
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

Efeito das isoflavonas da soja daidzeína e genisteína em células MCF-7, HB4a e OVCAR-3: Estudo da citotoxicidade, indução de apoptose, cinética de proliferação celular e expressão gênica.

MARCELA STEFANINI FERREIRA TSUBOY

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

SETEMBRO - 2012

MARCELA STEFANINI FERREIRA TSUBOY

Efeito das isoflavonas da soja daidzeína e genisteína em células MCF-7, HB4a e OVCAR-3: Estudo da citotoxicidade, indução de apoptose, cinética de proliferação celular e expressão gênica.

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências Biológicas
(Biologia Celular e Molecular).

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Regina Ribeiro
Co-orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Rio Claro, SP
Setembro - 2012

574.87 Tsuboy, Marcela Stefanini Ferreira
T882e Efeito das isoflavonas da soja daidzeína e genisteína em células MCF-7, HB4a e OVCAR-3: estudo da citotoxicidade, indução de apoptose, cinética de proliferação celular e expressão gênica. / Marcela Stefanini Ferreira Tsuboy. - Rio Claro : [s.n.], 2012
154 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Lúcia Regina Ribeiro
Co-Orientador: Mário Sérgio Mantovani

1. Citologia. 2. Nutrigenômica. 3. Quimioprevenção do câncer. 4. Concentrações fisiologicamente relevantes. 5. Cultura de células. 6. Atraso no ciclo celular. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

MARCELA STEFANINI FERREIRA TSUBOY

Efeito das isoflavonas da soja daidzeína e genisteína em células MCF-7, HB4a e OVCAR-3: Estudo da citotoxicidade, indução de apoptose, cinética de proliferação celular e expressão gênica.

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Lúcia Regina Ribeiro

Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, SP.

Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias

Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, SP.

Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes

Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, SP.

Profa. Dra. Verônica Elisa Pimenta Vicentini

Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, PR.

Profa. Dra. Silvana Pedroso de Goes Favoni

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza.
Faculdade de Tecnologia (FATEC) “Estudante Rafael Almeida Camarinha”, Marília, SP.

**Rio Claro, SP
Setembro - 2012**

Aos meus pais, Ruy e Silvana

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela constante presença em minha vida, por agraciar-me com pais e amigos maravilhosos, sem os quais eu não conseguiria chegar até aqui. Obrigada por abrir-me janelas quando portas foram fechadas; por dar-me forças, sabedoria e paciência para atravessar esse período de grandes ensinamentos.

Aos orientadores deste trabalho, Professora Dra. Lúcia Regina Ribeiro e Professor Dr. Mário Sérgio Mantovani, pela oportunidade. Muito obrigada Lúcia, pelo carinho que sempre teve por mim ao longo de todos esses anos. Obrigada também por enxergar em mim a vontade constante em aprender e a paixão pela Genética/Mutagênese que tenho até hoje.

Aos membros titulares e suplentes da comissão examinadora, pela colaboração e sugestões para a melhoria da redação final deste estudo.

A **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior) e ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual Paulista, UNESP, campus de Rio Claro, pela oportunidade concedida.

A todos os docentes do programa, especialmente às Professoras Maria Izabel Camargo Mathias e Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti pela recepção, atenção e compreensão das condições pelas quais o doutorado foi realizado.

A todos os funcionários, especialmente às queridas Rose e Josiele da Seção Técnica de Pós-Graduação.

A todos os colegas de curso doutorado, especialmente aos amigos do laboratório de Mutagênese, coordenado pela professora Maria Aparecida Marin Morales e pela técnica Sandra, as quais sou grata também.

À Prof. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez, da UEL, por disponibilizar o equipamento necessário à técnica de investigação de citotoxicidade.

À Dra. Nair Muto e Profa. Dra. Silvia Regina Rogatto, do Hospital AC Camargo, pela doação da linhagem celular HB4a.

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho e à Dra. Ana Lúcia T.G. Ruiz, da UNICAMP, pela doação da linhagem MCF-7 nestes últimos e conturbados meses do curso.

A todos os amigos da USP – Ribeirão Preto, envolvidos direta ou indiretamente na colaboração para realização dos experimentos de citometria de fluxo: Prof. Dr. Daniel J. Dorta e Profa. Dra. Danielle P. de Oliveira, Alecsandra Souza, Klaus, Fabiana, e todos de sua equipe. Obrigada por me acolherem tão bem em seus laboratórios, pela liberdade e por dispor de seus preciosos momentos para me ajudar a fazer um trabalho melhor.

À Natália, Priscila de Paula e toda família pela recepção, pelo carinho, pela torcida, pela ajuda nos experimentos e pelo cantinho acolhedor durante minha temporada em Ribeirão Preto.

Aos amigos de Londrina, PR:

Aos docentes e colegas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, UEL, onde concluí o mestrado e desenvolvi grande parte experimental deste estudo.

