

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do efeito do extrato de soja (*Glycine max*)
biotransformado pelo fungo *Aspergillus awamori* em cultura de
células de câncer de mama estrógeno-dependente e independente.**

Helen Figueiredo Fumagalli

Ribeirão Preto
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do efeito do extrato de soja (*Glycine max*)
biotransformado pelo fungo *Aspergillus awamori* em cultura de
células de câncer de mama estrógeno-dependente e independente.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientada: Helen Figueiredo Fumagalli

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Regina Torqueti

Ribeirão Preto

2011

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.

Fumagalli, Helen Figueiredo

Avaliação do efeito do extrato de soja (*Glycine max*) biotransformado pelo fungo *Aspergillus awamori* em cultura de células de câncer de mama estrógeno-dependente e independente. Ribeirão Preto, 2011.

p. 91:il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Torqueti, Maria Regina

1. Menopausa. 2. Fitoestrógenos. 3. Soja. 4. Terapia de Reposição Hormonal. 5. Câncer de mama.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Helen Figueiredo Fumagalli

Título: Avaliação do efeito do extrato de soja (*Glycine max*) biotransformado pelo fungo *Aspergillus awamori* em cultura de células de câncer de mama estrógeno-dependente e independente.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Regina Torqueti

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho...

À minha filha, Isabela

Por saber compreender as minhas ausências, me amar, apoiar e ser a minha fonte de vida. Ser sua mãe é consumir o amor único, eterno e incondicional por alguém. Eu sempre te amarei.

Ao meu marido, Marcos

Por ser, antes de tudo, um grande amigo e companheiro. Por sempre estar comigo nos momentos felizes e tristes. Por saber me amar quando achei que não havia vida, por saber fazer o mundo parar quando precisei de silêncio e por saber me apoiar quando achei que fosse tombar. Eu te amo.

Aos meus pais, Cristina e Angelo

Por me darem a vida. Por se dedicarem na minha formação, me ensinarem bons princípios e por sempre torcerem e me incentivarem a fazer o que me realizava. Não sei o que seria de mim, ou deste trabalho, se não tivesse tido o apoio de vocês. Vocês são insubstituíveis! Amo vocês.

Ao meu irmão, Marcel

Por saber, dentro de sua quietude, olhar e acreditar em mim. Por ter sido meu amigo e companheiro de tantas aventuras durante todos os anos de minha existência.

Aos meus avós, tios, tias, primas e primos

Por tornarem meus dias mais alegres, por compartilharem conquistas e pela torcida: “oooolllaaaa... ôôôô”. Obrigada.

Agradecimentos

À orientadora Prof^a. Dr^a Maria Regina Torqueti

Obrigada pela orientação, pelo ensinar a construir ciência. Obrigada pelas oportunidades, por ter me recebido em seu laboratório e por toda a compreensão.

Às colegas do laboratório de Citologia Clínica da FCFRP/USP: Bianca Stocco, Amanda N. Faria, Mírian M. Salvador e Camila M. Andrade.

Obrigada por me ajudarem sempre que puderam, por me ensinarem o que sabiam e pelos bons momentos que passamos juntas. Nunca me esquecerei de vocês!

Ao Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Seus ensinamentos, apoios e sábios conselhos sempre estarão comigo. Obrigada por permitir o uso de suas instalações sem nunca exigir nada em troca.

À Karina Toledo

Amiga e conselheira. Obrigada por estar sempre presente, dividindo sabedoria e espalhando alegria por onde passava.

Aos colegas de pós-graduação: Camilo D. C. Andrade, Nathalia S. Koyama, Lílian C. Rodrigues, Thalita B. Riul, Willian A. da Silveira, Amanda Trabuco, Jennifer Yokoya...

Todos vocês foram muito importantes para que tornasse esse trabalho concreto. Muito obrigada pela parceria, pela compreensão e pela amizade. Levarei a lembrança de vocês para toda a eternidade.

À Prof^a Dr^a Maria José Vieira Fonseca

Pela oportunidade de aprender parte do trabalho desenvolvido em seu laboratório e fornecimento dos extratos usados neste trabalho.

À Vanessa Fortes

Obrigada pela paciência e ensinamentos sobre o preparo dos extratos.

Aos técnicos Rubens E. da Silva e Francine Bianchini

Pelo carinho, coleguismo e colaboração no preparo dos materiais.

À amiga Marlise Montes

Pela amizade despretenciosa, pela sabedoria de vida (e técnica) que me permitiu acreditar em meu crescimento pessoal.

À equipe da Profª Drª Luciana Crott e da Profª Drª Fabíola Attié de Castro

Obrigada pelo convívio prazeroso e pelo fornecimento de reagentes e instrumentos.

À equipe da Profª Drª Maria José Alves da Rocha, em especial à Gabriela Pelegrin

Obrigada pelo convívio prazeroso e pelo auxílio em experimentos.

À responsável técnica Fabiana Rossetto de Moraes

Muito obrigada pela ajuda nos experimentos de citometria de fluxo e pelos momentos de desabafo.

Às instituições CNPq e FAPESP

Pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho

À Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

À todos que, de alguma maneira, tornaram esse trabalho possível.

*“Certamente um dos maiores estímulos
na Ciência é o simples prazer de
descobrir coisas, de aprender algo novo
sobre o mundo à nossa volta.”*

(Hal Hellman)

Resumo



FUMAGALLI, H. F. **Avaliação do efeito do extrato de soja (*Glycine max*) biotransformado pelo fungo *Aspergillus awamori* em cultura de células de câncer de mama estrógeno-dependente e independente.** 2011. 91f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmaceuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Introdução: Isoflavonóides são compostos encontrados em vários vegetais e apresentam diversos efeitos farmacológicos. Dentre estes compostos, encontramos os fitoestrógenos, assim chamados por possuírem ações que mimetizam o efeito do estrógeno natural sobre as células. A soja (*Glycine max*), um dos vegetais ricos nos fitoestrógenos daidzeína e genisteína, tem sido indicada pela literatura como terapia alternativa para a menopausa pela atividade estrogênica que apresenta, visto que a terapia estroprogestiva para tratar os sintomas desta fase aponta um aumento da incidência de câncer de mama. **Objetivo:** Avaliar a promoção de apoptose e/ou necrose por um Extrato de Soja (*Glycine max*) Biotransformado pelo fungo *Aspergillus awamori* (ESBF) em células de linhagem de adenocarcinoma mamário estrógeno-dependentes (MCF-7) e estrógeno-independentes (SK-BR-3). **Materiais e métodos:** o ESBF foi produzido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP), com concentração determinada de daidzeína (D) e genisteína (G) por CLAE e avaliado em dois modelos de células de adenocarcinoma mamário: estrógeno-dependentes (MCF-7) e estrógeno-independentes (SK-BR-3). Nestes modelos experimentais, foram avaliados também, o Extrato de Soja (ES) e os padrões comerciais de daidzeína (D) e genisteína (G) isoladas ou em combinação (D+G). Neste estudo avaliamos estes compostos perante os parâmetros: a) citotoxicidade pelo método de MTT; b) necrose e apoptose celular pelo ensaio de marcação por iodeto de propídio (IP) e anexina-V e IP; c) a atividade da caspase-3 por western blotting. **Resultados:** o ESBF nas linhagem MCF-7 e SK-BR-3 apresentou citotoxicidade dose-dependente a partir de 2,184 mg/mL; o ES apresentou aumento na viabilidade celular em todas as concentrações estudadas; os padrões D e G nas concentrações 1,3 e 1,5 μ M respectivamente aumentou a viabilidade celular apenas para a linhagem MCF-7; resultado este não observado nas células SK-BR-3. Quanto aos ensaios de necrose e apoptose, encontramos que as duas linhagens celulares apresentaram marcação pelo IP a partir da concentração de 1,638 mg/mL do ESBF, enquanto que o ES e D+G não apresentaram marcação nas concentrações testadas. Somente para a linhagem MCF-7 encontramos no teste de anexina-V + IP apoptose precoce a partir da concentração 0,819 mg/mL e apoptose tardia/necrose a partir da concentração de 2,717 mg/mL frente ao ESBF, enquanto que frente ao ES e aos padrões D+G este resultado não foi observado. Utilizando apenas a linhagem MCF-7, com relação a detecção da caspase-3 íntegra, não foi possível visualizar sua presença a partir da concentração de 1,638 mg/mL do ESBF. **Conclusão:** Com este estudo verificamos que o ESBF favorece a indução a morte celular das linhagens MCF-7 e SK-BR-3, não acontecendo o mesmo com o ES e os padrões D+G. Nossos achados sugerem que componentes do fungo são os responsáveis por este efeito biológico, e não os metabólitos da soja, visto que os padrões de daidzeína e genisteína, bem como o ES, não apresentaram os resultados de morte celular evidenciados aqui.

Palavras-chave: Menopausa, Fitoestrógenos, Soja, Terapia de Reposição Hormonal, Câncer de mama.

Abstract



FUMAGALLI, H. F. **Effect of Soy Extract (*Glycine max*) biotransformed by the fungus *Aspergillus awamori* in cultured breast cancer cells estrogen-dependent and independent.** 2011. 91f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Introduction: Isoflavones are compounds found in various vegetables and have different pharmacological effects. Among these compounds there are phytoestrogens, so called because they have actions that mimic the effects of natural estrogen on cells. Soybean (*Glycine max*), a plant rich in phytoestrogens genistein and daidzein, have been cited in the literature as an alternative therapy for menopause because this plant has estrogen activity. Since oestrogen therapy to treat the symptoms of this phase, has many collateral effects, like increased incidence of breast cancer. **Objective:** To evaluate the promotion of apoptosis and/or necrosis caused by an extract of soybean (*Glycine max*) biotransformed by the fungus *Aspergillus awamori* (ESBF) by cell lineage of estrogen-dependent (MCF-7) and estrogen-independent (SK-BR-3) breast adenocarcinoma. **Materials and methods:** ESBF was produced at the Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto (FCFRP / USP), with known concentration of daidzein (D) and genistein (G) by HPLC and subjected to two models of breast adenocarcinoma cells: estrogen-dependent (MCF-7) and estrogen-independent (SK-BR-3). In these experimental models were also evaluated, Soy Extract (ES) and the commercial standards of daidzein (D) and genistein (G) alone or in combination (D+G). In this study we evaluated all these compounds the following parameters: a) cytotoxicity by MTT method; b) necrosis and apoptosis assay by dialing propidium iodide (PI) and annexin-V + PI; c) the activity of caspase-3 by western blotting. **Results:** ESBF in cell line MCF-7 and SK-BR-3 showed dose-dependent cytotoxicity starting from 2.184 mg/mL, the ES showed an increase in cell viability at all concentrations studied, D and G standards at concentrations of 1, 3 and 1.5 mM respectively increased cell viability only in line MCF-7, this result not observed in SK-BR-3. For the tests of necrosis and apoptosis, we found that that two cell lines presented labeling IP from the concentration of 1.638 mg/mL of ESBF, while the ES and D + G showed no labeling at all concentrations tested. Only line MCF-7 in the test of annexin-V + PI early apoptosis from the concentration 0.819 mg / mL and late apoptosis or necrosis from the concentration of 2.717 mg / mL against the ESBF, while facing the ES and D+G standards this result was not observed. Using only the cell line MCF-7 in assay to detection of caspase-3 intact, we could not see his presence from the concentration of 1.638 mg/mL ESBF. **Conclusion:** This study verified that the ESBF favors the induction of cell death in cell line MCF-7 and SK-BR-3, the same not happening with the ES and D+G standards. Our findings suggest that components of the fungus are responsible for this biological effect and not the soy metabolites, since the standards of daidzein and genistein, as well as the ES, the results showed no cell death.

Keywords: Menopause, Phytoestrogens, Soy, Hormone Replacement Therapy, Breast Cancer.

FUMAGALLI, H. F. **Efecto del extracto de soja (*Glycine max*) biotransforma por el hongo *Aspergillus awamori* en cultivos de células de cáncer de mama estrógeno-dependientes e independientes.** 2011. 91F. Tesis (Maestría). Faculdade de Ciências Farmaceuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Introducción: Las isoflavonas son compuestos que se encuentran en los vegetales distintas y tienen diferentes efectos farmacológicos. Entre estos compuestos, los fitoestrógenos encontrados, llamados así porque tienen acciones que imitan los efectos del estrógeno natural en las células. De soja (*Glycine max*), una planta rica en fitoestrógenos genisteína y daidzeína, se ha indicado en la literatura como una terapia alternativa para la menopausia de la actividad del estrógeno, que desde entonces la terapia oestrogeno-progestativa para tratar los síntomas de esta fase indica un aumento en la incidencia cáncer de mama. **Objetivo:** Evaluar la promoción de la apoptosis y/o necrosis causada por un extracto de soja (*Glycine max*) biotransforma por el hongo *Aspergillus awamori* (ESBF) linaje de células de adenocarcinoma de mama estrógeno-dependientes (MCF-7) y estrógeno-independientes (SK-BR-3). **Material y métodos:** ESBF se produjo en la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP), con especial concentración de daidzeína (D) y la genisteína (G) por HPLC y se evaluó en dos modelos de células de adenocarcinoma de mama: los estrógenos-dependiente (MCF-7) e estrógenos-independientes (SK-BR-3). En estos modelos experimentales se evaluaron, extracto de soja (ES) y las normas comerciales de la daidzeína (D) y la genisteína (G) solo o en combinación (D + G). Se evaluaron estos compuestos antes de los parámetros: a) citotóxica por el método MTT; b) ensayo de la necrosis y la apoptosis mediante la marcación de yoduro de propidio (PI) y la anexina V y IP; c) la actividad de la caspasa-3 por Western Blotting. **Resultados:** ESBF en la células MCF-7 y SK-BR-3 mostraron citotoxicidad dependiente de la dosis inicial de 2,184 mg/mL, el ES mostraron un aumento de la viabilidad celular en todas las concentraciones estudiadas; los modelos D y G, en concentraciones de 1,3 y 1,5 mM, respectivamente, aumentó la viabilidad celular sólo para la células MCF-7, un resultado que no se ve en las células SK-BR-3. Para las pruebas de la necrosis y la apoptosis, se encontró que las dos líneas celulares presentaron IP etiquetado de la concentración de 1.638 mg/mL ESBF, mientras que el ES y D + G no mostró ninguna marca a las concentraciones ensayadas. Sólo la cepa MCF-7 en test anexina V + PI hallada principios de la apoptosis en la concentración de 0.819 mg/mL y finales de apoptosis/necrosis de la concentración de 2,717 mg/mL contra la ESBF, mientras que frente a la ES y D + G normas que este resultado no se observó. Utilizando únicamente la línea MCF-7, con respecto a la detección de caspasa-3 completo, no podía ver su presencia en la concentración de 1,638 mg/mL ESBF. **Conclusión:** Este estudio verificó que la ESBF favorece la inducción de las líneas de la muerte celular MCF-7 y SK-BR-3, lo mismo no sucede con el ES y el estándar de D & G. Nuestros hallazgos sugieren que los componentes de los hongos son los responsables de este efecto biológico no, los metabolitos de la soja, ya que las normas de la daidzeína y la genisteína, así como la ES, los resultados no mostraron evidencia aquí la muerte celular.

Palabras clave: Menopausia, fitoestrógenos, la soja, terapia de reemplazo hormonal, cáncer de mama.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Unidade estrutural básica das isoflavonas (RIMBACH et al, 2007)...	06
Figura 02 - Representação esquemática da formação do complexo DISC. Adaptado de MACFARLANE & WILLIAMS, 2004.....	19
Figura 03 - Representação esquemática das vias de ativação das caspases. Adaptado de TAYLOR et al, 2008.....	20
Figura 04 - Viabilidade das culturas de MCF-7 após 24 horas.....	40
Figura 05 - Viabilidade das culturas de SK-BR-3 após 24 horas.....	42
Figura 06 - Células de linhagem MCF-7 com caráter necrótico após tratamentos	44
Figura 07 - Células de linhagem SK-BR-3 com caráter necrótico após tratamentos	45
Figura 08 - Células de linhagem MCF-7 com caráter apoptótico após tratamentos	47
Figura 09 - Células de linhagem SK-BR-3 com caráter apoptótico após tratamentos	48
Figura 10 - Ensaio de apoptose na linhagem MCF-7 por citometria de fluxo utilizando anexina-V conjugada com FITC e iodeto de propídio.....	51
Figura 11 - Ensaio de apoptose por citometria de fluxo na linhagem SK-BR-3 utilizando anexina-V conjugada com FITC e iodeto de propídio.....	53
Figura 12 - Expressão de proteínas das células de linhagem MCF-7 por western blotting.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Estrutura molecular geral dos isoflavonóides em comparação com a estrutura do 17 β -estradiol. Adaptado de PATISAUL & JEFFERSON, 2010.....	05
Tabela 02 - Relações de concentrações contidas no ESBF de daidzeína e genisteína.....	29
Tabela 03 - Relações de concentrações contidas no ES de daidzeína e genisteína.....	29
Tabela 04 - Efeito dos tratamentos na viabilidade celular de MCF-7.....	39
Tabela 05 - Efeito dos tratamentos na viabilidade celular de SK-BR-3.....	41
Tabela 06 - Percentual de células de linhagem MCF-7 com caráter necrótico após tratamentos com ESBF, ES e D+G	44
Tabela 07 - Percentual de células de linhagem SK-BR-3 com caráter necrótico após tratamentos com ESBF, ES e D+G	45
Tabela 08 - Percentual de células de linhagem MCF-7 com caráter apoptótico após tratamentos com ESBF, ES e D+G	47
Tabela 09 - Percentual de células de linhagem SK-BR-3 com caráter apoptótico após tratamentos com ESBF, ES e D+G	48
Tabela 10 - Percentual de células de linhagem MCF-7 marcadas por anexina-V conjugada com FITC e iodeto de propídio.....	50
Tabela 11 - Percentual de células de linhagem SK-BR-3 marcadas por anexina-V conjugada com FITC e iodeto de propídio.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Activator protein-1
APAF-1	Apoptotic protease activating factor-1
ATP	Adenosina tri-fosfato
Bcl-2	Anti-apoptotic B-cell lymphoma-2
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
D	Daidzeína
DISC	Death-inducing signaling complex
DMSO	Dimetilsulfóxido
E₂	17 -estradiol
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ES	Extrato de soja
ESBF	Extrato de soja biotransformado por fungo <i>Aspergillus awamori</i>
FADD	Fas-associated death domain - Faz-associado ao domínio de morte
FEs	Fitoestrógenos
FS	Fosfatidilserina
FSD	Farinha de soja desengordurada
FSH	Hormônio folículo estimulante
G	Genisteína
GRF	Grow-factor receptor - Receptor de fator de crescimento
HERS	Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study
IAs	Inibidores seletivos de aromatase
IC₅₀	Hal maximal inhibitory concentration – 50% da concentração inibitória
IP	Iodeto de propídio
LH	Hormônio luteinizante
LTCs	Linfócitos T citotóxicos
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NF-κB	Nuclear factor-κB
PBS	Phosphate buffered salina - Solução salina em tampão fosfato
PDA	Potato dextrose ágar
PKs	Protein kinases

RE	Receptores estrogênicos
REα	Receptor de estrógeno α
REβ	Receptor de estrógeno β
SBF	Soro bovino fetal
SERMs	Selective estrogen receptor modulator - Moduladores seletivos de receptores de estrógenos
TKs	Tyrosine kinase
TNF	Tumor necrosis factor
TNF-α	Tumor necrosis factor α
TRADD	TNF-receptor-associated death domain - Receptor de TNF associado a domínio de morte
TRH	Terapia de reposição hormonal
WHI	Women's Health Initiative Investigators

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Menopausa	02
1.2. TRH e Seus Efeitos Colaterais	03
1.3. Fitoestrógenos (FEs)	04
1.3.1. FEs e Receptores Estrogênicos (RE)	09
1.3.2. FEs e a Inibição do Crescimento e Proliferação Celular	12
1.3.3. FEs e Câncer	12
1.4. Morte Celular	15
2. OBJETIVOS	22
2.1. Geral	23
2.2. Específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Obtenção dos Extratos de Soja	25
3.1.1. Extração da Fração Lipídica da Farinha de Soja	25
3.1.2. Reativação do <i>Aspergillus awamori</i> e obtenção da suspensão de esporos.	25
3.1.3. Biotransformação da Farinha e Soja desengordurada (FSD) por <i>Aspergillus awamori</i> em cultura de célula semi-sólida.....	26
3.1.4. Obtenção do Extrato de Soja (sem biotransformação) - ES.....	26
3.2. Preparo das soluções de Isoflavonas.....	27
3.3 Preparo dos ES e ESBF.....	27

3.4. Cultura Celular.....	27
3.4.1. Preparação das Células para Tratamento.....	28
3.4.2. Depleção de Estrógeno do SBF.....	28
3.5. Tratamento das Linhagens.....	29
3.6. Citotoxicidade Celular.....	30
3.6.1. Ensaio de Viabilidade Celular.....	30
3.7. Avaliação da Integridade Celular.....	31
3.7.1. Ensaio de Marcação com Iodeto de Propídio.....	31
3.7.1.1. Marcação do DNA em Células Íntegras.....	31
3.7.1.2. Determinação da Fragmentação de DNA	32
3.7.2. Ensaio de Apoptose por Marcação com Anexina-V e Iodeto de Propídio.....	33
3.8. Pesquisa da Expressão de Caspase-3 e Caspase-3 Clivada por Western Blotting.....	34
3.8.1. Extração das Proteínas por SDS-Page.....	34
3.8.2. Eletrotransferência para Membrana de Nitrocelulose.....	35
3.8.3. Western Blotting ou Imunofluorescência de Proteína.....	35
3.9. Análise Estatística.....	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1. Viabilidade Celular.....	38
4.2. Avaliação da Integridade Celular.....	43
4.2.1. Ensaio de Marcação com Iodeto de Propídio (IP).....	43
4.2.1.1. Marcação do DNA em Células Íntegras.....	43
4.2.1.2. Determinação da Fragmentação de DNA.....	46
4.2.2. Ensaio de apoptose por Marcação com Anexina-V e Iodeto de Propídio.....	49
4.3. Pesquisa da Expressão de Caspase-3 e Caspase-3 Clivada por Western Blotting.....	54
5. DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÕES.....	63
7. REFERÊNCIAS.....	66

1. Introdução

1.1. Menopausa

A menopausa é definida pela Organização Mundial da Saúde como o término permanente dos períodos menstruais, decorrente da falência ovariana fisiológica, com declínio da secreção dos hormônios estrogênio e progesterona pelos ovários, que ocorre naturalmente ou é induzida por cirurgia, quimioterapia ou radiação. A menopausa natural é reconhecida após 12 meses consecutivos sem períodos menstruais que não esteja associada com uma causa fisiológica (ex. lactação) ou patológica (SPEROFF, 1999; NIH CONFERENCE, 2005).

O período de transição entre o período fértil da mulher e a menopausa é marcada por ciclos hormonais irregulares, resultado de quantidades decrescentes de gonadotrofinas femininas, estrógeno e progesterona. O declínio das funções foliculares leva a uma série de sintomas vasomotores metabólicos e hormonais, culminando com a ausência da menstruação, levando a menopausa propriamente dita (GRACIA et al, 2005).

