD versus RAD 24h; 9: RAD+GEN versus GEN 24h; 10: RAD+GEN versus RAD 24h; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Analisando os tratamentos combinados em relação aos tratamentos isolados quanto à proporção de células MCF-7 em fase S (Tabela 31), foi observado que os tratamentos combinados com DXR reduziram significativamente a fase S em relação aos tratamentos isolados GEN 24h e DXR 1 ng/mL 24h ( $P_2$ ,  $P_3$ ,  $P_4$  e  $P_5 < 0,05$ ). Contudo, também não houve diferenças entre pré e pós-tratamentos nas combinações com DXR. Adicionalmente, foi observado que tratamentos combinados com RAD apresentaram redução significativa da fase S em relação ao tratamento isolado com GEN 24h ( $P_7$  e  $P_9 < 0,001$ ) (Tabela 31).

Analisando os tratamentos combinados em relação aos tratamentos isolados quanto à proporção de células MCF-7 em fase G2/M (Tabela 32), foi observado que, em geral, os tratamentos combinados com DXR não induzem diferenças estatísticas em relação aos tratamentos com GEN 24h e DXR 1 ng/mL, exceto no pós-tratamento com GEN 2,5  $\mu$ M e 5  $\mu$ M, as quais apresentaram fase G2/M significativamente maior do que GEN 24h ( $P_4 < 0,05$ ). A respeito dos tratamentos irradiados, a dose de GEN 1  $\mu$ M em tratamentos combinados não apresentou diferenças estatísticas em relação aos tratamentos isolados. Além disso, houve aumento significativo de células em fase G2/M no tratamento RAD 5 Gy em relação às combinações na dose GEN 2,5  $\mu$ M ( $P_8$  e  $P_{10} < 0,05$ ) (Tabela 32).

Analisando as diferenças entre as linhagens celulares em cada fase do ciclo celular (Tabela 33), foi observado que o controle não-tratado MCF-7 apresentou maior quantidade de células em fase G0/G1, e também menor quantidade de células em fase S em relação ao controle não-tratado MDA-MB-231 ( $P = 0,0002$ ). Nos tratamentos isolados com GEN 24h, foi observado que células MDA-MB-231 apresentaram aumento significativo nas fases G0/G1 e G2/M, e diminuição na fase S em relação à MCF-7 ( $P < 0,05$ ). Além disso, no tratamento isolado com DXR, células MDA-MB-231 apresentaram redução na fase S, e aumento na fase G2/M em comparação à MCF-7 ( $P < 0,05$ ). De modo semelhante, nos tratamentos combinados com DXR, células MDA-MB-231 apresentaram redução na fase G0/G1, e aumento na fase S em comparação à MCF-7 ( $P < 0,05$ ) (Tabela 33).

Tabela 31: Análise da proporção de células em Fase S comparando Tratamentos combinados e Tratamentos isolados na linhagem MCF-7.

Doses	Fase S (X% ± DP)				P1	P2	P3	P4	P5
	(pré-tratamento)	(pós-tratamento)	GEN 24h	DXR 24h (1 ng/mL)					
	GEN 24h + DXR 24h	DXR 24h + GEN 24h							
1 µM	19,40 ± 1,29	18,30 ± 4,65	55,43 ± 4,34		ns	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
2,5 µM	33,34 ± 4,12	34,91 ± 2,41	62,33 ± 10,31	57,88 ± 6,97	ns	<0,01*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
5 µM	36,86 ± 21,94	17,85 ± 3,09	68,45 ± 11,85		ns	ns	ns	<0,01*	<0,05*

Doses	Fase S (X% ± DP)				P6	P7	P8	P9	P10
	(pré-tratamento)	(pós-tratamento)	GEN 24h	RAD 24h (5 Gy)					
	GEN 24h + RAD 24h	RAD 24h + GEN 24h							
1 µM	7,51 ± 4,16	15,13 ± 3,71	55,43 ± 4,34		<0,05*	<0,001*	ns	<0,001*	<0,05*
2,5 µM	9,98 ± 1,52	24,54 ± 4,16	62,33 ± 10,31	4,95 ± 1,74	<0,05*	<0,001*	ns	<0,001*	<0,001*
5 µM	19,12 ± 6,11	11,13 ± 5,39	68,45 ± 11,85		ns	<0,001*	<0,05*	<0,001*	ns

P: Teste One-Way ANOVA e Teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X% ± DP: Média% ± Desvio Padrão; 1: GEN+DXR versus DXR+GEN; 2: GEN+DXR versus GEN 24h; 3: GEN+DXR versus DXR 24h; 4: DXR+GEN versus GEN 24h; 5: DXR+GEN versus DXR 24h; 6: GEN+RAD versus RAD+GEN; 7: GEN+RAD versus GEN 24h; 8: GEN+RAD versus RAD 24h; 9: RAD+GEN versus GEN 24h; 10: RAD+GEN versus RAD 24h; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Tabela 32: Análise da proporção de células em Fase G2/M comparando Tratamentos combinados e Tratamentos isolados na linhagem MCF-7.

Doses	Fase G2/M (X% ± DP)				P1	P2	P3	P4	P5
	(pré-tratamento)	(pós-tratamento)	GEN 24h	DXR 24h (1 ng/mL)					
	GEN 24h + DXR 24h	DXR 24h + GEN 24h							
1 µM	5,62 ± 4,19	10,17 ± 4,72	4,63 ± 4,26		ns	ns	ns	ns	ns
2,5 µM	6,35 ± 3,14	9,48 ± 3,67	2,71 ± 3,72	1,97 ± 3,42	ns	ns	ns	<0,05*	ns
5 µM	5,88 ± 6,44	12,64 ± 2,02	0,14 ± 0,12		ns	ns	ns	<0,05*	ns
Doses	Fase G2/M (X% ± DP)				P6	P7	P8	P9	P10
	(pré-tratamento)	(pós-tratamento)	GEN 24h	RAD 24h (5 Gy)					
	GEN 24h + RAD 24h	RAD 24h + GEN 24h							
1 µM	12,88 ± 1,88	13,09 ± 6,93	4,63 ± 4,26		ns	ns	ns	ns	ns
2,5 µM	1,97 ± 2,58	6,06 ± 3,09	2,71 ± 3,72	16,70 ± 1,59	ns	ns	<0,001*	ns	<0,001*
5 µM	3,96 ± 4,57	14,32 ± 4,13	0,14 ± 0,12		<0,05*	ns	<0,01*	<0,01*	ns

P: Teste One-Way ANOVA e Teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X% ± DP: Média% ± Desvio Padrão; 1: GEN+DXR *versus* DXR+GEN; 2: GEN+DXR *versus* GEN 24h; 3: GEN+DXR *versus* DXR 24h; 4: DXR+GEN *versus* GEN 24h; 5: DXR+GEN *versus* DXR 24h; 6: GEN+RAD *versus* RAD+GEN; 7: GEN+RAD *versus* GEN 24h; 8: GEN+RAD *versus* RAD 24h; 9: RAD+GEN *versus* GEN 24h; 10: RAD+GEN *versus* RAD 24h; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Tabela 33: Análise das Fases do Ciclo Celular comparando as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7.

Tratamentos	Fase G0/G1 (X% ± DP)			Fase S (X% ± DP)			Fase G2/M (X% ± DP)		
	MDA-MB-231	MCF-7	P	MDA-MB-231	MCF-7	P	MDA-MB-231	MCF-7	P
Controle	50,31±1,93	59,22±0,94	<b>0,0002*</b>	43,89±1,74	32,88±1,95	<b>0,0002*</b>	5,80±0,65	7,90±1,93	0,0854
DMSO 0,1%	48,87±1,54	61,98±0,70	<b>&lt;0,0001*</b>	47,34±2,68	29,58±5,30	<b>0,0010*</b>	3,57±2,91	8,44±5,72	0,1799
1µM GEN 24h	51,76±0,22	39,94±0,72	<b>&lt;0,0001*</b>	24,19±2,30	55,43±4,34	<b>0,0004*</b>	24,05±2,22	4,63±4,26	<b>0,0022*</b>
2,5µM GEN 24h	49,02±2,76	34,96±8,04	<b>0,0291*</b>	32,89±4,89	62,33±10,31	<b>0,0039*</b>	18,09±2,45	2,71±3,72	<b>0,0008*</b>
5µM GEN 24h	54,46±2,21	31,41±11,73	<b>0,0041*</b>	25,47±4,85	68,45±11,85	<b>0,0003*</b>	20,08±3,02	0,14±0,12	<b>&lt;0,0001*</b>
1ng/mL DXR 24h	49,57±10,04	40,14±6,76	0,1916	33,27±9,30	57,88±6,97	<b>0,0052*</b>	17,16±8,98	1,97±3,42	<b>0,0284*</b>
GEN 1µM + DXR	47,97±3,38	74,97±5,49	<b>0,0019*</b>	23,16±2,80	19,40±1,29	0,1025	28,86±3,77	5,62±4,19	<b>0,0020*</b>
GEN 2,5µM + DXR	50,18±2,74	60,31±2,41	<b>0,0086*</b>	31,69±19,09	33,34±4,12	0,8905	18,13±16,43	6,35±3,14	0,2896
GEN 5µM + DXR	45,21±1,59	57,27±17,75	0,3040	25,02±4,60	36,86±21,94	0,4099	29,77±3,65	5,88±6,44	<b>0,0023*</b>
DXR + GEN 1µM	46,16±2,78	71,53±0,71	<b>0,0001*</b>	26,35±3,52	18,30±4,65	0,0752	27,49±2,12	10,17±4,72	<b>0,0044*</b>
DXR + GEN 2,5µM	50,70±3,75	55,61±1,63	0,0625	36,03 ± 9,64	34,91±2,41	0,8282	13,27±11,61	9,48±3,67	0,5568
DXR + GEN 5µM	43,96±2,85	69,51±1,28	<b>0,0001*</b>	25,77 ± 3,14	17,85±3,09	<b>0,0358*</b>	30,27±0,41	12,64±2,02	<b>0,0001*</b>

P: Teste-t pareado e não-pareado com  $\alpha=0,05$ ; X% ± DP: Média% ± Desvio Padrão; \*: estatisticamente significativo.

#### 4.6 Contagem de células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>

Foram utilizados esquemas de tratamentos isolados e combinados para a linhagem MDA-MB-231, seguido por marcação com anticorpos anti-CD24 e anti-CD44, e leitura no citômetro de fluxo. Foram realizados tratamentos de 24h utilizando GEN (1  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M e 5  $\mu$ M) e 24h utilizando DXR 1 ng/mL (Figura 11). A linhagem MCF-7 possui fenótipo luminal, e no presente estudo apresentou quantidade de células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> inferior a 1% nas culturas tratadas e não-tratadas.

Em MDA-MB-231, de modo geral, foi observado que os tratamentos isolados com GEN não produziram diferenças estatísticas no número de células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>. Por outro lado, nos tratamentos combinados com DXR, o pré-tratamento GEN 5  $\mu$ M + DXR e o pós-tratamento DXR + GEN 1  $\mu$ M reduziram significativamente a população CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> em relação ao controle ( $P1 < 0,01$ ) (Tabela 34).

Tabela 34: Análise da proporção da população de células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> na linhagem MDA-MB-231 comparando tratamentos em relação aos controles não-tratados.

Tratamentos	População CD24 <sup>-</sup> /CD44 <sup>+</sup> (X% $\pm$ DP)	P
Controle	94,63 $\pm$ 4,50	-
1 $\mu$ M GEN 24h	96,07 $\pm$ 1,45	ns
2,5 $\mu$ M GEN 24h	94,90 $\pm$ 4,56	ns
5 $\mu$ M GEN 24h	97,43 $\pm$ 1,36	ns
1ng/mL DXR 24h	92,67 $\pm$ 1,69	ns
GEN 1 $\mu$ M 24h+DXR 1ng/mL 24h	91,53 $\pm$ 5,05	ns
GEN 2,5 $\mu$ M 24h+DXR 1ng/mL 24h	92,10 $\pm$ 9,04	ns
GEN 5 $\mu$ M 24h+DXR 1ng/mL 24h	79,27 $\pm$ 4,37	<b>&lt;0,05*</b>
DXR 1ng/mL 24h+GEN 1 $\mu$ M 24h	76,43 $\pm$ 9,39	<b>&lt;0,01*</b>
DXR 1ng/mL 24h+GEN 2,5 $\mu$ M 24h	81,63 $\pm$ 15,26	ns
DXR 1ng/mL 24h+GEN 5 $\mu$ M 24h	90,97 $\pm$ 6,58	ns

P: Teste One-Way ANOVA e Comparação de Dunnett com  $\alpha=0,05$ ; X%  $\pm$  DP: Média%  $\pm$  Desvio Padrão; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Comparando a porcentagem de células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> de acordo com a dose de GEN, não foram observadas diferenças estatísticas (Tabela 35).

Tabela 35: Análise da %População de células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> na linhagem MDA-MB-231 de acordo com as doses de GEN.

Tratamentos	População CD24 <sup>-</sup> /CD44 <sup>+</sup> (X% ± DP)			P1	P2	P3
	1 μM	2,5 μM	5 μM			
GEN 24h	96,07 ± 1,45	94,90 ± 4,56	97,43 ± 1,36	ns	ns	ns
GEN 24h + DXR 24h	91,53 ± 5,05	92,10 ± 9,04	79,27 ± 4,37	ns	ns	ns
DXR 24h + GEN 24h	76,43 ± 9,39	81,63 ± 15,26	90,97 ± 6,58	ns	ns	ns

P: Teste One-Way ANOVA e Teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X% ± DP: Média% ± Desvio Padrão; 1: GEN 1μM versus GEN 2,5μM; 2: GEN 1μM versus GEN 5μM; 3: GEN 2,5μM versus GEN 5μM; ns: estatisticamente não significativo.

Na análise dos tratamentos combinados em relação aos tratamentos isolados (Tabela 36), foi observado que as combinações com GEN 2,5 também não apresentaram variações significativas entre os tratamentos. Por outro lado, o pré-tratamento GEN 5 μM + DXR provocou redução significativa no número de células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> em relação aos demais tratamentos ( $P1$ ,  $P2$  e  $P3 <0,01$ ). O mesmo efeito foi observado no pós-tratamento DXR + GEN 1 μM ( $P4$  e  $P5 <0,01$ ) (Tabela 36).

Tabela 36: Análise da %População de células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> na linhagem MDA-MB-231 comparando Tratamentos combinados e Tratamentos isolados.

Doses	População CD24 <sup>-</sup> /CD44 <sup>+</sup> (X% ± DP)				P1	P2	P3	P4	P5
	(pré-tratamento)		GEN 24h	DXR 24h (1 ng/mL)					
	GEN 24h+DXR 24h	DXR 24h + GEN 24h							
1 µM	91,53 ± 5,05	76,43 ± 9,39	96,07 ± 1,45	92,67 ± 1,69	ns	ns	ns	<0,05*	<0,05*
2,5 µM	92,10 ± 9,04	81,63 ± 15,26	94,90 ± 4,56		ns	ns	ns	ns	ns
5 µM	79,27 ± 4,37	90,97 ± 6,58	97,43 ± 1,36		<0,05*	<0,01*	<0,05*	ns	ns

P: Teste One-Way ANOVA e Teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X% ± DP: Média% ± Desvio Padrão; 1: GEN+DXR *versus* DXR+GEN; 2: GEN+DXR *versus* GEN 24h; 3: GEN+DXR *versus* DXR 24h; 4: DXR+GEN *versus* GEN 24h; 5: DXR+GEN *versus* DXR 24h; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

#### 4.7 Correlação entre os dados e Regressão Linear

Foi avaliado o grau de associação entre os resultados obtidos nos tratamentos isolados e combinados, de acordo com a dose de GEN. Na linhagem MDA-MB-231, os parâmetros correlacionados foram: Dose de GEN, Viabilidade Celular, CID, Apoptose, População CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>, Fase G0/G1, Fase S e Fase G2/M (Tabelas 37 e 38). Na linhagem MCF-7, os parâmetros correlacionados foram: Dose de GEN, Viabilidade Celular, CID, Apoptose, Fase G0/G1, Fase S e Fase G2/M (Tabelas 39 e 40).

Quando os coeficientes de correlação ( $r$ ) apresentaram significância estatística, estes foram novamente analisados para verificar uma possível relação de dependência entre as variáveis (Figura 5: Teste de Regressão Linear,  $\alpha=0,05$ ).

Analisando os tratamentos isolados com GEN em MDA-MB-231 (Tabela 37), foram observadas correlações significativas entre População CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> e Fase G0/G1 ( $r= 0,9988$ ,  $p <0,0001$ ), ou seja, quando os valores de População CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> crescem, nota-se também o aumento na proporção de Fase G0/G1 (Figura 5A). Também houve correlação diretamente proporcional entre Fase G2/M e Apoptose ( $r= 0,9531$ ,  $p= 0,003$ , regressão não significativa,  $P =0,195$ ). Além disso, foram observadas correlações inversamente proporcionais entre Apoptose e Viabilidade ( $r= -0,9462$ ,  $p= 0,004$ , regressão não significativa,  $P =0,209$ ), e também entre Fase S e Fase G2/M ( $r= -0,8384$ ,  $p= 0,037$ , regressão não significativa,  $P =0,367$ ) (Tabela 37).

Nos pré-tratamentos GEN + DXR em MDA-MB-231, apenas Fase G2/M e Apoptose apresentaram correlação significativa ( $r= 0,9976$ ,  $p= 0,044$ ) (Figura 5B).

Por outro lado, nos pós-tratamentos DXR + GEN, houve correlação significativa entre Dose de GEN e População CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> ( $r =0,9998$ ,  $p =0,012$ ) (Figura 5C). Além disso, houve correlações inversamente proporcionais entre Dose de GEN e CID ( $r= -0,9987$ ,  $p =0,031$ ) (Figura 5D), e entre CID e População CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> ( $r= -0,9995$ ,  $p =0,018$ ) (Figura 5E) (Tabela 37).

Tabela 37: Correlação entre Viabilidade Celular, CID, Apoptose, População CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> e Fases G0/G1, S e G2/M em cada tratamento de acordo com as doses de GEN na linhagem MDA-MB-231.