Agradeço aos colegas de laboratório e às minhas grandes amigas e companheiras Juliana Cristina Marcarini, Tatiana Mozer, Maria Eliane L. Barroso, Josiane Mendes, Dalita Cavalcante, Danielle Sartori, Sueli Miranda, Ilara Budzinski e Selma Aparecida dos Santos, que infelizmente hoje habita somente nossas memórias e nossos corações. Não poderia faltar também um agradecimento especial ao Rodrigo Vida, Pri Ishii, Mari Mauro, Diogo, Zane, Andressa “MN”, Profas. Ana Lúcia, Silvia, Ilce e ao Prof. Rodrigo Cabral Luiz, grande amigo, conselheiro e com quem aprendi muito sobre a prática científica. Sei que depois de cinco anos de convivência na UEL, vai ser difícil não cometer o erro de esquecer o nome de alguém, então agradeço a todos os amigos de turma, professores e funcionários que fizeram/fazem parte deste grande círculo de amizade.

Amizade fundamental durante esses anos foi a da minha amiga-irmã Adriana Fujinami Omine. Não encontro palavras suficientes para agradecer tamanha amizade. Obrigada por todos os momentos felizes e engraçados, pela força e pelo carinho. Agradeço muito a Deus por ter colocado você e sua família em meu caminho.

Aos amigos Alexandre e família, Fernando e família, Márcia e família, Penha e Gi, agradeço imensamente pelo ombro amigo, pelo ouvido atento, pelas risadas e lágrimas compartilhadas, pelos conselhos, pelas palavras de incentivo e pela torcida. Com certeza vocês foram, e continuarão sendo, a minha segunda família.

Aos amigos de Marília e Assis, SP:

Amigos de longa data e amigos que ganhei há pouco tempo, muito obrigada pelo carinho. Cada um de vocês é um pouquinho responsável pela realização desta tese, uma vez que vocês também não deixaram que eu desanimasse. Muito obrigada, Juliana Friendenberg, Juliana Hayashida, Melina, Luciene, Daniela, Darlene, Davi, Giselli, Fernanda, Fabiana, Lilian, Ligiana, Leandro, Ivani, Rafael, Eduardo, Larissa, Priscila, Álvaro, Maria Emília e “toda turma”. Não poderia deixar de agradecer também pelo carinho da Profa. Derci e dos meus amigos da Unesp-Assis e Fatec, dentre eles os(as) professores(as) Rosana, Frei, Alice, Alda, Paulo Sérgio e Silvana.

Aos meus avós e meu irmão Gustavo. Sei que é difícil para quem está fora da Pós-Graduação entender todas as nossas preocupações e angústias. Muito obrigada pelos gestos e palavras de afeição dedicadas a mim.

Aos meus pais Ruy e Silvana. Dedicar esta tese a vocês ainda é pouco perto de tudo o que fizeram e ainda fazem por mim. Obrigada pelo apoio incondicional, pela preocupação, pelo investimento em minha educação desde a infância, pela confiança, pela segurança, pelo incentivo e por toda a dedicação e amor. Quero também me desculpar pelos momentos em que não fiz meu papel de filha adequadamente. Certamente eu não teria conseguido se não fossem por vocês, meus pais! Agradeço todos os dias a Deus por tê-los em minha vida.

*"A forma mais terrível de naufrágio é não partir."
Amyr Klink*

TSUBOY, Marcela Stefanini Ferreira. **Efeito das isoflavonas da soja daidzeína e genisteína em células MCF-7, HB4a e OVCAR-3: Estudo da citotoxicidade, indução de apoptose, cinética de proliferação celular e expressão gênica.** 2012. 154p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular). Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, SP.