Normalmente a falência ovariana acontece, por volta dos 51 anos, com o término tanto da menstruação quanto da ovulação (SANTORO, 2005; NELSON, 2008). Enquanto ambos os hormônios FSH (hormônio folículo estimulante) e hormônio luteinizante (LH) continuam diminuindo por três anos após o início da menopausa (KASE, 2009).

A baixa quantidade de estrógeno circulante leva a maioria das mulheres a terem sintomas tais como: sudorese; insônia; palpitações; mudanças de humor; ansiedade; depressão; perda da memória e da concentração; irritabilidade e fadiga; ressecamento do epitélio vaginal; perda da libido; dispaurenia; incontinência urinária, disúria, aumento da osteoporose, doenças cardiovasculares e mal de Alzheimer (SPRITZER & REIS, 1998; SANTORO, 2005; NIH CONFERENCE, 2005).

Sendo assim, as mulheres, cada vez mais, procuram um método seguro para aliviar os sintomas da menopausa e prevenir doenças comuns deste período, sobretudo as doenças cardiovasculares e a osteoporose; uma das alternativas para o alívio destes males é a terapia de reposição hormonal (TRH) (RINGA, 2000).

1.2. TRH e Seus Efeitos Colaterais

A TRH conta com a prescrição de estrógenos e/ou progesterona para a diminuição dos sintomas desse período (SARGIL, 1985, apud HELFERICH, 2008) e diminuir perdas ósseas maciças que levariam a uma osteopenia e osteoporose (CRISTIANSEN, 1991).

Entretanto, dois grandes estudos, o HERS e o WHI, questionaram os efeitos positivos da TRH e alertaram para seus efeitos adversos: o aumento da incidência de câncer de endométrio e de mama em tratamentos prolongados (HURLEY et al.; 1998). O que gerou questionamentos severos sobre a eficiência da TRH, sobretudo porque o câncer de mama é o que registra os maiores números de incidência e é a causa mais freqüente de morte por câncer em mulheres (12,7% do total), sendo quase de igual mortalidade que o de pulmão (WHO, 2011).

Ainda assim, antes de 2002, a TRH era largamente utilizada como forma de proteção a doenças coronarianas, baseando-se em estudos que indicavam diminuição de 40 a 50% de incidência desta doença em mulheres menopausadas fazendo uso do tratamento estro-progestivo (WOLF et al, 1991; ETTINGER et al, 1996; GRODSTEIN et al, 2000). Além disso, também foi observada, em ensaios clínicos e em estudos randomizados, a redução dos riscos de fraturas ósseas causadas pela osteoporose e da incidência de câncer do cólon (RANDELL et al, 2002; CAULEY et al, 2003; FOLSOM et al, 1995; SCHAIRER et al, 2000). Enquanto que ocorria um aumento de 20 a 30% dos casos de câncer de mama.

Baseando-se na expectativa de proteção a doenças coronarianas, a relação custo/benefício para a TRH foi calculada como sendo positiva para a maioria das mulheres (COL et al, 1997).

Já em 2002, ROSSOUW e colaboradores associaram o risco de derrame cerebral e câncer de mama estrógeno-dependente às TRH. Logo depois, em 2004, a equipe de ANDERSON avaliou que a TRH com uso isolado de estrógeno levava a uma diminuição dos riscos de câncer de mama, mas com aumento dos riscos de acidentes vasculares cerebrais e doenças tromboembólicas além de não observar benefícios na prevenção de doenças coronarianas.

Esta dúvida na eficácia da TRH levou a um abandono por parte dos médicos na indicação desta terapia, sobretudo pela discrepância de dados (HARMAN et al 2011).

Desde então, vários estudos relacionados a TRH estão sendo realizados a fim de relacionar o tempo de tratamento, dosagens, combinações hormonais, idade da paciente, histórico familiar, tempo do período de menopausa com e sem tratamento e outros múltiplos parâmetros para tentar mensurar a melhor forma de intervenção clínica (WOODIS, 2010).

Por existirem mulheres para quem a TRH é contra-indicada por problemas tromboembólicos ou histórico de câncer em si ou em seus familiares, nestes casos muito pouco pode ser oferecido para aliviar os sintomas da perimenopausa e da menopausa. Por todas essas razões, o desenvolvimento de terapias alternativas que possam trazer benefícios à saúde da mulher sem contra-indicações tem sido objeto de interesse (GLAZIER et al, 2001; KASS-ANNESE, 2000)

1.3. Fitoestrógenos (FEs)

Os fitoestrógenos são considerados uma terapia alternativa às TRH, por apresentarem potencial efeito estrogênico e serem estruturalmente similares aos estrógenos dos mamíferos e seus metabólitos (PRICE & FENWICK, 1985; SIMONCINI et al, 2005; WHITTEN, 1997).

Seus compostos foram encontrados primeiramente na soja (*Glycine max*), mais tarde em outras plantas: *Cimicifuga racemosa*, red clover (*Trifolium pratense*), no linho, no centeio e outros (REINLI et al, 1996).

Flavonóides, são compostos amplamente encontrados em frutas, vegetais e plantas. Estes compostos possuem atividade antihepatotóxica, antiinflamatória, antiaterogênica, antialérgica, antiosteoporótica e anticancerígena. Muitos dos efeitos farmacológicos dos flavonóides estão relacionados com a interação com várias enzimas e pela sua atividade antioxidante (SILVA et al., 2002). Apresentam uma estrutura básica de 15 átomos de carbono compreendendo dois anéis aromáticos ligados por três carbonos em cadeia (C6-C3-C6), que podem ser eventualmente parte dos três anéis. As diferentes possibilidades de conformação desses anéis são

responsáveis pela diversidade química destes componentes. (FRESCO et al, 2006) (Tabela 01).

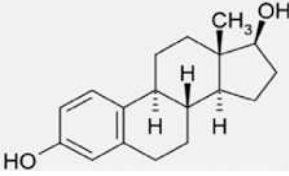
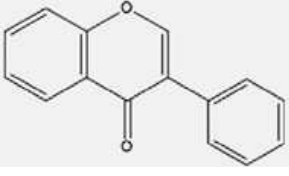
Grupo	Subgrupo	Exemplos	Fontes alimentares	Estrutura básica
17 β -estradiol	Estrógeno endógeno			
Isoflavonóides	Isoflavonas	Biochanina A, gliciteína, daidzeína, formononetina, genisteína	Soja e outros legumes	

Tabela 01: Estrutura molecular geral dos isoflavonóides em comparação com a estrutura do 17 β -estradiol. Adaptado de PATISAUL & JEFFERSON, 2010

A soja e alimentos derivados de soja são os mais significativos itens da dieta humana como fontes de isoflavonas, subgrupo dos isoflavonóides (COWARD et al, 1993; MURPHY & HENDRICH, 2002; WANG & MURPHY, 1994). As isoflavonas encontradas na soja se apresentam em quatro diferentes formas: glicosiladas (daidzina, genistina e glicitina), acetilglicosiladas (acetildaidzina, acetilgenistina e acetilglicitina), malonilglicosiladas (malonildaizina, malonilgenistina e malonilglicitina) e, na forma não conjugada, aglicona (daidzeína, genisteína e gliciteína). As formas glicosiladas mostram menor atividade biológica que suas formas agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína), que são mais comumente encontradas em alimentos de soja fermentados (IZUMI et al, 2000; CHUN et al., 2007; TANG et al, 2007; YIN et al, 2005). Além disso, há relatos que a velocidade de absorção das isoflavonas na forma de agliconas é mais rápida que na forma glicosilada, assim como a primeira é absorvida em maior quantidade que a segunda (KAWAKAMI et al, 2005). Em alguns estudos, encontramos dados atestando que os produtos ricos em agliconas das isoflavonas podem ser mais efetivos do que as formas glicosídicas na prevenção de doenças crônicas, como doenças coronarianas ou câncer (LEE et al, 2005).

A unidade estrutural básica das isoflavonas compreende dois anéis benzênicos (A ou B), unidos por um anel pirrólico heterocíclico (C) (Figura 01) (RIMBACH et al, 2007).

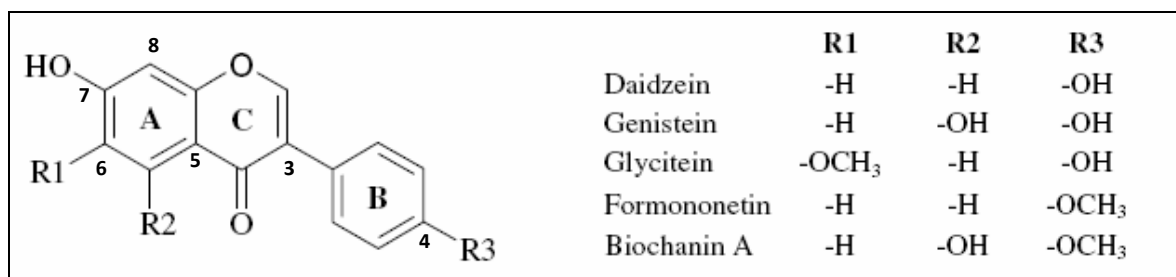


Figura 01: Unidade estrutural básica das isoflavonas (RIMBACH et al, 2007).

O anel fenólico, particularmente o que apresenta o grupo hidroxila (OH), anel A, não é uma estrutura esteroidal, porém é um componente essencial na interação com os receptores de estrogênio (CASSIDY et al, 2003; RIMBACH et al, 2007)

A daidzeína (4',7-dihidroxiisoflavona) e a genisteína (4',5,7-trihidroxiisoflavona) são isoflavonóides encontrados em apenas algumas famílias botânicas, devido à limitada distribuição de uma enzima que participa de sua formação (chalcona isomerase) e que é encontrada, especialmente, em leguminosas tropicais (COWARD et al., 1993).

As isoflavonas derivadas da soja, também possuem as mesmas propriedades dos estrogênios endógenos e, assim, competem com os mesmos pela ligação com os seus receptores, mimetizando o efeito do estrogênio sobre as células. Exercendo efeitos estrogênicos e antiestrogênicos no metabolismo, dependendo de muitos fatores, incluindo sua concentração, a concentração de estrogênios endógenos e características individuais, tais como sexo e a fase da menopausa (BARNES & KIM, 1988; THAM et al, 1998). Podem ser consideradas agonistas do estrogênio no sistema cardiovascular, nos ossos e no cérebro, enquanto têm um ou outro efeito antagonista na glândula mamária e no útero (CLARKSON et al, 2001).

Todos os isoflavonóides apresentam ação antioxidante, mas essa característica varia conforme a estrutura desses compostos, sendo que a genisteína exibe maior poder antioxidante (ARORA, NAIR, STRASBRUG, 1998). A atividade antioxidante das isoflavonas foi encontrada na seguinte ordem: genisteína > daidzeína = genistina = biocanina A = daidzina > formononetina = ononina (RUIT-LARREA et al, 1997).

A genisteína, em especial, exibe propriedades de prevenir a formação de câncer e, além disso, também demonstra atividade cardioprotetora e inibidora de osteoporose. Alguns dos efeitos farmacológicos da genisteína podem estar associados com sua atividade antiestrogênica. A genisteína tem sido identificada como inibidora da proteína quinase e histidina quinase, como também, DNA topoisomerase-II. A atividade antioxidante da genisteína pode influenciar na sua atividade antimutagênica (ZIELONKA, GERBICKI, GRYNKIEWICZ, 2003).

A genisteína se acumula na soja e em seus derivados em concentrações de até 1,5 mg/g (WANG & MURPHY, 1994). Esse valor depende de fatores como a variedade da soja e componentes ambientais durante seu crescimento, desenvolvimento (ELDRIDGE & KWOLEK, 1983) e processamento (YIN et al, 2005). Fritzpatrick e colaboradores (1998) (apud HELFERICH, 2008) demonstraram que a administração de genisteína no período neonatal protege efetivamente contra tumores quimicamente induzidos em ratos.

Após a ingestão das isoflavonas, a daidzeína e a genisteína são metabolizadas no trato gastrintestinal. Biocanina A e formononetina são precursores metilados da genisteína e daidzeína, respectivamente. No intestino, são convertidas por bactérias em suas respectivas agliconas. A absorção das várias isoflavonas varia entre indivíduos devido às diferenças na microbiota intestinal (BECK; ROHR; JUNGBAUER, 2005).

A daidzeína pode ser transformada em diidrodaidzeína e então em O-des-metil-angolensina (O-DMA) e equol. Este não é metabolizado igualmente em humanos, e a capacidade individual de transformar isoflavonas em equol pode oferecer uma explicação para a variedade de resultados dos benefícios da dieta rica em isoflavona, e os produtores de equol podem ser mais beneficiados do que os não-produtores. Segundo Setchell et al (2002), 30-50% da população excretam equol na urina após consumo de soja. A genisteína é metabolizada em diidrogenisteína e então em 6-hidroxi-O-DMA e p-etilfenol (composto inerte).

O metabolismo da isoflavona é variável entre indivíduos e é influenciado por outros componentes da dieta, por exemplo, uma alta quantidade de carboidratos leva a um aumento na formação de equol. Esses novos compostos produzidos do metabolismo podem ter diferentes efeitos biológicos e maior atividade estrogênica

(como o equol) que as isoflavonas originais digeridas (KRENN; UNTERRIEDR; RUPRECHTER, 2002).

De forma geral, são absorvidos pelo trato intestinal após uma desconjugação pela flora bacteriana, com formação de fenóis heterocíclicos de estrutura similar ao estrogênio, o que os torna biodisponíveis. Na parede intestinal e no fígado, estes compostos sofrem um processo de conjugação a proteínas e, em sua maior parte, são enviados para a corrente sanguínea e aos seus sítios de atuação. Uma pequena parte é excretada pela vesícula biliar, podendo sofrer nova desconjugação e reabsorção ou ser excretada pelas fezes. O maior volume dessas substâncias é retirado do organismo por via urinária (OSOSKI & KENNELLY, 2003).

Os FEs têm também efeitos sobre diferentes enzimas envolvidas no metabolismo dos hormônios esteroidais. A aromatase, enzima que converte androstenediona em estrona e testosterona em estradiol, é inibida pelos FEs. Com isso, a produção endógena de estrógeno fica diminuída, podendo ser responsável pelo efeito protetor contra o câncer de mama em populações com dieta rica em isoflavonas. As isoflavonas exercem seus efeitos inibitórios sobre muitas enzimas-chave do metabolismo esteroidal e assim diminuem o nível dos hormônios ativos nos respectivos tecidos. Muitos tipos de cânceres nos órgãos reprodutivos são dependentes de hormônios, e através da diminuição dos níveis dos hormônios ativos, o crescimento celular é evitado, sendo essa a base para explicar os efeitos benéficos de prevenção de câncer numa dieta rica em isoflavonas (WONG & KEUNG, 1999).

Os estrógenos exercem diversos efeitos no corpo humano, tal como influenciar no crescimento e funcionamento dos tecidos reprodutivos femininos e masculinos, na preservação do esqueleto e do sistema nervoso central, promover efeitos cardioprotetores e proteger contra câncer de colo de útero e envelhecimento da pele. Considerando esses efeitos, é esperado que os FEs tenham importante papel na saúde humana, como prevenção de cânceres, doenças cardíacas, aliviar os sintomas da menopausa e prevenir a osteoporose (CARSON-JURICA; SCHRADER; O'MALLEY, 1990).

Inúmeros estudos epidemiológicos e clínicos têm avaliado a relação entre o consumo de FEs e casos de moléstias humanas, mas os resultados não produzem

uma imagem clara quanto à possibilidade ou não estes compostos terem potencial terapêutico (CASSIDY et al, 2006; SIRTORI & ARNOLDI, 2005).

1.3.1. FEs e Receptores Estrogênicos (REs)

Provavelmente, a ação mais bem caracterizada dos FEs está vinculada aos receptores estrogênicos (REs), promovendo efeitos estrogênicos (agonistas), ou como antagonista, bloqueando ou alterando os REs, e assim, prevenindo contra a atividade estrogênica (MACKEY & EDEN, 1998; MURKIES et al, 1998; KUIPER et al.; 1998).

Desta forma, agindo como agonistas ou antagonistas, os FEs podem ser classificados como moduladores seletivos de receptores de estrógeno SERMs (SERMs - *selective estrogen receptor modulator*), assim como tamoxifeno e raloxifeno, sendo que o primeiro tem sido usado na clínica por pacientes com câncer de mama por agir como antagonista estrogênico no tecido mamário, reduzindo a proliferação de células cancerígenas, e como agonista no tecido ósseo e no sistema cardiovascular, prevenindo osteoporose e doenças cardíacas. Porém, o tamoxifeno tem mostrado atividade estrogênica no útero podendo aumentar o risco de câncer endometrial, além de não ser capaz de tratar os sintomas da menopausa (CARR, 1998).

Essa atividade diferencial entre os FEs e os clássicos SERMs (tamoxifeno e raloxifeno) resulta, em parte, devido ao perfil de co-ativador e co-repressor de proteínas presentes na célula. Aparentemente devido a cada ligante induzir mudanças conformacionais no RE, que então influencia o recrutamento de proteínas co-fatoras e interações com o elemento de resposta ao estrogênio (MANAS et al, 2004).

Existem dois tipos de receptores de estrógenos nos quais os FEs podem se ligar, receptores α (RE α) e β (RE β), que se diferem na distribuição tecidual e na afinidade por ligantes. Estes são receptores nucleares que podem agir como fatores de transcrição para genes reguladores de estrógeno. Os FEs são potentes agonistas do RE β e fracos agonistas do RE α e, assim, mostram efeitos estrogênicos principalmente em tecidos que expressam basicamente RE β , tais como os ossos,

sistema cardiovascular, pele e sistema nervoso central, sugerindo os diferentes caminhos para as ações dos mesmos e explicando as variáveis da especificidade de ação tecidual. Os FEs são capazes de interagir com enzimas e receptores, e devido a sua estrutura estável e ao baixo peso molecular, eles podem atravessar as membranas celulares (IMHOF et al., 2006). Na presença de fitoestrógenos e de outros desreguladores endócrinos, aparentemente RE β é mais eficiente que RE α no recrutamento de co-ativadores (ROUTLEDGE et al, 2000).

Em células de câncer de mama, por exemplo, o RE β regula o conjunto de genes que controlam a progressão do ciclo celular e, geralmente, suprimem a proliferação. Enquanto que a ativação do RE α , ao que tudo indica, faz efeito contrário (CHANG et al, 2006).

Uma vez ligado aos REs, os FEs podem então iniciar a transcrição de genes por via clássica através da interação com o RE ou por ligação inicial a genes imediatos, como Jun e Fos (KUSHNER et al, 2000). Sendo que essas vias não-clássicas só recentemente começaram a ser elucidadas. Hormônios esteróides, em particular os estrogênicos, são agora reconhecidos por iniciarem ações rápidas e não genômicas na superfície da célula através de uma série de mecanismos, incluindo a ligação de esteróides especializados a receptores de membrana (FALKENSTEIN et al, 2000; LEVIN et al, 2009; MICEVYCH & DOMINGUEZ et al, 2009; MICEVYCH et al, 2009; VASUDEVAN & PFAFF, 2008). A ligação desses esteróides a receptores de membrana causa ativação rápida (menos de 10 min) e transitória (algumas horas) na via de ativação do segundo mensageiro, com o aumento de cálcio intracelular ou de cAMP, resultando a estimulação das vias de transdução de sinal, importantes na sinalização neuronal, diferenciação e outros processos celulares. Inicialmente vistas com ceticismo, estas vias alternativas da ação esteróide estão se tornando mais apreciadas como possíveis principais responsáveis dos efeitos observados (ADAMS, 1995).

Embora os efeitos antiproliferativos do FE genisteína já tenham sido testados em diferentes modelos, a substância é mais conhecida por seus efeitos estrogênicos *in vitro* e *in vivo*. A genisteína tem uma estrutura química similar ao estrogênio e liga-se ao RE α e ao RE β *in vitro*, 0,017% de ligação em receptor α (baixa afinidade) e 7,4% em receptor β . Como comparação, o 17- β -estradiol tem 100% de ligação em ambos os casos (MUTHYALA et al, 2004). Curiosamente, S-equol, um metabólito da

daidzeína, demonstrou uma preferência similar para receptor β em relação ao receptor α (3,2% e 0,1%, respectivamente) e com afinidade de ligação muito superior à daidzeína (0,01% para receptor α e 0,04% para receptor β). (MUTHYALA et al, 2004).

FES também podem manipular os níveis de hormônios endógenos, interferindo na ação das enzimas necessárias para a biossíntese de esteróides. Coumestrol, por exemplo, atenua a conversão de 3H-estrona para 3H-estradiol in vitro por inibição da enzima 17 β -hidroxisteróide oxidoreductase tipo I de uma forma dose-dependente. Genisteína, embora mais fraca, tem um efeito dose-dependente inibitório similar (FRANKE & CUSTER, 1994).

A aromatase, enzima responsável pela biossíntese de estrógeno, é expressa em níveis elevados em células de carcinoma mamário e em tecido adiposo estromal circulante (ESTEBAN et al, 1992; BULUN et al, 1993; SASANO et al, 1994; LU et al, 1996). Por isso, o bloqueio total da biossíntese do estrógeno em mulheres menopausadas é facilmente conseguido pela inibição direta da aromatase. Uma vez que os estrógenos são formados no último passo da biossíntese de esteróides, a supressão de sua produção pela inibição da aromatase fornece a base para o desenvolvimento de quimioterapias seletivas que não interferirão na biossíntese de outros hormônios esteróides (BRODIE et al, 1990). Assim, inibidores sintéticos de aromatase (IAs) são considerados uma valiosa alternativa ao tamoxifeno (SANTEN & HARVERY, 1999; MILLER et al, 2001; WINER et al, 2002; ALI & COOMBES, 2002). A inibição da aromatase por alguns fitoestrogênios também tem sido demonstrado in vitro (WANG et al, 1994; PELISSERO et al, 1996; CHEN et al, 1997).

Os FEs encontrados na soja têm sido amplamente estudados porque a proteína da soja, uma rica fonte destes compostos, contém de 01 a 03 mg de isoflavona por grama de proteína (KUIPER et al.; 1998).

1.3.2. FEs e a Inibição do Crescimento e Proliferação Celular

Algumas isoflavonas, principalmente a genisteína, inibem vias importantes para o crescimento e proliferação celular, um efeito que afeta os sistemas de múltiplos órgãos. A genisteína inibe a atividade de proteínas tirosino-quinases (tyrosine kinases - TKs) nos tecidos da mama, incluindo células cancerosas (PIONTEK et al, 1993; BOUTIN, 1994).

As TKs catalisam a fosforilação de seus próprios resíduos de tirosina e os de outras proteínas, incluindo fatores de crescimento envolvidos na proliferação de células tumorais (LURJE & LENZ, 2009).