GEN 24h								
	Dose de GEN	Viabilidade	Apoptose	CD24 <sup>-</sup> /CD44 <sup>+</sup>	Fase G0/G1	Fase S	Fase G2/M	
Dose de GEN	-	-	-	-	-	-	-	-
Viabilidade	0,9343	-	-	-	-	-	-	-
Apoptose	-0,7689	<b>-0,9462*</b>	-	-	-	-	-	-
CD24 <sup>-</sup> /CD44 <sup>+</sup>	0,6520	0,3390	-0,0167	-	-	-	-	-
Fase G0/G1	0,6152	0,2939	0,0308	<b>0,9988*</b>	-	-	-	-
Fase S	-0,0066	0,3500	-0,6341	-0,7625	-0,7924	-	-	-
Fase G2/M	-0,5394	-0,8040	<b>0,9531*</b>	0,2866	0,3319	<b>-0,8384*</b>	-	-
GEN 24h + DXR 24h								
	Dose de GEN	Viabilidade	CID	Apoptose	CD24 <sup>-</sup> /CD44 <sup>+</sup>	Fase G0/G1	Fase S	Fase G2/M
Dose de GEN	-	-	-	-	-	-	-	-
Viabilidade	0,6093	-	-	-	-	-	-	-
CID	-0,9457	-0,8338	-	-	-	-	-	-
Apoptose	0,1441	-0,6967	0,1850	-	-	-	-	-
CD24 <sup>-</sup> /CD44 <sup>+</sup>	-0,9132	-0,2334	0,7314	-0,5348	-	-	-	-
Fase G0/G1	-0,6674	0,1837	0,3893	-0,8331	0,9128	-	-	-
Fase S	0,0654	0,8311	-0,3860	-0,9778	0,3467	0,6993	-	-
Fase G2/M	0,2120	-0,6456	0,1168	<b>0,9976*</b>	-0,5917	-0,8692	-0,9612	-
DXR 24h +GEN 24h								
	Dose de GEN	Viabilidade	CID	Apoptose	CD24 <sup>-</sup> /CD44 <sup>+</sup>	Fase G0/G1	Fase S	Fase G2/M
Dose de GEN	-	-	-	-	-	-	-	-
Viabilidade	-0,9414	-	-	-	-	-	-	-
CID	<b>-0,9987*</b>	0,9569	-	-	-	-	-	-
Apoptose	-0,0855	-0,2554	0,0363	-	-	-	-	-
CD24 <sup>-</sup> /CD44 <sup>+</sup>	<b>0,9998*</b>	-0,9478	<b>-0,9995*</b>	-0,0660	-	-	-	-
Fase G0/G1	-0,4521	0,7264	0,4955	-0,8500	-0,4694	-	-	-
Fase S	-0,1924	0,5121	0,2406	-0,9612	-0,2116	0,9623	-	-
Fase G2/M	0,2920	-0,5974	-0,3388	0,9279	0,3107	-0,9851	-0,9947	-

r. Coeficiente de Correlação de Pearson com  $\alpha=0,05$ ; \*: estatisticamente significativo.

Nos pré-tratamentos GEN + RAD em MDA-MB-231 (Tabela 38), houve correlações significativas inversamente proporcionais entre Fase S e Apoptose ( $r = -0,9975$ ,  $p = 0,045$ ) (Figura 5F), Fase G0/G1 e Fase S ( $r = -0,9995$ ,  $p = 0,020$ ) (Figura 5G) e entre Fase G0/G1 e Fase G2/M ( $r = -0,9999$ ,  $p = 0,002$ ) (Figura 5H). Além disso, houve também correlação positiva entre Fase S e Fase G2/M ( $r = 0,9994$ ,  $p = 0,021$ ) (Figura 5I) (Tabela 38).

Nos pós-tratamentos RAD + GEN em MDA-MB-231 (Tabela 38), foram observadas correlações diretamente proporcionais entre Fase S e Viabilidade ( $r = 0,9997$ ,  $p = 0,014$ ) (Figura 5J) e entre Fase G2/M e Apoptose ( $r = 0,9989$ ,  $p = 0,029$ ) (Figura 5L). Adicionalmente, houve também uma correlação inversamente proporcional entre Fase G0/G1 e Apoptose ( $r = -0,9973$ ,  $p = 0,046$ ) (Figura 5M) (Tabela 38).

A respeito da linhagem MCF-7, nos tratamentos isolados com GEN foram observadas correlações inversamente proporcionais significativas entre Dose de GEN e Fase G2/M ( $r = -0,9981$ ,  $p = 0,038$ ) (Figura 5N) e entre Fase G0/G1 e Fase S ( $r = -0,9980$ ,  $p = 0,039$ ) (Figura 5O) (Tabela 39).

Além disso, observado a linhagem MCF-7, nos pré-tratamentos GEN + DXR, houve também uma correlação significativa entre Fase G0/G1 e Fase S ( $r = -0,9995$ ,  $p = 0,019$ ) (Figura 5P). Do mesmo modo, nos pós-tratamentos DXR + GEN houve somente uma correlação inversa estatisticamente significativa entre Dose de GEN e CID ( $r = -0,9973$ ,  $p = 0,046$ ) (Figura 5Q) (Tabela 39).

Por outro lado, nos tratamentos irradiados não houve correlações estatisticamente significativas em MCF-7 (Tabela 40).

Tabela 38: Correlação entre Viabilidade Celular, CID, Apoptose e Fases G0/G1, S e G2/M em cada tratamento de acordo com as doses de GEN na linhagem MDA-MB-231.

GEN 24h + RAD 24h							
	Dose de GEN	Viabilidade	CID	Apoptose	Fase G0/G1	Fase S	Fase G2/M
Dose de GEN	-	-	-	-	-	-	-
Viabilidade	0,7685	-	-	-	-	-	-
CID	0,3943	0,8910	-	-	-	-	-
Apoptose	-0,0493	0,6011	0,8983	-	-	-	-
Fase G0/G1	-0,1495	0,5177	0,8496	0,9949	-	-	-
Fase S	0,1190	-0,5438	-0,8654	<b>-0,9975*</b>	<b>-0,9995*</b>	-	-
Fase G2/M	0,1519	-0,5156	-0,8483	-0,9946	<b>-0,9999*</b>	<b>0,9994*</b>	-
RAD 24h + GEN 24h							
	Dose de GEN	Viabilidade	CID	Apoptose	Fase G0/G1	Fase S	Fase G2/M
Dose de GEN	-	-	-	-	-	-	-
Viabilidade	0,6036	-	-	-	-	-	-
CID	-0,2782	0,5978	-	-	-	-	-
Apoptose	-0,8243	-0,9489	-0,3143	-	-	-	-
Fase G0/G1	0,8630	0,9236	0,2450	<b>-0,9973*</b>	-	-	-
Fase S	0,6214	<b>0,9997*</b>	0,5795	-0,9557	0,9320	-	-
Fase G2/M	-0,7980	-0,9621	-0,3566	<b>0,9989*</b>	-0,9931	-0,9680	-

r. Coeficiente de Correlação de *Pearson* com  $\alpha=0,05$ ; \*: estatisticamente significativo.

Tabela 39: Correlação entre Viabilidade Celular, CID, Apoptose e Fases G0/G1, S e G2/M em cada tratamento de acordo com as doses de GEN na linhagem MCF-7.

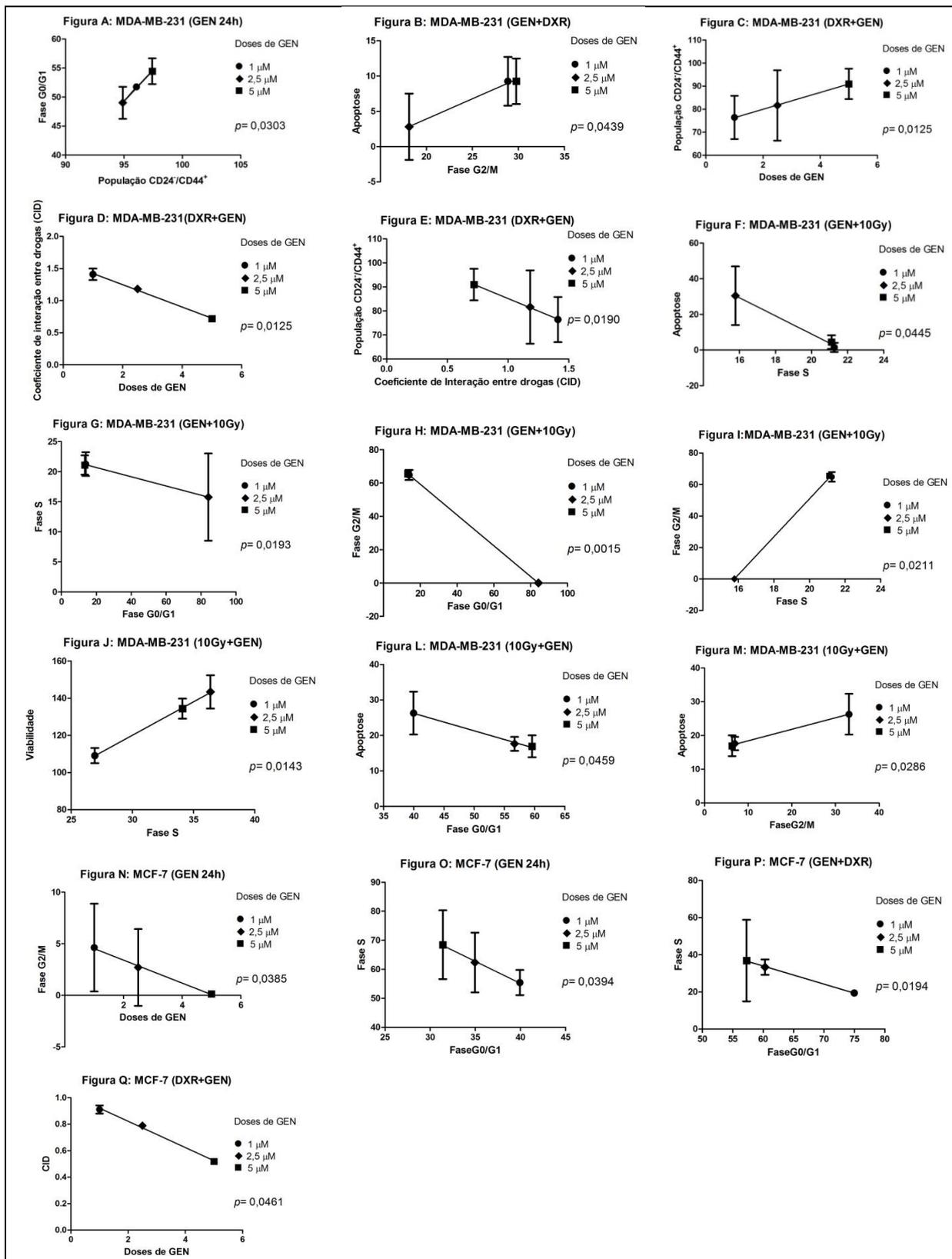
GEN 24h							
	Dose de GEN	Viabilidade	Apoptose	Fase G0/G1	Fase S	Fase G2/M	
Dose de GEN	-	-	-	-	-	-	-
Viabilidade	0,7263	-	-	-	-	-	-
Apoptose	0,0820	-0,6254	-	-	-	-	-
Fase G0/G1	-0,9713	-0,8688	0,1570	-	-	-	-
Fase S	0,9842	0,8364	-0,0956	<b>-0,9980*</b>	-	-	-
Fase G2/M	<b>-0,9981*</b>	-0,7664	-0,0217	0,9839	-0,9931	-	-
GEN 24h + DXR 24h							
	Dose de GEN	Viabilidade	CID	Apoptose	Fase G0/G1	Fase S	Fase G2/M
Dose de GEN	-	-	-	-	-	-	-
Viabilidade	0,9897	-	-	-	-	-	-
CID	-0,7075	-0,8012	-	-	-	-	-
Apoptose	-0,7055	-0,5970	-0,0016	-	-	-	-
Fase G0/G1	-0,8748	-0,9350	0,9612	0,2740	-	-	-
Fase S	0,8892	0,9454	-0,9524	-0,3032	<b>-0,9995*</b>	-	-
Fase G2/M	0,2080	0,3456	-0,8384	0,5463	-0,6557	0,6324	-
DXR 24h + GEN 24h							
	Dose de GEN	Viabilidade	CID	Apoptose	Fase G0/G1	Fase S	Fase G2/M
Dose de GEN	-	-	-	-	-	-	-
Viabilidade	-0,9433	-	-	-	-	-	-
CID	<b>-0,9973*</b>	0,9648	-	-	-	-	-
Apoptose	0,3597	-0,0296	-0,2913	-	-	-	-
Fase G0/G1	0,0265	-0,3568	-0,0987	-0,9231	-	-	-
Fase S	-0,1657	0,4836	0,2365	0,8605	-0,9902	-	-
Fase G2/M	0,8316	-0,9688	-0,8696	-0,2188	0,5771	-0,6853	-

r. Coeficiente de Correlação de Pearson com  $\alpha=0,05$ ; \*: estatisticamente significativo.

Tabela 40: Correlação entre Viabilidade Celular, CID, Apoptose, População CD24<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup> e Fases G0/G1, S e G2/M em cada tratamento de acordo com as doses de GEN na linhagem MCF-7.

GEN 24h + RAD 24h							
	Dose de GEN	Viabilidade	CID	Apoptose	Fase G0/G1	Fase S	Fase G2/M
Dose de GEN	-	-	-	-	-	-	-
Viabilidade	0,1667	-	-	-	-	-	-
CID	-0,9267	-0,5248	-	-	-	-	-
Apoptose	0,9002	-0,2791	-0,6708	-	-	-	-
Fase G0/G1	-0,3675	0,8556	-0,0086	-0,7357	-	-	-
Fase S	0,9844	-0,0091	-0,8463	0,9627	-0,5252	-	-
Fase G2/M	-0,6683	-0,8449	0,8987	-0,2777	-0,4461	-0,5271	-
RAD 24h + GEN 24h							
	Dose de GEN	Viabilidade	CID	Apoptose	Fase G0/G1	Fase S	Fase G2/M
Dose de GEN	-	-	-	-	-	-	-
Viabilidade	0,5587	-	-	-	-	-	-
CID	-0,9624	-0,7628	-	-	-	-	-
Apoptose	-0,1336	0,7471	-0,1402	-	-	-	-
Fase G0/G1	0,6506	-0,2662	-0,4201	-0,8395	-	-	-
Fase S	-0,4242	0,5139	0,1626	0,9541	-0,9636	-	-
Fase G2/M	0,2780	-0,6412	-0,0070	-0,9891	0,9103	-0,9878	-

r. Coeficiente de Correlação de *Pearson* com  $\alpha=0,05$ .



**Figura 5:**  $p$ : Teste de Regressão Linear com  $\alpha=0,05$ ; Genisteína (GEN  $\mu\text{M}$ ); Doxorrubicina (DXR  $\text{ng/mL}$ ); Radiação (RAD Gy).

#### 4.8 Tratamentos candidatos para a investigação da expressão gênica

Ao final dos experimentos, os resultados obtidos em todos os tratamentos foram avaliados a fim de selecionar candidatos para a análise da expressão de 15 genes relacionados a Apoptose em sub-populações CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> e não-CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> de MDA-MB-231.

Os critérios utilizados na escolha dos tratamentos citotóxicos mais efetivos levaram em consideração diferenças significativas em relação ao controle como: redução na viabilidade celular, efeito sinérgico, aumento da apoptose, bloqueio em alguma fase do ciclo celular e redução da população CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> (Tabela 41).

Dessa forma, aqueles que apresentaram os melhores resultados foram os tratamentos GEN 1  $\mu$ M, GEN 5  $\mu$ M + DXR e DXR + GEN 5  $\mu$ M (Tabela 41).

Na linhagem MCF-7, os tratamentos irradiados induziram intensa morte celular com bloqueio na fase G0/G1 (Tabela 42). No entanto, MCF-7 não apresentou quantidade relevante de células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>, o que não permitiu a continuidade do estudo da expressão gênica em células hormônio-dependentes.

Tabela 41: Resumo dos dados obtidos após os tratamentos isolados e combinados em MDA-MB-231.

Tratamentos	Dados totais							Candidato
	Viabilidade	Interação	Apoptose	Fase G0/G1	Fase S	Fase G2/M	CD24 <sup>-</sup> /CD44 <sup>+</sup>	
1µM GEN 24h	↓Viabilidade	-	↑Apoptose	Inalterado	↓Fase S	↑Fase G2/M	Inalterado	X
2,5µM GEN 24h	Inalterado	-	inalterada	Inalterado	Inalterado	↑Fase G2/M	Inalterado	
5µM GEN 24h	Inalterado	-	inalterada	Inalterado	↓Fase S	↑Fase G2/M	Inalterado	
GEN 1µM +DXR	Inalterado	Antagonismo	↑Apoptose	Inalterado	↓Fase S	↑Fase G2/M	Inalterado	
GEN 2,5µM +DXR	Inalterado	Adição	inalterada	Inalterado	Inalterado	Inalterado	Inalterado	
GEN 5µM +DXR	Inalterado	Sinergia	↑Apoptose	Inalterado	Inalterado	↑Fase G2/M	↓CD24 <sup>-</sup> /CD44 <sup>+</sup>	X
1ng/mL DXR 24h	↑Viabilidade	-	inalterada	Inalterado	↓Fase S	↑Fase G2/M	Inalterado	
DXR +GEN 1µM	↑Viabilidade	Antagonismo	↑Apoptose	Inalterado	Inalterado	↑Fase G2/M	↓CD24 <sup>-</sup> /CD44 <sup>+</sup>	
DXR +GEN 2,5µM	↑Viabilidade	Antagonismo	Inalterado	Inalterado	Inalterado	Inalterado	Inalterado	
DXR +GEN 5µM	↓Viabilidade	Sinergia	↑Apoptose	Inalterado	Inalterado	↑Fase G2/M	Inalterado	X
GEN 1µM + 10Gy	Inalterado	Antagonismo	Inalterado	↓Fase G0/G1	↓Fase S	↑Fase G2/M	-	
GEN 2,5 + 10Gy	↑Viabilidade	Antagonismo	↑Apoptose	↑Fase G0/G1	↓Fase S	Inalterado	-	
GEN 5µM + 10Gy	↑Viabilidade	Antagonismo	Inalterado	↓Fase G0/G1	↓Fase S	↑Fase G2/M	-	
10Gy RAD 24h	↓Viabilidade	-	Inalterado	↓Fase G0/G1	↓Fase S	↑Fase G2/M	-	
10Gy +GEN 1µM	↑Viabilidade	Antagonismo	↑Apoptose	Inalterado	Inalterado	Inalterado	-	
10Gy +GEN 2,5µM	↑Viabilidade	Antagonismo	↑Apoptose	Inalterado	Inalterado	Inalterado	-	
10Gy +GEN 5µM	↑Viabilidade	Antagonismo	↑Apoptose	Inalterado	Inalterado	Inalterado	-	

A escolha dos tratamentos para a análise da expressão de 15 genes relacionados a Apoptose em sub-populações CTTs e não-CTTs de MDA-MB-231 considerou variações estatisticamente significativas apenas em relação ao controle. Resultados favoráveis em verde: redução na Viabilidade Celular, Efeito sinérgico, aumento da Apoptose, bloqueio no ciclo celular (aumento em alguma Fase concomitante à redução da Viabilidade ou aumento na Apoptose) e redução da População CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>. Resultados desfavoráveis em vermelho: aumento na Viabilidade Celular, Efeito antagônico, redução na Apoptose, proteção via *checkpoint* (aumento em alguma Fase concomitante a inalteração na Viabilidade e Apoptose), proliferação (aumento das Fases G2/M e/ou S, concomitante ao aumento na Viabilidade ou redução na Apoptose), e aumento da População CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>. Os tratamentos escolhidos foram marcados com X.