RESUMO

Atualmente, principalmente devido aos avanços na área de Nutrigenômica, sabe-se que a dieta tem grande influência na saúde e bem estar das pessoas. Uma dieta adequada pode contribuir para a prevenção de diversas doenças crônicas, dentre elas, o câncer. Estudos epidemiológicos apontam que as populações de países asiáticos sofrem menos com estas doenças, e o alto consumo de soja (e suas isoflavonas daidzeína e genisteína) está associado a este fato. As isoflavonas da soja daidzeína e genisteína possuem grande potencial de prevenção do câncer, uma vez que muitos estudos já demonstraram que elas interferem em diversos estágios do processo de carcinogênese. A modulação da proliferação e morte celular é um dos efeitos quimiopreventivos das isoflavonas mais investigados, porém a maioria dos estudos utiliza-se de concentrações fisiologicamente irrelevantes, ou seja, concentrações que não são encontradas no organismo humano. Portanto, o objetivo do nosso estudo foi analisar os efeitos da máxima concentração fisiologicamente relevante dessas isoflavonas em células humanas *in vitro*. Três linhagens celulares foram utilizadas: MCF-7 (tumoral de mama), HB4a (não tumoral de mama) e OVCAR-3 (tumoral de ovário). O efeito citotóxico, a expressão gênica (*CASP-3*, *CASP-7*, *BAX*, *BCL-xL* e *COX-2*) e a indução de apoptose foram investigadas nas três linhagens celulares. Além disso, foi estudado o efeito das isoflavonas sobre o ciclo celular das linhagens MCF-7 e HB4a. Somente uma concentração alta de genisteína (100 μM) após 72h de tratamento induziu citotoxicidade na linhagem OVCAR-3. Ambas as isoflavonas em concentração de 10 μM não induziram apoptose nesta linhagem, e a expressão dos genes analisados não mudou significativamente frente ao tratamento com daidzeína ou genisteína. O tratamento das células HB4a com daidzeína não foi citotóxico em nenhuma das condições experimentais. Este mesmo tratamento (daidzeína 10 ou 25 μM) também não foi capaz de induzir apoptose ou atraso no ciclo da linhagem não tumoral HB4a. A concentração de 10 μM de daidzeína não alterou a expressão gênica de maneira significativa nesta mesma linhagem. A alteração estatisticamente significativa de alguns genes frente ao tratamento da HB4a com daidzeína 25 μM não foi biologicamente relevante, uma vez que não foi observado apoptose nessas células. A daidzeína também não foi citotóxica para a linhagem tumoral MCF-7. Ambas as concentrações testadas (daidzeína 10 ou 25 μM) foram capazes de induzir parada do ciclo celular da MCF-7 na fase G0/G1, porém não houve indução de apoptose, mesmo com a expressão estatisticamente significativa dos transcritos de caspases após tratamento com daidzeína 25 μM . Não foi observado efeito citotóxico na linhagem HB4a após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de genisteína. Entretanto, quando as células foram tratadas por 48 horas, o efeito citotóxico foi observado com as concentrações de 50 e 100 μM . A parada no ciclo celular da HB4a foi encontrado somente com o tratamento de 25 μM de genisteína e nenhuma das concentrações (genisteína 10 ou 25 μM) induziu morte celular por apoptose nesta linhagem não tumoral. O tratamento das células MCF-7 com genisteína 100 μM foi citotóxico nos dois tempos analisados (24 e 48h), enquanto que o tratamento com genisteína 50 μM foi citotóxico após 48h. Nas células tumorais MCF-7, ambas as concentrações de genisteína (10 e 25 μM) induziram atraso no ciclo celular na fase G0/G1, sem indução de apoptose (mesmo com modificação estatisticamente significativa de alguns genes). Em resumo, os resultados mostram que as máximas concentrações fisiologicamente relevantes de daidzeína e genisteína não são

citotóxicas às linhagens celulares estudadas e, mesmo que não induzam apoptose, estas isoflavonas ainda podem ser consideradas bons agentes quimiopreventivos, uma vez que em baixas concentrações podem interferir no ciclo celular, atrasando-o. Esperamos que nossos dados, aliados às demais publicações existentes, auxiliem a comunidade científica a compreender os reais efeitos das concentrações fisiologicamente relevantes das isoflavonas sobre a carcinogênese de tumores estrógeno-dependentes, a fim de que a população tenha uma melhor orientação sobre o consumo de soja e seus derivados.

Palavras-chave: Nutrigenômica, quimioprevenção do câncer, isoflavonas da soja, concentrações fisiologicamente relevantes, cultura de células, atraso no ciclo celular.

TSUBOY, Marcela Stefanini Ferreira. **Effect of soy isoflavones daidzein and genistein in MCF-7, HB4a and OVCAR-3 cells: Study of cytotoxicity, apoptosis induction, cell proliferation kinetics and gene expression.** 2012. 154p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular). Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, SP.