Pela genisteína ter um potencial efeito lento sobre as, TKs, muitos laboratórios exploram seu potencial terapêutico para o câncer de mama e de próstata (AGARWAL, 2000). Inibição da atividade da TK pode também desempenhar um papel na melhoria função cardiovascular (PARK et al, 2005), impedindo a vascularização de tumores. Além disso, a genisteína, também pode inibir enzimas de replicação de DNA associadas a tumorigênese, incluindo DNA topoisomerases I e II (OKURA et al, 1988).

A regulação de moléculas independentes de receptores de estrógeno, colocou a genisteína e outros isoflavonóides como potenciais efetores em uma grande variedade de mecanismos de sinalização celular, importantes para a regulação do crescimento celular e de proteção do organismo (MAGGI et al, 2004).

1.3.3. FEs e Câncer

Tumores mamários são caracterizados como malignos ou benignos após análise histopatológica e identificados como estrógeno-dependente ou estrógeno-independente dependendo da presença ou não de receptores para estrógeno e progesterona (HELFERICH et al, 2008).

Os FEs com sua afinidade pelos receptores de estrógenos (RE) das células, induzem ou modulam o estímulo estrogênico, incluindo ativação da quinase e transcrição do gene de regulação (HELFERICH et al, 2008). Não obstante, esse mecanismo de sinalização via RE, têm demonstrado estimular o crescimento de

células de câncer de mama RE-positivas (LIPPMAN et al, 1986; BATES et al, 1988; GREEN et al, 1990; SETCHELL, 2001).

O câncer é uma doença cuja prevenção é possível, sobretudo através de uma dieta apropriada. Atualmente, tanto a terapia convencional quanto a cirurgia acessível não têm sido capazes de controlar os muitos tipos de câncer, o que torna urgente a necessidade de desenvolvimento de estratégias para diminuição do número de vítimas dessa doença. A prevenção via agentes não tóxicos pode ser uma alternativa apropriada (FRESCO et al, 2006). O alto consumo de produtos de soja é associado com o baixo risco de câncer de mama em asiáticas em fase pré e pós-menopausa (GANRY, 2002; SUZUKI et al, 2008).

Flavonóides são geralmente atóxicos e possuem uma grande variedade de benefícios em atividades biológicas. O uso de dietas ricas em flavonóides na prevenção do câncer é largamente discutido. Existem muitas evidências de que os flavonóides são importantes inibidores da carcinogênese (REN et al, 2003).

Ren e colaboradores (2003), analisando as várias propriedades dos flavonóides, encontraram alguns estudos epidemiológicos que associam dietas ricas em flavonóides a baixa prevalência de câncer em humanos. Esses estudos estão sendo confirmados com resultados *in vitro* e *in vivo*, mostrando que os flavonóides podem inibir vários estágios no processo da carcinogênese, ou seja, o início da formação do tumor, sua promoção e progressão. Baseado nos estudos *in vivo* e *in vitro*, muitos mecanismos podem estar envolvidos, como inativação da carcinogênese, antiproliferação, estagnação do ciclo celular, indução a apoptose e diferenciação, inibição da angiogênese, antioxidação e reversão da resistência a múltiplas drogas ou a combinação desses mecanismos. Dentre as ações oriundas da intervenção dos compostos fenólicos perante o processo de iniciação e desenvolvimento do câncer podemos enumerar a supressão: da ativação do fator de transcrição NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*) (AHMAD et al, 2000); da ativação do fator de ativação de transcrição AP-1 (*Activator Protein-1*) (YOSHIOKA, et al, 1995; DONG et al, 1997; YU et al, 2001); da MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) (KUO et al, 1995); das PKs (*Protein Kinases*) (MARKOVITS et al, 1989; LIN et al, 1997); GRF (*grow-factor receptor*) (MASUDA et al, 2002); da angiogênese (TAN et al, 2003; LIN et al, 2003).

Em mulheres menopausadas a terapia endócrina é largamente aceita como uma modalidade de tratamento para câncer de mama de receptor hormonal positivo, com agentes endócrinos designados para inibir a síntese de estrógeno ou bloquear a atividade do estrógeno junto ao receptor estrogênico (HOUWELL, 2005). A genisteína e a daidzeína tem sido estudadas como possuindo atividade agonista ao estrógeno em câncer de mama *in vitro* (WANG & KURZER, 1997; HSIEH et al, 1998; MAGGIOLINI et al, 2001; CHEN et al, 2003; WOODS, 2003). A genisteína também inibe a angiogênese e a metástase em muitos modelos *in vitro* e *in vivo* (FOTSIS et al, 1993; SANTIBANEZ et al, 1997; SHAO et al, 1998).

Shao e colaboradores (1998) demonstraram que a genisteína poderia reduzir o crescimento de células estrógeno-dependentes (MCF-7) e estrógeno-independentes (MDA-MB-231) implantadas *in vivo*. Sendo que o grupo aponta que os efeitos são mais evidentes em altas doses de genisteína (20 μ mol/L) *in vivo*, sendo aplicado subcutaneamente em dose aproximada de 0,5 mg/kg.

Em uma pesquisa recente, LIN e colaboradores (2009) detectaram a redução da viabilidade de células MCF-7 significativamente quando incubadas por 72 horas com soro de puerarin (*Puerariae radix*), planta rica em daidzeína e genisteína, resultado este que não foi conseguido nas mesmas proporções usando daidzeína e genisteína comerciais. Verificou-se também que os resultados eram dependentes da concentração dos compostos testados. Na mesma pesquisa, as células MCF-7 demonstraram, após o tratamento com o soro da planta, estagnação no ciclo celular e indução da apoptose, confirmada pela presença da caspase-3 (proteína relacionada a apoptose celular), tanto pelo soro quanto pela genisteína e pela daidzeína. Concluíram, também, a inibição do crescimento de células de câncer de mama com IC₅₀ da concentração de 2,35 μ M dos metabólitos da *Puerariae radix* (LIN et al, 2009; FERREIRA et al, 2006).

Helferich e colaboradores, em 2008, decidiram determinar a possível interação da genisteína com o tamoxifeno. No teste realizado por Helferich, foram implantadas células MCF-7 e MDA-MB-435 (linhagem estrógeno-independente) em ratas ovariectomizadas e o que se observou foi que a dieta rica em genisteína inibiu o efeito do tamoxifeno nas MCF-7, mas não na linhagem MDA-MB-435. Sendo assim, concluíram que a relação fitoestrógenos e câncer de mama é muito complexa e conflitiva. A interação de fitoestrógenos e ciclo celular pode depender de múltiplos

fatores como: tempo de exposição; digestão, absorção e metabolismo do indivíduo; status hormonal; condição de saúde; uso ou não de medicamentos; quantidade e qualidade dos fitoestrógenos na comida ou suplementos e condição genética. Sendo assim, o consumo de altas doses de fitoestrógenos não é recomendado por mulheres com alto risco de desenvolverem carcinoma de mama e por pacientes que fazem uso do tamoxifeno, assim como por sobreviventes de câncer de mama (HELFERICH et al, 2008).

Além dos efeitos benéficos, nosso grupo detectou que as isoflavonas não interferem significativamente na coagulação sanguínea, no sistema fibrinolítico, no perfil lipídico e nos níveis de estradiol e de hormônio folículo estimulante (RIOS et al, 2008 a, b). Quanto aos efeitos frente a células ECV-304, encontramos que as isoflavonas daidzeína e genisteína conferem proteção contra dano celular induzido por H_2O_2 , induzem aumento significativo da síntese de NO, aumentam a síntese de prostaglandina E_2 (PAULO et al, 2009).

Fitoestrógenos estão sendo utilizados na dieta por muitas mulheres. Esta concepção pode não estar correta e sua eficácia tem sido questionada (TICE et al, 2003), além de existir uma apreensão sobre a segurança deste hábito, sobretudo quando o assunto são mulheres que tem, ou com alto risco de ter, carcinoma mamário (KURZER, 2003).

1.4. Morte celular

Diversos sinais regulam a proliferação, vida e morte celular, sendo que as ações coordenadas desses três meios levam uma célula normal à divisão celular ordenada e sua senescência (MESTER & REDEUILH, 2008).

Apoptose é um fenômeno de morte celular programada, que ocorre individualmente, sendo que a morte de uma célula não leva à morte de outras células. É um mecanismo rigidamente controlado por expressões genéticas decorrentes da interação célula e meio externo, levando à produção de várias moléculas com atividades específicas que resultam em alterações celulares funcionais expressas morfologicamente por condensação e fragmentação

cromatínica e formação de protuberâncias na superfície celular (ISRAELS & ISRAELS, 1999).

Este processo de morte celular possui um papel essencial na manutenção da homeostase tecidual e é importante em certas condições patológicas, incluindo o câncer. Sendo que, após o reconhecimento do processo apoptótico como um mecanismo celular fundamental, a biologia da apoptose continuou a ser investigada avaliando-se as alterações morfológicas e bioquímicas (ANAZETTI & MELO, 2007).

O padrão de alterações morfológicas e bioquímicas celulares associadas com a programação normal de morte celular e certos processos patológicos *in vivo* inclui a formação de vacúolos citoplasmáticos, encolhimento e diminuição do contato entre células vizinhas, fragmentação da membrana nuclear e condensação cromatínica (WYLLIE; KERR; CURRIE, 1980; MCCONKEY, 1998; MELO et al., 2000), despolarização de membrana mitocondrial, fragmentação internucleossomal do DNA e alterações na assimetria de fosfolípidos de membrana plasmática (CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002). Quando a morte celular apresenta todas as características morfológicas e bioquímicas de apoptose, mas foi induzida por um determinado composto ou por um estímulo físico, não constitui um processo programado e sim uma resposta celular às mudanças ambientais (KERR, 2002).

Por outro lado, a morte celular por necrose ocorre, geralmente, em resposta à injúria severa às células, definida como uma forma violenta de morte celular iniciada por estímulos ambientais que resultam em rápida desregulação da homeostasia (BRAS et al, 2005). A necrose é caracterizada morfolologicamente por condensação da cromatina, inchaço citoplasmático, mitocondrial e do retículo endoplasmático, (levando a desagregação dos ribossomos), ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo extracelular. Conseqüentemente, ocorre a geração de uma resposta inflamatória local, que pode causar injúria e até morte de células vizinhas, ou seja, nesta condição um grande número de células são afetadas e lesadas ao mesmo tempo e devido ao desencadeamento do processo inflamatório há alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado, ainda que o material necrótico seja removido por fagócitos (KERR et al, 1995; CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002; BROUJRAD et al, 2007).

Na morte celular por necrose devido às alterações da função mitocondrial, diminui drasticamente a produção de ATP interferindo na função da bomba Na^+/K^+ ,

levando a tumefação celular devido ao aumento de Na^+ citosólico. O aumento do Ca^{2+} citosólico provoca ativação de fosfolipases e de proteases, que juntamente com o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzem ruptura da membrana plasmática, ativação de proteases com consequente indução do extravasamento do conteúdo celular, sinalizando para a migração de macrófagos e ativando uma resposta inflamatória do sistema imune. Ao contrário da retração celular observada em células apoptóticas, na necrose observa-se um intumescimento celular devido às lesões no citoesqueleto e inibição da bomba de Na^+/K^+ , ocasionando a perda da permeabilidade seletiva da membrana (MCCONKEY, 1998).

Quando a célula em sofrimento entra em apoptose, ela torna-se arredondada e retraída em relação às células vizinhas. Isso é seguido por um longo período de formação de vesículas na membrana citoplasmática, chamadas corpos apoptóticos. (TAYLOR et al, 2008). Além disso, as alterações no complexo de Golgi, no retículo endoplasmático e na mitocôndria, produzem numerosas proteínas, os citocromos c, liberados pela membrana mitocondrial (WILLIAMS, LITTLE, SHIPLEY, 1974; FRANK et al, 2001) engatilhando um complexo de ativação de caspases dentro do citosol (TAYLOR et al, 2008).

As caspases (*Cystein-dependent aspartate-specific protease*) são normalmente presentes em células saudáveis como enzimas precursoras inativas (zimógenos), com pequenas ou nenhuma atividade protéica (NICHOLSON, 1999; CREAGH, CONROY, MARTIN, 2003; STENNICKE & SALVESEN, 1998; STENNICKE et al, 1998). Entretanto, todo estímulo que desencadeia a apoptose aparentemente leva a ativação de caspases, embora por diferentes vias. Três vias de ativação do processo de apoptose por caspases são bem conhecidas, sobretudo em animais (CREAGH, CONROY, MARTIN, 2003; ADRAIN & MARTIN, 2001) e outras ainda estão em estudo, ainda gerando algumas controvérsias. Independente da via de ativação das caspases, todas elas levam a ativação das maiores caspases efetoras: caspase-3, caspase-6 e caspase-7, e estas enzimas são responsáveis pela realização de grande parte das proteólises que são observadas durante a fase de destruição celular na apoptose (TAYLOR et al, 2008).

De maneira geral a apoptose pode ocorrer via caspase-dependente ou via caspase-independente. A apoptose caspase-dependente pode ocorrer de duas formas já identificadas: via extrínseca, envolvendo receptores de morte celular,

como receptores do fator de necrose tumoral (TNF – *tumor necrosis factor*), FAS/CD95-APO-1 e TRAIL/APO-2; e via intrínseca, que tem como regulador central a mitocôndria (JIN & EL DEIRY, 2005).

A ativação da caspase pela via extrínseca envolve a interação de marcadores extracelulares de morte, como FasL ou o TNF- α (TNF- α - *Tumor necrosis factor- α*) com receptores de morte transmembrana. Após a interação dos receptores de morte com seus respectivos ligantes, ocorre o recrutamento de proteínas adaptadoras como a Fas associada ao domínio de morte (FADD – Fas-associated death domain), que por sua vez, recruta moléculas de caspase-8, promovendo sua auto-ativação (TAYLOR et al, 2008). FADD e receptor TNF associado ao domínio de morte (TNF-receptor-associated death domain - TRADD) recrutam e ativam a caspase-8 para formar um complexo sinalizador de indução de morte (DISC - *death-inducing signaling complex*) (WALCZAK & KRAMMER, 2000). DISC, então, pode propagar o sinal de morte, de duas maneiras. Primeiramente, DISC pode se ligar à proteína BID, passando a ser chamada de tBID, que após translocação para a mitocôndria pode causar permeabilização da membrana mitocondrial externa, levando à liberação de proteínas pró-apoptóticas, como citocromo c (LI et al, 1998). O citocromo c pode interagir com a protease apoptótica ativando o fator-1 (*apoptotic protease activating factor-1* - Apaf-1) e a pró-caspase 9 para formar um complexo chamado apoptossomo, que é capaz de ativar a caspase 9, que por sua vez ativa as caspases efetoras 3, 6 e 7, levando à apoptose (ZOU et al, 1997). Alternativamente, DISC pode também ativar diretamente essas caspases efetoras (ASHKENAZI & DIXIT, 1998). (Figura 02).

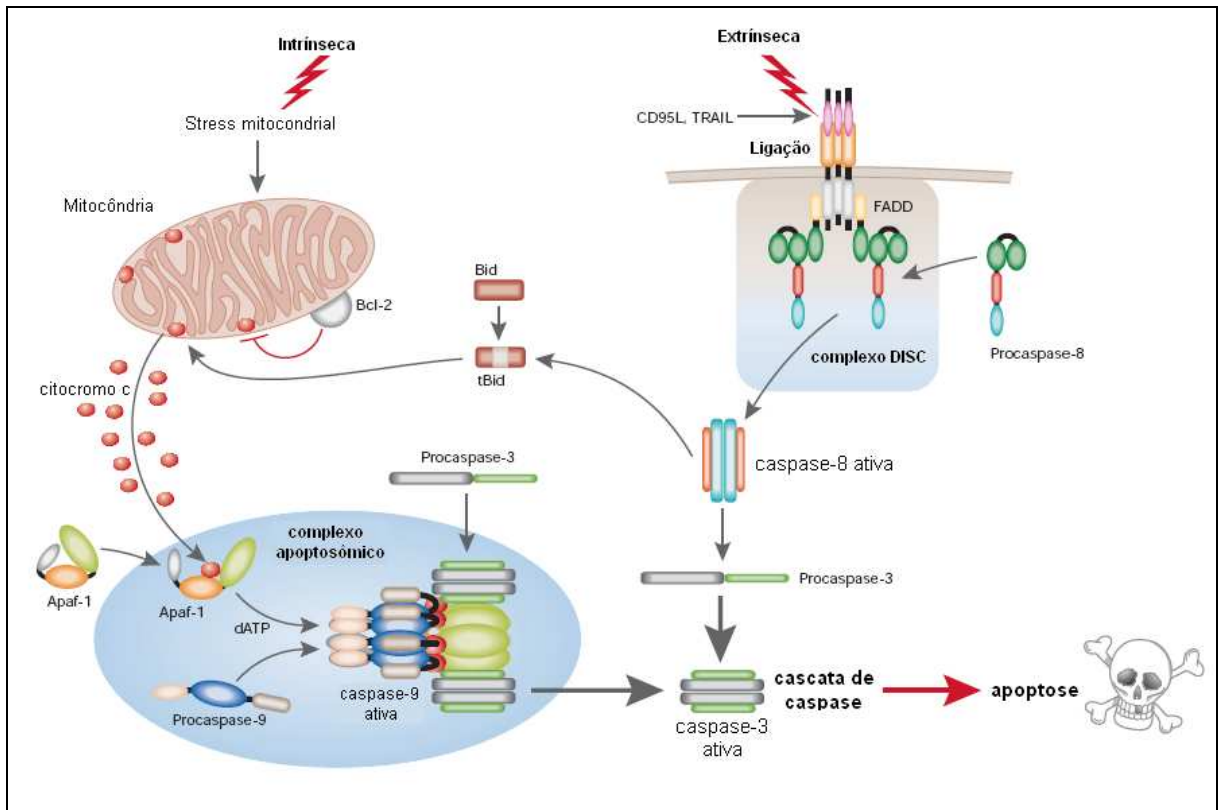


Figura 02: Representação esquemática da formação do complexo DISC. Adaptado de MACFARLANE & WILLIANS, 2004.

Pela via intrínseca, diversos estímulos que provocam dano ou stress celular podem ativar um ou mais membros da família de proteínas BH-3. Estas proteínas agem como sensores de via específica para vários estímulos celulares e são regulados de forma distinta. As proteínas BH-3 podem receber um sinal inibitório de uma família de moléculas denominadas Bcl-2 (*anti apoptotic B-cell lymphoma-2*). Entretanto, se não inibidas, as moléculas desse grupo BH-3 promovem a reunião de oligômeros BAK-BAX, dentro da membrana externa da mitocôndria. Estes oligômeros permitem o efluxo de proteínas no espaço intermembranar, como o citocromo c, para o citosol, permitindo a formação do apoptosomo (TAYLOR et al, 2008).

Na terceira via de ativação, chamada rota dependente da granzima B, ocorre a entrada dessas proteases na célula-alvo. As granzimas B são liberadas por linfócitos T citotóxicos (LTC) ou células NK (NK - *natural killer*). Os grânulos das LTCs ou NKs podem conter, além das granzimas, uma proteína formadora de poro, perforina, que, quando oligomerizada na célula-alvo, permite a entrada das granzimas. Essas granzimas B, assim como as caspases, unem-se aos substratos

células que deverão ser fagocitadas (WYLLIE, 1985; COMPTON, 1992; TAYLOR et al, 2008).

Em células sadias a FS encontram-se na face interna da membrana plasmática, devido a ação de uma translocase aminofosfolípídeo ATP dependente. Os eventos celulares durante a apoptose (ativação de caspases, stress oxidativo e alterações citoplasmáticas na concentração de cálcio), atuam modulando a permeabilidade da membrana mitocondrial externa. O citocromo c, liberado no citoplasma atua oxidando a FS, o que permite sua externalização na membrana plasmática. Além disso, outras duas enzimas corroboram com essa externalização: a ativação da fosfolípídeo *scramblase* (que aumenta o movimento de lipídeos através da dupla camada lipídica) e a inativação da aminofosfolípídeo translocase (responsável por deslocar a FS para a face interna da membrana) (FADOK et al, 2001; TIBREWAL & RAYMOND, 2006).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo é avaliar a promoção de apoptose e/ou necrose por um Extrato de Soja (*Glycine max*) Biotransformado pelo fungo *Aspergillus awamori* (ESBF) em células de linhagem de adenocarcinoma mamário estrógeno-dependentes (MCF-7) e estrógeno-independentes (SK-BR-3).

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade celular, utilizando o método de MTT, nas linhagens celulares MCF-7 e SK-BR-3, frente ao ESBF, ao ES, à daidzeína e à genisteína. Sendo essas últimas, avaliadas isoladamente e em combinação (D+G).
- Avaliar a indução a necrose e apoptose celular, utilizando o ensaio de marcação por iodeto de propídio (IP) em célula íntegra e a determinação da fragmentação de DNA por marcação com IP, nas linhagens celulares MCF-7 e SK-BR-3, frente ao ESBF, ao ES e à daidzeína e à genisteína combinadas (D+G);
- Avaliar a indução a necrose e apoptose celular, utilizando o ensaio de Anexina-V, por citometria de fluxo, nas linhagens celulares MCF-7 e SK-BR-3, frente ao ESBF, ao ES e à daidzeína e à genisteína combinadas (D+G);
- Avaliar a atividade da caspase-3 por western blotting, na linhagem celular MCF-7 frente ao ESBF e a daidzeína e genisteína combinadas (D+G).

3. Materiais e Métodos

3.1. Obtenção dos Extratos de Soja

Ambos os extratos de soja utilizados neste trabalho foram obtidos por técnica desenvolvida na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos sob a supervisão da Professora Doutora Maria José Vieira Fonseca.

3.1.1. Extração da Fração Lipídica da Farinha de Soja

A soja (*Glycine max*) transgênica em grãos, variedade Codetec 232, foi obtida de agricultor do Estado do Paraná (PR); os grãos de soja foram moídos em moinho de martelo e a farinha de soja fina assim processada, foi armazenada e mantida sob baixa temperatura (-20° C). Antes do processo de biotransformação, a farinha de soja foi desengordurada utilizando-se álcool isopropílico na proporção 1 parte de soja para 2 partes de álcool isopropílico (p/p). A suspensão resultante foi mantida sob agitação, em agitador mecânico a 500 rpm, durante duas horas à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ \text{C}$), e após esse período, a mesma foi centrifugada á 5000g na temperatura de 25° C por 30 minutos; a fração sobre nadante foi desprezada. Posteriormente procedeu-se a eliminação do resíduo de álcool isopropílico, por aquecimento do precipitado em banho-maria em capela de exaustão.

3.1.2. Reativação do *Aspergillus awamori* e Obtenção da Suspensão de Esporos

O *Aspergillus awamori* (ATCC 22342) foi ativado por repique em meio PDA (*Potato Dextrose Ágar*), seguido por incubação a 30°C por 5 dias. Após esse período, com auxílio de bastão de vidro e salina estéreis, os esporos do fungo foram retirados.

A suspensão de esporos em salina obtida foi diluída 1:100, e o número de esporos determinados por contagem em câmara de Neubauer. Posteriormente, fez-

se a diluição da suspensão, de tal modo a obter-se aproximadamente 100 esporos/mL de salina.