Tabela 42: Resumo dos dados obtidos após os tratamentos isolados e combinados em MCF-7.

Tratamentos	Dados totais					
	Viabilidade	Interação	Apoptose	Fase G0/G1	Fase S	Fase G2/M
1µM GEN 24h	Inalterado	-	↑Apoptose	↓Fase G0/G1	↑Fase S	Inalterado
2,5µM GEN 24h	↑Viabilidade	-	↑Apoptose	↓Fase G0/G1	↑Fase S	Inalterado
5µM GEN 24h	↑Viabilidade	-	↑Apoptose	↓Fase G0/G1	↑Fase S	↓Fase G2/M
GEN 1µM +DXR	Inalterado	Sinergia	↑Apoptose	Inalterado	Inalterado	Inalterado
GEN 2,5µM +DXR	Inalterado	Sinergia	↑Apoptose	Inalterado	Inalterado	Inalterado
GEN 5µM +DXR	Inalterado	Sinergia	Inalterado	Inalterado	Inalterado	Inalterado
1ng/mL DXR 24h	↑Viabilidade	Sinergia	↑Apoptose	↓Fase G0/G1	↑Fase S	Inalterado
DXR +GEN 1µM	Inalterado	Sinergia	Inalterado	↑Fase G0/G1	↓Fase S	Inalterado
DXR +GEN 2,5µM	Inalterado	Sinergia	↑Apoptose	Inalterado	Inalterado	Inalterado
DXR +GEN 5µM	↓Viabilidade	Sinergia	↑Apoptose	↑Fase G0/G1	↓Fase S	Inalterado
GEN 1µM + 5Gy	↓Viabilidade	Sinergia	Inalterado	↑Fase G0/G1	↓Fase S	Inalterado
GEN 2,5µM + 5Gy	↓Viabilidade	Sinergia	Inalterado	↑Fase G0/G1	↓Fase S	Inalterado
GEN 5µM + 5Gy	↓Viabilidade	Sinergia	↑Apoptose	↑Fase G0/G1	Inalterado	Inalterado
5Gy RAD 24h	↓Viabilidade	Sinergia	↑Apoptose	↑Fase G0/G1	↓Fase S	Inalterado
5Gy + GEN 1µM	↓Viabilidade	Sinergia	Inalterado	↑Fase G0/G1	↓Fase S	Inalterado
5Gy +GEN 2,5µM	↓Viabilidade	Sinergia	↑Apoptose	↑Fase G0/G1	↓Fase S	Inalterado
5Gy +GEN 5µM	↓Viabilidade	Sinergia	Inalterado	↑Fase G0/G1	↓Fase S	Inalterado

Resumo das variações estatisticamente significativas em relação ao controle. Resultados favoráveis em verde: redução na Viabilidade Celular, Efeito sinérgico, aumento da Apoptose e bloqueio no ciclo celular (aumento em alguma Fase concomitante à redução da Viabilidade ou aumento na Apoptose). Resultados desfavoráveis em vermelho: aumento na Viabilidade Celular, Efeito antagônico, redução na Apoptose, proteção via checkpoint (aumento em alguma Fase concomitante a inalteração na Viabilidade e Apoptose) e proliferação (aumento das Fases G2/M e/ou S, concomitante ao aumento na Viabilidade ou redução na Apoptose).

#### 4.9 Análise da expressão gênica

Foram escolhidos três tratamentos efetivamente citotóxicos para a investigação da expressão de 15 genes relacionados a apoptose em sub-populações CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> e não-CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> de MDA-MB-231, por meio de qRT-PCR. A expressão relativa foi quantificada em relação ao controle endógeno 18S.

Na população não-CTT, de modo geral, foi observada redução nos níveis de expressão dos genes dos avaliados nos tratamentos em relação ao controle, porém os resultados não foram estatisticamente significativos (Tabela 43). Destaque para os tratamentos combinados GEN 1  $\mu$ M 24h e DXR 1 ng/mL 24h + GEN 5  $\mu$ M 24h que provocaram redução significativa na expressão dos genes *CYCS*, *CFLAR*, *FASLG*, *CASP8*, *CASP9*, *CASP3* e *AIFM1* (Tabela 43).

Comparando a expressão gênica entre os tratamentos na população não-CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>, foi observado aumento nos níveis de expressão dos tratamentos combinados em relação ao tratamento GEN 1  $\mu$ M 24h, porém os resultados não foram estatisticamente significativos (Tabela 44).

De modo semelhante, na população CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> foi observada redução nos níveis de expressão dos genes avaliados após os tratamentos GEN 1  $\mu$ M 24h e DXR 1 ng/mL 24h + GEN 5  $\mu$ M 24h, entretanto, os resultados não foram estatisticamente significativos (Tabela 45). Por outro lado, houve aumento da expressão gênica após o tratamento GEN 5  $\mu$ M 24h + DXR 1 ng/mL 24h. Todos os grupos gênicos estudados (*checkpoint*, vias intrínseca e extrínseca, caspases iniciadoras e efetoras, e efetor independente de caspases) apresentaram genes superexpressos. Contudo, os resultados também não foram estatisticamente significativos (Tabela 45). Em contrapartida, o gene *CASP9* apresentou supressão significativa em relação ao controle.

Comparando os tratamentos na população CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> (Tabela 46), foi observado que o tratamento GEN 5  $\mu$ M 24h + DXR 1 ng/mL 24h também provocou aumento nos níveis de expressão gênica dos alvos investigados. No entanto, os resultados não foram significativos (Tabela 46).

Tabela 43: Expressão Relativa de mRNA de genes envolvidos na indução de apoptose em células MDA-MB-231 não-CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>, em relação ao controle não-tratado.

Gene	Função	Quantidade Relativa de Expressão Gênica (X% ± EP)				P1	P2	P3
		Controle	GEN 1 µM	GEN 5 µM +DXR	DXR + GEN 5 µM			
<i>TP53</i>	Checkpoint (supressor tumoral)	1,00 ± 0,00	0,03 ± 0,03	0,82 ± 0,66	0,91 ± 0,90	ns	ns	ns
<i>AKT1</i>	Checkpoint (oncogene)	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,37 ± 0,29	0,29 ± 0,29	ns	ns	ns
<i>APAF1</i>	Via intrínseca	1,00 ± 0,00	0,19 ± 0,19	1,10 ± 0,89	0,48 ± 0,48	ns	ns	ns
<i>BAD</i>	Via intrínseca	1,00 ± 0,00	0,03 ± 0,02	0,74 ± 0,59	0,81 ± 0,80	ns	ns	ns
<i>BAX</i>	Via intrínseca	1,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,31 ± 0,24	0,29 ± 0,29	ns	ns	ns
<i>CYCS</i>	Via intrínseca	1,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,32 ± 0,26	0,17 ± 0,17	<b>&lt;0,05*</b>	ns	ns
<i>CFLAR</i>	Via extrínseca	1,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,30 ± 0,25	0,16 ± 0,16	<b>&lt;0,05*</b>	ns	<b>&lt;0,05*</b>
<i>FADD</i>	Via extrínseca	1,00 ± 0,00	0,04 ± 0,03	0,90 ± 0,78	0,49 ± 0,47	ns	ns	ns
<i>FAS</i>	Via extrínseca	1,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,54 ± 0,45	0,21 ± 0,21	ns	ns	ns
<i>FASLG</i>	Via extrínseca	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<i>CASP8</i>	Caspase iniciadora	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,31 ± 0,28	0,10 ± 0,09	<b>&lt;0,05*</b>	ns	<b>&lt;0,05*</b>
<i>CASP9</i>	Caspase iniciadora	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<i>CASP3</i>	Caspase efetora	1,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,31 ± 0,27	0,09 ± 0,09	<b>&lt;0,05*</b>	ns	<b>&lt;0,05*</b>
<i>CASP7</i>	Caspase efetora	1,00 ± 0,00	0,02 ± 0,02	0,71 ± 0,58	0,31 ± 0,30	ns	ns	ns
<i>AIFM1</i>	Efetor independente	1,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,33 ± 0,27	0,18 ± 0,18	<b>&lt;0,05*</b>	ns	ns

P: Teste One-Way ANOVA com repetições e teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X% ± EP: Média% ± Erro Padrão; 1: GEN 1µM versus Controle; 2: GEN 5µM + DXR versus Controle; 3: DXR + GEN 5µM versus Controle; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Tabela 44: Expressão Relativa de mRNA de genes envolvidos na indução de apoptose em células MDA-MB-231 não-CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>, comparando os tratamentos entre si.

Gene	Função	Quantidade Relativa de Expressão Gênica (X% ± EP)			P1	P2	P3
		GEN 1 µM	GEN 5 µM +DXR	DXR + GEN 5 µM			
<i>TP53</i>	Checkpoint (supressor tumoral)	0,03 ± 0,03	0,82 ± 0,66	0,91 ± 0,90	ns	ns	ns
<i>AKT1</i>	Checkpoint (oncogene)	0,00 ± 0,00	0,37 ± 0,29	0,29 ± 0,29	ns	ns	ns
<i>APAF1</i>	Via intrínseca	0,19 ± 0,19	1,10 ± 0,89	0,48 ± 0,48	ns	ns	ns
<i>BAD</i>	Via intrínseca	0,03 ± 0,02	0,74 ± 0,59	0,81 ± 0,80	ns	ns	ns
<i>BAX</i>	Via intrínseca	0,01 ± 0,01	0,31 ± 0,24	0,29 ± 0,29	ns	ns	ns
<i>CYCS</i>	Via intrínseca	0,01 ± 0,01	0,32 ± 0,26	0,17 ± 0,17	ns	ns	ns
<i>CFLAR</i>	Via extrínseca	0,01 ± 0,01	0,30 ± 0,25	0,16 ± 0,16	ns	ns	ns
<i>FADD</i>	Via extrínseca	0,04 ± 0,03	0,90 ± 0,78	0,49 ± 0,47	ns	ns	ns
<i>FAS</i>	Via extrínseca	0,01 ± 0,01	0,54 ± 0,45	0,21 ± 0,21	ns	ns	ns
<i>FASLG</i>	Via extrínseca	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	ns	ns	ns
<i>CASP8</i>	Caspase iniciadora	0,00 ± 0,00	0,31 ± 0,28	0,10 ± 0,09	ns	ns	ns
<i>CASP9</i>	Caspase iniciadora	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	ns	ns	ns
<i>CASP3</i>	Caspase efetora	0,01 ± 0,01	0,31 ± 0,27	0,09 ± 0,09	ns	ns	ns
<i>CASP7</i>	Caspase efetora	0,02 ± 0,02	0,71 ± 0,58	0,31 ± 0,30	ns	ns	ns
<i>AIFM1</i>	Efetor independente	0,01 ± 0,01	0,33 ± 0,27	0,18 ± 0,18	ns	ns	ns

P: Teste One-Way ANOVA com repetições e teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X% ± EP: Média% ± Erro Padrão; 1: GEN 1µM versus GEN 5µM + DXR; 2: GEN 5µM versus DXR + GEN 5µM; 3: GEN 5µM + DXR versus DXR + GEN 5µM; ns: estatisticamente não significativo.

Tabela 45: Expressão Relativa de mRNA de genes envolvidos na indução de apoptose em células MDA-MB-231 CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>, em relação ao controle não-tratado.

Gene	Função	Quantidade Relativa de Expressão Gênica (X% ± EP)				P1	P2	P3
		Controle	GEN 1 µM	GEN 5 µM +DXR	DXR + GEN 5 µM			
<i>TP53</i>	Checkpoint (supressor tumoral)	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,86 ± 3,66	0,09 ± 0,05	ns	ns	ns
<i>AKT1</i>	Checkpoint (oncogene)	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,20 ± 2,06	0,06 ± 0,03	ns	ns	ns
<i>APAF1</i>	Via intrínseca	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,87 ± 1,70	0,08 ± 0,04	ns	ns	ns
<i>BAD</i>	Via intrínseca	1,00 ± 0,00	0,03 ± 0,02	3,94 ± 3,74	0,12 ± 0,05	ns	ns	ns
<i>BAX</i>	Via intrínseca	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,48 ± 2,37	0,05 ± 0,02	ns	ns	ns
<i>CYCS</i>	Via intrínseca	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	4,54 ± 4,46	0,04 ± 0,02	ns	ns	ns
<i>CFLAR</i>	Via extrínseca	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,69 ± 2,61	0,03 ± 0,02	ns	ns	ns
<i>FADD</i>	Via extrínseca	1,00 ± 0,00	0,03 ± 0,02	3,02 ± 2,91	0,08 ± 0,03	ns	ns	ns
<i>FAS</i>	Via extrínseca	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,11 ± 2,03	0,04 ± 0,02	ns	ns	ns
<i>FASLG</i>	Via extrínseca	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	4,88 ± 4,85	0,00 ± 0,00	ns	ns	ns
<i>CASP8</i>	Caspase iniciadora	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,60 ± 3,52	0,04 ± 0,03	ns	ns	ns
<i>CASP9</i>	Caspase iniciadora	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,03	0,03 ± 0,01	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<i>CASP3</i>	Caspase efetora	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,56 ± 3,46	0,04 ± 0,02	ns	ns	ns
<i>CASP7</i>	Caspase efetora	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,88 ± 1,74	0,07 ± 0,04	ns	ns	ns
<i>AIFM1</i>	Efetor independente	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,00 ± 2,91	0,07 ± 0,06	ns	ns	ns

P: Teste One-Way ANOVA com repetições e teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X% ± EP: Média% ± Erro Padrão; 1: GEN 1µM versus Controle; 2: GEN 5µM + DXR versus Controle; 3: DXR + GEN 5µM versus Controle; ns: estatisticamente não significativo; \*: estatisticamente significativo.

Tabela 46: Expressão Relativa de mRNA de genes envolvidos na indução de apoptose em células MDA-MB-231 CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>, comparando os efeitos de cada tratamento entre si.

Gene	Função	Quantidade Relativa de Expressão Gênica (X% ± EP)			P1	P2	P3
		GEN 1 µM	GEN 5 µM +DXR	DXR + GEN 5 µM			
<i>TP53</i>	Checkpoint (supressor tumoral)	0,00 ± 0,00	3,86 ± 3,66	0,09 ± 0,05	ns	ns	ns
<i>AKT1</i>	Checkpoint (oncogene)	0,00 ± 0,00	2,20 ± 2,06	0,06 ± 0,03	ns	ns	ns
<i>APAF1</i>	Via intrínseca	0,00 ± 0,00	1,87 ± 1,70	0,08 ± 0,04	ns	ns	ns
<i>BAD</i>	Via intrínseca	0,03 ± 0,02	3,94 ± 3,74	0,12 ± 0,05	ns	ns	ns
<i>BAX</i>	Via intrínseca	0,00 ± 0,00	2,48 ± 2,37	0,05 ± 0,02	ns	ns	ns
<i>CYCS</i>	Via intrínseca	0,00 ± 0,00	4,54 ± 4,46	0,04 ± 0,02	ns	ns	ns
<i>CFLAR</i>	Via extrínseca	0,00 ± 0,00	2,69 ± 2,61	0,03 ± 0,02	ns	ns	ns
<i>FADD</i>	Via extrínseca	0,03 ± 0,02	3,02 ± 2,91	0,08 ± 0,03	ns	ns	ns
<i>FAS</i>	Via extrínseca	0,00 ± 0,00	2,11 ± 2,03	0,04 ± 0,02	ns	ns	ns
<i>FASLG</i>	Via extrínseca	0,00 ± 0,00	4,88 ± 4,85	0,00 ± 0,00	ns	ns	ns
<i>CASP8</i>	Caspase iniciadora	0,00 ± 0,00	3,60 ± 3,52	0,04 ± 0,03	ns	ns	ns
<i>CASP9</i>	Caspase iniciadora	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,03	0,03 ± 0,01	ns	ns	ns
<i>CASP3</i>	Caspase efetora	0,00 ± 0,00	3,56 ± 3,46	0,04 ± 0,02	ns	ns	ns
<i>CASP7</i>	Caspase efetora	0,00 ± 0,00	1,88 ± 1,74	0,07 ± 0,04	ns	ns	ns
<i>AIFM1</i>	Efetor independente	0,00 ± 0,00	3,00 ± 2,91	0,07 ± 0,06	ns	ns	ns

P: Teste One-Way ANOVA com repetições e teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; X% ± EP: Média% ± Erro Padrão; 1: GEN 1µM versus GEN 5µM + DXR; 2: GEN 5µM versus DXR + GEN 5µM; 3: GEN 5µM + DXR versus DXR + GEN 5µM; ns: estatisticamente não significativo.