ABSTRACT

Nowadays, mainly because of Nutrigenomics advances, it is known that diet has a major influence on health and welfare of people. A proper diet can contribute to the prevention of several chronic diseases, including cancer. Epidemiological studies indicate that Asian populations suffer less from these diseases, and high intake of soy (and its isoflavones daidzein and genistein) is associated with this fact. The soy isoflavones daidzein and genistein have great potential for cancer prevention, since many studies have shown that they interfere with several stages of carcinogenesis. Modulation of cellular proliferation and death is one of the most investigated chemopreventive effects of isoflavones, but in most of the studies, physiological irrelevant concentrations are used, i.e., concentrations that are not found in human body. The objective of our study was to analyze the effects of maximal physiological relevant concentration of these isoflavones in *in vitro* human cell lines. Three cell lineages were used: MCF-7 (from breast carcinoma), HB4a (breast non-tumoral cell) and OVCAR-3 (from ovarian carcinoma). Cytotoxic effect, gene expression (*CASP-3*, *CASP-7*, *BAX*, *BCL-xL* and *COX-2*) and induction of apoptosis were investigated in all cell lines. In addition, it was studied the effect of the isoflavones on the cell cycle of MCF-7 and HB4a. Only the highest concentration of genistein (100 μM) was cytotoxic to OVCAR-3 after 72 hours of treatment of the cells. Both isoflavones at 10 μM did not induce apoptosis in this cell line and expression of the studied genes did not change in front of daidzein or genistein treatment. Daidzein treatment of HB4a cells was not cytotoxic in none of the experimental conditions. Daidzein 10 or 25 μM also was not able to induce apoptosis or to arrest cell cycle of non-tumoral HB4a. Also in this lineage, concentration of 10 μM of daidzein did not change gene expression significantly. Daidzein 25 μM altered expression of some genes in a statistically significant way, but it was not biologically relevant, since it was not observed apoptosis in these cells. Daidzein also was not cytotoxic to tumoral MCF-7. Both tested concentrations (daidzein 10 or 25 μM) induced G0/G1 cell cycle arrest. There was no apoptosis induction, even with a statistically significant expression of caspases transcripts after treatment of MCF-7 with daidzein 25 μM . It was not found cytotoxicity in HB4a cells after 24 hours of treatment with different concentrations of genistein. However, when cells were treated with 48 hours, genistein 50 and 100 μM induced cytotoxic effect. The arrest of HB4a cell cycle was seen only after treatment of cells with genistein 25 μM and none of the analyzed concentrations induced apoptosis in this non-tumoral cell line. The treatment of MCF-7 cells with genistein 100 μM was cytotoxic in both experimental times (24 e 48h), while genistein 50 μM showed cytotoxicity only after 48 hours of treatment. In tumoral MCF-7 cells, both concentrations of genistein (10 and 25 μM) arrested cell cycle at G0/G1 phase, with no apoptosis induction (even with significant gene expression modification of some transcripts). In summary, the results show that the highest physiologically relevant concentrations of daidzein and genistein are not cytotoxic to the studied cell lines, and even they were not able to induce apoptosis, these isoflavones can still be considered good chemopreventive agents, since at low levels they can interfere within cell cycle, delaying it. We hope that our data, combined with other existing publications, help the scientific community to understand the real effects of the physiological relevant concentrations of isoflavones on the carcinogenesis of estrogen-

dependent tumors, so that people can have a better counseling on the consumption of soybean and its derivatives.

Keywords: Nutrigenomics, cancer chemoprevention, soy isoflavones, physiologically relevant concentrations, cell culture, cell cycle arrest.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- FIGURA 1.** Estrutura básica e sistema de numeração dos flavonóides. R = radicais. Fonte: BEECHER (2003).....25
- FIGURA 2.** Semelhança estrutural das isoflavonas genisteína, daidzeína e o hormônio sexual feminino 17- β -estradiol. Retirado de McCUE & SHETTY (2004).....28
- FIGURA 3.** Similaridade estrutural entre 17- β -estradiol e genisteína. Ambos possuem anéis aromáticos com grupamento -OH na posição C3 e outro grupo -OH a uma distância idêntica do primeiro. Isto permite a ligação dos dois compostos ao domínio de ligação dos receptores de estrogênio (ERs). Retirado de WUTTKE *et al.* (2007).....29
- FIGURA 4.** Estrutura química dos metabólitos intermediários e finais (equol e O-DMA) da daidzeína. Retirado de LAMPE (2009).....39

MATERIAIS E MÉTODOS

- FIGURA 5.** Esquema da placa de cultivo celular para o Ensaio citotoxicidade com resazurina. mc: meio de cultura sem célula; C(-): controle; meio de cultura com célula; C(+): controle positivo, doxorubicina (Adriblastina[®]), 10 μ g/mL; [1] genisteína ou daidzeína 0,1 μ M; [2] genisteína ou daidzeína 1,0 μ M; [3] genisteína ou daidzeína 10 μ M; [4] genisteína ou daidzeína 50 μ M; [5] genisteína ou daidzeína 100 μ M.....50

ARTIGO 1

- Figure 1.** Fluorescence intensity measured after treatment of OVCAR-3 (24, 48 and 72h) with different concentrations of daidzein (Daid) in resazurin-based assay. Daid [0.1] = cells treated with daidzein 0.1 μ M; Daid [1] = cells treated with daidzein 1 μ M; Daid [10] = cells treated with daidzein 10 μ M; Daid [50] = cells treated with daidzein 50 μ M; Daid [100] = cells treated with daidzein 100 μ M; Doxorubicin = cells treated with doxorubicin 10 μ g/mL. * indicates cytotoxic effect ($p < 0.05$; Student's t-test in relation to control group).....77
- Figure 2.** Fluorescence intensity measured after treatment of OVCAR-3 (24, 48 and 72h) with different concentrations of genistein (Gen) in resazurin-based assay. Gen [0.1] = cells treated with genistein 0.1 μ M; Gen [1] = cells treated with genistein 1 μ M; Gen [10] = cells treated with genistein 10 μ M; Gen [50] = cells treated with genistein 50 μ M; Gen [100] = cells

treated with genistein 100 μM ; Doxorubicin = cells treated with doxorubicin 10 $\mu\text{g/mL}$. * indicates cytotoxic effect ($p < 0.05$; Student's t-test in relation to control group).....78