3.1.3. Biotransformação da Farinha de Soja Desengordurada (FSD) por *Aspergillus awamori* em cultura semi-sólida

A FSD foi colocada a temperatura ambiente e posteriormente distribuída em erlenmeyer de 250 mL na quantidade de 10 g. Sobre a FSD, foi adicionada de modo uniforme 10mL de água deionizada.

O erlenmeyer foi então tampado e esterilizado em autoclave. Após a esterilização, a FSD foi removida do fundo com bastão de vidro. O processo de esterilização a torna compacta, o que dificulta a proliferação do fungo. Sobre a farinha foi depositada 1 mL da suspensão de esporos (aproximadamente 100 esporos/mL de salina) de modo uniforme. Então, a FSD inoculada com os esporos foi incubada a 30°C por 48 horas.

Após esse período, ao observar-se a presença das hifas, adicionou-se 42 mL de etanol 80% à cultura, que foi posteriormente agitada por 2 horas. Então, a mistura de etanol, FSD e cultura do fungo foi filtrada em filtro de papel, membranas de 0,45 µm e 0,22 µm, nesta sequência, para esterilização. O extrato obtido foi concentrado em rotaevaporador até a obtenção de 12% de sólidos totais.

O extrato de soja biotransformado pelo fungo (ESBF), então foi alíquotado no volume de 1 mL em microtubos com tampa e, por evaporação em estufa fechada, foi retirado o restante do etanol.

3.1.4. Obtenção do Extrato de Soja (sem biotransformação) - ES

Para fabricação do extrato de soja não biotransformado, denominado ES, utilizado neste estudo como controle, foi tomado uso de todo o procedimento utilizado para obtenção do ESBF, exceto que o volume de 1 mL da suspensão de esporos foi substituído pelo mesmo volume de salina estéril.

Tanto o ES quanto o ESBF hidroetanólicos foram caracterizados por medida das quantidades de genisteína e daidzeína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP).

3.2. Preparo das Soluções de Isoflavonas

As isoflavonas daidzeína e genisteína (ambas da Sigma) foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma) e armazenados a -18° C. Para todos os experimentos as soluções de isoflavonas, foram preparadas diluindo-se o estoque com o meio de tratamento (RMPI sem fenol, acrescido de SBF tratado com carvão). A concentração final de DMSO na culturas foi de até 0.01%.

3.3. Preparo dos ES e ESBF

Ambos os extratos ES e ESBF foram dissolvidos em 100 μ L de DMSO e acondicionados em meio de tratamento (q.s.p. 1000 μ L), armazenados a -18° C até o momento do uso. Sendo que para todos os experimentos a concentração final de DMSO na cultura foi de até 0,01%.

3.4. Cultura celular

Neste estudo foram utilizadas duas linhagens celulares de adenocarcinoma mamário: uma estrógeno-dependente (MCF-7), e outra estrógeno-independente (SK-BR-3) ambas procedentes da American Type Culture Collection (ATCC® CLR-1998™).

O cultivo das células foi iniciado após descongelamento rápido de uma alíquota contendo 5×10^5 células a 37° C em banho maria. Após o descongelamento, as células foram submetidas à centrifugação de 1000 rpm durante 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi retirado e o sedimento celular foi lavado duas vezes com

PBS (solução salina em tampão fosfato) estéril para retirar qualquer resíduo de DMSO utilizado na etapa de congelamento. Finalmente o material foi centrifugado nas mesmas condições acima citadas e ressuspenso em 3ml de meio de crescimento [RPMI com fenol red (Gibco Life Technologies), suplementado com HEPES (25mmol/l - Sigma), L-glutamina (2mmol/l - Invitrogen), antibiótico antimicótico (1% - Sigma), e 20% de soro bovino fetal - SBF (Invitrogen) inativado por 30 minutos a 56 °C].

As células foram distribuídas em garrafas plásticas de cultura (25 cm²) sendo incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37° C. O meio de cultivo foi trocado a cada dois dias, até as culturas atingirem confluência de 90 a 100% de células aderidas.

3.4.1. Preparação das Células para Tratamento

Antes de todos os testes, com o intuito de retirar o estrógeno do meio (comum no SBF), as células foram cultivadas por 48 horas em meio de tratamento [RPMI sem fenol red (Gibco Life Technologies), suplementado com piruvato de sódio (1% - Sigma), L-glutamina (2mmol/l - Invitrogen), antibiótico antimicótico (1% - Sigma) e 5% de SBF (Invitrogen) depletado de estrógeno com carvão ativado (Sigma) e inativado por 30 minutos a 56 °C].

3.4.2. Depleção de Estrógeno do SBF

Após a inativação do SBF por 30 minutos a 56°C, a ele foi acrescentado, na proporção de 0,016 g/mL, carvão ativado e a mistura foi incubada em temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, o soro foi aliquoteado em tubos cônicos com rosca de 50 mL e centrifugado a 4000 g por 20 minutos para separação do carvão.

Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro comum e finalmente em filtros estéreis de 0,22 µm, para, então, serem armazenados em tubos cônicos com rosca de 15 mL a -4°C até o momento do uso.

3.5. Tratamento das Linhagens

Para análise dos efeitos dos compostos sobre a morte celular das duas linhagens de células estudadas, as mesmas foram tratadas com ESBF e com o ES, inicialmente, nas concentrações de 0,403; 0,546; 0,819; 1,092; 1,638; 2,184; 2,717 e 5,421 mg/mL, aqui denominadas respectivamente [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7] e [8]. Para efeito de comparação, os padrões de daidzeína (D) e genisteína (G), isoladamente ou em combinação (D+G) foram utilizados nos tratamentos nas mesmas concentrações encontradas no ESBF: genisteína (0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 10,0 μM) e daidzeína (0,94; 1,30; 1,93; 2,56; 3,83; 5,12; 6,38; 12,8 μM) respectivamente (tabela 02).

Identificação da concentração	Concentração do ESBF (mg/mL)	Concentração de daidzeína (μM)	Concentração de genisteína (μM)
[1]	0,403	0,94	0,75
[2]	0,546	1,3	1
[3]	0,819	1,93	1,5
[4]	1,092	2,56	2
[5]	1,638	3,83	3
[6]	2,184	5,12	4
[7]	2,717	6,38	5
[8]	5,421	12,8	10

Tabela 02: Relações das concentrações de daidzeína e genisteína contidas no ESBF.

A tabela 03 apresenta as concentrações de genisteína e daidzeína presentes no ES.

Identificação da concentração	Concentração do ES (mg/mL)	Concentração de daidzeína (μM)	Concentração de genisteína (μM)
[1]	0,403	0,06	0,06
[2]	0,546	0,08	0,08
[3]	0,819	0,12	0,11
[4]	1,092	0,16	0,15
[5]	1,638	0,25	0,22
[6]	2,184	0,33	0,30
[7]	2,717	0,41	0,37
[8]	5,421	0,82	0,74

Tabela 03: Concentrações de daidzeína e genisteína contidas no ES.

3.6. Citotoxicidade Celular

3.6.1. Ensaio de Viabilidade Celular

Para avaliar a citotoxicidade das isoflavonas (D e G, isoladas, ou em combinação – D+G), do ES, do ESBF e do DMSO nas linhagens em estudo foi utilizado o método de análise colorimétrica através do ensaio MTT [sal 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] (Sigma). O corante Thiazolyl blue, em sua forma oxidada, possui coloração amarela, mas adquire coloração azul em sua forma reduzida, conversão feita pelas desidrogenases mitocondriais. Partindo deste princípio, medindo por espectrofotometria a coloração obtida ao fim da reação, pode-se inferir a viabilidade celular das culturas tratadas comparando-as com o grupo controle (MOSMANN, 1983).

As células foram cultivadas em placa de 96 poços (1.10^4 células/por poço) em 200 μ L de meio de crescimento e incubadas em estufa de CO₂ a temperatura de 37°C. Após observância de confluência em aproximadamente 60% das células por campo e aderência das células à placa, o meio de crescimento foi retirado, lavando-se os poços duas vezes com PBS e colocando-se meio de tratamento. Após 48 horas de incubação, as células foram submetidas aos tratamentos com o ESBF, o ES e as isoflavonas, daidzeína e genisteína, (isoladas e em combinação) por 24 horas.

O controle de viabilidade continha apenas o meio de tratamento e o controle de morte celular, uma solução de meio de tratamento com 1% de Triton X 100. Após o período de 24 horas, acrescentou-se 20 μ L de MTT (solução de 5 mg/mL) em cada poço. Após incubação por 4 horas a 37 °C e 5% CO₂, retirou-se a solução de MTT e adicionou-se 200 μ L/poço de DMSO para solubilização dos sais de formazam. Após 3 horas, foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. A absorbância obtida das células não estimuladas foi considerada como 100% de viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

3.7. Avaliação da Integridade Celular

3.7.1. Ensaio de Marcação com Iodeto de Propídio

O iodeto de propídio liga-se ao DNA por intercalação entre as bases nitrogenadas da molécula, com pouca ou nenhuma preferência do tipo de base. Essa ligação ocorre com uma relação de aproximadamente uma molécula de IP para cada 4 ou 5 pares de nucleotídeos (SUZUKI, 1997). O IP é impermeável a membrana íntegra, o que exclui sua ligação com moléculas de células viáveis, sendo muito comum sua utilização para identificar populações de células mortas em técnicas de multi-coloração (MOORE, 1998).

O iodeto de propídio (IP) é excitável por laser de argônio (480nm) e emite fluorescência na faixa de 560-580 nm.

As células rompidas por tampão de lise expõem os núcleos. O IP se liga ao DNA, e as células contendo núcleos íntegros emitirão alta fluorescência. A condensação de cromatina e a fragmentação do DNA podem ser observadas pela ocorrência de eventos com baixa fluorescência. Isso se deve à menor marcação do DNA com o IP devido à condensação da cromatina. Além disso, pedaços menores de DNA captam menos IP, emitindo menor fluorescência (PERES, 2005).

3.7.1.1. Marcação de DNA em Célula Íntegra

Quando as células não são previamente lisadas e faz-se uso do IP para marcação, consegue-se obter apenas a marcação de DNA livre (no sobrenadante celular) e/ou marcação de DNA ainda no interior da célula. Neste último caso, a marcação só ocorre se o IP conseguir penetrar na célula através de poros na membrana celular, provavelmente ocasionadas pelo estado de necrose celular.

Neste ensaio, as células foram cultivadas em meio de crescimento (37 °C, 5% CO₂), em placas de 12 poços (2.10⁵ células/poço), por 24 horas e posteriormente preparadas (como já descrito no item 3.4.1) para, então, receberem os tratamentos.

Neste ensaio, ambas as linhagens celulares foram tratadas por 24 horas, nas concentrações de ESBF, ES e D+G [1], [3], [5] e [7]. Os tratamentos das células foram acompanhados de controle positivo (células não tratadas).

Após o período de tratamento, o sobrenadante foi coletado em tubos de ensaio identificados, o poço foi lavado com PBS e as células foram retiradas com uma solução tripsina/EDTA (0,2%/0,02%) (Gibco BRL, Life Technologies), deixando a solução agir por 5 minutos em estufa de CO₂ (5%) a 37 °C.

As suspensões foram aspiradas e colocadas nos respectivos tubos de ensaio. A suspensão foi então centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspensão com 200 µL meio de tratamento. A esta suspensão, foi acrescentado 1 µL de solução de IP (Sigma) (1mg/mL). Em seguida, amostras foram analisadas por citometria de fluxo (Citômetro FACSCanto - software DIVA - Becton Dickinson, CA, EUA).

Como controle, foram utilizadas células cultivadas nas mesmas condições, porém submetidas apenas ao meio de tratamento.

3.7.1.2. Determinação da Fragmentação de DNA

Este ensaio foi realizado conforme descrito em NICOLLETTI et al. (1991). E assim como no ensaio anteriormente descrito (item 3.7.1.2), as células das duas linhagens foram cultivadas em meio de crescimento (37 °C, 5% CO₂), em placas de 12 poços (2x10⁵ células/poço), por 24 horas e posteriormente preparadas (como já descrito no item 3.4.1) para, então, receberem os tratamentos nas concentrações de ESBF, ES e D+G [1], [3], [5] e [7] por 24 horas. Os testes foram acompanhados de controle (células cultivadas em meio sem tratamento).

Após o período de tratamento, as células foram lavadas com PBS e removidas dos poços com uma solução tripsina/EDTA (0,2%/0,02%) (Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD), deixando a solução agir por 5 minutos em estufa de CO₂(5%) a 37°C. A solução foi aspirada e colocada em tubo cônico. Neutralizou-se a ação da tripsina pela adição de 3 mL de meio de crescimento. As células foram submetidas à centrifugação por 5 minutos a 1000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspensão em 500 µL de tampão citrato-

triton-IP (0.1% citrato de sódio, 0.1% Triton X-100, iodeto de propídio 50 µg/mL) e incubado por até 18 horas no escuro a 4°C. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (Citômetro FACSCanto - software DIVA - Becton Dickinson, CA, EUA).

3.7.2. Ensaio de Apoptose por Marcação com Anexina-V e Iodeto de Propídio

A anexina-V tem capacidade de se ligar fortemente aos fosfolipídeos de membrana plasmática, sobretudo as fosfatidilserinas (FS) externalizadas, através de suas cargas negativas na presença de íons cálcio (VAN HEERDE et al, 2000). A taxa de associação sugere que a anexina-V não penetra na membrana e comporta-se como uma proteína extrínseca de membrana plasmática. Assim, a translocação da FS presente na face interna para a face externa da membrana celular e a ligação de anexina V é uma forte evidência de apoptose (MOCHIZUKI, 2003).

Ao utilizar anexina-V marcada com FITC para detecção de apoptose é possível avaliar os níveis de FS expostas na membrana celular externa, indicando fase inicial de apoptose (apoptose precoce). Associando iodeto de propídio (IP), pode-se avaliar células com permeabilidade de membrana, o que pode indicar fase tardia de apoptose ou necrose. Uma vez que, tanto no processo de apoptose tardia, quanto na necrose, a anexina-V pode atravessar a membrana permeabilizada ao mesmo tempo em que o IP entra no citosol (PEC et al, 2003).

Para o ensaio, as células das linhagens MCF-7 e SK-BR-3 foram cultivadas isoladamente em meio de crescimento (37 °C, 5% CO₂), em placas de 12 poços (2.10⁵ células/poço), por 24 horas e posteriormente preparadas (como já descrito no item 3.4.1) para, então, receberem os tratamentos nas concentrações de ESBF, ES e D+G [1], [3], [5] e [7] por 24 horas. Os testes foram acompanhados de controle (células cultivadas em meio sem tratamento).

Após o período de tratamento, o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com PBS (para retirada de todo o meio) e removidas dos poços com uma solução tripsina/EDTA (0,2%/0,02%) (Gibco BRL, Life Technologies, Garithesburb, MD), deixando a solução agir por 5 minutos em estufa de CO₂ (5%) a

37°C. A solução foi aspirada e colocada em tubo cônico. Neutralizou-se a ação da tripsina pela adição de 3 mL de PBS gelado (4°C). As células foram submetidas à centrifugação a 10 °C por 10 minutos a 1000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspensão em 200 µL de tampão de ligação [10 mM de HEPES (Sigma), 140 mM de NaCl, 2,5 mM de CaCl₂] e 1 µL de Anexina-V (Caltag). Os tubos foram incubados em gelo por 15 minutos, acrescido a suspensão 4 µL de IP (Sigma) (100 µg/mL) e imediatamente lidos em citômetro de fluxo (Citômetro FACSCanto - software DIVA - Becton Dickinson, CA, EUA).

3.8. Pesquisa da expressão de caspase-3 e caspase-3 clivada por Western Blotting

Para a pesquisa de caspase-3, as células da linhagem MCF-7 foram cultivadas em meio de crescimento (37°C, 5% CO₂), em placas de 12 poços (2.10⁵ células/poço), por 24 horas e posteriormente preparadas (como já descrito no item 3.4.1) para, então, receberem os tratamentos com ESBF e com a combinação D+G, nas concentrações de [1], [3], [5] e [7], por 24 horas. Para a pesquisa de caspase-3 clivada, as células MCF-7 foram tratadas com ESBF nas concentrações de [1] e [5], e com D+G na concentração [7]. Como controle, foram utilizadas proteínas caspase-3 e caspase-3 clivada de linhagens celulares.

3.8.1. Extração das proteínas por SDS-PAGE

Após os tratamento às células foi adicionada uma solução tripsina/EDTA (0,2%/0,02%) (Gibco BRL, Life Technologies), deixando a solução agir por 5 minutos em estufa de CO₂ (5%) a 37 °C. Após esse período, o sobrenadante foi aspirado, depositado em microtubos e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. O *pellet* de células foi ressuspensão em tampão de amostra [0,125M Tris-HCl (pH 6.8), ; 20% de glicerol; 4% de SDS; 10% de β-mercaptoetanol; e 0,012% de azul de bromofenol] e incubado por 30 minutos a 100°C em banho seco, seguido de incubação por 5 minutos em gelo para desnaturação. Após esse período, as amostras foram

centrifugadas a 10000 g por 5 minutos para remoção do material insolúvel. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e armazenado a -20°C até o momento de sua dosagem.

As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida [gel de corrida a 12%, (para separação da caspase-3) ou 15% (para separação da caspase-3 clivada) de poliacrilamida, 2,5 mL de Tris-HCl (1,5 M pH 8,8), 100 µL de SDS (10%), 50 µL de persulfato de amônio (10%), 5 µL de TEMED, 2,4 mL de água destilada], em um sistema de eletroforese vertical (BioRad), com uma fonte de energia de amperagem constante de 15 ou 20 mA por gel, durante aproximadamente 90 minutos, na presença de tampão de corrida [3,0285 g de Tris base (25 mM), 14,2633 g de glicina (190 mM), 1,0 g de SDS (0,1%), água destilada qsp 1000 mL].

3.8.2. Eletrotransferência para membrana de nitrocelulose

As proteínas separadas em géis de poliacrilamida foram eletrotransferidas para folhas de papel de nitrocelulose (0,45µM, AMERSHAM BIOSCIENCES, GE, USA), por meio de um sistema de eletroforese horizontal. Para isso, as membranas e os géis foram previamente estabilizados em água destilada e tampão de transferência [3,0285 g de Tris base (25 mM); 14,2633 g de glicina (190 mM); 200 mL de metanol (20%) e água destilada qsp 1000 mL] respectivamente, por 10 minutos. Feito isso, membrana e gel foram postos em contato (sistema de “sandwich”) para eletrotransferência por cerca de 2 horas a 325 mA constantes.

3.8.3. Western blotting ou Imunofluorescência de Proteína

Os papéis de nitrocelulose contendo as proteínas de interesse foram incubadas por 1 hora, em temperatura ambiente, em solução TBS-Tween acrescido de leite (100 mM de Tris-HCl; 0,9% de NaCl; 0,1% de Tween 20; e 5% de leite desnatado em pó) para bloqueio. O papel de nitrocelulose, posteriormente, foi incubado sob agitação por 5 minutos, duas vezes, em TBS (100 mM de Tris-HCl; 0,9% de NaCl). Depois disto, as membranas foram incubadas com os anticorpos

anti-caspase-3 (BD-557035) e anti-caspase-3 clivada (Cell Signaling-9661), respectivamente, em solução 1:1000 com TBS-Tween durante cerca de 16 horas a temperatura ambiente.

Após esse período, as membranas foram incubadas sob agitação com solução de TBS-Tween, por 10 minutos, 3 vezes. Posteriormente, foram incubadas com solução 1:1000 de anticorpo secundário específico (Affinipure Goat – Jackson ImmunoResearch para caspase íntegra e Dako para caspase clivada) conjugado a peroxidase por 1 hora. Feito isso, a membrana foi novamente lavada com TBS-Tween, 3 vezes, por 10 minutos. As membranas, então foram lavadas sucessivas vezes com kit de marcação (Immun-Star HRP – Bio Rad). A membrana foi lavada com água destilada e a marcação foi revelada em filme fotográfico.

Como controle da reação, foi utilizada a marcação da α -tubulina utilizando anticorpo primário anti-tubulina (Sigma-T3320).

3.9. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada através do programa Graph Pad Prism (versão 4 Prism, Graph Pad, USA). Utilizou-se a análise de variância entre os grupos (ANOVA) “one-way”, e o teste complementar de Tukey, considerando-se um nível de significância $p < 0.05$.

4. Resultados

4.1. Viabilidade Celular

Os experimentos de citotoxicidade foram realizados para determinar que concentrações do ESBF possuíam efeito redutor tanto nas células da linhagem MCF-7, quanto nas células da linhagem SK-BR-3. Para isso, foi utilizado o método de análise colorimétrica com corante MTT, após 24 horas de tratamento. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade em relação ao controle (células não tratadas). Foram utilizadas as mesmas concentrações de ES e concentrações equivalentes de daidzeína (D) e genisteína (G) encontradas no ESBF, isoladas e em combinação. Como controle de viabilidade foram utilizadas células das linhagens cultivadas sem tratamento.

Como se pode observar na tabela 04, os resultados mostram que as células MCF-7 tratadas com o ESBF, apresentaram diminuição significativa de sua viabilidade nas concentrações [6], [7] e [8], porém apresentaram aumento significativo da viabilidade na concentração [4]. A linhagem MCF-7 tratada com ES, apresentou aumento significativo na viabilidade celular nas concentrações de [4] a [8]. Enquanto que daidzeína na concentração [2] e genisteína na concentração [3], as células da linhagem MCF-7 apresentaram aumento significativo da viabilidade (Figura 04).

O resultados encontrados com as células SK-BR-3, como mostra a tabela 05 nos indica que frente o tratamento com o ESBF, as células SK-BR-3 também apresentaram diminuição significativa de sua viabilidade nas concentrações [6], [7] e [8]. Enquanto que com ES, a linhagem SK-BR-3 apresentou aumento significativo na viabilidade celular nas concentrações [1], [2], [5], [6] e [7]. Como tratamento com daidzeína e genisteína (tratamentos isolados ou em combinação) não houve alteração significativa em nenhuma das concentrações (Figura 05).

Tabela 04: Efeito dos tratamentos na viabilidade celular de MCF-7

Grupo	Viabilidade celular (%)
Controle	100,00
ESBF [1]	146,89
ESBF [2]	119,52
ESBF [3]	139,17
ESBF [4]	160,04*
ESBF [5]	108,41
ESBF [6]	38,27*
ESBF [7]	3,51**
ESBF [8]	0,53**
ES [1]	119,46
ES [2]	107,30
ES [3]	113,63
ES [4]	143,38**
ES [5]	155,13**
ES [6]	167,57**
ES [7]	155,31**
ES [8]	154,25**

Grupo	Viabilidade celular (%)
Daidzeína [1]	128,16
Daidzeína [2]	139,49*
Daidzeína [3]	123,55
Daidzeína [4]	107,86
Daidzeína [5]	97,93
Daidzeína [6]	123,68
Daidzeína [7]	115,63
Genisteína [1]	118,33
Genisteína [2]	127,08
Genisteína [3]	133,83*
Genisteína [4]	112,30
Genisteína [5]	97,97
Genisteína [6]	130,54
Genisteína [7]	127,88
Genisteína [8]	108,86
D + G [1]	107,38
D + G [2]	129,08
D + G [3]	117,99
D + G [3]	117,99
D + G [4]	117,54
D + G [5]	79,42
D + G [6]	79,79
D + G [7]	92,65
D + G [8]	97,82

Os valores estão expresos em % em relação ao controle (células não tratadas).
 Os dados apresentados representam a média de experientos realizados em triplicata.
 *p.<0,05, comparado com controle, **p<0,001, comparado com controle.