Comparando as sub-populações CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> e não-CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> em cada tratamento, foi observado que células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> apresentaram supressão na expressão de genes apoptóticos após os tratamentos GEN 1 µM 24h e DXR 1 ng/mL 24h + GEN 5 µM 24h em relação à população não-CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>, entretanto, as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas (Tabela 47). Em contrapartida, após o tratamento GEN 5 µM + DXR, células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> apresentam aumento na expressão de genes apoptóticos em comparação a população não-CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>. Contudo, tais diferenças também não foram estatisticamente significativas (Tabela 47).

Tabela 47: Expressão Relativa de mRNA de genes envolvidos na indução de apoptose em MDA-MB-231, comparando células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> e não-CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>.

Gene	Função	Quantidade Relativa de Expressão Gênica (X% ± EP)						P1	P2	P3
		GEN 1 µM		GEN 5 µM + DXR 1 ng/mL		DXR 1 ng/mL + GEN 5 µM				
		não-CTT	CTT	não-CTT	CTT	não-CTT	CTT			
<i>TP53</i>	Checkpoint (supressor tumoral)	0,03 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,82 ± 0,66	3,86 ± 3,66	0,91 ± 0,90	0,09 ± 0,05	ns	ns	ns
<i>AKT1</i>	Checkpoint (oncogene)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,37 ± 0,29	2,20 ± 2,06	0,29 ± 0,29	0,06 ± 0,03	ns	ns	ns
<i>APAF1</i>	Via intrínseca	0,19 ± 0,19	0,00 ± 0,00	1,10 ± 0,89	1,87 ± 1,70	0,48 ± 0,48	0,08 ± 0,04	ns	ns	ns
<i>BAD</i>	Via intrínseca	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,74 ± 0,59	3,94 ± 3,74	0,81 ± 0,80	0,12 ± 0,05	ns	ns	ns
<i>BAX</i>	Via intrínseca	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,31 ± 0,24	2,48 ± 2,37	0,29 ± 0,29	0,05 ± 0,02	ns	ns	ns
<i>CYCS</i>	Via intrínseca	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,32 ± 0,26	4,54 ± 4,46	0,17 ± 0,17	0,04 ± 0,02	ns	ns	ns
<i>CFLAR</i>	Via extrínseca	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,30 ± 0,25	2,69 ± 2,61	0,16 ± 0,16	0,03 ± 0,02	ns	ns	ns
<i>FADD</i>	Via extrínseca	0,04 ± 0,03	0,03 ± 0,02	0,90 ± 0,78	3,02 ± 2,91	0,49 ± 0,47	0,08 ± 0,03	ns	ns	ns
<i>FAS</i>	Via extrínseca	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,54 ± 0,45	2,11 ± 2,03	0,21 ± 0,21	0,04 ± 0,02	ns	ns	ns
<i>FASLG</i>	Via extrínseca	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	4,88 ± 4,85	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	ns	ns	ns
<i>CASP8</i>	Caspase iniciadora	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,31 ± 0,28	3,60 ± 3,52	0,10 ± 0,09	0,04 ± 0,03	ns	ns	ns
<i>CASP9</i>	Caspase iniciadora	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,01	ns	ns	ns
<i>CASP3</i>	Caspase efetora	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,31 ± 0,27	3,56 ± 3,46	0,09 ± 0,09	0,04 ± 0,02	ns	ns	ns
<i>CASP7</i>	Caspase efetora	0,02 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,71 ± 0,58	1,88 ± 1,74	0,31 ± 0,30	0,07 ± 0,04	ns	ns	ns
<i>AIFM1</i>	Efetuor independente	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,27	3,00 ± 2,91	0,18 ± 0,18	0,07 ± 0,06	ns	ns	ns

P: Teste t Student pareado com  $\alpha=0,05$ ; X% ± EP: Média% ± Erro Padrão; 1: GEN 1µM não-CTT versus GEN 1µM CTT; 2: GEN 5µM + DXR não-CTT versus GEN 5µM + DXR CTT; 3: DXR + GEN 5µM não-CTT versus DXR + GEN 5µM CTT; ns: estatisticamente não significativo.

***Discussão***

---

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Tratamentos isolados

No presente estudo, a exposição a GEN 1  $\mu\text{M}$  por 24 h provocou aumento da apoptose por bloqueio em fase G2/M e redução na viabilidade celular. Isso confirmou o pressuposto efeito antitumoral atribuído à GEN em doses fisiológicas, entretanto, o aumento na concentração de GEN não provocou variações nas taxas de apoptose e viabilidade. Tais resultados corroboram parcialmente com Pan *et al.* (2012), que investigaram os efeitos de doses de 5 – 20  $\mu\text{M}$  de GEN por 72h em MDA-MB-231 e verificaram inibição do crescimento celular, acúmulo de células em fase G2/M, e inibição da atividade da NF-kB por meio da sinalização da via Notch-1.

A respeito da capacidade da GEN em inibir o crescimento e a viabilidade em células de CM triplo-negativo, a literatura aponta resultados contraditórios em concentrações elevadas e reduzidas de GEN (Li *et al.*, 2005; Yang, Zhou e Yang, 2007). Magee *et al.* (2004) estudou os efeitos de GEN 2,5  $\mu\text{M}$  por 48h em células MDA-MB-231 e não observou redução na viabilidade celular. Santell *et al.* (2000) utilizando 20  $\mu\text{M}$  de GEN por 48h observaram inibição de 50% na proliferação celular em MDA-MB-231. No entanto, o mesmo estudo apontou que o tratamento *in vivo* com GEN, cuja concentração plasmática máxima foi de 1  $\mu\text{M}$ , não mostrou redução na formação do tumor.

Apesar da redução na viabilidade celular, no nosso estudo foi observado que o tratamento com GEN 1  $\mu\text{M}$  não reduziu a proporção CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>. Além disso, GEN 1  $\mu\text{M}$  provocou supressão na expressão de genes que induzem apoptose, de modo que, a supressão em células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> foi mais intensa do que em não-CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>. A respeito dos efeitos da GEN sobre CTTs de CM, ainda há pouca informação na literatura. Fan *et al.* (2013) trataram células MCF-7 com GEN 5 - 30  $\mu\text{M}$  por 48h e observaram que a inibição da via *Hedgehog* provoca redução na proliferação celular, e também redução na proporção de células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>.

A cerca da linhagem MCF-7 (CM hormônio-dependente), não foram observados efeitos letais associados ao tratamento com GEN nas concentrações estudadas. Contudo, pela regressão linear foi possível observar que o aumento da

dose de GEN 24h induz acúmulo na fase S seguido de diminuição das fases G0/G1 e G2/M, levando a aumento na apoptose e na viabilidade como resultante final. Dessa forma, isso sugere que o tratamento induz as células MCF-7 a permanecerem em fase S por tempo prolongado. Esses resultados corroboram com Wang e Kurzer (1997), que demonstraram aumento de 150%-235% na síntese de DNA em células MCF-7 após 24h de tratamento com 0,1-10  $\mu\text{M}$  GEN. Além disso, Zheng *et al.* (2013) analisaram os efeitos de 0,001 – 10  $\mu\text{M}$  de GEN em células MCF-7, e verificaram aumento na fase S com significativa proliferação, possivelmente ocasionados pela ativação de respostas estrogênicas mediadas por REs e pela via PI3K/Akt.

De modo geral, na literatura acredita-se que células hormônio-dependentes sofrem inibição com concentrações de GEN entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ , e apresentam proliferação a partir de 10  $\mu\text{M}$  (Klein e King, 2007; Yang, Zhou e Yang, 2007), mas isso não é um consenso. Alguns pesquisadores apontaram que somente doses saturantes acima de 10  $\mu\text{M}$  de GEN são capazes de estimular ambos RE $\alpha$  e RE $\beta$ , inibindo células hormônio-dependentes (Bilal *et al.*, 2014).

Sobre os tratamentos isolados com DXR 1 ng/mL, 2 ng/mL e 5 ng/mL, foi observado aumento significativo na viabilidade celular em MDA-MB-231 e MCF-7. Em MDA-MB-231, houve aumento na proporção de células em fase G2/M. Já em MCF-7, houve aumento na proporção de células em fase S, seguido de aumento também na taxa apoptose. Paralelamente, a dose de DXR 1 ng/mL também não produziu alteração na população CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> em MDA-MB-231. Estudos anteriores já demonstraram que a dose mínima de DXR que induz 50% de morte celular (IC50) em 48h para a MCF-7 e MDA-MB-231 é em torno de 20-50 ng/mL, respectivamente (Li *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2011). Assim, as concentrações utilizadas no presente estudo (cerca de 10 vezes abaixo da IC50) certamente não exercem efeitos inibitórios. No entanto, por ser uma droga mutagênica, a DXR possivelmente pode provocar danos sub-letais que sinalizam resposta ao dano no DNA e estimulam rotas de sobrevivência celular. A respeito dos efeitos da DXR sobre CTTs, Tudoran *et al.* (2015) verificaram que células MDA-MB-231 tratadas com DXR na dose IC50 por 24h tornam-se resistentes e não sofrem inibição nas taxas de proliferação, agregação e formação de mamoesferas.

Sobre os tratamentos isolados com 5 Gy e 10 Gy de RAD ionizante, em células MCF-7 foi observado redução na viabilidade por bloqueio em G0/G1 e

apoptose. Já na linhagem MDA-MB-231, a redução na viabilidade ocorreu somente na dose 10 Gy, sendo observado bloqueio em fase G2/M, seguido de apoptose. Tais dados corroboram com os resultados na literatura. Sabe-se que o CM triplo-negativo é altamente radio-resistente pela elevada presença de células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>, ao contrário da MCF-7, a qual possuem fenótipo luminal (Phillips, Mcbride e Pajonk, 2006; Moncharmont *et al.*, 2012). Um estudo recente realizado por Bensimon *et al.* (2015) apontou que a radioresistência em CTTs pode está diretamente associada à eliminação do CD24. Os pesquisadores concluíram que células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> induzidas a expressar CD24 apresentam aumento no estresse oxidativo e na instabilidade genômica, tornando as células CTTs mais sensíveis a radiação.

## 5.2 Tratamentos combinados

A respeito dos tratamentos combinados com DXR, foi observado que o pré-tratamento com GEN (GEN + DXR), de modo geral, não induziu alterações na viabilidade em ambas as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7. Em MCF-7, houve interações sinérgicas entre GEN e DXR em todas as doses GEN + DXR, seguido de aumento da apoptose nas doses GEN 1  $\mu$ M e 2,5  $\mu$ M. Pela regressão linear, verificou-se que o aumento da dose de GEN provoca diminuição da fase G0/G1 e aumento da fase S em MCF-7.

Por outro lado, em MDA-MB-231, a redução do CID nos tratamentos GEN + DXR esteve atrelada ao aumento da concentração de GEN. Dessa forma, na dose de GEN 5  $\mu$ M + DXR 1 ng/mL foi observado efeito sinérgico entre GEN e DXR, com aumento na fase G2/M seguido de apoptose e redução na população CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>. Além disso, o tratamento GEN 5  $\mu$ M + DXR 1 ng/mL induziu a expressão de genes apoptóticos, de modo que, a expressão em células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> foi mais intensa do que em não-CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>. No entanto, a expressão do gene *CASP9* apresentou significativa supressão, sugerindo que o processo de apoptose, nesse caso, parece estar ocorrendo principalmente via caspases 8 e 3. Dessa forma, tais resultados indicam que o bloqueio em fase G2/M provocado pela exposição a GEN 5  $\mu$ M é capaz de sensibilizar células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> de MDA-MB-231 ao tratamento posterior com o agente mutagênico DXR 1 ng/mL.

Esses resultados corroboram parcialmente Lim *et al.* (2006), que trataram células MCF-7 e MDA-MB-231 com doses de GEN 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M por 24h, seguido de tratamento com doses de DXR 1-100 ng/mL por 48h. Foi observado que a GEN tornou as células MDA-MB-231 mais sensíveis a DXR, possivelmente pela superexpressão de GRP78 (*glucose-regulated protein-78*), entretanto, a GEN não exerceu efeitos sobre a MCF-7.

A respeito dos pós-tratamentos (DXR + GEN), em ambas as linhagens, a redução do CID, ou seja, o aumento da sinergia, também esteve atrelado ao aumento da concentração de GEN. Em MDA-MB-231, o pós-tratamento DXR 1 ng/mL + GEN 5  $\mu$ M provocou drástica redução na viabilidade, com aumento na apoptose e bloqueio em fase G2/M. Semelhantemente, em MCF-7, o pós-tratamento DXR 1 ng/mL + GEN 5  $\mu$ M também provocou drástica redução na viabilidade, aumento na apoptose e bloqueio em fase G0/G1.

Embora a redução na viabilidade celular seja notável, os pós-tratamentos em MDA-MB-231 chamam atenção para outros aspectos importantes. Na dose de GEN 1  $\mu$ M, o pós-tratamento DXR + GEN apresentou efeito antagônico entre GEN e DXR, com aumento na viabilidade seguido de aumento na fase G2/M, aumento na apoptose e redução na população CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>. Por outro lado, na dose de GEN 5  $\mu$ M, o pós-tratamento DXR + GEN apresentou efeito sinérgico entre GEN e DXR, com bloqueio na fase G2/M seguido de apoptose. Contudo, não houve redução na população CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>. Além disso, o tratamento DXR 1 ng/mL + GEN 5  $\mu$ M provocou supressão de genes apoptóticos, de modo que, a supressão em células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> foi mais intensa do que em não-CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>. Pela regressão linear, é possível verificar que o aumento na dose de GEN no pós-tratamento (DXR + GEN) induz aumento na população CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>. Do mesmo modo, a redução do CID, ou seja, o aumento da sinergia, também produz aumento na população CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>.

Dessa forma, esses resultados apontam que os pré e pós-tratamentos que provocam morte celular e redução da viabilidade nas populações sensíveis, concomitantemente, parecem induzir a sinalização de mecanismos de sobrevivência em populações CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>, incluindo supressão de vias apoptóticas. Nesse contexto, somente doses que induzem bloqueio celular, mas sem provocar redução

na viabilidade celular, são capazes de afetar populações CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> de MDA-MB-231.

Na literatura não há estudos relacionando os efeitos do pré-tratamento e do pós-tratamento utilizando GEN e DXR nas condições de nosso estudo. Um estudo realizado por Wang *et al.* (2008) apontou que DXR em pequenas concentrações pode conduzir as células à fase G2/M, tornando-as mais suscetíveis a tratamentos secundários. No entanto, Vijayaraghavalu *et al.* (2012) testaram DXR 1 ng/mL em MCF-7 por 48-72h e não observaram aumento na fase G2/M. Paralelamente, a GEN pode exercer algum bloqueio no reparo dos danos causados pela DXR ao DNA, como a inibição da topoisomerase II (Chen e Liu, 1994).

A respeito dos tratamentos combinados com RAD, na linhagem MCF-7 foi observado que todos os tratamentos apresentaram efeitos sinérgicos, com redução da viabilidade e bloqueio na fase G0/G1. Contudo, os tratamentos combinados não produziram taxas de morte celular superiores ao tratamento isolado com RAD 5 Gy. Em contrapartida, a linhagem MDA-MB-231 se mostrou resistente aos tratamentos combinados com GEN, ou seja, em todos os tratamentos houve efeito antagônico entre GEN e RAD, refletindo em aumento da viabilidade. Nos pré-tratamentos GEN + 10 Gy houve aumento na fase G2/M, mas nos pós-tratamentos 10 Gy + GEN não houve alteração no ciclo celular.

Liu *et al.* (2013) irradiaram células MCF-7 e MDA-MB-231 com RAD 4 Gy na presença e na ausência de 5 - 20 µM de GEN, ou seja, os pesquisadores mantiveram as linhagens expostas a GEN durante a aplicação da RAD (co-tratamento). Foi observado um potente efeito antitumoral, inclusive na linhagem MDA-MB-231, em que as células pré-tratadas com GEN apresentaram mais lesões no DNA e bloqueio na fase G2/M do que as células que foram apenas irradiadas.

De modo geral, sabe-se que o tratamento utilizando agentes mutagênicos como DXR e RAD ativa uma complexa rede de reações celulares que em conjunto podem ser chamadas de “Resposta ao Dano no DNA” as quais controlam diversas funções como proliferação celular, reparo do DNA e mortes por apoptose e necrose. Essas reações são interligadas por redes de sinalização celular que interagem em diversos níveis moleculares de comunicação e *feedback* (Harper e Elledge, 2007). Conseqüentemente, a avaliação da eficiência de uma combinação terapêutica exige um entendimento detalhado a respeito da “Resposta ao Dano no

DNA” e também sobre o processamento de diversas outras respostas moleculares. Além disso, deve-se considerar como esse processamento pode ser modificado pelas alterações genéticas geralmente encontradas no tumor, e como redes específicas de sinalização podem ser ativadas por drogas de modo a dirigir a célula à morte (Sachs *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2012).

Visando a prática clínica, de modo geral, os resultados no presente estudo apontam que a faixa de concentração para a utilização da GEN em pacientes parece ter pouca margem de segurança. Embora a inibição sobre CTTs seja expressiva, a GEN age de forma pleiotrópica, e induz efeitos antagônicos após a variação da dose em apenas duas vezes. Dessa forma, a investigação de concentrações de GEN com efeitos antitumorais, mas sem riscos ao paciente, ainda representa um desafio para os estudos futuros (Russo *et al.*, 2016).

## ***Conclusões***

---

## 6 CONCLUSÕES

A hipótese inicial de que doses fisiológicas de GEN induzem morte celular em linhagem MDA-MB-231 (CM triplo-negativo) foi confirmada nesse estudo, entretanto, os tratamentos não afetaram a população de CTTs resistentes. Além disso, o aumento na concentração de GEN não provocou variações nas taxas de apoptose e viabilidade.