Figure 3. Curve of cell proliferation of OVCAR-3 treated with 10 μM of the isoflavones (daidzein or genistein). Doxorubicin = cells treated with doxorubicin 10 $\mu\text{g/mL}$. Experimental time of 96h. * Statistical significant ($p < 0.05$; Student's t-test in relation to control group). Exponential growth equation was used by GraphPad Prism[®] 5 software to determine the curve of cell proliferation.....79

Figure 4. Cell viability of OVCAR-3 during cell proliferation kinetics assay treated with 10 μM of the isoflavones (daidzein or genistein). Doxorubicin = cells treated with doxorubicin 10 $\mu\text{g/mL}$. Experimental time of 96h. * Statistical significant ($p < 0.05$; Student's t-test in relation to control group).....80

Figure 5. Apoptotic DNA fragments analysis. DNA samples of three repetitions are showed in this figure. Ladder (100 pb – Invitrogen); C = control; CPT = camptotecin 4 $\mu\text{g/mL}$; VINC = vincristine 4 $\mu\text{g/mL}$; GEN = genistein 10 μM ; DAID = daidzein 10 μM81

Figure 6. Relative gene expression (R value) of *CASP-3*, *CASP-7*, *BAX*, *BCL-xL* and *COX-2* after treatment of 10 or 25 μM of the isoflavones (daidzein or genistein). Data were submitted to software REST© (PFAFFL *et al.*, 2002). Ratio value (R) of control group is considered as 1.....82

ARTIGO 2

Figure 1. Fluorescence intensity measured after treatment of HB4a (24, 48h) with different concentrations of daidzein (Daid) in resazurin-based assay. Daid [0.1] = cells treated with daidzein 0.1 μM ; Daid [1] = cells treated with daidzein 1 μM ; Daid [10] = cells treated with daidzein 10 μM ; Daid [50] = cells treated with daidzein 50 μM ; Daid [100] = cells treated with daidzein 100 μM ; Doxorubicin = cells treated with doxorubicin 10 $\mu\text{g/mL}$. * indicates cytotoxic effect ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group)..101

Figure 2. Fluorescence intensity measured after treatment of MCF-7 (24, 48h) with different concentrations of daidzein (Daid) in resazurin-based assay. Daid [0.1] = cells treated with daidzein 0.1 μM ; Daid [1] = cells treated with daidzein 1 μM ; Daid [10] = cells treated with daidzein 10 μM ; Daid [50] = cells treated with daidzein 50 μM ; Daid [100] = cells treated with daidzein 100 μM ; Doxorubicin = cells treated with doxorubicin 10 $\mu\text{g/mL}$. * indicates

cytotoxic effect (p < 0.05; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).....	102
Figure 3. Analysis of apoptosis induction by flow cytometry (FITC-annexin-V) in HB4a cells treated with daidzein for 24 hours. *statistical significant (p < 0.05; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).....	103
Figure 4. Analysis of apoptosis induction by flow cytometry (FITC-annexin-V) in MCF-7 cells treated with daidzein for 24 hours. *statistical significant (p < 0.05; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).....	104
Figure 5. Cell cycle distribution of HB4a after daidzein treatment for 24 hours. CPT = cells treated with camptothecin 4 µg/mL; Daid [10] = cells treated with daidzein 10 µM; Daid [25] = cells treated with daidzein 25 µM. *statistical significant (p < 0.05; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).....	105
Figure 6. Cell cycle distribution of MCF-7 after daidzein treatment for 24 hours. CPT = cells treated with camptothecin 4 µg/mL; Daid [10] = cells treated with daidzein 10 µM; Daid [25] = cells treated with daidzein 25 µM. *statistical significant (p < 0.05; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).....	106
Figure 7. HB4a relative gene expression (R value) of <i>CASP-3</i> , <i>CASP-7</i> , <i>BAX</i> , <i>BCL-xL</i> and <i>COX-2</i> after treatment of 10 or 25 µM of daidzein (12h). Data were submitted to software REST© (PFAFFL <i>et al.</i> , 2002). Ratio value (R) of control group is considered as 1. Daid [10] = cells treated with daidzein 10 µM; Daid [25] = cells treated with daidzein 25 µM.....	107
Figure 8. MCF-7 relative gene expression (R value) of <i>CASP-3</i> , <i>CASP-7</i> , <i>BAX</i> , and <i>BCL-xL</i> after treatment of 10 or 25 µM of daidzein (12h). Data were submitted to software REST© (PFAFFL <i>et al.</i> , 2002). Ratio value (R) of control group is considered as 1. Daid [10] = cells treated with daidzein 10 µM; Daid [25] = cells treated with daidzein 25 µM. <i>COX-2</i> expression was null in this cell line.....	108

ARTIGO 3

Figure 1. Fluorescence intensity measured after treatment of HB4a (24, 48h) with different concentrations of genistein (Gen.) in resazurin-based assay. Gen. [0.1] = cells treated with genistein 0.1 µM; Gen. [1] = cells treated with genistein 1 µM; Gen. [10] = cells treated with genistein 10 µM; Gen. [50] = cells treated with genistein 50 µM; Gen. [100] = cells treated with genistein 100 µM; Doxorubicin = cells treated with doxorubicin 10 µg/mL. * indicates cytotoxic effect (p < 0.05; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).....	127
--	-----