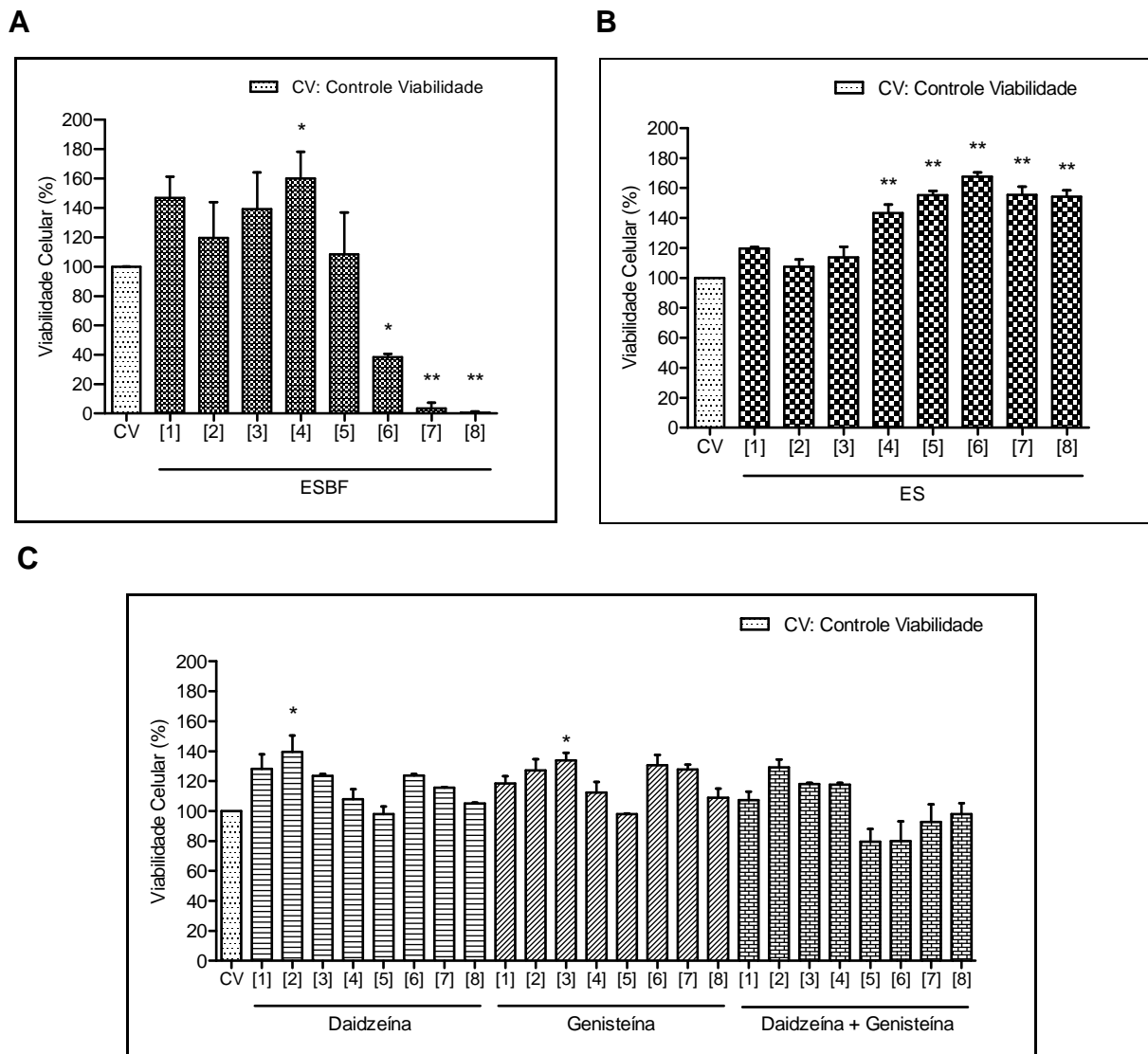


Figura 04: Viabilidade das culturas de MCF-7 após 24 horas.

As células MCF-7 ($1 \cdot 10^4$ cél/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços com meio de tratamento e incubadas com ESBF (A), ES (B) e a daidzeína e a genisteína isoladas ou em combinação (C). Como controle de viabilidade celular utilizou-se células em meio de cultura (CV) (não tratadas). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs controle de viabilidade, ** $p < 0,001$ vs controle de viabilidade.

Tabela 05: Efeito dos tratamentos na viabilidade celular de SK-BR-3

Grupo	Viabilidade celular (%)
Controle	100,00
ESBF [1]	101,11
ESBF [2]	85,80
ESBF [3]	88,73
ESBF [4]	102,81
ESBF [5]	89,42
ESBF [6]	11,54**
ESBF [7]	4,94**
ESBF [8]	6,70**
ES [1]	147,03*
ES [2]	147,49*
ES [3]	123,23
ES [4]	141,13
ES [5]	160,41**
ES [6]	163,61**
ES [7]	159,07**
ES [8]	140,05

Grupo	Viabilidade celular (%)
Daidzeína [1]	109,28
Daidzeína [2]	125,41
Daidzeína [3]	108,76
Daidzeína [4]	106,11
Daidzeína [5]	112,02
Daidzeína [6]	136,38
Daidzeína [7]	119,96
Daidzeína [8]	105,86
Genisteína [1]	103,34
Genisteína [2]	125,04
Genisteína [3]	107,39
Genisteína [4]	99,97
Genisteína [5]	139,55
Genisteína [6]	135,46
Genisteína [7]	122,22
Genisteína [8]	87,57
D + G [1]	97,32
D + G [2]	114,57
D + G [3]	114,33
D + G [4]	97,49
D + G [5]	87,14
D + G [6]	120,68
D + G [7]	82,79
D + G [8]	77,96

Os valores estão expresos em % em relação ao controle (células não tratadas).
 Os dados apresentados representam a média de experientos realizados em triplicata.
 *p.<0,05, comparado com controle, **p<0,001, comparado com controle.

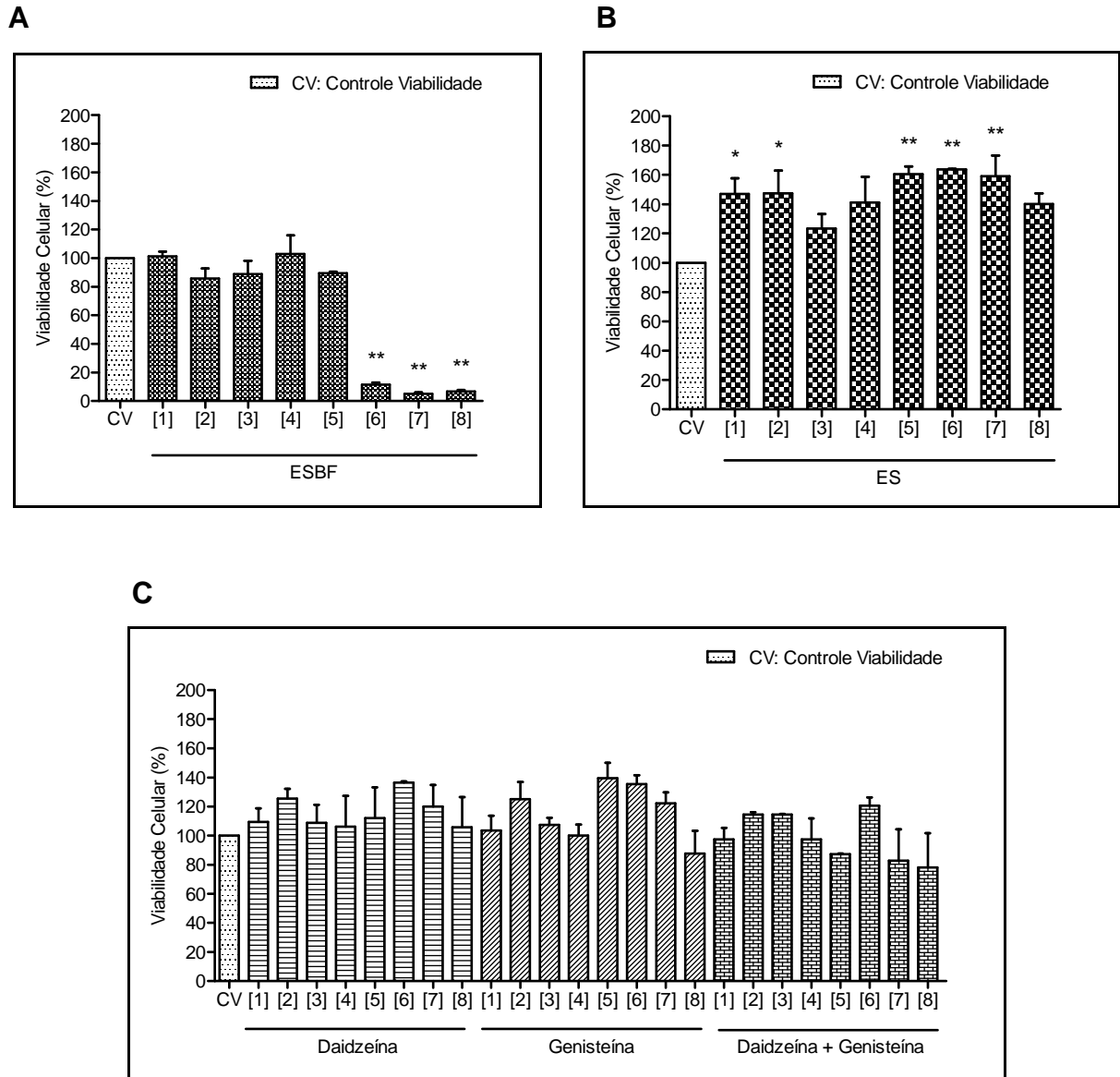


Figura 05: Viabilidade das culturas de SK-BR-3 após 24 horas.

As células SK-BR-3 (1.10^4 cél/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços com meio de tratamento e incubadas com ESBF (A), ES (B) e a daidzeína e a genisteína isoladas ou em combinação (C). Como controle de viabilidade celular utilizou-se células em meio de cultura (CV) (não tratadas). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs controle de viabilidade, ** $p < 0,001$ vs controle de viabilidade.

4.2. Avaliação da Integridade Celular

4.2.1. Ensaio de Marcação com Iodeto de Propídio (IP)

4.2.1.1. Marcação de DNA em Célula Íntegra

Uma das características do estado de necrose celular e também de apoptose tardia é a presença de poros na membrana plasmática. Sendo assim, para avaliação da integridade da membrana plasmática das células, e portanto avaliação de possível estado necrótico celular, foi realizado ensaio de marcação de DNA por iodeto de propídio (IP) em células tratadas ou não e não lisadas experimentalmente. A célula que apresentasse poros em sua membrana, permitiria a passagem do iodeto de propídio pela mesma, e, portanto, apresentaria marcação pelo IP.

Para este teste, células de linhagem MCF-7 e SK-BR-3 foram tratadas por 24 horas com os ESBF, ES ou com a combinação D+G em duas das concentrações que não causaram diminuição da viabilidade celular [1] e [3], e também com duas concentrações que, no teste de citotoxicidade, apresentaram diminuição significativa da mesma: as concentrações [5] e [7]. Como controle, foram utilizadas células cultivadas sem tratamento. Os resultados foram expressos em porcentagem de marcação em relação ao controle (células não tratadas).

Os resultados indicam que, no tratamento com ESBF, as células MCF-7 apresentaram aumento significativo de marcação nas concentrações [5] e [7]. Entretanto, não foi observada marcação significativa em nenhum dos outros tratamentos, com ES e com os FE associados (D+G) (tabela 06, figura 06). Enquanto que as células da linhagem SK-BR-3, apresentaram aumento significativo de marcação apenas na concentração [7] do tratamento com ESBF (tabela 07, figura 07).

Tabela 06: Percentual de células de linhagem MCF-7 com caráter necrótico tratadas com ESBF, ES e D+G.

Grupo	Necrose (%)
Controle	4,90
ESBF [1]	7,90
ESBF [3]	14,45
ESBF [5]	56,83**
ESBF [7]	64,57**
ES [1]	2,93
ES [3]	4,40
ES [5]	3,07
ES [7]	4,90
D + G [1]	16,25
D + G [3]	17,10
D + G [5]	6,80
D + G [7]	7,95

Os valores estão expresos em % em relação ao controle (células não tratadas). Os dados apresentados representam a média de experientos realizados em triplicata. Nenhuma diferença significativa foi observada.

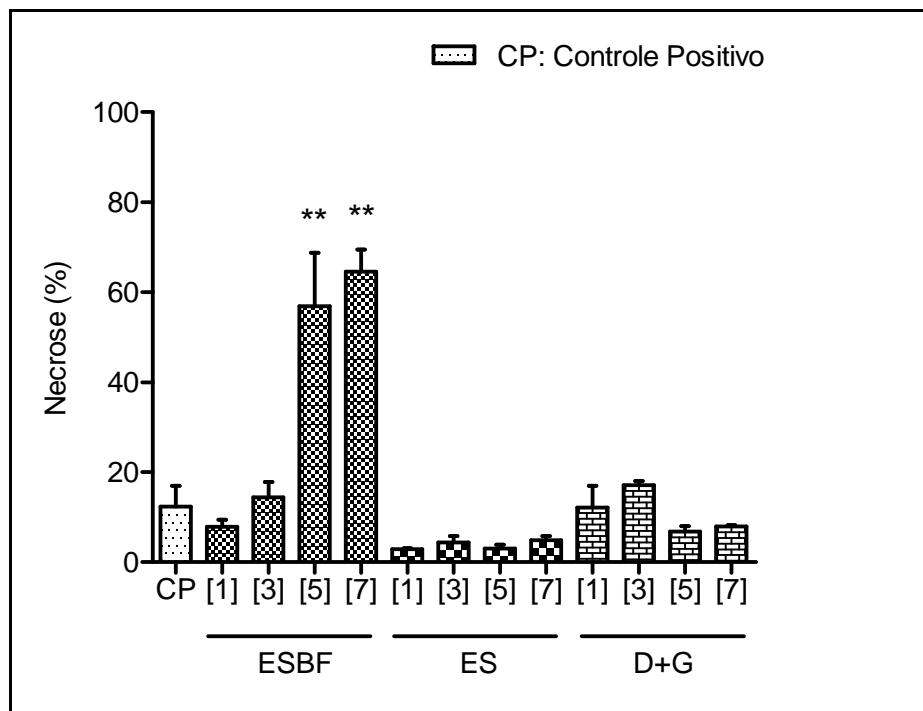


Figura 06: Células de linhagem MCF-7 com caráter necrótico frente após tratamentos.

As células MCF-7 ($2 \cdot 10^5$ cél/poço) foram cultivadas em placas de 12 poços com meio de tratamento e incubadas com ESBF, ES e daidzeína e genisteína em combinação (D+G). Como controle positivo utilizou-se células em meio de cultura (CP) (não tratadas). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. ** $p < 0,001$ vs controle.

Tabela 07: Percentual de células de linhagem SK-BR-3 com caráter necrótico após tratamento com ESBF, ES e D+G.

Grupo	Necrose (%)
Controle	15,40
ESBF [1]	11,27
ESBF [3]	22,53
ESBF [5]	21,53
ESBF [7]	30,87*
ES [1]	23,17
ES [3]	24,67
ES [5]	22,83
ES [7]	23,57
D + G [1]	14,03
D + G [3]	16,80
D + G [5]	15,47
D + G [7]	19,50

Os valores estão expresos em % em relação ao controle (células não tratadas).
Os dados apresentados representam a média de experientos realizados em triplicata.
*p.<0,05, comparado com controle.

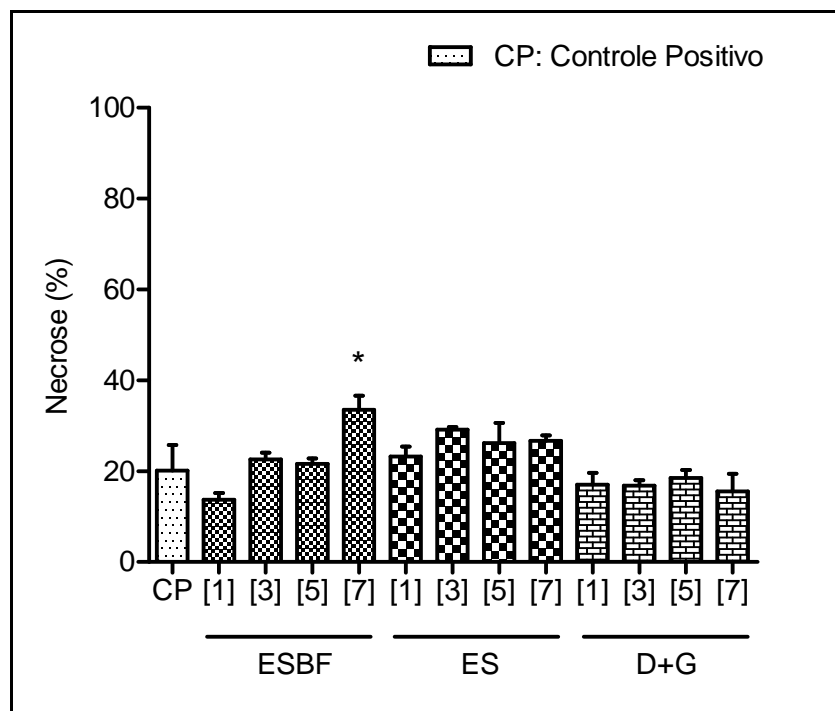


Figura 07: Células de linhagem SK-BR-3 com caráter necrótico após tratamentos.

As células SK-BR-3 ($2 \cdot 10^5$ cél/poço) foram cultivadas em placas de 12 poços com meio de tratamento e incubadas com ESBF, ES e daidzeína e genisteína em combinação (D+G). Como controle positivo utilizou-se células em meio de cultura (CP) (não tratadas). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de experientos realizados em triplicata. *p.<0,05 vs controle.

4.2.1.2. Determinação da Fragmentação de DNA

Quando a célula inicia seu processo de apoptose, uma das primeiras medidas é a fragmentação do seu DNA, por enzimas competentes e a condensação da cromatina. Estas células, quando lisadas, expõem seu material genético a ligação com IP. O DNA fragmentado será pouco marcado pela presença desta molécula fluorescente, por não haver sequências de bases nitrogenadas expostas e em diploidia suficientes para tal ligação. Assim, quanto menor for o sinal de fluorescência da célula, maior será a quantidade de DNA fragmentado ou cromatina condensada, indicando processo de apoptose.

Desta forma, durante a análise da citometria de fluxo, foram consideradas células apoptóticas (hipodiplóides) aquelas que apresentavam menor fluorescência no comprimento de onda de 560-580 nm (indicativo da presença de IP). Para este teste, assim como no anterior, as células das duas linhagens foram tratadas por 24 horas com o ESBF, ou ES ou com a combinação D+G nas concentrações [1], [3], [5] e [7]. Como controle, foram utilizadas células cultivadas sem tratamento.

Os resultados sugerem o ESBF nas concentrações de [5] e [7], a quantidade de células de ambas as linhagens (MCF-7 e SK-BR-3) em apoptose é significativamente maior quando comparadas às células controle (sem tratamento) (tabelas 08 e 09). Enquanto que em todas as outras concentrações do ES e da combinação D+G, não foi observado nenhuma diferença significativa (figuras 08 e 09).

Tabela 08: Percentual de células de linhagem MCF-7 com caráter apoptótico após tratamentos com ESBF, ES e D+G.

Grupo	Apoptose (%)
Controle	5,77
ESBF [1]	2,00
ESBF [3]	3,10
ESBF [5]	85,90**
ESBF [7]	98,60**
ES [1]	10,73
ES [3]	8,53
ES [5]	8,70
ES [7]	11,55
D + G [1]	2,80
D + G [3]	2,70
D + G [5]	2,50
D + G [7]	2,60

Os valores estão expresos em % em relação ao controle (células não tratadas).
Os dados apresentados representam a média de experientos realizados em triplicata.
**p<0,001, comparado com controle.

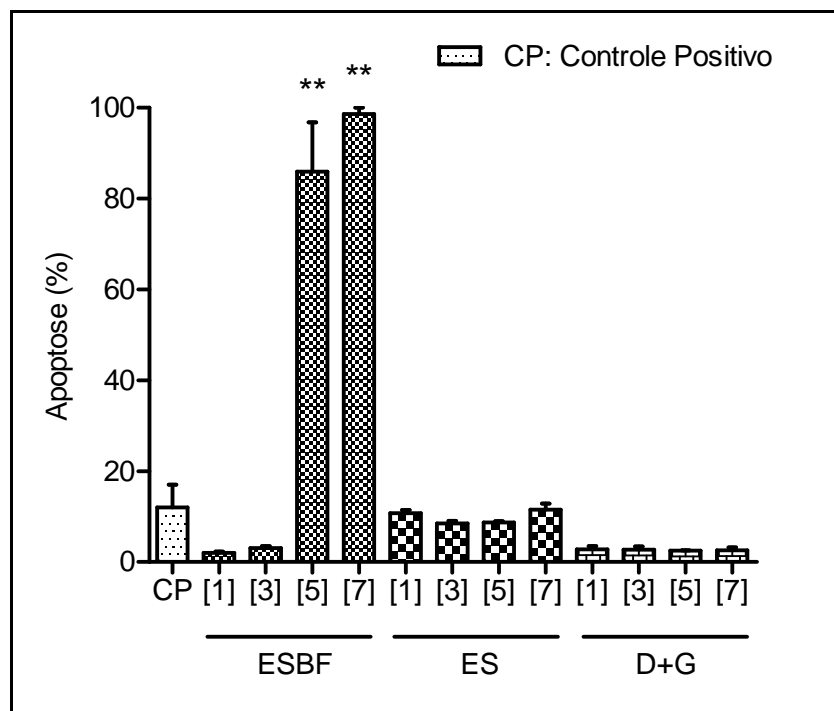


Figura 08: Células de linhagem MCF-7 com caráter apoptótico após tratamentos.

As células MCF-7 (1.10^4 cél/poço) foram cultivadas em placas de 12 poços com meio de tratamento e incubadas com ESBF, ES e daidzeína e genisteína em combinação (D+G). Como controle positivo utilizou-se células em meio de cultura (CP) (não tratadas). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. **p<0,001 vs controle.

Tabela 09: Percentual de células de linhagem SK-BR-3 com caráter apoptótico após tratamentos com ESBF, ES e D+G.