A cerca da linhagem MCF-7 (CM hormônio-dependente), foram observados efeitos pró-oncogênicos importantes associados ao tratamento com GEN nas concentrações estudadas. Dessa forma, o uso de doses fisiológicas de GEN parece não trazer benefícios para portadores de CM hormônio-dependente.

Sobre os pré e pós-tratamentos irradiados na linhagem MDA-MB-231, todas as doses fisiológicas de GEN estudadas apresentaram efeito antagônico em combinação com a dose de 10 Gy de RAD, refletindo em aumento na viabilidade celular. Dessa forma, o uso de irradiação em combinação com GEN nas doses estudadas parece não ser vantajoso em células MDA-MB-231.

Em esquemas de pré e pós-tratamento, doses fisiológicas de GEN atingiram sinergia em combinação com uma dose extremamente baixa de DXR. No entanto, os tratamentos que provocaram efetiva redução da viabilidade, concomitantemente, causaram supressão de vias apoptóticas em populações CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>. Nesse sentido, somente o tratamento que induziu bloqueio celular, mas sem provocar redução na viabilidade, foi capaz de afetar a população de CTTs da linhagem MDA-MB-231. Em virtude disso, o presente estudo evidencia que o uso combinado de doses fisiológicas de GEN e DXR se mostra eficaz na inibição de CTTs somente no pré-tratamento com GEN 5 µM por 24h seguido de DXR 1 ng/mL por 24h.

Por fim, a investigação de novos esquemas terapêuticos no combate ao CM, especialmente as novas abordagens empregando compostos naturais, em geral, requer mais atenção a respeito da presença de CTTs, visto que a redução na viabilidade celular não garante a eliminação de populações resistentes, as quais são responsáveis pela maioria dos casos de recidiva, metástase e morte.

## ***Referências Bibliográficas***

---

---

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABLETT, M. P.; SINGH, J. K.; CLARKE, R. B. Stem cells in breast tumours: are they ready for the clinic? **European Journal of Cancer**, v. 48, n. 14, p. 2104-2116, 2012. ISSN 0959-8049.

AGGARWAL, R. et al. Natural compounds: Role in reversal of epigenetic changes. **Biochemistry (Moscow)**, v. 80, n. 8, p. 972-989, 2015. ISSN 0006-2979.

AKIYAMA, T. et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 12, p. 5592-5595, 1987. ISSN 0021-9258.

AL-HAJJ, M. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 7, p. 3983-3988, 2003. ISSN 0027-8424.

AL-LAZIKANI, B.; BANERJI, U.; WORKMAN, P. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. **Nature biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 679-692, 2012. ISSN 1087-0156.

ALLRED, D. C. Issues and updates: evaluating estrogen receptor- $\alpha$ , progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. **Modern Pathology**, v. 23, p. S52-S59, 2010. ISSN 0893-3952.

B GENCEL, V. et al. Vascular effects of phytoestrogens and alternative menopausal hormone therapy in cardiovascular disease. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 2, p. 149-174, 2012. ISSN 1389-5575.

BAGNOLI, M.; CANEVARI, S.; MEZZANZANICA, D. Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 42, n. 2, p. 210-213, 2010. ISSN 1357-2725.

BENSIMON, J. et al. Forced extinction of CD24 stem-like breast cancer marker alone promotes radiation resistance through the control of oxidative stress. **Molecular carcinogenesis**, 2015. ISSN 1098-2744.

BERENBAUM, M. C. What is synergy? **Pharmacological reviews**, v. 41, n. 2, p. 93-141, 1989. ISSN 1521-0081.

BERGMANN, A.; STELLER, H. Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. **Science signaling**, v. 3, n. 145, p. re8, 2010.

BERGQUIST, P. L. et al. Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology. **Extremophiles**, v. 13, n. 3, p. 389-401, 2009. ISSN 1431-0651.

BILAL, I. et al. Phytoestrogens and prevention of breast cancer: The contentious debate. **World J Clin Oncol**, v. 5, n. 4, p. 705-712, 2014. ISSN 2218-4333.

- BJERKVIG, R. et al. The origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 11, p. 899-904, 2005. ISSN 1474-175X.
- BLAGOSKLONNY, M. Target for cancer therapy: proliferating cells or stem cells. **Leukemia**, v. 20, n. 3, p. 385-391, 2005. ISSN 0887-6924.
- BLANPAIN, C. et al. DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 8, n. 1, p. 16-29, 2011. ISSN 1934-5909.
- BORG, Å. et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. **Cancer research**, v. 50, n. 14, p. 4332-4337, 1990. ISSN 0008-5472.
- BURSTEIN, H. J. et al. Phase II study of sunitinib malate, an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 11, p. 1810-1816, 2008. ISSN 0732-183X.
- CAMPBELL, L. L.; POLYAK, K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? **Cell Cycle**, v. 6, n. 19, p. 2332-2338, 2007. ISSN 1538-4101.
- CEDERROTH, C. R.; NEF, S. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 304, n. 1-2, p. 30-42, 2009. ISSN 0303-7207.
- CHAPPELL, J.; DALTON, S. Altered cell cycle regulation helps stem-like carcinoma cells resist apoptosis. **BMC biology**, v. 8, n. 1, p. 63, 2010. ISSN 1741-7007.
- CHEN, A. Y.; LIU, L. F. DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 34, n. 1, p. 191-218, 1994. ISSN 0362-1642.
- CHEUNG, M.; TESTA, J. R. Diverse mechanisms of AKT pathway activation in human malignancy. **Current cancer drug targets**, v. 13, n. 3, p. 234, 2013.
- CHOU, T.-C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological reviews**, v. 58, n. 3, p. 621-681, 2006. ISSN 1521-0081.
- \_\_\_\_\_. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. **Cancer research**, v. 70, n. 2, p. 440-446, 2010. ISSN 0008-5472.
- CHUTHAPISITH, S. et al. Breast cancer chemoresistance: emerging importance of cancer stem cells. **Surgical oncology**, v. 19, n. 1, p. 27-32, 2010. ISSN 0960-7404.
- CLARKE, R. B. Steroid receptors and proliferation in the human breast. **Steroids**, v. 68, n. 10, p. 789-794, 2003. ISSN 0039-128X.
- CLEATOR, S.; HELLER, W.; COOMBES, R. C. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. **The lancet oncology**, v. 8, n. 3, p. 235-244, 2007. ISSN 1470-2045.
- CREAGH, E. M.; CONROY, H.; MARTIN, S. J. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. **Immunological reviews**, v. 193, n. 1, p. 10-21, 2003. ISSN 1600-065X.

- CREIGHTON, C. J. et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 33, p. 13820-13825, 2009. ISSN 0027-8424.
- CROWDER, R.; EL-DEIRY, W. Caspase-8 regulation of TRAIL-mediated cell death. **Exp Oncol**, v. 34, n. 3, p. 160-164, 2012.
- DANCEY, J. E.; CHEN, H. X. Strategies for optimizing combinations of molecularly targeted anticancer agents. **Nature reviews Drug discovery**, v. 5, n. 8, p. 649-659, 2006. ISSN 1474-1776.
- DASHZEVEG, N.; YOSHIDA, K. Cell death decision by p53 via control of the mitochondrial membrane. **Cancer letters**, v. 367, n. 2, p. 108-112, 2015. ISSN 0304-3835.
- DEBEB, B. G.; XU, W.; WOODWARD, W. A. Radiation resistance of breast cancer stem cells: understanding the clinical framework. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 14, n. 1, p. 11-17, 2009. ISSN 1083-3021.
- DEL VECCHIO, C. A. et al. Epidermal growth factor receptor variant III contributes to cancer stem cell phenotypes in invasive breast carcinoma. **Cancer research**, v. 72, n. 10, p. 2657-2671, 2012. ISSN 0008-5472.
- DENIAUD, A. et al. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. **Oncogene**, v. 27, n. 3, p. 285-299, 2008. ISSN 0950-9232.
- DITTMER, A. et al. Mesenchymal stem cells and carcinoma-associated fibroblasts sensitize breast cancer cells in 3D cultures to kinase inhibitors. **International journal of oncology**, v. 39, n. 3, p. 689-696, 2011. ISSN 1019-6439.
- EDMONDSON, J. M.; ARMSTRONG, L. S.; MARTINEZ, A. O. A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures. **Journal of tissue culture methods**, v. 11, n. 1, p. 15-17, 1988. ISSN 0271-8057.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007. ISSN 0192-6233.
- EVANS, M. et al. The effect of synthetic genistein on menopause symptom management in healthy postmenopausal women: a multi-center, randomized, placebo-controlled study. **Maturitas**, v. 68, n. 2, p. 189-196, 2011. ISSN 0378-5122.
- FAN, P. et al. Genistein decreases the breast cancer stem-like cell population through Hedgehog pathway. **Stem cell research & therapy**, v. 4, n. 6, p. 146, 2013. ISSN 1757-6512.
- FAN, T.-J. et al. Caspase family proteases and apoptosis. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 37, n. 11, p. 719-727, 2005. ISSN 1672-9145.

- FANG, Y. et al. Quantitative phosphoproteomics reveals genistein as a modulator of cell cycle and DNA damage response pathways in triple-negative breast cancer cells. **International journal of oncology**, v. 48, n. 3, p. 1016-1028, 2016. ISSN 1019-6439.
- FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-E386, 2015. ISSN 1097-0215.
- FIANDALO, M.; KYPRIANOU, N. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. **Experimental oncology**, v. 34, n. 3, p. 165, 2012.
- FORNARI, F. A. et al. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. **Molecular pharmacology**, v. 45, n. 4, p. 649-656, 1994. ISSN 1521-0111.
- FOTSIS, T. et al. Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 7, p. 2690-2694, 1993. ISSN 0027-8424.
- FOULKES, W. D. et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 19, p. 1482-1485, 2003. ISSN 0027-8874.
- FRANKE, T. PI3K/Akt: getting it right matters. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6473-6488, 2008. ISSN 0950-9232.
- FULDA, S.; DEBATIN, K. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4798-4811, 2006. ISSN 0950-9232.
- GEWIRTZ, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochemical pharmacology**, v. 57, n. 7, p. 727, 1999. ISSN 0006-2952.
- GIONO, L. E.; MANFREDI, J. J. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. **Journal of cellular physiology**, v. 209, n. 1, p. 13-20, 2006. ISSN 1097-4652.
- GRANN, V. R. et al. Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma. **Cancer**, v. 103, n. 11, p. 2241-2251, 2005. ISSN 1097-0142.
- GREAVES, M.; MALEY, C. C. Clonal evolution in cancer. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 306-313, 2012. ISSN 0028-0836.
- GREVE, B. et al. Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. **Cytometry Part A**, v. 81, n. 4, p. 284-293, 2012. ISSN 1552-4930.
- HAJRA, K.; LIU, J. Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis**, v. 9, n. 6, p. 691-704, 2004. ISSN 1360-8185.
- HAMMOND, M. E. H. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 134, n. 7, p. 48-72, 2010. ISSN 1543-2165.

- HARFOUCHE, G.; MARTIN, M. T. Response of normal stem cells to ionizing radiation: A balance between homeostasis and genomic stability. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 704, n. 1, p. 167-174, 2010. ISSN 1383-5742.
- HARPER, J. W.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: ten years after. **Molecular cell**, v. 28, n. 5, p. 739-745, 2007. ISSN 1097-2765.
- HARPER, L. J. et al. Normal and malignant epithelial cells with stem-like properties have an extended G2 cell cycle phase that is associated with apoptotic resistance. **BMC cancer**, v. 10, n. 1, p. 166, 2010. ISSN 1471-2407.
- HENNESSY, B. T. et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. **Cancer research**, v. 69, n. 10, p. 4116-4124, 2009. ISSN 0008-5472.
- HERSCHKOWITZ, J. I. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome biology**, v. 8, n. 5, p. R76, 2007. ISSN 1465-6906.
- HICKS, S. W.; MACHAMER, C. E. Golgi structure in stress sensing and apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1744, n. 3, p. 406-414, 2005. ISSN 0167-4889.
- HINOHARA, K. et al. ErbB receptor tyrosine kinase/NF- $\kappa$ B signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 17, p. 6584-6589, 2012. ISSN 0027-8424.
- HOCHGRÄFE, F. et al. Tyrosine phosphorylation profiling reveals the signaling network characteristics of Basal breast cancer cells. **Cancer research**, v. 70, n. 22, p. 9391-9401, 2010. ISSN 0008-5472.
- HOEIJMAKERS, J. H. J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 366-374, 2001. ISSN 0028-0836.
- HUANG, J. et al. Genistein inhibits protein histidine kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 22, p. 15511-15515, 1992. ISSN 0021-9258.
- HÜTTEMANN, M. et al. The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. **Mitochondrion**, v. 11, n. 3, p. 369-381, 2011. ISSN 1567-7249.
- IBRAHIM, S. F.; VAN DEN ENGH, G. High-speed cell sorting: fundamentals and recent advances. **Current opinion in biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 5-12, 2003. ISSN 0958-1669.
- INCA. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Rio de Janeiro: Coordenação de Prevenção e Vigilância 2016.

- KAKARALA, M.; WICHA, M. S. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 17, p. 2813-2820, 2008. ISSN 0732-183X.
- KANTARI, C.; WALCZAK, H. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 4, p. 558-563, 2011. ISSN 0167-4889.
- KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316-323, 2004. ISSN 0028-0836.
- KEEG PATHWAY DATABASE. Apoptosis - Homo Sapiens. p. 04210, 2012. Disponível em: < [http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa04210](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04210) >. Acesso em: 2<sup>nd</sup> February 2016.
- KEEN, J. C.; DAVIDSON, N. E. The biology of breast carcinoma. **Cancer**, v. 97, n. S3, p. 825-833, 2003. ISSN 1097-0142.
- KHALIL, A. A. et al. Heat shock proteins in oncology: diagnostic biomarkers or therapeutic targets? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1816, n. 2, p. 89-104, 2011. ISSN 0304-419X.
- KHRAMTSOV, A. I. et al. Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome. **The American journal of pathology**, v. 176, n. 6, p. 2911-2920, 2010. ISSN 0002-9440.
- KING, K.; CIDLOWSKI, J. Cell cycle regulation and apoptosis 1. **Annual review of physiology**, v. 60, n. 1, p. 601-617, 1998. ISSN 0066-4278.
- KING, R. A.; BURSILL, D. B. Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. **The American journal of clinical nutrition**, v. 67, n. 5, p. 867-872, 1998. ISSN 0002-9165.
- KING, R. W.; JACKSON, P. K.; KIRSCHNER, M. W. Mitosis in transition. **Cell**, v. 79, n. 4, p. 563-571, 1994. ISSN 0092-8674.
- KLEIN, C. B.; KING, A. A. Genistein genotoxicity: critical considerations of in vitro exposure dose. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 224, n. 1, p. 1-11, 2007. ISSN 0041-008X.
- KORKAYA, H. et al. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/ $\beta$ -catenin signaling. **PLoS biology**, v. 7, n. 6, p. e1000121, 2009. ISSN 1545-7885.
- LE DOUSSAL, V. et al. Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. **Cancer**, v. 64, n. 9, p. 1914-1921, 1989. ISSN 1097-0142.
- LEE, M. J. et al. Sequential application of anticancer drugs enhances cell death by rewiring apoptotic signaling networks. **Cell**, v. 149, n. 4, p. 780-794, 2012. ISSN 0092-8674.

- LEVITZKI, A.; GAZIT, A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. **Science**, v. 267, n. 5205, p. 1782-1788, 1995. ISSN 0036-8075.
- LI, X. et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 9, p. 672-679, 2008. ISSN 0027-8874.
- LI, Y. et al. Inactivation of nuclear factor  $\kappa$ B by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells. **Cancer research**, v. 65, n. 15, p. 6934, 2005. ISSN 0008-5472.
- LI, Y.; SARKAR, F. H. Targeting Epigenetically Deregulated miRNA by Nutraceuticals: Focusing on Cancer Prevention and Treatment. **Current Pharmacology Reports**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2015. ISSN 2198-641X.
- LI, Y. et al. Implications of cancer stem cell theory for cancer chemoprevention by natural dietary compounds. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 22, n. 9, p. 799-806, 2011. ISSN 0955-2863.
- LIM, H. A. et al. Genistein induces glucose-regulated protein 78 in mammary tumor cells. **Journal of medicinal food**, v. 9, n. 1, p. 28-32, 2006. ISSN 1096-620X.
- LIM, S.; KALDIS, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development**, v. 140, n. 15, p. 3079-3093, 2013. ISSN 0950-1991.
- LITTLE, J. B. Cellular radiation effects and the bystander response. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 597, n. 1, p. 113-118, 2006. ISSN 0027-5107.
- LIU, X. et al. Genistein Enhances the Radiosensitivity of Breast Cancer Cells via G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis. **Molecules**, v. 18, n. 11, p. 13200-13217, 2013.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001. ISSN 1046-2023.
- MAGEE, P. J.; MCGLYNN, H.; ROWLAND, I. R. Differential effects of isoflavones and lignans on invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro. **Cancer letters**, v. 208, n. 1, p. 35-41, 2004. ISSN 0304-3835.
- MAIURI, M. C. et al. Autophagy regulation by p53. **Current opinion in cell biology**, v. 22, n. 2, p. 181-185, 2010. ISSN 0955-0674.
- MARUSYK, A.; POLYAK, K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1805, n. 1, p. 105-117, 2010. ISSN 0304-419X.
- MASON, E. F.; RATHMELL, J. C. Cell metabolism: an essential link between cell growth and apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 4, p. 645-654, 2011. ISSN 0167-4889.