Figure 2. Fluorescence intensity measured after treatment of MCF-7 (24, 48h) with different concentrations of genistein (Gen.) in resazurin-based assay. Gen. [0.1] = cells treated with genistein 0.1 μM ; Gen. [1] = cells treated with genistein 1 μM ; Gen. [10] = cells treated with genistein 10 μM ; Gen. [50] = cells treated with genistein 50 μM ; Gen. [100] = cells treated with genistein 100 μM ; Doxorubicin = cells treated with doxorubicin 10 $\mu\text{g/mL}$. * indicates cytotoxic effect ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).....128

Figure 3. Cell cycle distribution of HB4a after genistein treatment for 24 hours. CPT = cells treated with camptothecin 4 $\mu\text{g/mL}$; Gen. [10] = cells treated with genistein 10 μM ; Gen. [25] = cells treated with genistein 25 μM . *statistical significant ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).....129

Figure 4. Cell cycle distribution of MCF-7 after genistein treatment for 24 hours. CPT = cells treated with camptothecin 4 $\mu\text{g/mL}$; Gen. [10] = cells treated with genistein 10 μM ; Gen. [25] = cells treated with genistein 25 μM . *statistical significant ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).....130

Figure 5. Analysis of apoptosis induction by flow cytometry (Annexin V-FITC/PI) in HB4a cells treated with genistein for 24 hours. *statistical significant ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).....131

Figure 6. Analysis of apoptosis induction by flow cytometry (Annexin V-FITC/PI) in MCF-7 cells treated with genistein for 24 hours. *statistical significant ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).....132

Figure 7. Relative gene expression (R value) of *CASP-3*, *CASP-7*, *BAX*, *BCL-xL* and *COX-2* after treatment of HB4a cells with 10 or 25 μM of genistein (12h). Data were submitted to software REST© (PFAFFL *et al.*, 2002). Ratio value (R) of control group is considered as 1. Gen. [10] = cells treated with genistein 10 μM ; Gen. [25] = cells treated with genistein 25 μM133

Figure 8. Relative gene expression (R value) of *CASP-3*, *CASP-7*, *BAX* and *BCL-xL* after treatment of MCF-7 cells with 10 or 25 μM of genistein (12h). Data were submitted to software REST© (PFAFFL *et al.*, 2002). Ratio value (R) of control group is considered as 1. Gen. [10] = cells treated with genistein 10 μM ; Gen. [25] = cells treated with genistein 25 μM . COX-2 expression was null in this cell line and it is according to literature (Liu and Rose, 1996; Half *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2008).134

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Estrutura das agliconas daidzeína e genisteína e seus glicosídeos.....	27
Tabela 2. Concentrações plasmáticas de isoflavona encontradas no organismo humano, alguns exemplos.....	34

ARTIGO 1

Table 1. Primer sequences of the analyzed genes, NCBI Access number and amplicon size.....	76
Table 2. Relative gene expression (R value) of <i>CASP-3</i> , <i>CASP-7</i> , <i>BAX</i> , <i>BCL-xL</i> and <i>COX-2</i> after treatment of 10 or 25 μ M of the isoflavones (daidzein or genistein).R value \pm SD and p value.....	82

ARTIGO 2

Table 1. Relative gene expression (R value) of <i>CASP-3</i> , <i>CASP-7</i> , <i>BAX</i> , <i>BCL-xL</i> and <i>COX-2</i> after treatment of 10 or 25 μ M of daidzein in HB4a cells. R value \pm SD and p value.....	107
Table 2. Relative gene expression (R value) of <i>CASP-3</i> , <i>CASP-7</i> , <i>BAX</i> and <i>BCL-xL</i> after treatment of 10 or 25 μ M of daidzein in MCF-7 cells. R value \pm SD and p value.....	108

ARTIGO 3

Table 1. Relative gene expression (R value) of <i>CASP-3</i> , <i>CASP-7</i> , <i>BAX</i> , <i>BCL-xL</i> and <i>COX-2</i> after treatment of 10 or 25 μ M of genistein in HB4a cells. R value \pm SD and p value.....	133
Table 2. Relative gene expression (R value) of <i>CASP-3</i> , <i>CASP-7</i> , <i>BAX</i> and <i>BCL-xL</i> after treatment of 10 or 25 μ M of genistein in MCF-7 cells. R value \pm SD and p value.....	134

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tabela 3. Comparação dos resultados obtidos com as duas substâncias-teste e as três linhagens celulares.....	136
Tabela 4. Resumo das principais observações derivadas de nosso estudo.....	139