Grupo	Apoptose (%)
Controle	2,65
ESBF [1]	11,63
ESBF [3]	11,87
ESBF [5]	40,70**
ESBF [7]	50,40**
ES [1]	5,83
ES [3]	5,33
ES [5]	3,70
ES [7]	3,10
D + G [1]	10,43
D + G [3]	5,20
D + G [5]	5,53
D + G [7]	5,45

Os valores estão expresos em % em relação ao controle (células não tratadas).
Os dados apresentados representam a média de experientos realizados em triplicata.
**p<0,001, comparado com controle.

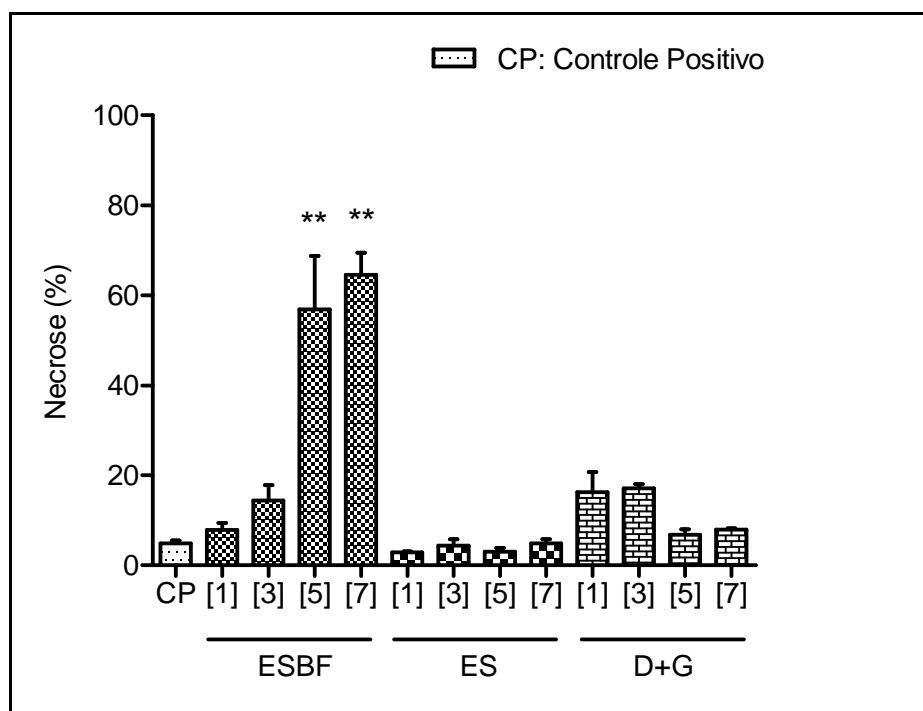


Figura 09: Células de linhagem SK-BR-3 com caráter apoptótico após tratamentos.

As células SK-BR-3 (2.10^5 cél/poço) foram cultivadas em placas de 12 poços com meio de tratamento e incubadas com ESBF, ES e daidzeína e genisteína em combinação (D+G). Como controle positivo utilizou-se células em meio de cultura (CP) (não tratadas). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. **p<0,001 vs controle.

4.2.2. Ensaio de Apoptose por Marcação com Anexina-V e Iodeto de Propídio

Para melhor diferenciação e avaliação do estado de apoptose (precoce ou tardia) ou necrose celular causado pelo ESBF, o ensaio de anexina-V por citometria de fluxo foi realizado em ambas as linhagens tratadas por 24 horas com ESBF, ES e com a combinação D+G nas concentrações [1], [3], [5] e [7]. Como controle, foram utilizadas células cultivadas sem tratamento.

Foram consideradas células em apoptose precoce aquelas marcadas apenas com anexina-V (anexina-V+ IP-) e células necróticas ou apoptóticas tardias aquelas que apresentavam ou não marcação de anexina com marcação para IP positivo (anexina-V+/- IP+).

Os resultados sugerem que as células de linhagem MCF-7, nas concentrações [3] e [5], apresentaram aumento do percentual de células em apoptose precoce em relação às células não tratadas. Enquanto que ESBF na concentração [7], apresentou aumento significativo no percentual de células em apoptose tardia ou necrose. Para todos os outros compostos e concentrações, não foram observados aumentos significativos (tabela 10, figura 10).

Na linhagem SK-BR-3, apesar do aumento na apoptose tardia/necrose na concentração [7] de ESBF, em relação ao controle, estatisticamente, o aumento não é significativo (tabela 11, figura 11).

Tabela 10: Percentual de células de linhagem MCF-7 marcadas por anexina-V conjugada com FITC e iodeto de propídio.

Grupo	Marcação (%)	
	Anexina (+) IP (-)	Anexina (+/-) IP (+)
Controle	2,23	15,30
ESBF [1]	3,63	16,30
ESBF [3]	8,67*	14,93
ESBF [5]	15,10**	11,53
ESBF [7]	7,27	28,47**
ES [1]	3,53	18,90
ES [3]	4,67	15,20
ES [5]	4,13	11,87
ES [7]	5,47	8,60
D + G [1]	1,17	19,60
D + G [3]	2,03	18,97
D + G [5]	0,80	19,00
D + G [7]	1,33	28,63

Os valores estão expresos em % em relação ao controle (células não tratadas).

Os dados apresentados representam a média de experientos realizados em triplicata.

**p<0,001, comparado com controle.

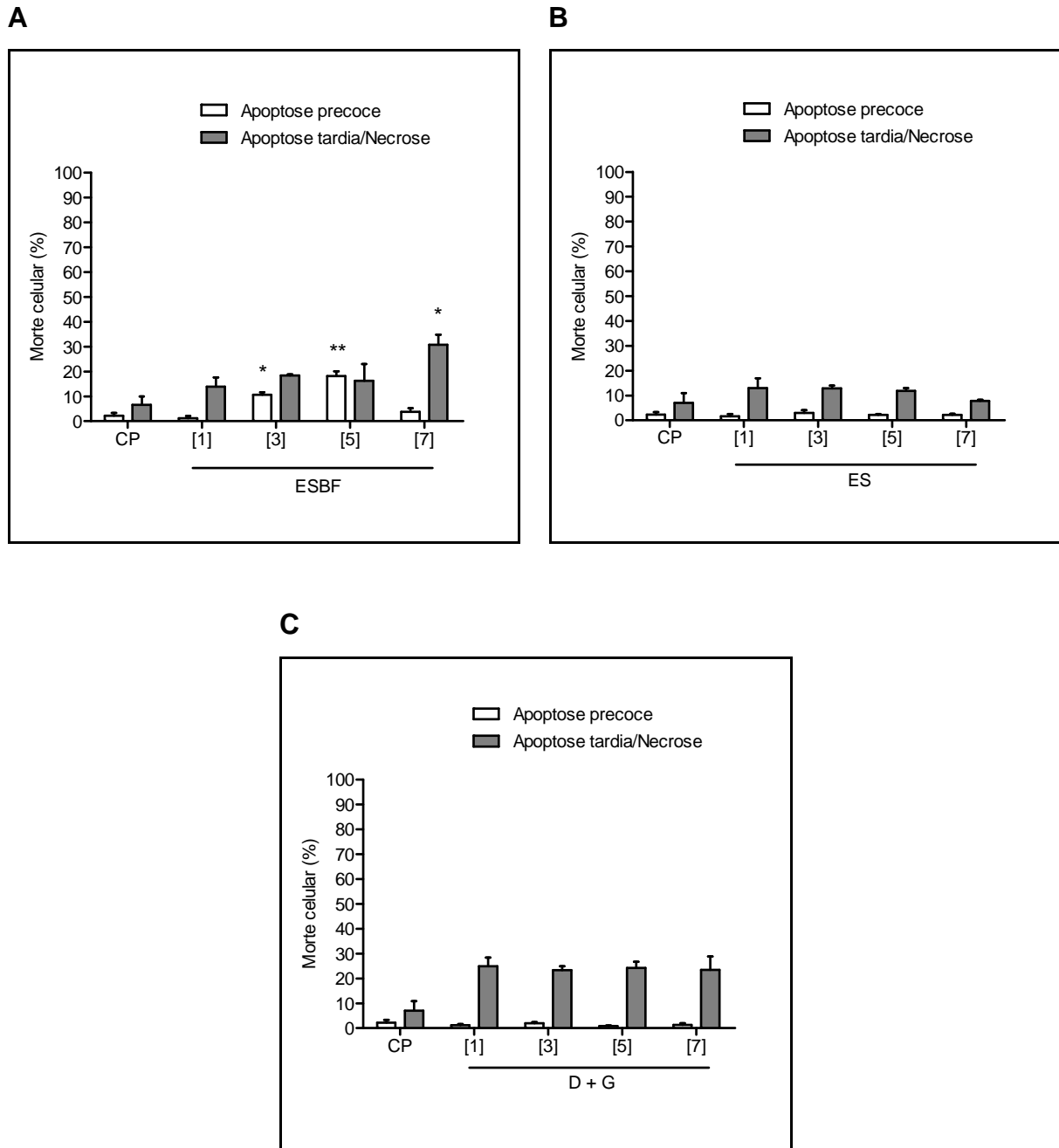


Figura 10: Ensaio de apoptose por citometria de fluxo utilizando anexina-V conjugada com FITC e iodeto de potássio.

As células MCF-7 ($2 \cdot 10^5$ cél/poço) foram cultivadas em placas de 12 poços com meio de tratamento e incubadas com ESBF (A), ES (B) e daidzeína e genisteína em combinação (D+G) (C). Como controle positivo utilizou-se células em meio de cultura (CP) (não tratadas). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs controle positivo, ** $p < 0,001$ vs controle positivo.

Tabela 11: Percentual de células de linhagem SK-BR-3 marcadas por anexina-V conjugada com FITC e iodeto de propídio.

Grupo	Marcação (%)	
	Anexina (+) IP (-)	Anexina (+/-) IP (+)
Controle	3,30	11,00
ESBF [1]	11,25	15,80
ESBF [3]	10,15	14,20
ESBF [5]	9,35	25,20
ESBF [7]	11,80	26,40
ES [1]	9,60	16,05
ES [3]	23,65	13,80
ES [5]	22,10	16,30
ES [7]	26,20	10,95
D + G [1]	5,05	15,55
D + G [3]	7,45	12,60
D + G [5]	5,50	14,65
D + G [7]	5,40	14,45

Os valores estão expresos em % em relação ao controle (células não tratadas).
Os dados apresentados representam a média de experientos realizados em triplicata.

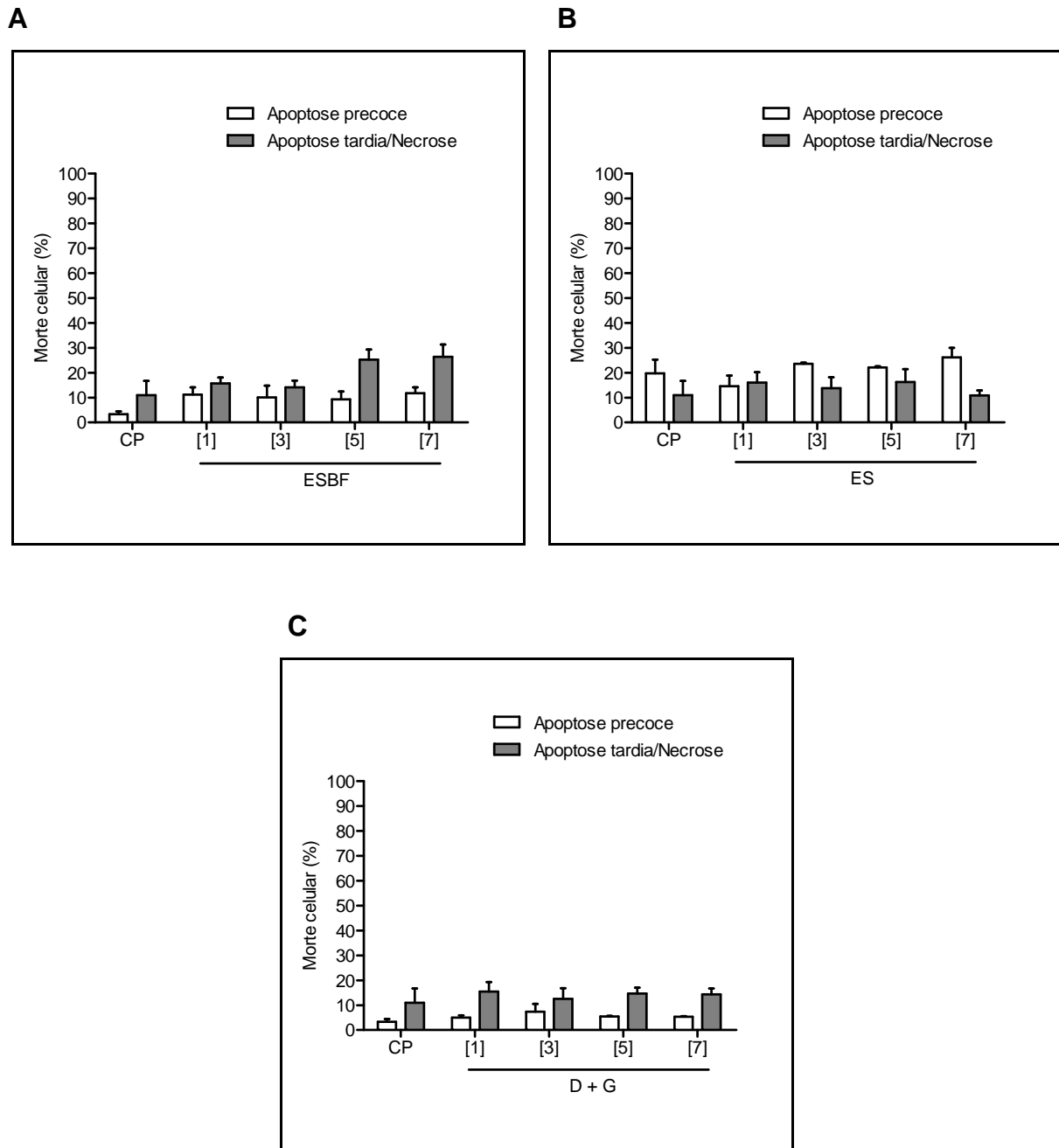


Figura 11: Ensaio de apoptose por citometria de fluxo utilizando anexina-V conjugada com FITC e iodeto de propídio.

As células SK-BR-3 (2.10^5 cél/poço) foram cultivadas em placas de 12 poços com meio de tratamento e incubadas com ESBF (**A**), ES (**B**) e daidzeína e genisteína em combinação (D+G) (**C**). Como controle positivo utilizou-se células em meio de cultura (CP) (não tratadas). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata.

4.3. Pesquisa da Expressão de Caspase-3 e Caspase-3 Clivada por Western Blotting

Foi utilizada a técnica de Western Blotting (ou Imunofluorescência de Proteína) para avaliar morte celular da linhagem MCF-7 após tratamentos com ESBF. Foram pesquisadas a presença de caspase-3 íntegra e de caspase-3 clivada, esta última como indicativo de ativação das via das caspases no sistema de apoptose.

Desde modo, foram utilizadas proteínas extraídas de células da referida linhagem, previamente tratadas por 24 horas. Para a pesquisa da presença da caspase-3 (íntegra), as células foram tratadas com ESBF e D+G (este último para controle do tratamento) nas concentrações [1], [3], [5] e [7]. E para a pesquisa da presença de caspase clivada, as células foram tratadas com ESBF nas concentrações [1] e [5] e com a associação D+G na concentração [5] (esta última como controle do tratamento). Como controle positivo (CP) da reação, utilizamos proteínas extraídas de células que previamente já se havia detectado a presença de ambas caspases pesquisadas. E para controle da quantidade de proteínas, foi usada marcação da α -tubulina.

Na marcação da caspase-3 íntegra, foi observada marcação nas amostras após tratamento com ESBF nas concentrações [1] e [3] e com D+G nas concentrações [1], [3], [5] e [7], sugerindo que nas concentrações de ESBF [5] e [7] não é possível detectar a presença da proteína (figura 04).

Por outro lado, na marcação da caspase-3 clivada, não foi possível observar marcação em nenhuma das amostras pesquisadas, sugerindo ausência dessa proteína após o tratamento (dados não mostrados).

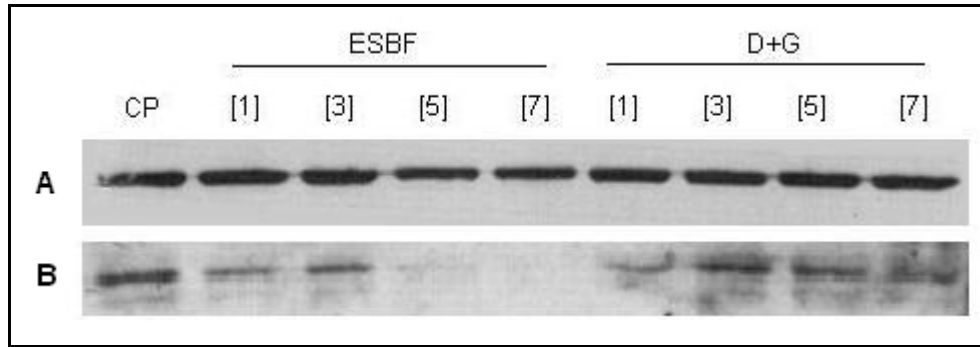


Figura 12: Expressão de proteínas das células de linhagem MCF-7 por western blotting.

As células MCF-7 foram cultivadas em meio de tratamento e incubadas com ESBF e D+G nas concentrações [1], [3], [5] e [7] por 24 horas. **(A)** proteínas de α -tubulina, **(B)** caspase-3 íntegra, (CP) controle positivo.

5. Discussão

A menopausa na vida da mulher sadia é um estágio fisiológico obrigatório, devido à inevitável falência dos folículos ovarianos. No entanto, a melhoria de qualidade de vida e os avanços na medicina têm aumentado a expectativa de vida do ser humano gradativamente, levando, conseqüentemente, ao aumento de tempo produtivo de homens e mulheres. Entretanto, a fisiologia feminina delimita que, cessado o período de fertilidade reprodutiva, os hormônios gonadotróficos apresentam uma diminuição gradativa, levando a sintomas característicos desta fase, como ansiedade, depressão, sudorese, fadiga, além de doenças cardiovasculares e outros (GRACIA et al, 2005; NIH CONFERENCE, 2005). E para que esses sintomas não causem prejuízo na qualidade de vida feminina, é aconselhável o uso de terapias de reposição hormonal (TRH) para minimizá-los (RINGA, 2000). A literatura aponta que usuárias atuais e recentes da TRH correm um risco maior de desenvolver câncer de mama do que as mulheres que nunca usaram a terapia hormonal, sendo que o risco aumenta com a duração do uso de hormônios, ao mesmo tempo em que diminui significativamente após cessação da terapia (WHO, 2006).

O câncer de mama é uma das patologias de maior morbidade e mortalidade entre as mulheres, sendo, como já relatado aqui (WHO, 2011). O número de casos novos de câncer de mama estimados para o Brasil em 2010 foi de 49.240, com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres. Sendo que na Região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres, com um risco estimado de 65 casos novos por 100 mil (BRASIL, 2009).

Muitos estudos epidemiológicos têm indicado que hormônios sexuais endógenos, principalmente os estrogênios, desempenham um papel importante na etiologia do câncer de mama. A análise conjunta de nove estudos prospectivos mostrou que estrogênios mais elevados e seus precursores andrógenos foram associados a um maior risco de câncer de mama em mulheres pós-menopausa (KEY et al, 2002). As diferenças quanto aos níveis de hormônio sexual entre as populações podem, portanto, contribuir para a variação na incidência de câncer de mama entre os países e regiões (IWASAKI et al, 2011).

Assim, desde que os primeiros estudos a respeito dos efeitos colaterais oriundos dessas terapias, citaram aumento no número de casos de câncer e outras patologias relacionadas à administração de hormônios exógenos, a TRH tradicional

tem sido posta a prova (HURLEY et al.; 1998). Concomitante a isso, pesquisas epidemiológicas passaram a relacionar a dieta rica em soja à baixa incidência de sintomas vasomotores no período da menopausa (KURZER, 2008), assim como aos baixos índices de câncer de mama (BARNES & KIM, 1995; ADLERCREUTZ, 1995; ADLERCREUTZ, 2002; BECK et al, 2005). Como no recente estudo realizado por Iwasaki e colaboradores, que indicaram que os níveis de estrógeno e andrógeno em imigrantes japonesas residentes no Brasil eram superiores aos encontrados em japonesas, e semelhantes ou maiores do que os níveis encontrados em brasileiras natas, depositando mais suspeitas na relação entre alimentação e níveis hormonais (IWASAKI et al, 2011). Todos esses indicativos fizeram a Ciência investigar terapias alternativas de reposição hormonal com fitoestrógenos.

Por outro lado, estudos afirmam que os efeitos dos fitoestrógenos poderiam estar sendo supervalorizados em detrimento de um efeito placebo (PATISAUL & JEFFERSON, 2011). Portanto, cada vez mais, se faz necessário realizar pesquisas mais apuradas de como os FE atuam na fisiologia celular, assim como pesquisar compostos com alto teor de isoflavonóides, como os oriundos da soja, frente aos mais diversos tipos de modelos *in vitro* e *in vivo*.

No presente trabalho, analisamos um Extrato de Soja Biotransformado por Fungo obtido por técnica padronizada no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP devido a sua conhecida ação antioxidante frente a células de linhagem de fibroblasto e provável facilidade de absorção entérica (GEORGETTI et al, 2009), o que nos fez supor uma possível fonte alternativa às tradicionais TRH.

Logo nos primeiros testes realizados de citotoxicidade, observamos que o ESBF induziu nas células de linhagem MCF-7 uma diminuição significativa de sua viabilidade nas concentrações 2,184; 2,717 e 5,421 mg/mL. Induzindo também a um aumento significativo da viabilidade celular na concentração de 1,092 mg/mL, o que seria resultado da presença de fitoestrógenos em baixa concentração (2,56 μ M de daidzeína e 2,0 μ M de genisteína), visto que esta linhagem celular apresenta fisiologia dependente de estrógenos. O que pode ser reforçado pelo aumento da viabilidade observada no tratamento isolado com os referidos estrógenos também em concentrações baixas (tabela 04, gráfico 01), o que é reforçado pela literatura que aponta que tanto a genisteína quanto a daidzeína possuem a capacidade de ligarem-se fortemente a receptores de estrógeno tanto α (RE α) quanto β (RE β)

(HANG et al, 2006), presentes em células de linhagem MCF-7 (PUGAZHENDHI et al, 2008). Reforçando nossos achados, a literatura aponta que a genisteína em baixa concentração exerce efeito estrogênico, enquanto que em alta concentração é antiestrogênica. (GALLO et al, 2001; WITSETT & LAMARTINIÉRE, 2006). A apoptose em células MCF-7 induzida tanto pelos fitoestrógenos daidzeína (JIN et al, 2010) quanto pela genisteína (AGARWAL, 2000) também já é bastante descrita.