- MESTER, J.; REDEUILH, G. Proliferation of breast cancer cells: regulation, mediators, targets for therapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 8, n. 8, p. 872-885, 2008. ISSN 1871-5206.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Cadernos de atenção básica nº13. Controle dos cânceres do colo do útero e da mama.** Brasília: Ministério da Saúde: 124 p. 2013.
- MIODINI, P. et al. The two phyto-oestrogens genistein and quercetin exert different effects on oestrogen receptor function. **British journal of cancer**, v. 80, n. 8, p. 1150, 1999.
- MODJTAHEDI, N.; GIORDANETTO, F.; KROEMER, G. A human mitochondriopathy caused by AIF mutation. **Cell death and differentiation**, v. 17, n. 10, p. 1525, 2010. ISSN 1350-9047.
- MONCHARMONT, C. et al. Targeting a cornerstone of radiation resistance: cancer stem cell. **Cancer letters**, v. 322, n. 2, p. 139-147, 2012. ISSN 0304-3835.
- MONTALES, M. T. E. et al. Repression of mammosphere formation of human breast cancer cells by soy isoflavone genistein and blueberry polyphenolic acids suggests diet-mediated targeting of cancer stem-like/progenitor cells. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 3, p. 652-660, 2012. ISSN 0143-3334.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983. ISSN 0022-1759.
- MUELLER, H.; KASSACK, M. U.; WIESE, M. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. **Journal of biomolecular screening**, v. 9, n. 6, p. 506-515, 2004. ISSN 1087-0571.
- NAVARRO, R. et al. Doxorubicin-Induced MAPK Activation in Hepatocyte Cultures Is Independent of Oxidant Damage. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1090, n. 1, p. 408-418, 2006. ISSN 1749-6632.
- NEVILLE, A. M. et al. Factors predicting treatment responsiveness and prognosis in node-negative breast cancer. The International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. **Journal of clinical oncology**, v. 10, n. 5, p. 696-705, 1992. ISSN 0732-183X.
- OKURA, A. et al. Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val 12] Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 157, n. 1, p. 183-189, 1988. ISSN 0006-291X.
- ORMEROD, M. The study of apoptotic cells by flow cytometry. **Leukemia (08876924)**, v. 12, n. 7, 1998. ISSN 0887-6924.
- ORMEROD, M. G. Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. **Journal of immunological methods**, v. 265, n. 1, p. 73-80, 2002. ISSN 0022-1759.

- PAN, H. et al. Genistein inhibits MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell growth by inhibiting NF- $\kappa$ B activity via the Notch-1 pathway. **International journal of molecular medicine**, v. 30, n. 2, p. 337, 2012. ISSN 1107-3756.
- PANNUTI, A. et al. Targeting Notch to target cancer stem cells. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 12, p. 3141-3152, 2010. ISSN 1078-0432.
- PARDAL, R.; CLARKE, M. F.; MORRISON, S. J. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 12, p. 895-902, 2003. ISSN 1474-175X.
- PATERSON, M. C. et al. Correlation between c-erbB-2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. **Cancer research**, v. 51, n. 2, p. 556-567, 1991. ISSN 0008-5472.
- PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-752, 2000. ISSN 0028-0836.
- PHILLIPS, T. M.; MCBRIDE, W. H.; PAJONK, F. The response of CD24<sup>-</sup>/low/CD44<sup>+</sup> breast cancer-initiating cells to radiation. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 24, p. 1777-1785, 2006. ISSN 0027-8874.
- PIETENPOL, J.; STEWART, Z. Cell cycle checkpoint signaling:: Cell cycle arrest versus apoptosis. **Toxicology**, v. 181, p. 475-481, 2002. ISSN 0300-483X.
- PRAT, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 12, n. 5, p. R68, 2010.
- PRICE, P.; MCMILLAN, T. J. Use of the tetrazolium assay in measuring the response of human tumor cells to ionizing radiation. **Cancer Research**, v. 50, n. 5, p. 1392-1396, 1990. ISSN 0008-5472.
- RAKHA, E. A. et al. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. **Cancer**, v. 109, n. 1, p. 25-32, 2006. ISSN 1097-0142.
- RENAULT, T. T.; MANON, S. Bax: Addressed to kill. **Biochimie**, v. 93, n. 9, p. 1379-1391, 2011. ISSN 0300-9084.
- REUBOLD, T. F.; ESCHENBURG, S. A molecular view on signal transduction by the apoptosome. **Cellular signalling**, v. 24, n. 7, p. 1420-1425, 2012. ISSN 0898-6568.
- RICARDO, S. et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. **Journal of clinical pathology**, v. 64, n. 11, p. 937-946, 2011. ISSN 1472-4146.
- RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458-1461, 2006. ISSN 1754-2189.
- ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. **Cancer letters**, v. 332, n. 2, p. 237-248, 2013. ISSN 0304-3835.

- ROSEN, P. P. et al. Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. **Journal of Clinical Oncology**, v. 7, n. 9, p. 1239-1251, 1989. ISSN 0732-183X.
- RUSSO, M. et al. Understanding genistein in cancer: The “good” and the “bad” effects: A review. **Food chemistry**, v. 196, p. 589-600, 2016. ISSN 0308-8146.
- SACHS, K. et al. Causal protein-signaling networks derived from multiparameter single-cell data. **Science**, v. 308, n. 5721, p. 523-529, 2005. ISSN 0036-8075.
- SAEZ, R. A.; MCGUIRE, W. L.; CLARK, G. M. Prognostic factors in breast cancer. *Seminars in surgical oncology*, 2006, Wiley Online Library. p.102-110.
- SALUCCI, S. et al. Ultraviolet B (UVB) irradiation-induced apoptosis in various cell lineages in vitro. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 1, p. 532-546, 2012.
- SANTELL, R. C.; KIEU, N.; HELFERICH, W. G. Genistein inhibits growth of estrogen-independent human breast cancer cells in culture but not in athymic mice. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 7, p. 1665-1669, 2000. ISSN 0022-3166.
- SARKAR, F. H.; LI, Y. Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 21, n. 3, p. 265-280, 2002. ISSN 0167-7659.
- SAYERS, T. J. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 60, n. 8, p. 1173-1180, 2011. ISSN 0340-7004.
- SCHAFFER, K. The cell cycle: a review. **Veterinary Pathology Online**, v. 35, n. 6, p. 461-478, 1998. ISSN 0300-9858.
- SCHEEL, C.; WEINBERG, R. A. Cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Seminars in cancer biology*, 2012, Elsevier. p.396-403.
- SENDOEL, A.; HENGARTNER, M. O. Apoptotic cell death under hypoxia. **Physiology**, v. 29, n. 3, p. 168-176, 2014. ISSN 1548-9213.
- SHACKLETON, M. et al. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. **Cell**, v. 138, n. 5, p. 822-829, 2009. ISSN 0092-8674.
- SHAO, Z. M. et al. Genistein exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. **Cancer research**, v. 58, n. 21, p. 4851-4857, 1998. ISSN 0008-5472.
- SHARMA, R. et al. MCF-7 Breast Tumour Cells In Vitro Is Modulated by Treatment with Tamoxifen, Doxorubicin, and Docetaxel: Relationship to Chemotherapy-Induced Changes in ATP Content, Hexokinase Activity, and Glucose Transport. 2011.
- SHERIDAN, C. et al. CD44+/CD24-breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. **Breast Cancer Res**, v. 8, n. 5, p. R59, 2006.

- SLAVOTINEK, A.; MCMILLAN, T.; STEEL, C. Measurement of radiation survival using the MTT assay. **European Journal of Cancer**, v. 30, n. 9, p. 1376-1382, 1994. ISSN 0959-8049.
- SPERKA, T.; WANG, J.; RUDOLPH, K. L. DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 13, n. 9, p. 579-590, 2012. ISSN 1471-0072.
- SRIVASTAVA, S. K. et al. Modulation of microRNAs by phytochemicals in cancer: underlying mechanisms and translational significance. **BioMed research international**, v. 2015, 2015. ISSN 2314-6133.
- SUEN, D.-F.; NORRIS, K. L.; YOULE, R. J. Mitochondrial dynamics and apoptosis. **Genes & development**, v. 22, n. 12, p. 1577-1590, 2008. ISSN 0890-9369.
- SUN, M. et al. Nitidine chloride induces apoptosis, cell cycle arrest, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin in breast cancer cells. **Tumor Biology**, v. 35, n. 10, p. 10201-10212, 2014. ISSN 1010-4283.
- SØRLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 19, p. 10869-10874, 2001. ISSN 0027-8424.
- TANAKA, H. et al. The Hedgehog signaling pathway plays an essential role in maintaining the CD44+ CD24-/low subpopulation and the side population of breast cancer cells. **Anticancer research**, v. 29, n. 6, p. 2147-2157, 2009. ISSN 0250-7005.
- TORUNO, C. et al. Interdependence of Bad and Puma during ionizing-radiation-induced apoptosis. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e88151, 2014. ISSN 1932-6203.
- TRYFONOPOULOS, D. et al. Src: a potential target for the treatment of triple-negative breast cancer. **Annals of oncology**, v. 22, n. 10, p. 2234-2240, 2011. ISSN 0923-7534.
- TUDORAN, O. et al. Regulation of stem cells-related signaling pathways in response to doxorubicin treatment in Hs578T triple-negative breast cancer cells. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 409, n. 1-2, p. 163-176, 2015. ISSN 0300-8177.
- ULLRICH, A.; SCHLESSINGER, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. **Cell**, v. 61, n. 2, p. 203-212, 1990. ISSN 0092-8674.
- VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell proliferation**, v. 36, n. 3, p. 131-149, 2003. ISSN 1365-2184.
- VIJAYARAGHAVALU, S. et al. Highly synergistic effect of sequential treatment with epigenetic and anticancer drugs to overcome drug resistance in breast cancer cells is mediated via activation of p21 gene expression leading to G2/M cycle arrest. **Molecular pharmaceuticals**, v. 10, n. 1, p. 337-352, 2012. ISSN 1543-8384.

- VIRA, D. et al. Cancer stem cells, microRNAs, and therapeutic strategies including natural products. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 31, n. 3-4, p. 733-751, 2012. ISSN 0167-7659.
- VOGEL, C. L. et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 3, p. 719-726, 2002. ISSN 0732-183X.
- VOUSDEN, K. H.; PRIVES, C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 413-431, 2009. ISSN 0092-8674.
- WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2, p. 97-110, 2009. ISSN 0944-7113.
- WANG, C.; KURZER, M. S. Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. 1997. ISSN 0163-5581.
- WANG, Y. A. et al. Enhanced anti-cancer effect of a phosphatidylinositol-3 kinase inhibitor and doxorubicin on human breast epithelial cell lines with different p53 and oestrogen receptor status. **International Journal of Cancer**, v. 123, n. 7, p. 1536-1544, 2008. ISSN 1097-0215.
- WATANABE, S. et al. Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). **The Journal of nutrition**, v. 128, n. 10, p. 1710-1715, 1998. ISSN 0022-3166.
- WEIGELT, B. et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. **The Journal of pathology**, v. 216, n. 2, p. 141-150, 2008. ISSN 1096-9896.
- WONG, F. C. et al. The anti-cancer activities of Vernonia amygdalina extract in human breast cancer cell lines are mediated through caspase-dependent and p53-independent pathways. 2013. ISSN 1932-6203.
- WU, C.-C.; BRATTON, S. B. Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 6, p. 546-558, 2013. ISSN 1523-0864.
- WÜRSTLE, M. L.; LAUSSMANN, M. A.; REHM, M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. **Experimental cell research**, v. 318, n. 11, p. 1213-1220, 2012. ISSN 0014-4827.
- XU, N. et al. Akt: a double-edged sword in cell proliferation and genome stability. **Journal of oncology**, v. 2012, 2012. ISSN 1687-8450.
- YANG, F. et al. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1845, n. 1, p. 84-89, 2014. ISSN 0304-419X.

YANG, S.; ZHOU, Q.; YANG, X. Caspase-3 status is a determinant of the differential responses to genistein between MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1773, n. 6, p. 903-911, 2007. ISSN 0167-4889.

YASUHARA, S. et al. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 51, n. 7, p. 873-885, 2003. ISSN 0022-1554.

YE, X.; WEINBERG, R. A. Epithelial–Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. **Trends in cell biology**, v. 25, n. 11, p. 675-686, 2015. ISSN 0962-8924.

YIN, H.; GLASS, J. The phenotypic radiation resistance of CD44+/CD24 (-or low) breast cancer cells is mediated through the enhanced activation of ATM signaling. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e24080, 2011. ISSN 1932-6203.

ZHENG, W.-Y. et al. Stimulatory effects of genistein and quercetin on the proliferation of MCF-7 cells. **Food Bioscience**, v. 2, p. 15-23, 2013. ISSN 2212-4292.

ZHOU, L. et al. The prognostic role of cancer stem cells in breast cancer: a meta-analysis of published literatures. **Breast cancer research and treatment**, v. 122, n. 3, p. 795-801, 2010. ISSN 0167-6806.

**ANEXO**

Manuscrito submetido à revista *Experimental and Therapeutic Medicine*

*Print ISSN: 1792-0981*

*Online ISSN: 1792-1015*

*2014 Impact Factor: 1.269*

**Moderate synergism between genistein and doxorubicin in MDA-MB-231 preserves cell viability in G2/M phase, but defeats CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> population**

FERNANDA PAULA DE CARVALHO<sup>1</sup>, WILLIAN ABRAHAM DA SILVEIRA<sup>2</sup>,  
RENATA DANIELLE SICCHIERI<sup>3</sup>, DANIEL GUIMARÃES TIEZZI<sup>2\*</sup> and HOUTAN  
NOUSHMEHR<sup>1\*</sup>

1 Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14049-900, Ribeirão Preto - SP, Brasil;

2 Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14049-900, Ribeirão Preto - SP, Brasil;

3 Departamento de Cirurgia e Anatomia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14049-900, Ribeirão Preto - SP, Brasil;

\* Contributed equally

*Correspondence to:*

M.Sc. Fernanda Paula de Carvalho, Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, 14049-900, Ribeirão Preto – SP, Brasil.

E-mail: fe.carvalho@usp.br

*Key words:* genistein, cancer stem cell, breast cancer, triple-negative, claudin-low, apoptosis, drug combination, synergy, doxorubicin, radiation

CARVALHO et al: GENISTEIN AND DOXORUBICIN COMBINATION DEFEATS CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> CELLS IN MDA-MB-231

**Abstract.** Conventional chemo- and radiotherapy acts both reducing tumor cells before the surgery, as eliminating remaining cancer cells after the surgery. However, in both cases cytogenotoxic therapy selects resistant cancer stem cells (CSCs), resulting in tumor relapse. The investigation of CSCs status after *in vitro* exposure to cytogenotoxic agents combined with a tyrosine kinase inhibitor may help to understand cancer resistance scenery. Low doses of the tyrosine kinase inhibitor genistein (GEN) cause G2/M arrest and reduce MDA-MB-231 viability and proliferation. Thus, this study aimed to investigate synergic effects of low doses of GEN in combination with radiation (RAD) and doxorubicin (DXR), using pre and post-treatment regimens in breast cancer cell line *claudin-low* MDA-MB-231. We correlated cell viability, coefficient of drug interaction, cell cycle, late apoptosis and amount of CSCs (CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>). Synergic treatments had CSCs and non-CSCs sorted in order to analyze pro-apoptotic gene expression. We found that all GEN low doses showed antagonism in combination with 10 Gy RAD (p <0.01). In contrast, one GEN low dose combined with DXR achieved modest synergism (p <0.01). GEN 5 µM pretreatment followed by DXR 1 ng/ml reduced CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> population, likely up-regulating pro-apoptotic genes in CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> cells (result statistically non- significant), but did not disturb MDA-MB-231 cell viability. Thus, we conclude that some combined treatments using low doses of DXR and GEN in pre and post-treatment schemes can trigger apoptosis and reduce MDA-MB-231 viability. However, decrease in cell viability appears to induce survival signaling mechanisms in CSCs, including apoptosis suppression. These findings suggest that only GEN combinations that induce G2/M arrest, but do not alter cell viability, are able to target CSCs in MDA-MB-231.

In practice, these results can help understanding how to sensitize resistant CSCs before boost antitumor attack, and contribute to develop new anticancer strategies.

## Introduction

Cancer stem cells (CSCs), characterized by CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> phenotype, have high capacity for self-renewal and differentiation, leading to production of all cell types found within the tumor (1). In addition, CSCs exhibit gene expression profile strongly associated with poorly differentiated tumors such as *claudin-low* breast cancer (2, 3). CSCs maintenance involves mechanisms regulated by specific pathways with active participation of several tyrosine kinases (4-7).

It is known that CSCs have up-regulated DNA repair mechanisms and protection against oxidative stress, which makes them highly radio-resistant (8). In addition, CSCs are quiescent cells and have low proliferation rate, making them refractory to chemotherapeutic agents that act on cell cycle block (9). Li and colleagues (10) observed that core-biopsy samples obtained from patients treated with neoadjuvant chemotherapy using doxorubicin (DXR) showed a significant increase in CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> percentage associated with treatment. Furthermore, antiapoptotic mechanisms related to cell cycle regulators in CSCs may also be critical to the chemo/radioresistance (11). Harper *et al.* (12) reported that CSCs stay longer in the G2 phase after exposure to different chemotherapeutic agents and radiation, and concluded that the checkpoint in G2 may be the responsible for processes that prevent apoptosis.

Genistein (GEN - 4',5,7-trihydroxyisoflavone - C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>), is a non-steroidal natural compound structurally similar to 17β-estradiol hormone. GEN can interact with estrogen receptors (ERα and ERβ) exercising agonistic or antagonistic effects (13). GEN also exerts inhibition on a wide variety of protein kinases (14) and histidine kinase (15). In general, GEN acts as a competitive inhibitor of adenosine triphosphate (ATP) in kinase phosphorylation reaction, however, does not compete with the protein substrate. Thus, its broad spectrum inhibition of tyrosine kinases is probably attributed to ATP binding domain be highly conserved (16, 17). Recently, Fang *et al.* (18) conducted a phosphoproteomic study using MDA-MB-231 cells and indicated that 40 μM of GEN exerts antitumor effects by modulating 332 phosphorylation sites in 226 proteins involved in several biological processes such as cell cycle, DNA replication, cell division and response to DNA damage. Other studies also indicate that GEN inhibits cell growth via miRNAs regulation (19, 20) and epigenetic modulation (21, 22).