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivos gerais.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
3.1. Câncer e Quimioprevenção.....	21
3.2. Isoflavonas da soja (<i>Glycine max</i>).....	25
3.2.1. Consumo diário de isoflavonas.....	31
3.2.2. Benefícios gerais do consumo de soja.....	35
3.2.3. Daidzeína.....	38
3.2.4. Genisteína.....	41
3.2.5. Considerações sobre o uso de isoflavonas: resultados controversos.....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1. Substâncias-teste: isoflavonas da soja.....	47
4.2. Substâncias utilizadas como controle positivo dos ensaios.....	47
4.3. Linhagens celulares.....	48
4.4. Ensaio de citotoxicidade com resazurina.....	49
4.5. Ensaio da cinética de proliferação celular e teste de viabilidade celular.....	50
4.6. Avaliação da expressão de genes relacionados a apoptose por PCR quantitativa em tempo real.....	51
4.7. Avaliação da indução de apoptose em gel de agarose.....	55
4.8. Avaliação da indução de apoptose por citometria de fluxo (Anexina V-FITC/PI).....	56
4.9. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo.....	56
4.10. Análise estatística.....	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1. ARTIGO 1.....	59
5.2. ARTIGO 2.....	83
5.3. ARTIGO 3.....	109
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	135
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	140

1. INTRODUÇÃO

As doenças crônico-degenerativas representam hoje as maiores causas de morte na população, e o controle destas doenças torna-se complexo por serem de origem multifatorial. Em vista disso, esforços têm sido realizados no intuito de diminuir a taxa de mortalidade por estas doenças (De FLORA & FERGUSON, 2005).

Como vários estudos têm demonstrado que uma dieta adequada pode contribuir para a saúde humana, muitos alimentos e suplementos alimentares, contendo isoflavonas da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] estão sendo cada vez mais consumidos (STOPPER *et al.*, 2005). Estudos epidemiológicos apontam que a ingestão de alimentos ricos nesses fitoquímicos (por exemplo, flavonoides) confere proteção contra várias formas de câncer (ADLEUCREUTZ *et al.*, 2002). Um exemplo dessa proteção é observado na população asiática, cuja alimentação é rica em flavonoides e em que a incidência e mortalidade causada por câncer de mama e próstata têm sido menor em relação à população dos países ocidentais (KLEIN & KING, 2007). A população de países asiáticos também apresenta menores taxas de doenças cardiovasculares, e suas mulheres sofrem menos com os efeitos vasomotores advindos da menopausa.

No Brasil, a procura e o consumo de soja e seus produtos derivados têm aumentado nos últimos anos, em função dos benefícios à saúde atribuídos a isso (GÓES-FAVONI *et al.*, 2004; GÓES-FAVONI *et al.*, 2010). A constante exposição na mídia e a conscientização da população de que a busca por uma vida mais saudável começa com a adoção de uma dieta balanceada, rica em fitoquímicos presentes, principalmente nos vegetais, frutas e legumes é o que tem aumentado a busca por alimentos ou suplementos à base de soja, inclusive pelas mulheres na fase de menopausa, sendo responsável pelo crescente aumento no consumo de soja e seus derivados em nosso país. Dados de 2007 mostram que 46,3% dos ginecologistas

prescreveram isoflavonas a suas pacientes como auxiliar na terapia de reposição hormonal (LAZAR Jr *et al.*, 2007).

O efeito protetor dos flavonoides tais como as isoflavonas da soja daidzeína e genisteína, no processo de carcinogênese, parece ser resultante do seu potencial de interferir na iniciação, desenvolvimento e progressão do tumor por meio da modulação da proliferação e diferenciação celular, apoptose, angiogênese e metástase (RAMOS, 2007).

Um número significativo de estudos investiga o potencial da soja e seus derivados na redução do risco de câncer hormônio-dependente, especialmente o câncer de mama e de ovário (ZHANG *et al.*, 2004; MESSINA & WU, 2009), porém essa relação ainda permanece controversa (DUFFY *et al.*, 2007). A maioria dos resultados de quimioprevenção (indução de apoptose, por exemplo) é obtida quando utilizadas altas concentrações dessas isoflavonas (acima de 30 μM , ou seja, concentrações dificilmente encontradas no plasma humano), produzindo resultados que são irrelevantes fisiologicamente, dificultando assim previsões de sua eficácia (MOISEEVA & MANSON, 2009). Atualmente, importantes pesquisadores e organizações orientam o uso dessas concentrações fisiologicamente relevantes em estudos futuros e atentam para um melhor delineamento e padronização delas a fim de que se consiga chegar a um consenso sobre o tema.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito quimiopreventivo (por meio do estudo da viabilidade celular) do tratamento com as isoflavonas da soja daidzeína e genisteína nas linhagens tumorais humanas MCF-7 (carcinoma de mama) e OVCAR-3 (carcinoma de ovário), e na linhagem não tumoral de mama HB4a. O foco do estudo é a análise dos efeitos da concentração dessas isoflavonas considerada por muitos autores como a máxima concentração fisiologicamente relevante (10 ou 25 μM), ou seja, concentração plasmática que pode ser atingida pela dieta rica em soja ou por meio de suplementação, respectivamente.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar, por ensaio de citotoxicidade resazurina, o efeito citotóxico das isoflavonas da soja daidzeína e genisteína em células MCF-7; OVCAR-3 e HB4a;
- Investigar, pela análise de PCR quantitativo em tempo real, a variação na expressão de genes relacionados a apoptose do tratamento das células MCF-7; OVCAR-3 e HB4a em concentração de isoflavonas daidzeína e genisteína fisiologicamente relevante;
- Avaliar a indução de apoptose nas linhagens celulares MCF-7; OVCAR-3 e HB4a frente ao tratamento das isoflavonas daidzeína e genisteína em concentração fisiologicamente relevante (teste de visualização dos fragmentos apoptóticos em gel de agarose e técnica de detecção de apoptose anexina-V/PI por citometria de fluxo);
- Analisar os efeitos do tratamento com isoflavonas daidzeína e genisteína em concentração fisiologicamente relevante sobre o ciclo celular das linhagens de mama MCF-7 e HB4a pelo uso da citometria de fluxo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. CÂNCER E QUIMIOPREVENÇÃO