Observamos, também que resultados semelhantes frente ao ESBF foram encontrados na linhagem estrógeno-independente (SK-BR-3), o que não era esperado devido a sua natureza RE-independente (tabela 05, gráfico 02). Contudo, pesquisas com outras linhagens, também estrógeno-independentes (MDA-MB-468), mostram que a genisteína também é responsável pela redução da proliferação de ambos os tipos celulares (RE-positiva e RE-negativa) nas concentrações farmacológicas de 10 a 100 $\mu\text{mol/L}$ (PETERSON & BARNES, 1993).

Entretanto, a diminuição da viabilidade celular em ambas as linhagens nos levou a acreditar que seriam necessários outros testes para avaliarmos melhor o motivo desta constatação, uma vez que o ES não afetou a viabilidade das duas linhagens, assim como a associação dos fitoestrógenos presentes no ESBF (D+G). Deste modo, selecionamos as quatro mais significativas concentrações na relação dose-resposta para os testes de integridade da membrana plasmática e testes de fragmentação do DNA, com o intuito de pesquisar a causa morte destes extratos.

No teste de integridade da membrana plasmática procuramos avaliar, de modo indireto o estado necrótico das células, uma vez que a perda desta integridade pode estar relacionada à necrose celular, e observamos que as concentrações de 1,638 e 2,717 mg/mL de ESBF levaram a linhagem MCF-7 a uma alta porcentagem de marcação (tabela 06, gráfico 03), enquanto que apenas na concentração de 2,717 mg/mL de ESBF encontramos resultados semelhantes para a linhagem SK-BR-3 (tabela 07, gráfico 04).

Concomitante a isso, na marcação do DNA em célula propositalmente lisada, procuramos avaliar a quantidade de DNA íntegro e não condensado (típico de células viáveis), invertendo, desta vez a relação marcação-resposta. Assim, levamos em consideração que, quanto menor fosse a marcação, maior seria a possibilidade da célula estar em estado apoptótico, pela fragmentação do DNA. Pensando deste modo, observamos que, mais uma vez, as concentrações de 1,638 e 2,717 mg/mL

do ESBF contribuíram para menor marcação das células MCF-7 e SK-BR-3, indicando estado apoptótico (tabela 08 e 09, gráfico 05 e 06).

Em uma análise mais detalhada, a elevada indução a apoptose na concentração de 2,717 mg/mL nas células SK-BR-3, responde à baixa, mas significativa porcentagem de células necróticas avaliadas em primeira instância. Em outros termos, os resultados nos levavam a pensar que a viabilidade celular era significativamente menor nas concentrações de 1,638 e 2,717 mg/mL de ESBF, para essa célula, devido à morte por apoptose e não por necrose. Enquanto que os resultados obtidos na linhagem MCF-7, nos ensaios de avaliação da integridade da membrana plasmática e marcação de DNA em célula íntegra, nos aponta que a morte poderia ser apenas por necrose e que os resultados apresentados na marcação do DNA em célula íntegra poderiam ser indícios de um falso positivo. Sendo assim, ensaios mais apurados sobre morte celular foram realizados. Uma vez que a morte das células por apoptose pode prevenir respostas imunes desconhecidas (TAYLOR et al, 2008), e a presença de células necróticas no tecido é frequentemente interpretada pelo sistema imune como sendo extremamente perigosa (MATZINGER, 2002), levando a uma ação inflamatória muitas vezes indesejada no local.

Pensando assim, foi realizado o ensaio de marcação por anexina-V e IP, onde evidenciamos que a linhagem de células MCF-7 apresentava morte por apoptose precoce nas concentrações de 0,819 e 1,638 mg/mL de ESBF, enquanto que a morte por necrose ou apoptose tardia era bastante evidente na concentração de 2,717 mg/mL (tabela 10, gráfico 07). O que nos faz pensar que a morte celular observada na concentração de 1,638 mg/mL de ESBF poderia ser realmente por via apoptótica, mas na concentração de 2,717 mg/mL de ESBF a célula poderia estar apresentando um estado de apoptose tardio, facilmente confundido com necrose celular, devido à limitação da técnica utilizada, em diferenciar esses dois tipos de morte celular. Já que tanto no processo de apoptose tardia, quanto na necrose, a anexina-V pode atravessar a membrana permeabilizada ao mesmo tempo em que o iodeto de IP entra no citosol (RÜCKER-MARTIN et al, 1999; PEC et al, 2003). Por outro lado, apesar do visível aumento de células em necrose ou apoptose tardia observados na linhagem SK-BR-3 frente às diferentes concentrações do ESBF, as análises estatísticas apontaram como não sendo aumentos significativos (tabela 11, gráfico 08).

Para ativação da via da apoptose na linhagem MCF-7, com ESBF, realizamos os testes de western blotting para detecção de caspase-3 íntegra e caspase-3 clivada. Nossos resultados sugerem que a via dependente de caspase-3 é ativada, uma vez que encontramos a expressão desta importante proteína na via apoptótica na sua forma íntegra, apenas nas concentrações onde não foram constatadas diminuição da viabilidade celular ou morte celular por necrose ou apoptose (figura 04); a ausência das proteínas nas demais concentrações pode ter ocorrido devido a sua clivagem, ou seja, ativação. De posse de anticorpos específicos para a fração de caspase-3 clivada, nas amostras onde observamos a ausência da caspase íntegra, entretanto, não foi possível a detecção da referida fração em nenhuma delas (dados não mostrados). Este resultado nos sugere que, na concentração de ESBF 0,403 mg/mL, onde o resultado foi a constatação da presença da caspase íntegra mas não clivada, era natural que não fosse encontrada essa última fração, uma vez que a cascata de ativação de apoptose não tinha sido ativada nesta concentração de ESBF.

Entretanto, na análise dos resultados obtidos na tentativa de detecção da caspase clivada com ESBF na concentração de 1,638 mg/mL, temos dados experimentais que justifique que a sua não detecção. Contudo, a via de ativação da apoptose por clivagem da caspase-3, em células MCF-7, ainda é muito contraditória, uma vez que encontramos na literatura tanto estudos revelando vias apoptóticas da MCF-7 dependentes da clivagem de caspase-3, quanto estudos que afirmam que esse tipo celular apresenta ativação da cascata de apoptose independente da clivagem desta proteína. Kim e colaboradores (2010) atestaram que um extrato de *Saururus chinensis* (vegetal conhecido como “cauda de lagarto-chinês” na China), induzia apoptose em células MCF-7 via caspase-3. Assim Lin e colaboradores (2009), analisando o extrato de *Puerariae radix* e doses de daidzeína e genisteína, que também afirmarem que os três compostos induziam apoptose mediada por caspase-3. Por outro lado, outros trabalhos afirmam que a caspase-3, em células MCF-7 não são produzidas devido à depleção de 47 pares de bases nos genes que regulam a transcrição da caspase-3 (JÄNICKE et al, 1998; CUI et al, 2007).

O ESBF é um extrato inédito na literatura, devido a sua forma de obtenção, nossos resultados apontam a presença de componentes ainda desconhecidos, responsáveis pelos efeitos de diminuição da viabilidade celular, morte por apoptose ou necrose frente a células de adenocarcinoma estrógeno-dependente ou

estrógeno-independente, principalmente porque quando se analisou os padrões daidzeína e genisteína na concentração presente nos extratos, estes resultados acima citados não foram reproduzidos.

Neste estudo, procuramos investigar os efeitos do ESBF sobre diferentes linhagens de adenocarcinoma mamário e, sobretudo, se esses efeitos tinham origem na soja ou nas isoflavonas presentes nele. Entretanto o ESBF apresentou ação biológica nos dois modelos estudados, o que não foi observado no ES e na combinação de daidzeína e genisteína, esse resultado revela que os efeitos observados não tiveram origem na interação dos fitoestrógenos aos receptores de estrógeno (RE), uma vez que tanto a linhagem estrógeno-dependente (MCF-7), quanto a linhagem estrógeno-independente (SK-BR-3), tiveram resultados semelhantes nos testes.

Sabendo que a linhagem MCF-7 possui RE e que estes, uma vez ligados a fitoestrógenos, regulam a atividade celular pela transcrição de genes por via clássica ou por ligação inicial a genes imediatos (KUSHNER et al, 2000), torna claro que certamente existem outras substâncias, oriundas do metabolismo do fungo ou não, que contribuem para as ações observadas aqui. Por ausência de literatura que aborde o mesmo extrato (ESBF) em linhagens de câncer de mama ou extratos originados a partir da ação do fungo *Aspergillus awamori*, propomos novos parâmetros a serem investigados tais como ação de frações do ESBF obtidos por CLAE e ação de extratos de soja obtidos a partir da ação isolada da enzima β -glicosidase, responsável pelo enriquecimento da soja em fitoestrógenos, frente a diferentes linhagens celulares.

6. Conclusão

O Extrato de Soja Biotransformado por Fungo (ESBF) apresentou:

- Efeito citotóxico dose-resposta em ambas as linhagens, a partir da concentração de 2,184 mg/mL;
- Alteração na integridade da membrana plasmática (indicativo de necrose) em células MCF-7 a partir da concentração de 1,638 mg/mL;
- Alteração na integridade da membrana plasmática (indicativo de necrose) em células SK-BR-3 a partir da concentração de 2,717 mg/mL;
- Alteração na integridade do DNA celular em ambas as linhagens a partir da concentração de 2,717 mg/mL;
- Apoptose precoce na linhagem MCF-7, a partir da concentração de 1,092 mg/mL;
- Apoptose tardia ou necrose na linhagem MCF-7, a partir da concentração de 2,717 mg/mL;
- Alteração na expressão da caspase-3 em células MCF-7 a partir da concentração de 1,638 mg/mL;

O Extrato de Soja não biotransformado (ES), apresentou nas duas linhagens celulares:

- Alteração na viabilidade celular, causando um aumento da mesma, sem relação dose-resposta aparente;
- Nenhuma alteração na integridade da membrana plasmática ou do DNA;

- Ausência de indução a apoptose precoce, tardia ou necrose;

Os padrões de daidzeína e genisteína apresentaram, nas duas linhagens celulares:

- Nenhuma alteração na viabilidade celular;
- Nenhuma alteração na integridade da membrana plasmática ou do DNA;
- Ausência de indução a apoptose precoce, tardia ou necrose;
- Nenhuma alteração na expressão de caspase-3 íntegra.

7. Referências Bibliográficas

ADAMS, N. R. Organizational and activational effects of phytoestrogens on the reproductive tract of the ewe. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 208, p. 87–91, 1995.

ADLERCREUTZ, H. Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, p. 103-112, 1995.

ADLERCREUTZ, H. Phytoestrogens and cancer. **The Lancet Oncology**, v. 6, p. 364-73, 2002.

ADRAIN, C. & MARTIN, S. J.. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, p. 390-397, 2001.

AGARWAL, R. Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 1051–1059, 2000.

AHMAD, N.; GUPTA, S.; MUKTAR, H.. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor kB in cancer cells versus normal cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.376, p.338-346, 2000.

ALI, S. & COOMBES, R. C.. Endocrine-responsive cancer and strategies for combating resistance. **Nature Reviews. Cancer**, v. 2, p. 101-115, 2002.

ANAZETTI, M. C. & MELLO, P. S.. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.

ARENDS, M. J.; MORRIS, R. G.; WYLLIE, A. H. Apoptosis: the role of the endonuclease. **The American Journal Pathology**, n. 136, p. 593-608, 1990.

ARORA, A.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. **Arquives of Biochemistry and Biophysics**, v. 356, n. 2, p. 133-141, 1998.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, v. 281, p. 1305–1308, 1998.

BARNES, S.; KIM, H. Soy isoflavones, estrogens, and growth factor signaling. **Soy Connection**, v. 6, p. 1-5, 1995.

BATES, S.E.; DAVIDSON, N.E.; VALVERIUS, E.M.; FRETES, C.E.; DICKSON, R.B.; TAM, J.P.; KUDLOW, J.E.; LIPPMAN, M.E.; SALOMON, D.S. Expression of transforming growth factor alpha and its messenger ribonucleic acid in human breast cancer; its regulation by estrogen and its possible functional significance. **Molecular Endocrinology**, v.2, p.543-555, 1988.

BECK, V.; ROHR, U.; JUNGBAUER, A. Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy? **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 94, p. 499-518, 2005.

BOUTIN, J. A. Minireview - Tyrosine protein kinase inhibition and cancer. **The International Journal Biochemistry & Cell Biology**, v. 26, p. 1203–1226, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). **Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2009.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry**, v. 70, n. 2, p.231-239, 2005.

BRODIE, A. M.; BANKS, P. K., INKSTER, S. E.; DOWSETT, M.; COOMBES, R.C..Aromatase inhibitors and hormone-dependent cancers. **Journal Steroid Biochemistry Molecular Biology**, v. 37, p. 327-333, 1990.

BROUJRAD, H.; GUBKINA O.; ROBERT, N.; KRANTIC, S.; SUSIN, S. A.. AIF-Mediate Programmed Necrosis: A Highly Regulated Way to Die. **Cell Cycle**, v.6, n.21, p. 2612-2619, 2007.

BULUN, S. E.; PRICE, T. M.; AIKTEN, J.; MAHENDRO, M. S.; SIMPSON, E.. A link between breast cancer and local estrogen biosynthesis suggested by quantification of breast adipose tissue aromatase cytochrome P450 transcripts using competitive polymerase chain reaction after reverse transcription. **The Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 77, p. 1622-1628, 1993.

CARR, B, R. Disorders of the ovaries and female reproductive tract. Em: Wilson, J.D., Foster, D.W., Kronenberg, H.M., Larsen P.R.**Textbook of Endocrinology**. W.B. Saunders ed., p. 751–773, 1998.

CARSON-JURICA, M. A.; SCHRADER, W. T.; O'MALLEY, B. W. Steroid receptor family: structure and functions. **Endocrine Reviews**, v. 2, p. 201-220, 1990.

CASSIDY, A.; ALBERTAZZI, P.; LISE, N. I.; HALL, W.; WILLIAMSON, G.; TETENS, I.; ATKINS, S.; CROSS, H.; MANIOS, Y.; WOLK, A.; STEINER, C.; BRANCA, F. Critical review of health effects of soyabean phytoestrogens in post-menopausal women. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 65, p. 76–92, 2006.

CASSIDY, A.; TERESA, D, S.; RIMBACH, G. Molecular mechanisms by which dietary isoflavones potentially prevent atherosclerosis. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 24, p. 1-15, 2003.

CAULEY, J.A.; ROBBINS, J.; CHEN, Z.; et al. Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density: the Women's Health Initiative randomized trial. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 290, p. 1729-1738, 2003.

CHANG, E.C.; FRASOR, J.; KOMM, B.; KATZENELLENBOGEN, B. S. Impact of estrogen receptor beta on gene networks regulated by estrogen receptor alpha in breast cancer cells. **Endocrinology**, v. 147, p. 4831–4842, 2006.

CHEN, W. F.; HUANG, M.H.; TZANG C.H.; YANG M.; WONG M.S. Inhibitory actions of genistein in human breast cancer (MCF-7) cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol.1638, p.187-196, 2003.

CHEN, S.; KAO, Y. C.; LAUGHTON, C. A. Binding characteristics of aromatase inhibitors and phytoestrogens to human aromatase. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 61, p. 107-115, 1997.

CHUN, J.; KIM, G. M.; LEE, K. W. et al. Conversion of isoflavone glucosides to aglycones in soymilk by fermentation with lactic acid bacteria, **Journal of Food Science**, v. 72, p. M39-44, 2007.

CLARKSON, T. B; ANTHONY, M. S; WAGNER, J. D. A comparison of tibolone and conjugated equine estrogens effects on coronary artery atherosclerosis and bone density of postmenopausal monkeys. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 11, p. 5369-5404, 2001.

COL, N. F.; ECKMAN, M. H.; KARAS, R. H.; et al. Patient-specific decisions about hormone replacement therapy in postmenopausal women. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 277, p. 1140-1147, 1997.

COMPTON, M. M. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev.*, n. 11, p. 105-119, 1992.

COWARD, L.; BARNES, N. C.; SETCHELL, K. D. R.; BARNES, S. Genistein, daidzein, and their β -glucoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from american and asian diets. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 41, p. 1961-1967, 1993.

CRISTIENSEN, C. Hormone replacement therapy for established osteoporosis in elderly women, **Bailliere's Clinical Obstet. Gynaecol.**, v.5, p.853-856, 1991.

CREAGH, E. M.; CONROY, H. & MARTIN, S. J.. Caspase activation pathways in apoptosis and immunity. **Immunological Reviews**. v. 193, p. 10-21, 2003.

CUI Q, Y. J.; WU, J.; TASHIRO, S.; ONODERA, S.; MINAMI, M.; IKEJIMA, T. p53-mediated cell cycle arrest and apoptosis through a caspase-3-independent, but caspase-9-dependent pathway in oridonin-treated MCF-7 human breast cancer cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, p. 1057–1066, 2007.

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **Journal Immunological Methods**, n. 265, p. 49-72, 2002.

DONG, K.; MA, W.; HUANG, C.; YANG, C. S.. Inhibition of tumor promoter-induced activator protein 1 activation and cell transformation by tea polyphenols, epigallocatechin gallate, and theaflavins. **Cancer Research**, v.57, p.4414-4419, 1997.

ELDRIDGE, A. C. & KWOLEK, W. F. Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition, **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, p. 394-396, 1983.

ESTEBAN, J. M.; WARSI, Z.; HANIU, M.; HALL, P.; SHIVELY, J. E.; CHEN, S.. Detection of intratumoral aromatase in breast carcinomas. An immunohistochemical study with clinicopathologic correlation. **The American Journal Pathology**, v. 140, p. 337-343, 1992.

ETTINGER, B.; FRIEDMAN, G.D.; BUSH, T.; QUESENBERRY, C. P. J.. Reduced mortality associated with long-term postmenopausal estrogen therapy. **Obstetrics and Gynecology**, v. 87, p. 6-12, 1996.

FADOK, V. H.; BRATTON, D. L.; HENSON, P. M. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, p. 957-962, 2001.

FALKENSTEIN, E.; TILLMANN, H. C.; CHRIST, M.; FEURING, M.; WEHLING, M. Multiple actions of steroid hormones - a focus on rapid, nongenomic effects. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 513-556, 2000.

FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. et al. Morte celular. **Oncologia Molecular**. 1ª ed., p.59, São Paulo, Brasil, 2006.

FOLSOM, A. R.; MINK, P. J.; SELLERS, T. A.; HONG, C. P.; ZHENG, W.; POTTER, J. D. Hormonal replacement therapy and morbidity and mortality in a prospective study of postmenopausal women. **American Journal of Public Health**, v. 85, p. 1128-1132, 1995.

FOTSIS, T.; PEPPER, M.; ADLERCREUTZ, H.; FLEISHMANN, G.; HASE, T.; MONTESANO, R.; SCHWEIGERER, L.. Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 2690-2694, 1993.

FRANKE, A. A. & CUSTER, L.J.; High-performance liquid chromatographic assay of isoflavonoids and coumestrol from human urine. **Journal of Chromatography. B: Biomedical Applications**, v. 662, p. 47-60, 1994.

FRANK, S. et al. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. **Developmental Cell**, v. 1, p. 515-525, 2001.

FRESCO P.; BORGES F.; DINIZ C.; MARQUES M. P. M. New Insights of the Anticancer Properties of Dietary Polyphenols. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 6, p. 747-766, 2006.

GALLO, D.; GIACOMELLI, S.; CANTELMO, F. et al. Chemoprevention of DMBA-induced mammary cancer in rats by dietary soy, **Breast Cancer Research**, v.69, p.153-164, 2001.

GANRY, O. Phytoestrogen and breast cancer revention, **European Journal of Cancer Prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organization**, v.11, p.519-522, 2002.

GEORGETTI, S. R.; VICENTINI, F. T. M. C.; YOKOYAMA, C. Y.; BORIN, SPADARO, A. C. C.; FONSECA, M. J. V.. Enhanced *in vivo* and *in vitro* antioxidant activity and mobilization of free phenolic compounds of soybean flour fermented with different β -glucosidase-producing fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p.459-466, 2009.

GLAZIER, M.; GINA, M. B.; BOWMAN, M.. A review of the evidence for use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy. **Arquives of Internal Medicine**, v. 161, p. 1161-1172, 2001

GRACIA, C. R.; SAMMEL, M. D.; FREEMAN, E. W. et al.. Defining menopause status: creation of a new definition to identify the early stages of the menopausal transition. **Menopause**, v. 12, n. 2, p. 128-135, 2005.

GREEN, S.J. Steroid receptors and new (anti-)steroidal agents: modulation of estrogen receptor activity by estrogens and anti-estrogens. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.37, p. 747-751, 1990.

GRODSTEIN, F.; MANSON, J. E.; COLDITZ, G. A.; WILLETT, W. C.; SPEIZER, F. E.; STAMPFER, M. J.. A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 133, p. 933-941, 2000.

HANG, C.S.; KWAK, H.S.; LIM, H.J.; LEE, S.H.; KANG, Y.S.; CHOE, T.B.; HUR, H.G.; HAN K.O. Isoflavones metabolites and their *in vitro* dual functions: they can act as estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.101, p.246-253, 2006.

HARMAN, S. MITCHELL; VITTINGHOFF, E.; BRINTON, E. A.; et al timing and duration of menopausal hormone treatment may affect cardiovascular outcomes. **The American Journal of Medicine**, v. 124, n. 3, 2011.

HELFERICH, W. G.; ANDRADE, J. E.; HOAGLAND, M.S.. Phytoestrogens and Breast cancer: a complex story. **Inflammopharmacology**, v.16, p.219-226, 2008.

HOUWELL, A. New developments in the treatment of postmenopausal breast cancer. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.16, n.9, p.420-428, 2005.

HSIEH, C.Y.; SANTELL, R.C.; HASLAM S.Z.; HELFERICH, W.G. Estrogenic effects of genistein on the grow of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cell *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Research**, v. 58, p. 3833-3838, 1998.

HURLEY, S.; GRADY, D.; BUSH, T. et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS). **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 280, p. 605-613, 1998.

IMHOF, M.; GOCAN, F.; REITHMAYR, F.; LIPOVAC, M.; SCHIMITZEK, C.; CHEDRAUI, P.; HUBER, J. Effects of a red clover (MF11RCE) on endometrium and sex hormones in postmenopausal women. **Maturitas**, v. 38, p. S41-8, 2006.

ISRAELS, L. G.; ISRAELS, E. D. Apoptosis. **Stem Cells**, n. 17, p. 306-313, 1999.

IWASAKI, M.; KASUG, Y.; YOKOYAMA, S.; ONUMA, H.; NISHIMURA H.; KUSAMA R.; HAMADA, G. S.; NISHIMOTO, I. N.; MACIE, M. S.; MOTOLA-JR, J.; LAGINHA, F. M.; ANZAI, R.; TSUGANE, S. Comparison of postmenopausal endogenous sex hormones among Japanese, Japanese Brazilians, and non-Japanese Brazilians, **BMC Medicine**, n. 9, v. 16, 2011.

IZUMI, T; PRISKULA, M. K.; OSAWA, S.; OBATA, A.; TOKE, K; SAITO, M Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than glucosides in humans. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1695-1699, 2000.