The impact that G2/M checkpoint may produce on CSCs needs to be better understood, since the G2/M arrest signals extremely powerful survival pathways in CSCs (11). In this context, inhibition of tyrosine kinases using low doses of GEN represents a useful tool, especially when combined with cytogenotoxic agents which also enable checkpoints and lead to apoptosis. Thus, this study aimed to observe whether *in vitro* exposures using low doses of GEN combined with DXR and RAD in pre and post-treatments schemes are able to induce pro-apoptotic effects in CSCs and non-CSCs populations in MDA-MB-231. Furthermore, we investigated whether the amount of CSCs (CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>) is associated with variations in cell viability, apoptosis and cell cycle in MDA-MB-231 cultures after treatment. This study also analyzed luminal breast cancer MCF-7 cell viability.

## Materials and methods

*Cell culture.* MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines were purchased from Rio de Janeiro Cell Bank (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). MDA-MB-231 were cultured in Lebovitz medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), whereas MCF-7 were cultured in DMEM F12 (Thermo Fisher

Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). Both medium cultures were supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Thermo Fisher Scientific, origin: South America) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Cells were cultured in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Exponential growing cells were used in the subsequent experiments.

*Compounds and treatments.* GEN (1 µM, 2.5 µM and 5 µM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), DXR (1 ng/ml, 2 ng/ml and 5 ng/ml; Glenmark Pharmaceutical, São Paulo, SP, Brazil) and vehicle control dimethylsulfoxide (0.1% DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were tested for 24 h and 48 h. In addition, 5 Gy and 10 Gy of RAD were applied respectively in MCF-7 and MDA-MB-231. Cells were irradiated using the RS 2000 x-ray biological irradiator (RadSource Tech, Boca Raton, FL, USA), and the assays were performed 24 h after irradiation. GEN was administered in combination with RAD and DXR using pre-treatment (GEN 24 h + DXR 24 h and GEN 24 h + RAD 24 h) and post-treatment (DXR 24 h + GEN 24 h and RAD 24 h + GEN 24 h) schemes. Before each treatment, cells were washed with PBS.

*Cell Viability.* Cytotoxicity was measure by MTT assay (23). Cells lines were plated into 96-well plates at a density of  $2 \times 10^4$  cell/well and incubated at 37°C for 24 h. Subsequent to treatments, cells were incubated with 20 µl MTT (5 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 37°C for 4 h. Medium was removed and was added 100 µl solubilizing solution (10% Triton X-100, 50% isopropyl alcohol, 0.5% HCl, 35.5% water), leaving overnight in a humidified incubator. Colorimetric reading was performed on SpectraMax 190 Microplate Absorbance Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) at λ570 nm. Absorbance is directly proportional to the number of viable cells in each treatment. Cell viability was expressed as a percentage of the absorbance relative to the control group. We considered optimal doses treatments that caused at least 60% viability.

*In vitro antagonism.* The coefficient of drug interaction (CDI) was used to analyze the antagonist effect of GEN, DXR and RAD combinations (24-26). CDI is calculated as follows:  $CDI = AB/(A \times B)$ . AB is the viability ratio of the combination group relative to the control group; A or B is the viability ratio of the single treatment group relative to the control group. Thus, CDI value less than, equal to or greater than 1 indicates that the elements are synergistic, additive or antagonistic, respectively. CDI less than 0.7 indicates that the treatments are significantly synergistic.

*Cell cycle distribution and late apoptosis.* The distribution of cell cycle phases was estimated analyzing the DNA content by flow cytometry (27). Cells were plated in 12 well plates at a density of  $4 \times 10^4$  cell/well and incubated at 37°C for 24 h. At the end of each treatment, cells were fixed with ethanol 70% and stained with 45 µl of PBS, 5 µl of RNase A and 50 µl of propidium iodide (2 mg/ml RNase A, 100 g/ml PI and 0.1% Triton-X-100; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells were read on flow cytometer FACS Canto II (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). At least  $10^5$  cells were counted. The fraction of cells in the sub-G1, G0/G1, S, and G2/M-phases was performed using ModFit LT 3.3.11 software (Verity Software House, Topsham, ME, USA).

*Immunophenotyping and cell sorting.* CSCs populations were detected by CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> phenotype.  $4 \times 10^6$  cells were plated in culture dishes and incubated at 37°C for 24 h. Subsequent to treatments, cells were incubated with mouse anti-human monoclonal antibodies (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) CD44 (APC; cat#559942) and CD24 (PE; cat#555428). In the calibration were used the corresponding mouse isotypes controls IgG1-

APC and IgG1-PE (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Treatments that show synergism, CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> and non- CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> populations were sorted using the equipment FACS Aria (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Were acquired 2 x 10<sup>5</sup> cells of each sub-population with purity >95%. Data analysis was performed using the software FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, USA).

*Pro-apoptotic gene expression levels.* Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions, and quantified using NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Reverse transcriptase-polymerase chain reaction for cDNA synthesis used 500 ng of total RNA in 20 µl final volume reaction using High Capacity cDNA Reverse Transcription with RNase inhibitor kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reaction conditions were 25°C for 10 min, 37°C for 2 h, 85°C for 5 min and 4°C for ∞, performed in thermal cycler GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). cDNA was used as a template for quantitative real time-polymerase chain reaction in 10 µl final volume reaction using Taqman Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) in a 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reaction conditions were 50°C for 20 sec and 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. mRNA quantification of 15 gene targets used specific primers already inventoried purchased as TaqMan Array 96-well Fast Plate (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA): *AIFM1* (cat#Hs00377585\_m1), *AKT1* (cat#Hs00178289\_m1), *APAF1* (cat#Hs00559441\_m1), *BAD* (cat#Hs00188930\_m1), *BAX* (cat#Hs00180269\_m1), *CASP3* (cat#Hs00234387\_m1), *CASP7* (cat#Hs00169152\_m1), *CASP8* (cat#Hs01018151\_m1), *CASP9* (cat#Hs00154260\_m1), *CFLAR* (cat#Hs01116280\_m1), *CYCS* (cat#Hs01588973\_m1), *FADD* (cat#Hs00538709\_m1), *FAS* (cat#Hs00531110\_m1), *FASLG* (cat#Hs00181225\_m1) and *TP53* (cat#Hs01034249\_m1). The 18S ribosomal (cat#Hs99999901\_s1) expression was used as the endogenous RNA control, where each sample was normalized according to 18S amount. Relative expression of each gene was calculated based on the relative quantification method (28) using the equation: Relative Quantification =  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .

*Statistical analysis.* The experiments were performed in triplicate. Results are presented as mean ± standard deviation. Gene expression is presented as mean ± standard error. Analysis was performed with Student's t test or with one-way ANOVA followed by Dunnett and Tukey tests. Correlation analysis used Pearson's correlation. *P* value <0.05 was considered a statistically significant difference.

## Results

*Effect of single and combined treatments using GEN, DXR and RAD on cell viability in MDA-MB-231 and MCF-7.* Compared with non- treated control group, MDA-MB-231 viability after single treatment with GEN 1 µM for 24 h was 18.13% lower. Likewise, single treatment with 10 Gy and post-treatment DXR 1 ng/mL + GEN 5 µM reduced MDA-MB-231 viability in 21.61 and 18.18%, respectively. However, MDA-MB-231 viability were about 17% higher after single treatments with 1 – 5 ng/ml of DXR for 24 h. Compared with non- treated control group MCF-7, single and combined treatments with DXR did not cause reduction in cell viability, except in post-treatment DXR 1 ng/ml + GEN 5 µM, which induced 35% cell death. In addition, single and combined treatments with RAD induced about 15% cell death in MCF-7. In general, single treatments with GEN provoked significant increase in MCF-7 viability (Figure 1 A and B).

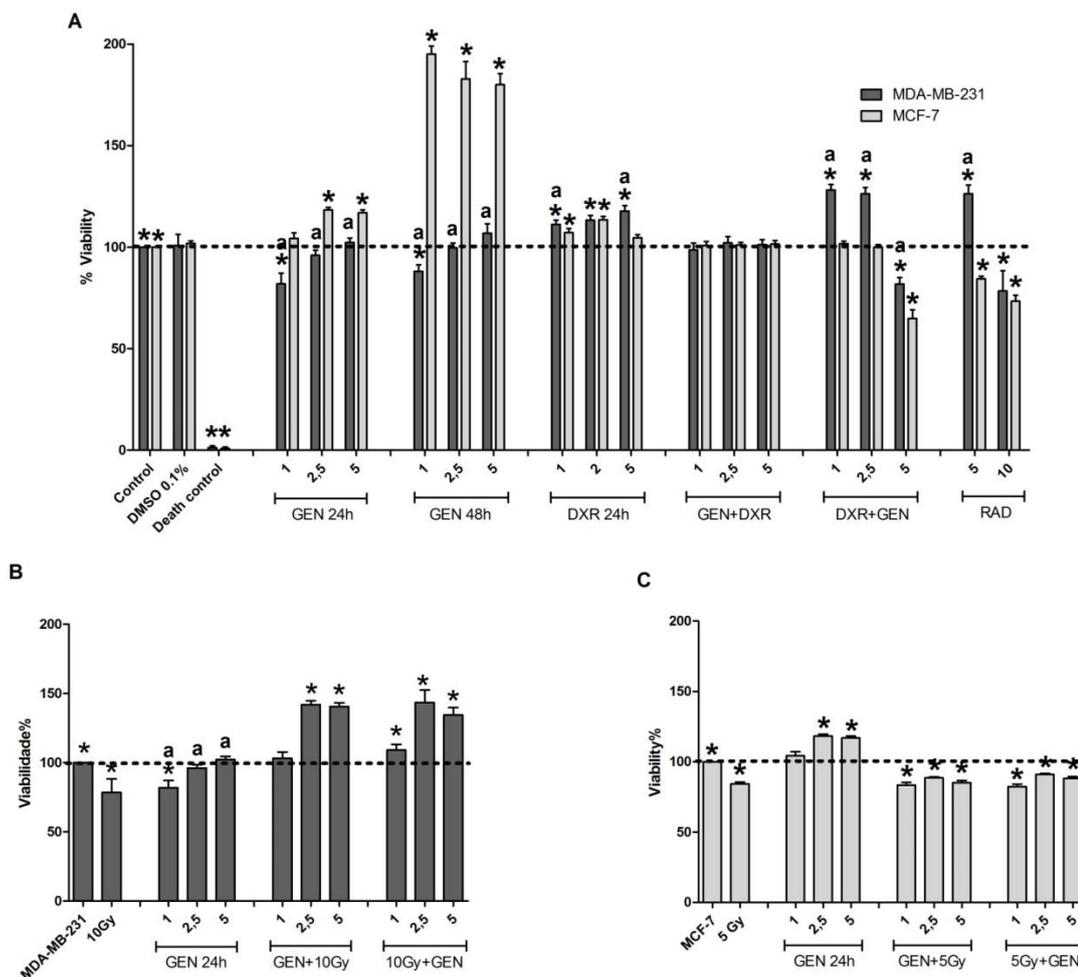


Figure 1. Effect of single and combined treatments using GEN, DXR and RAD on cell viability in MDA-MB-231 (A and B) and MCF-7 (A and C). Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation. DXR: 1 ng/ml doxorubicin. GEN: 1  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M and 5  $\mu$ M genistein. \*:  $p < 0.05$  vs control. a:  $p < 0.05$  vs MCF-7.

*Synergism between GEN, DXR and RAD in MDA-MB-231 and MCF-7.* In MDA-MB-231, GEN 5  $\mu$ M combined with DXR exerted moderate synergistic effects in both pre and post-treatment. On the other hand, all combinations between GEN and 10 Gy RAD showed antagonistic interactions. In MCF-7, all GEN combinations with RAD and DXR showed synergistic effects (Figure 2).

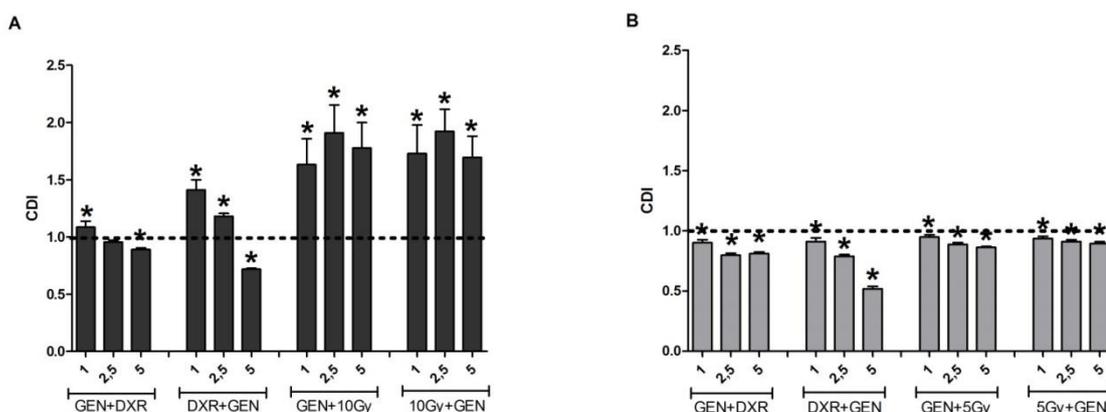


Figure 2: Synergism between GEN, DXR and RAD in MDA-MB-231 (A) and MCF-7 (B).

Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation. CDI: coefficient of drug interaction. DXR: 1 ng/ml doxorubicin. GEN: 1  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M and 5  $\mu$ M genistein. \*:  $p < 0.05$  vs control.

*Effect of single and combined treatments using GEN, DXR and RAD on late apoptosis in MDA-MB-231.* GEN 1  $\mu$ M for 24 hours induced 13.1% apoptotic cells in comparison with non-treated control group MDA-MB-231. In addition, both GEN 1  $\mu$ M and 5  $\mu$ M in pre and post-treatments with DXR induced about 10% apoptotic cells. In general, treatments combined with RAD provoked higher apoptosis rate, except in pretreatments with GEN 1  $\mu$ M and 5  $\mu$ M (Figure 3).

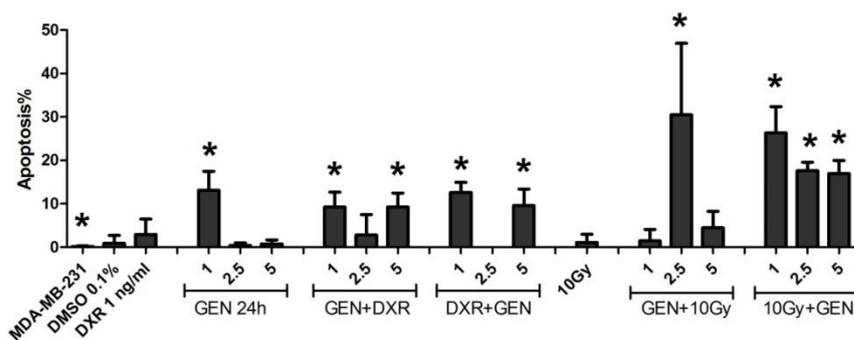


Figure 3: Effect of single and combined treatments using GEN, DXR and RAD on late apoptosis in MDA-MB-231. Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation. DXR: 1 ng/ml doxorubicin. GEN: 1  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M and 5  $\mu$ M genistein. \*:  $p < 0.05$  vs control.

*Effect of single and combined treatments using GEN, DXR and RAD on cell cycle in MDA-MB-231.* Comparing G0/G1 phase to control in MDA-MB-231, only the irradiated treatments showed significant variations. Single treatment with 10 Gy RAD, and combinations GEN 1  $\mu$ M + 10 Gy and GEN 5  $\mu$ M + 10 Gy caused 39.8, 36.38 and 36.4% reduction in G0/G1, respectively. However, G0/G1 phase after GEN 2.5  $\mu$ M + 10 Gy treatment was 33.88% higher than control. Moreover, several treatments induced significant reduction in S phase compared to control, especially irradiated pretreatments. Comparing G2/M phase to control, in general, treatments induced significant increase (Figure 4).

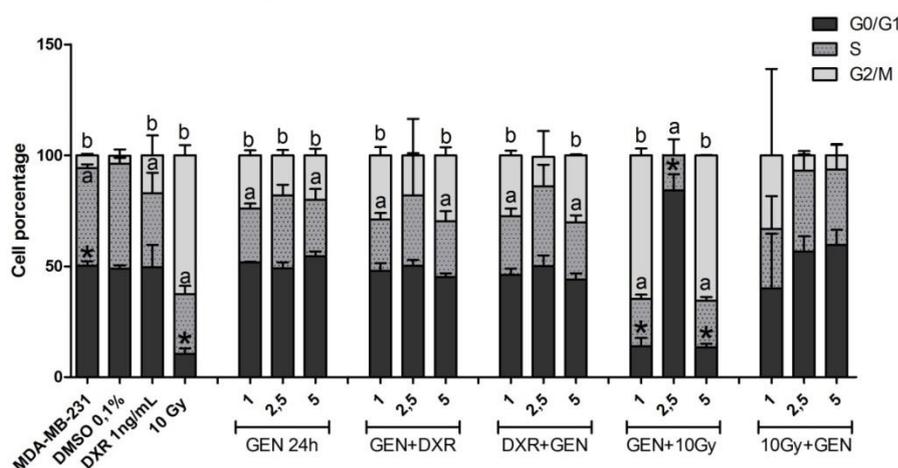


Figure 4: Effect of single and combined treatments using GEN, DXR and RAD on cell cycle in MDA-MB-231. Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation. DXR: 1 ng/ml doxorubicin. GEN: 1  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M and 5  $\mu$ M genistein. \*:  $p < 0.05$  G0/G1 phase vs. control. a :  $p < 0.05$  S phase vs. control. b :  $p < 0.05$  G2/M phase vs. control.

Effect of single and combined treatments using GEN and DXR on CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> population in MCF-7 and MDA-MB-231. MCF-7 showed CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> population less than 1% in treated and untreated cultures. In MDA-MB-231, no statistical differences were observed in single treatments compared with control. On the other hand, pretreatment GEN 5  $\mu$ M + DXR 1 ng/ml and post-treatment DXR 1 ng/ml + GEN 1  $\mu$ M reduced 15.36 and 18.2% CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> population, respectively.