JÄNICKE, R. U.; SPRENGART, M. L.; WATI, M. R.; PORTER, A. G. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 9357–9360, 1998.

Jin, S.; Zhang, Q. Y.; Kang, X. M.; Wang, J. X.; Zhao, W. H. Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway. **Annals of Oncology**, v. 21, p. 263–268, 2010.

JIN, Z. & EL DEIRY, W. S. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer Biology & Therapy**, v. 4, p. 139–163, 2005.

KASE, N. G.. Impact of hormone therapy for women aged 35 to 65 years, from contraception to hormone replacement. **Gender Medicine**, v. 6, p. 37-59, 2009.

KASS-ANNESE, B. Alternatives therapies for menopause. **Clinic Obstetrics and Gynecology**, v. 43, p. 162-183, 2000.

KAWAKAMI, Y.; TSURUGASAKI, W.; NAKAMURA, S.; OSADA, K.. Comparison of regulative functions between dietary soy isoflavones aglycone and glucoside on lipid metabolism in rats fed cholesterol. **The Journal of Nutrition. Biochemistry**, v. 16, p. 205-212, 2005.

KERR, J. F. R.; GOBE, G.C.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B.V. Anatomical methods in cell death. **Methods cell Biol**, v.46, p.1-27, 1995.

KERR, J. F. R. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. **Toxicology**, n. 182, p. 471-474, 2002.

KEY, T.; APPLEBY, P.; BARNES, I.; REEVES, G.; Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, p. 606-616, 2002.

KIM, H.Y., CHOI, T. W.; KIM, H. J.; KIM, S.; PARK, K.; JANG, H.; LEE, E. H.; KIM C. Y.; JUNG, S. H.; SHIM, B. S.; AHN, K. S. Amethylene chloride fraction of *Saururus chinensis* induces apoptosis through the activation of caspase-3 in prostate and breast cancer cells. **Phytomedicine**, v. 18, p. 567-574, 2010.

KRENN, L. I.; UNTERRIEDER, R.; RUPRECHTER, T. Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 777, p. 123–128, 2002.

KUIPER, G. G.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON, J. C.; SAFE, S.H.; van der SAAG, P.T.; van der BURG, B.; GUSTAFSSON, J.A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor α . **Endocrinology**, v. 139, p. 4252-4263, 1998.

KUO, M. L.; YANG, N. C.; Reversion of v-H-ras-transformed NIH 3T3 cells by apigenin through inhibiting mitogen activated protein kinase and its downstream oncogenes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.26, p.767-775, 1995.

KURZER, M. S.. Phytoestrogen supplement use by women. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 6, p. 1983S-1986S, 2003.

KUSHNER, P. J.; AGARD, D. A.; GREENE, G. L.; SCANLAN, T. S.; SHIAU, A. K.; UHT, R. M.; WEBB, P. Estrogen receptor pathways to AP-1. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 74, p. 311–317, 2000.

LEE, H. C.; YANG, L.; XU, J. Z. YEUNG, S. Y. V.; HUANG, Y.; CHEN, Z. Y.. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides. **Food Chemistry**, v. 90, p. 735-741, 2005.

LEVIN, E. R. Membrane oestrogen receptor alpha signalling to cell functions. **The Journal of Physiology**, p. 587, p. 5019–5023, 2009.

LIN, J. K.; CHEN Y. C; HUANG, Y. T.; LIN-SHIAU, S. Y.. Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanism of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.28-29(suppl), p.39-48, 1997.

LIN, M. T.; YEN, M. L.; LIN, C. Y.; KUO, M; L.; Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by resveratrol through interruption of Src-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation. **Molecular Pharmacology**, v.64, p.1029-1036, 2003.

LIN, Y; HOU, Y.C.; LIN, C.; HSU, Y.; SHEY, J.J.C.; LAI, C.; CHEN, B.; CHAO, P.L.; WAN, L.; TSAI, F. *Pueriae radix* isoflavones and their metabolites inhibit growth and induce apoptosis in breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.378, p.683-688, 2009.

LIPPMAN, M.E.; DICKSON, R.B.; KASID, A.; GELMANN, E.; DAVIDSON, N.; MCMANAWAY, M.; HUFF, K.; BRONZERT, D.; BATES, B.; SWAIN, S. Autocrine

and paracrine growth regulation of human breast cancer. **Journal of Steroid Biochemistry**, v.24, p.147-154, 1986.

LURJE, G. & LENZ, H. J. EGFR signaling and drug discovery. **Oncology**, v. 77, p. 400–410, 2009.

LU, Q.; NAKMURA, J.; SAVINOV, A.; YUE, W.; WEISK, J.; DABBS, D. J.; WOLZ, G.; BRODIE, A. Expression of aromatase protein and messenger ribonucleic acid in tumor epithelial cells and evidence of functional significance of locally produced estrogen in human breast cancers. **Endocrinology**, v. 137, p. 3061-3068, 1996.

MACFARLANE, M & WILLIAMS, A.C. Apoptosis and disease: a life or death decision. **EMBO Reports**, v. 5, p. 674-678, 2004.

MACKEY, R.; EDEN, J. Phytoestrogens and the menopause. **Climacteric: The Journal of the International Menopause Society**, v. 4, p. 302-308, 1998.

MAGGIOLINI, M.;BONOFILIO, D.; MARSICO, S; PANNO, M.S.; CENNI B.; PICARD, D.; ANDO, S. Estrogen receptor α mediates the proliferative but not the cytotoxic dose dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. **Molecular Pharmacology**, v.60, p.595-602, 2001.

MAGGI, A.; CIANA, P.; BELCREDITO, S.; VEGETO, E. Estrogens in the nervous system: mechanisms and nonreproductive functions. **Annual Review of Physiology**, v. 66, p. 291–313, 2004.

MANAS, E. S.; XU, Z. B.; UNWALLA, R. J.; SOMERS, W. S. Understanding the selectivity of genistein for human estrogen receptor-beta using X-ray crystallography and computational methods. **Structure**, v. 12, p. 2197–2207, 2004.

MARKOVITS, J.; LINASSIER, C.; FOSSE, P.; COUPRE, J.; JACQUEMIN-SABLON, A.; SAUCIER, J. M.; LE PECQ, J. B.; LARSEN, A. K.; Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. **Cancer Research**, v.49, p.5111-5117, 1989.

MASUDA, M.; SUZUI, M.; LIM, J. T.; DEGUCHI, A.; SOH, J.W.; WEINTEIN, I.B.. Epigallocatechin-3-gallate decreases VEGF production in head and neck and breast carcinoma cells by inhibiting EGFR-related pathways of signal transduction. **Journal of experimental therapeutics & oncolog**, v.2, p. 350-359, 2002.

MATZINGER, P. The danger model: a renewed sense of self. **Science**, v. 296, p. 301-305, 2002.

MCCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology Letters**, n. 99, p. 157-168, 1998.

MELO, P. S. et al. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cell Dev. Biology-Animal**, n. 36, p. 539-543, 2000.

MESTER, J; REDEUILH, G. Proliferation of breast cancer cells: regulation, mediators, targets for therapy. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 872-885, 2008.

MICEVYCH, P.; KUO, J.; CHRISTENSEN, A. Physiology of membrane oestrogen receptor signalling in reproduction. **Journal of Neuroendocrinol.**, v. 21, p. 249–256, 2009.

MICEVYCH, P. & DOMINGUEZ, R. Membrane estradiol signaling in the brain. **Frontier in Neuroendocrinol.**, v. 30, p. 315–327, 2009

MILLER, W. R.; DIXON, J. M.; CAMERON, D. A.; ANDERSON, T. J.. Biological and clinical effects of aromatase inhibitors in neoadjuvant therapy. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 79, p. 103-107, 2001.

MOCHIZUKI, T.; RUGE, Y.; ZHAO, S.; TSUKAMOTO, E.; HOSOKAWA, M.; SATRAUSS, H. W.; BLANKENBERG, F. G.; TAIT, J. F.; TAMAKI, N. Detection of apoptotic tumor response in vivo after a single dose of chemotherapy with Tc-annexin-V. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 44, n. 1, 2003.

MOORE, A.; DONAHUE, C. J.; BAUER, K. D.; MATHER, J. P. "Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death". **Methods Cell Biology**, v. 57, p. 265-78, 1998.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MURKIES, A. L.; WILCOX, G.; DAVIS, S, R. Phytoestrogens. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, p. 297-303, 1998.

MURPHY, P. A. & HELDRICH, S., Phytoestrogens in food, **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 44, p. 195-246, 2002.

MUTHYALA, R. S.; JU, Y. H.; SHENG, S.; WILLIAMS, L. D.; DOERGE, D. R.; KATZENELLENBOGEN, B. S.; HELFERICH, W. G.; KATZENELLENBOGEN, J. A.. Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and s-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1559-1567, 2004.

NELSON, H.D.. Menopause. **Lancet.**, v. 371, n. 9614, p. 760-770, 2008.

NICHOLSON, D. W. Caspase structure, proteolytic substrates and function during apoptotic death. **Cell Death and Differentiation**, v. 6, p. 1028-1042, 1999.

NIH CONFERENCE. National Institutes of Health State-of-the-Science Conference Statement: Management of Menopause-Related Symptoms. **Annals of Internal Medicine**. v. 142 (12), p. 1003-1013, 2005.

OKURA, A.; ARAKAWA, H.; OKA, H.; YOSHINARI, T.; MONDEN, Y. Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val 12] Ha-ras-transformed NIH 3T 3 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 157, p. 183–189, 1988.

OSOSKI, A, L. & KENNELLY, E, J. Phytoestrogens: a review of the present state of research. **Phytotherapy Research: PTR**, v. 18, p. 845-869, 2003.

PARK, D.; HUANG, T.; FRISHMAN, W. H. Phytoestrogens as cardioprotective agents. **Cardiology in Review**. v. 13, p. 13–17, 2005.

PATISAUL, H. B. & JEFFERSON, W.. The pros and cons of phytoestrogens. **Front Neuroendocrinol**, v. 31, n. 4, p. 400–419, 2010.

PAULO, M.; SALVADOR, M. M.; FILHO, M. A. N.; MONTES, M. B. A.; FRANCESCHINI, S. A.; TOLOI, M. R. T.. Effect of isoflavones extracts from *Glycine max* on human endothelial cell damage and on nitric oxide production. **The Journal of North American Menopause Society**, v. 16, p. 539-544, 2009.

PEC, M. K.; AGUIRRE, A.; MOSER-THEIR, K.; FERNANDEZ, J. J.; SOUTO, M. L.; DORTA, J. DIAZ-GONZALEZ, F.; VILLAR, J. Induction of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by the marine terpenoid dehydrothysiferol. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 1451-1461, 2003.

PELISSERO, C.; LENCZOWSKI, M.; CHINZI, D.; DAVAIL-CUISSET, B.; SUMPTER, J.; FOSTIER, A. Effects of flavonoids on aromatase activity, and in vitro study. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 57, p. 215–223, 1996.

PERES, C. M. & CURI R. **Como cultivar células**. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro – RJ, p. 251, 2005.

PETERSON, G & BARNES, S., Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation, **Prostate**, v. 22, p.335-345, 1993.

PIONTEK, M.; HANGELS, K. J.; PORSCHEN, R.; STROHMEYER, G. Anti-proliferative effect of tyrosine kinase inhibitors in epidermal growth factor-stimulated growth of human gastric cancer cells. **Anticancer Research**, v. 13, p. 2119–2123, 1993.

PRICE, K.R.; & FENWICK, G.R. Naturally occurring oestrogens in foods – a review. **Food Additives & Contaminants**, v. 2, p. 73-106, 1985.

PUGAZHENDHI, D; WATSON, K.A.; MILLS, S.; BOTTING, N.; POPE, G.S.; DARBRE, P.D. Effect of sulphation on the oestrogen appoint activity of the phytoestrogens genistein and daidzein in MCF-7 human breast cancer cells. **Journal of Endocrinology**, v.197, p.503-515, 2008.

RANDELL, K. M.; HONKANEN, R. J.; KROGER, H.; SAARIKOSKI, S.. Does hormone replacement therapy prevent fractures in early postmenopausal

women?. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 17, p. 528-533, 2002.

REINLI, K.; BLOCK, G. Phytoestrogen content of foods – a compendium of literature values. **Nutrition and Cancer**, v. 26, p. 123-148, 1996.

REN, WENYING.; QIAO, Z.; WANG, H.; ZHU, L.;ZHANG L. Flavonoids Anticancer Agents. **Medicinal Research Reviews**. v.23, n.4, p.519-534, 2003.

RIMBACH, G.; BOESCH-SAADATMANDI, C.; FRANK, J.; FUCHS, D.; WENZEL, U.; DANIEL, H.; HALL, W, L.; WEINBERG, P, D. Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease - A molecular perspective. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 3, p. 335-341, 2007.

RINGA, V. Menopause and treatments. **Quality of Life Research**, v. 9, p. 695-707, 2000.

RIOS, R. A.; RODRIGUES, E. T.; CARDOSO, A. Z.; MONTES, M. B. A.; FRANCESCHINI, S. A.; TOLOI, M. R. T.. Effects of isoflavones on the coagulation and fibrinolytic system of postmenopausal women. **Nutrition**, v. 24, p. 120-126, 2008 (a).

RIOS, R. A.; RODRIGUES, E. T.; CARDOSO, A. Z.; MONTES, M. B. A.; FRANCESCHINI, S. A.; TOLOI, M. R. T.. Lack of effects of isoflavones on the lipid profile of Brazilian postmenopausal women. **Nutrition**, v. 24, p. 1153-1158, 2008 (b).

ROUTLEDGE, E. J.; WHITE, R.; PARKER, M. G.; SUMPTER, J. P. Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ER beta. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, p.35986–35993, 2000.

RÜCKER-MARTIN, C.; HÉNAFF, M.; HATERN, S. N.; MERCADIER, J. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis of adult rat ventricular myocytes *in vitro*. **Basic research in cardiology**, v. 94, p. 171-179, 1999.

RUIT-LARREA, M.B.; MOHAN, A. R.; PAGANGA, G.; MILLER, H. J.; BOLWELL, G. P.; RICE-EVANS, C.A. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. **Free Radical Research**, v. 25, p. 63-70, 1997.

SANTEN, R. J. & HARVEY, H. A.. Use of aromatase inhibitors in breast carcinoma. **Endocrine-related cancer**, v. 6, p. 75-92, 1999.

SANTIBANEZ, J. F.; NAVARRO, A.; MARTINEZ, J., Genistein inhibits proliferation and *in vitro* invasive potential of human prostatic cancer cell lines, **Anticancer Research**, v. 17, p. 1199-1204, 1997.

SANTORO, N. The menopausal transition. **The American of Journal Medicine**, v. 118, p. 1188-1213, 2005.

SASANO, H.; NAGURA, H.; HARADA, N.; GOUKON, Y.; KIMURA, M.. Immunolocalization of aromatase and other steroidogenic enzymes in human breast disorders. **Human pathology**, v. 25, p. 530-535, 1994.

SCHAIRER, C.; LUBIN, J.; TROISI, R.; STURGEON, S.; BRINTON, L.; HOOVER, R. Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. **JAMA: The Journal of the American Medical Association.**, v. 283, p. 485-491, 2000.

SETCHELL, K. D.; BROWN, N. M.; LYDEKING-OLSEN, E. The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p. 3577-3584, 2002.

SETCHELL, K. D. Soy isoflavones – benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs). **Journal of American Coll. Nutrition**, v.20, p.354S-362S discussion 381S-383S, 2001.

SHAO, Z.M.; WU, J.; SHEN, Z.Z. et al, Genistein exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. **Cancer Research**, v.58, p.4851-4857, 1998.

SILVA, M. M.; SANTOS. M. R.; CAROÇO, G.; ROCHA, R.; JUSTINO, G.; MIRA, L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. **Free Radical Research**, v. 36, n.11, p. 1219-1227, 2002.

SIMONCINI, T; FORNARI, L; MANNELLA, P; CARUSO, A; GARIBALDI, S; BALDACCI, C; GENAZZANI, A. R. Activation of nitric oxide synthesis in human endothelial cells by red clover extracts. **The Journal of the British Menopause Society**, Marlow, v. 12, p. 69-77, 2005.

SIRTORI, C. R.; ARNOLDI, A.; JOHNSON, S. K. Phytoestrogens: end of a tale? **Annals of Medicine**, v. 37, p. 423–438, 2005.

SPEROFF, L. A transição da peri-menopausa. **Reprodução & Climatério**, v. 14, p. 59-51, 1999.

SPRITZER, P. M.; REIS, F. M. Reposição hormonal no climatério: princípios terapêuticos embasados em evidências. **Reprodução & Climatério**, v. 13, p. 32-41, 1998.

STENNICKE, H. R. & SALVESEN, G. S.. Properties of the caspases. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1387, p. 17-31, 1998.

STENNICKE, H. R. et al. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. **Journal of Chemical Biology**, v. 273, p. 27084-27090, 1998.

SUZUKI, T.; FUJIKURA, K.; HIGASHIYAMA, T.; TAKATA, K. "DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy". **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 45, p. 49–53, 1997.

SUZUKI, T.; MATSUO, K.; TSUNODA, N.; HIROSE, K.; HIRAKI, A.; KAWASE, T.; YAMASHITA, T.; IWATA, H.; TANABA, H. TAJIMA, K. Effect soybean on breast cancer according to receptor status: A case-control in Japan. **International journal of cancer**, v. 123, p.1674-1680, 2008.

TAN, W. F.; LIN, L. P.; LI, M. H.; ZANG, Y. X.; TONG, Y. G.; XIAO, D.; DING, J.. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. **European Journal of Pharmacology**, v.459, p.255-262, 2003.

TANG, A. L.; SHAH, N. P.; WILCOX, G. et al, Fermentation of calcium-fortified soymilk with *Lactobacillus*: effects on calcium solubility, isoflavone conversion, and production of organic acids. **Journal Food Science**, v. 72, p. M431-436, 2007.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P. & MARTIN, S. J.. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews**, v. 9, p. 231-241, 2008.

THAM, D. M.; GARDNER, C. D.; HASKELL, W. L. Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, p. 2223-2235, 1998.

TIBREWAL, Y. W. N. & BIRGE, R. B. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. **TRENDS in Cell Biology**, v. 16, n. 4, 2006.

TICE, J.A.; ETTINGER, B.; ENSRUD, K.; WALLACE, R.; BLACKWELL, T.; CUMMINGS, S. R..Phytoestrogen supplements for the treatment of hot flashes: the Isoflavone Clover Extract (ICE) Study: a randomized controlled trial. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 290, n. 2, p.207-214, 2003.

VAN HEERDE, W. L. ROBERT-OFFERMAN, S.; DUMONT, E.; HOFSTRA. L.; DOEVENDANS, P. A.; SMITS, J. F. M.; DAEMEN, M. J. A. P.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on annexin V. **Cardiovascular Research**, v. 45, p. 549-559, 2000.

VASUDEVAN, N.; PFAFF, D. W. Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain. **Frontiers in Neuroendocrinology.**, v. 29, p. 238–257, 2008.

WALCZAK, H.; KRAMMER, P. H. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. **Experimental Cell Research**, v. 256, p. 58–66, 2000.

WANG, C.; MAKELA, T.; HASE, T. A.; ADLERCREUTZ, C. H. T.; KURZER, M. S. Lignans and isoflavonoids inhibit aromatase enzyme in human preadipocytes. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular. Biology**, v. 50, p. 205–212, 1994.

WANG, C. & KURZER, M.S. Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. **Nutrition and Cancer**, v.28, p.236-247, 1997.

WANG, H. J. & MURPHY, P. A., Isoflavone content in commercial soybean foods, **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1666-1673, 1994.

WHITTEN, P. L.; KUDO, S.; OKUBO, K. K. Isoflavonoids. **Handbook of Plant and Fungal Toxicants**, ed. JPF, Boca Raton, p. 117-137, 1997.

WHITSETT, T.G.; JR and LAMARTINIÉRE, C.A.. Genistein and resveratrol: mammary cancer chemoprevention and mechanisms of action in the rat, **Expert review of anticancer therapy**, v.6, p.1699-1706, 2006.

WHO, Guidelines for the early detection and screening of breast cancer, **EMRO Technical Publications Series**, v. 30, 2006.

WHO. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/breast.asp>> Acesso em 10 de junho de 2011.

WILLIAMS, J. R.; LITTLE, J. B. & SHIPLEY, W. U.. Association of mammalian cell death with a specific endonucleolytic degradation of DNA. **Nature**, v. 252, p. 754-755, 1974.

WINER, E. P.; HUTIS, C.; BURSTEIN, H. J.; CHEBOWSKI, R. T.; INGLE, J. N.; EDGE, S. B.; MAMOUNAS, E. P.; GRALOW, J.; GOLDSTEIN, L. J.; PRICHERD, K. I. et al. Technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: Status Report 2002. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, p. 3317-3327, 2002.

WOLF, P. H.; MADANS, J. H.; FINUCANE, F. F.; HIGGINS, M.; KLEINMAN, J. C.; Reduction of cardiovascular disease-related mortality among postmenopausal women who use hormones: evidence from a national cohort. **American Journal Obstetrics and Gynecology**, v. 164, p. 489-494, 1991.

WONG, C. K. & KEUNG, W. M. Bovine adrenal (3[beta]-hydroxysteroid dehydrogenase E.C. 1.1.1.145)/5-ene-4-ene isomerase (E.C.5.3.3.1): characterization and its inhibition by isoflavonas. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 719, p. 191-202, 1999.

WOODIS, B. C.; Hormone Therapy for the Management of Menopausal Symptoms: Pharmacotherapy Update. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 23, n. 6, p. 540-547, 2010.

WOODS, H.F. **Phytoestrogens and Health**, UK: Crown copyright, 2003.

WYLLIE, A. H.; KERR, J. F. K.; CURRIE, A. R. Cell Death: the significance of apoptosis. **International Review of Cytology**, n. 68, p. 251-305, 1980.

WYLLIE, A. H. The biology of cell death in tumors. **Anticancer Research**, n. 5, p. 131-142, 1985.

YIN, L. J.; LI, L. T.; LIU, H. et al, Effects of fermentation temperature on the content and composition of isoflavones and beta-glycosidase activity in sufu, **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v 69, p. 267-272, 2005.

YOSHIOKA, K.; DENG, T.; CAVIGELLI, M.; KARIN, M.. Antitumor promotion by phenolic antioxidants: Inhibition of AP-1 activity through induction of Fra expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 4972-4976, 1995.

YU, R.; HEBBAR, V.; KIM, D.W.; MANDLEKAR, S.; PEZZUTO, J. M.; KONG, A. N.. Resveratrol inhibits phorbol ester and UV-induced activator protein 1 activation by interfering with mitogen-activated protein kinase pathways. **Molecular Pharmacology**, v.60, p.217-224, 2001.

ZIELONKA, J; GEBICKI, J.; GRYNKIEWICZ, G. Radical scavenging properties of genistein. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, n. 8, p. 958-965, 2003.

ZOU, H.; HENZEL, W. J.; LIU, X.; LUTSCHG, A.; WANG, X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. **Cell**, v. 90, p. 405–413, 1997.