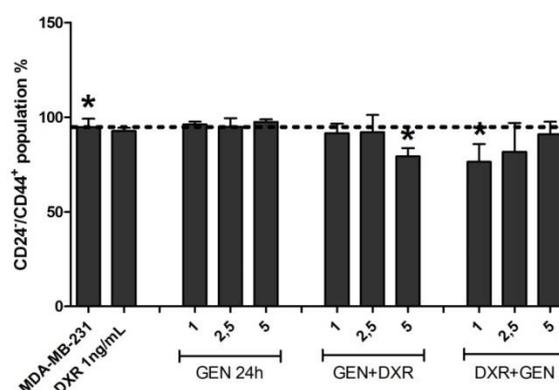


Figure 5: Effect of single and combined treatments using GEN and DXR on CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> population in MCF-7 and MDA-MB-231.

Correlation matrix using data from DXR 24 h + GEN 24 h post-treatment in MDA-MB-231. DXR 24 h + GEN 24 h post-treatments showed significant correlation between GEN dose and CSCs, that is, when GEN dose increases, there is also an expansion in CSCs population (Table I). Furthermore, there were inversely proportional correlations between GEN dose and CDI, and between CDI and CSCs population. In other words, when GEN dose increases, there is a synergy gain. In addition, when synergy increases, there is an expansion in CSCs population (Table I).

Table I. Correlation matrix using data from DXR 24 h + GEN 24 h post-treatments in MDA-MB-231.

	DXR 24 h + GEN 24 h							
	GEN dose	Viability	CDI	Apoptosis	CSCs	G0/G1	S	G2/M
GEN dose	-	-	-	-	-	-	-	-
Viability	-0,941	-	-	-	-	-	-	-
CDI	-0,998*	0,956	-	-	-	-	-	-
Apoptosis	-0,085	-0,255	0,036	-	-	-	-	-
CSCs	0,999*	-0,947	-0,999*	-0,066	-	-	-	-
G0/G1	-0,452	0,726	0,495	-0,850	-0,469	-	-	-
S	-0,192	0,512	0,240	-0,961	-0,211	0,962	-	-
G2/M	0,292	-0,597	-0,338	0,927	0,310	-0,985	-0,994	-

Results are presented as Pearson's correlation coefficient. DXR: 1 ng/ml doxorubicin. GEN: 1  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M and 5  $\mu$ M genistein. CDI: coefficient of drug interaction. CSCs: cancer stem cells. \*p < 0.05.

*Effect of combined treatments using GEN and DXR on pro-apoptotic gene expression in CSCs and non- CSCs in MDA-MB-231.* Synergic treatments GEN 5  $\mu$ M + DXR 1 ng/ml and DXR 1 ng/ml + GEN 5  $\mu$ M were choose to sorting CSCs and non-CSCs populations, followed by molecular analysis. Single treatment GEN 1  $\mu$ M for 24 h were also evaluated. In non-CSCs population, pro-apoptotic gene expression after treatments was down-regulated in comparison to the control. Similarly, in CSCs population, gene expression levels associated to treatments GEN 1  $\mu$ M and DXR 1 ng/ml + GEN 5  $\mu$ M also seemed down-regulated, but the results were not statistically significant. In contrast, GEN 5  $\mu$ M + DXR 1 ng/ml treatment overexpressed apoptotic genes, but the results also were not statistically significant, exception *CASP9*, that showed significant suppression compared to control (Figure 5 A and B).

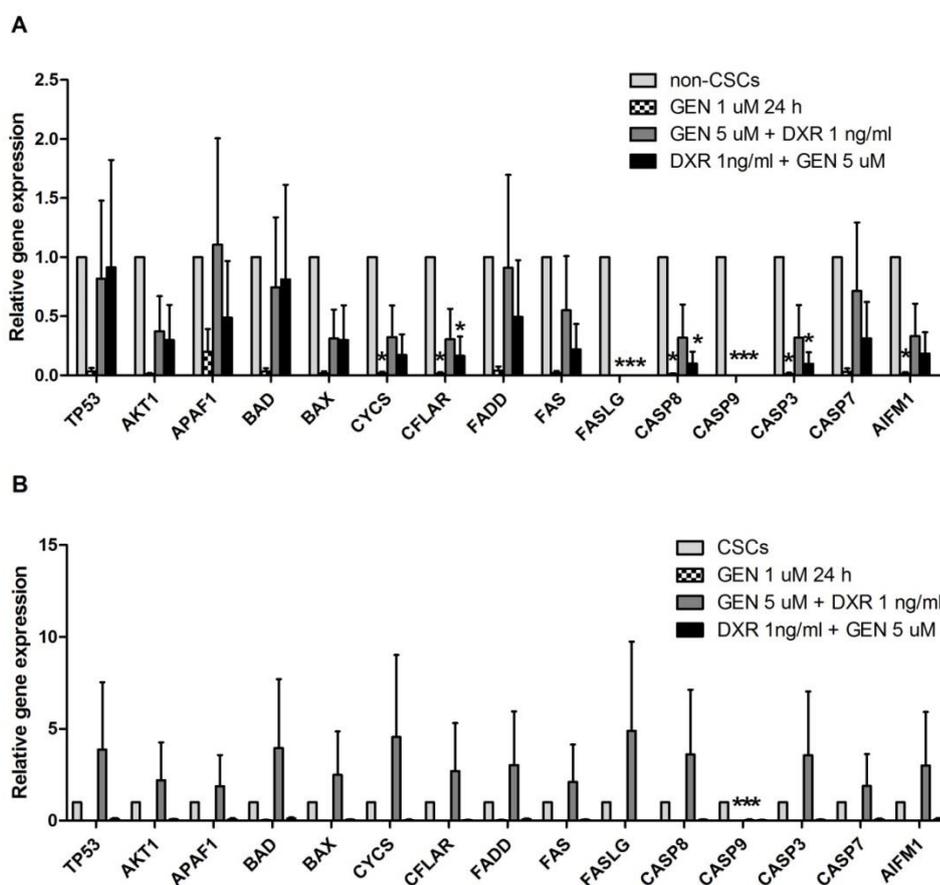


Figure 5: Effect of combined treatments using GEN and DXR on pro-apoptotic gene expression in CSCs (A) and non- CSCs (B) in MDA-MB-231. CSCs: cancer stem cells. GEN: genistein. DXR: doxorubicin.

## Discussion

The hypothesis that *in vitro* exposures with low doses of GEN combined with DXR are able to induce pro-apoptotic effects in CSCs and non-CSCs populations in MDA-MB-231 were confirmed in the present study. In pre and post treatment schemes, low doses of GEN reach synergy in combination with an extremely low dose of DXR. However, treatments that lead to the effective the reduction of cell viability concomitantly causes suppression in apoptotic pathways in CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> cells. Accordingly, only treatments that induce cell

arrest, but without causing decrease in viability, are able to affect CSCs population in MDA-MB-231 line.

Thus, at a dose of GEN 5  $\mu\text{M}$  + DXR 1 ng/ml is observed an increase in the G2/M phase followed by induction in apoptosis and reduction in CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> population. Furthermore, the treatment GEN 5  $\mu\text{M}$  + DXR 1 ng/ml induces the expression of apoptotic genes. Expression in CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> cells is higher than in non-CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>. However, *CASP9* expression is significantly suppressed, suggesting that apoptosis in this case seems to occur mainly through caspase 8 and caspase 3. Thus, these results indicate that blockade in G2/M phase caused by exposure to GEN 5  $\mu\text{M}$  is capable of sensitizing CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> in MDA-MB-231 cells to subsequent treatment with the mutagen DXR 1 ng/ml. These results partially corroborate Lim et al. (29), who treated MCF-7 and MDA-MB-231 cells with 25  $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$  doses of GEN for 24 h, followed by DXR treatment with doses of 1-100 ng/ml for 48h. It was observed that the GEN made MDA-MB-231 cells more sensitive to DXR, possibly for overexpression of GRP78, however, the GEN had no effect on the MCF-7.

Concerning the post-treatment (DXR + GEN), in both strains, the reduction of CDI, or the synergy increase, it is also linked to GEN concentration. In MDA-MB-231, the post-treatment DXR 1ng/ml + GEN 5  $\mu\text{M}$  causes drastic reduction in viability, with an increase in apoptosis and blocking G2/M phase. Similarly, in MCF-7, the post-treatment DXR 1 ng/ml + GEN 5  $\mu\text{M}$  also causes a drastic reduction in viability, increased apoptosis and blockade at G0/G1 phase. There are no published studies evaluating the effects of pre-treatment and post-treatment using GEN and DXR with the conditions of our study. Wang et al. (30) showed that DXR in small concentrations can lead cells to the G2/M phase, making them more susceptible to secondary treatments. However, Vijayaraghavalu et al. (31) tested DXR 1 ng/ml in MCF-7 for 48-72 hours and observed no increase in the G2/M phase. In addition, GEN can also inhibit topoisomerase II, blocking DNA repair processes that usually are required to fix damages caused by DXR (32).

Treatment with DXR 1 ng/ml, 2 ng/ml and 5 ng/ml shows significant increase in cell viability of MDA-MB-231 and MCF-7. In MDA-MB-231, there is an increase in phase G2/M. Already in MCF-7, there is an increase in S phase, followed by an increase in apoptosis rate also. In addition, the dose of DXR 1 ng/ml also produced no change on the CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> population in MDA-MB-231. Previous studies have shown that the minimum DXR dose that induces 50% cell death (IC50) in MCF-7 and MDA-MB-231 is around 20-50 ng/ml for 48h, respectively (33, 34). Thus, the concentrations used in this study (approximately 10 fold below the IC50) certainly not exert inhibitory effects. However, as a mutagenic drug, DXR may possibly cause sublethal damage signaling response to DNA damage and stimulate cell survival routes. Regarding the DXR effects on CSCs, Tudoran et al. (35) found that MDA-MB-231 cells treated with DXR in the dose IC50 for 24h become resistant and did not showed inhibition in proliferation rates, aggregation and mammospheres formation.

In irradiated pre- and post-treatments in MDA-MB-231, all low doses of GEN studied shows antagonistic effect in combination with 10 Gy RAD, resulting in increased cell viability. Thus, the use of irradiation in combination with GEN appears to be not advantageous in MDA-MB-231 cells. Liu et al. (36) irradiated MCF-7 and MDA-MB-231 cells with 4 Gy RAD in presence and absence of GEN 5-20  $\mu\text{M}$ , in other words, researchers maintained GEN exposition to during RAD application (co- treatment). They observed potent antitumor effect, in which cells pretreated with GEN showed more DNA damage and blocking the G2/M phase cells than cells that were irradiated only.

In general, it is known that treatments using mutagens such as DXR and RAD activates a complex network of cellular reactions which together can be called "DNA Damage

Responses" which control various functions such as cell proliferation, DNA repair and death by apoptosis and necrosis. These reactions are interconnected by cellular signaling networks that interact at different molecular levels and feedback communication (37). Consequently, the evaluation of the effectiveness of a therapy combination requires a detailed understanding of the "DNA Damage Responses" and also on the processing of several other molecular responses. Moreover, it is important to consider how this processing can be modified by genetic changes usually found in the tumor, and how specific signaling networks may be activated by drugs to direct cell death (38, 39).

### **Acknowledgements:**

The present study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Authors thank Prof. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli and Prof. Carlos Gilberto Carlotti Jr. (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto) for the laboratorial support, PhD. Bárbara Santana (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto) for the support during cell irradiation, Fabiana Rossetto de Moraes (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto) and Denise Brufato Ferraz (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto) for the support in flow cytometry analysis.

Authors declare not have any conflict of interest.

### **References**

1. Pardal R, Clarke MF and Morrison SJ: Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature Reviews Cancer* 3: 895-902, 2003.
2. Hennessy BT, Gonzalez-Angulo A-M, Stemke-Hale K, et al.: Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer research* 69: 4116-4124, 2009.
3. Creighton CJ, Li X, Landis M, et al.: Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 13820-13825, 2009.
4. Hochgräfe F, Zhang L, O'Toole SA, et al.: Tyrosine phosphorylation profiling reveals the signaling network characteristics of Basal breast cancer cells. *Cancer research* 70: 9391-9401, 2010.
5. Hinohara K, Kobayashi S, Kanauchi H, et al.: ErbB receptor tyrosine kinase/NF- $\kappa$ B signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 6584-6589, 2012.
6. Dittmer A, Fuchs A, Oerlecke I, et al.: Mesenchymal stem cells and carcinoma-associated fibroblasts sensitize breast cancer cells in 3D cultures to kinase inhibitors. *International journal of oncology* 39: 689-696, 2011.
7. Tryfonopoulos D, Walsh S, Collins D, et al.: Src: a potential target for the treatment of triple-negative breast cancer. *Annals of oncology* 22: 2234-2240, 2011.
8. Skvortsova I, Debbage P, Kumar V and Skvortsov S: Radiation resistance: Cancer stem cells (CSCs) and their enigmatic pro-survival signaling. In: *Seminars in cancer biology* Elsevier, pp 39-44, 2015.
9. Blagosklonny M: Target for cancer therapy: proliferating cells or stem cells. *Leukemia* 20: 385-391, 2005.
10. Li X, Lewis MT, Huang J, et al.: Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *Journal of the National Cancer Institute* 100: 672-679, 2008.
11. Chappell J and Dalton S: Altered cell cycle regulation helps stem-like carcinoma cells resist apoptosis. *BMC biology* 8: 63, 2010.

12. Harper LJ, Costea DE, Gammon L, Fazil B, Biddle A and Mackenzie IC: Normal and malignant epithelial cells with stem-like properties have an extended G2 cell cycle phase that is associated with apoptotic resistance. *BMC cancer* 10: 166, 2010.
13. Miodini P, Fioravanti L, Di Fronzo G and Cappelletti V: The two phyto-oestrogens genistein and quercetin exert different effects on oestrogen receptor function. *British journal of cancer* 80: 1150, 1999.
14. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, et al.: Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* 262: 5592-5595, 1987.
15. Huang J, Nasr M, Kim Y and Matthews HR: Genistein inhibits protein histidine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 267: 15511-15515, 1992.
16. Ullrich A and Schlessinger J: Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61: 203-212, 1990.
17. Levitzki A and Gazit A: Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 267: 1782-1788, 1995.
18. Fang Y, Zhang Q, Wang X, et al.: Quantitative phosphoproteomics reveals genistein as a modulator of cell cycle and DNA damage response pathways in triple-negative breast cancer cells. *International journal of oncology* 48: 1016-1028, 2016.
19. Srivastava SK, Arora S, Averett C, Singh S and Singh AP: Modulation of microRNAs by phytochemicals in cancer: underlying mechanisms and translational significance. *BioMed research international* 2015, 2015.
20. Vira D, Basak SK, Veena MS, Wang MB, Batra RK and Srivatsan ES: Cancer stem cells, microRNAs, and therapeutic strategies including natural products. *Cancer and Metastasis Reviews* 31: 733-751, 2012.
21. Li Y and Sarkar FH: Targeting Epigenetically Deregulated miRNA by Nutraceuticals: Focusing on Cancer Prevention and Treatment. *Current Pharmacology Reports* 1: 1-10, 2015.
22. Aggarwal R, Jha M, Shrivastava A and Jha AK: Natural compounds: Role in reversal of epigenetic changes. *Biochemistry (Moscow)* 80: 972-989, 2015.
23. Edmondson JM, Armstrong LS and Martinez AO: A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures. *Journal of tissue culture methods* 11: 15-17, 1988.
24. Sun M, Zhang N, Wang X, et al.: Nitidine chloride induces apoptosis, cell cycle arrest, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin in breast cancer cells. *Tumor Biology* 35: 10201-10212, 2014.
25. Wong FC, Woo CC, Hsu A and Tan BKH: The anti-cancer activities of *Vernonia amygdalina* extract in human breast cancer cell lines are mediated through caspase-dependent and p53-independent pathways. 2013.
26. Chou T-C: Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer research* 70: 440-446, 2010.
27. Ormerod MG: Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. *Journal of immunological methods* 265: 73-80, 2002.
28. Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods* 25: 402-408, 2001.
29. Lim HA, Kim JH, Kim JH, et al.: Genistein induces glucose-regulated protein 78 in mammary tumor cells. *Journal of medicinal food* 9: 28-32, 2006.
30. Wang YA, Johnson SK, Brown BL, et al.: Enhanced anti-cancer effect of a phosphatidylinositol-3 kinase inhibitor and doxorubicin on human breast epithelial cell lines with different p53 and oestrogen receptor status. *International Journal of Cancer* 123: 1536-1544, 2008.
31. Vijayaraghavalu S, Dermawan JK, Cheriya V and Labhasetwar V: Highly synergistic effect of sequential treatment with epigenetic and anticancer drugs to overcome

- drug resistance in breast cancer cells is mediated via activation of p21 gene expression leading to G2/M cycle arrest. *Molecular pharmaceutics* 10: 337-352, 2012.
32. Chen AY and Liu LF: DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annual review of pharmacology and toxicology* 34: 191-218, 1994.
33. Sharma R, Welch A, Schweiger L, Craib S and Smith T: MCF-7 Breast Tumour Cells In Vitro Is Modulated by Treatment with Tamoxifen, Doxorubicin, and Docetaxel: Relationship to Chemotherapy-Induced Changes in ATP Content, Hexokinase Activity, and Glucose Transport. 2011.
34. Li Y, Ahmed F, Ali S, Philip PA, Kucuk O and Sarkar FH: Inactivation of nuclear factor  $\kappa$ B by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Cancer research* 65: 6934, 2005.
35. Tudoran O, Soritau O, Balacescu L, et al.: Regulation of stem cells-related signaling pathways in response to doxorubicin treatment in Hs578T triple-negative breast cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry* 409: 163-176, 2015.
36. Liu X, Sun C, Jin X, et al.: Genistein Enhances the Radiosensitivity of Breast Cancer Cells via G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Molecules* 18: 13200-13217, 2013.
37. Harper JW and Elledge SJ: The DNA damage response: ten years after. *Molecular cell* 28: 739-745, 2007.
38. Sachs K, Perez O, Pe'er D, Lauffenburger DA and Nolan GP: Causal protein-signaling networks derived from multiparameter single-cell data. *Science* 308: 523-529, 2005.
39. Lee MJ, Ye AS, Gardino AK, et al.: Sequential application of anticancer drugs enhances cell death by rewiring apoptotic signaling networks. *Cell* 149: 780-794, 2012.