É de conhecimento geral que um dos maiores problemas de saúde pública mundial é o câncer. De acordo com Guerra *et al.* (2005), cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo são em decorrência do câncer. Importantes causas de doença e morte no Brasil, desde 2003, as neoplasias malignas representam quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade, constituindo, assim, a segunda causa de morte da população (INCA, 2010). Ainda segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2010), as estimativas apontam para a ocorrência de 489.270 novos casos de câncer para o biênio 2010-2011, sendo que os tipos mais incidentes são o câncer de próstata e pulmão nos indivíduos do sexo masculino e o de mama e colo uterino no sexo feminino.

Apesar de ser uma das maiores causas de morte no mundo, Hail Jr. *et al.* (2008) consideram que se tem conseguido pouco progresso para reduzir a morbidade e a mortalidade do câncer. Sendo assim, além do tratamento da doença em si, sua prevenção tornou-se uma importante abordagem para o controle da enfermidade. As estratégias de prevenção incluem evitar a exposição a agentes conhecidamente cancerígenos, melhorar a imunidade do indivíduo, modificar o estilo de vida e a quimioprevenção (MANN & DuBOIS, 2004; HAIL Jr. *et al.*, 2008).

O termo quimioprevenção foi cunhado pela primeira vez em 1976 pelo pesquisador Michael B. Sporn para descrever o uso de substâncias naturais ou sintéticas que atrasam, revertem ou suprimem o processo de carcinogênese em seus estágios iniciais (SPORN, 1976; SPORN & SUH, 2002). Desde então, muitos compostos da dieta e derivados de plantas têm sido investigados em relação ao seu potencial quimiopreventivo. A observação de Doll e Peto,

em seu clássico artigo de 1981, de que uma média de 35% do total de mortes por câncer está associada a fatores nutricionais também ajudou a alavancar as pesquisas nessa área (DOLL & PETO, 1981).

Podemos dizer que câncer é a designação dada ao conjunto de manifestações patológicas caracterizadas pela perda do controle da proliferação celular e do ganho da capacidade de invasão de outros tecidos. O processo de carcinogênese é resultante da acumulação de múltiplas mutações que culminam na insensibilidade de controle da célula cancerígena pelo ambiente celular local e pelo organismo como um todo (SARASIN, 2003). A progressão para o tumor maligno é governada por alterações essenciais na fisiologia celular, como autossuficiência nos sinais de fatores de crescimento; insensibilidade aos sinais de fatores inibitórios de crescimento; evasão da apoptose; potencial replicativo ilimitado; sustento da angiogênese; invasão tecidual e metástase (HANAHAN & WEINBERG, 2000); reprogramação do metabolismo energético celular e ativação de mecanismos de evasão do sistema imune, aliadas à instabilidade genômica e à inflamação, resultando em um microambiente favorável para o seu desenvolvimento (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Esses eventos são tradicionalmente separados em três fases: iniciação, promoção e progressão. Na fase de iniciação, ocorre o dano ao DNA por agentes químicos, físicos ou biológicos que predisõem essa célula danificada à instabilidade genética e a alterações epigenéticas. A fase de promoção é aquela em que os promotores de tumor agem como mitógenos, induzindo a expansão de clones das células iniciadas. Também ocorrem eventos genéticos e epigenéticos adicionais que levam ao acúmulo desses clones celulares. A progressão é caracterizada pelo desenvolvimento irreversível de mudanças macroscópicas e microscópicas pelas células já alteradas, genotípica e fenotipicamente, que agora possuem características necessárias para a invasão e para a metástase (GESCHER *et al.*, 2001; TROSKO *et al.*, 2005).

Diante disso, os então chamados compostos quimiopreventivos são aqueles que interferem em uma ou mais fases do processo de carcinogênese. A eficácia dos compostos quimiopreventivos é medida pelos mesmos procedimentos aplicados a uma nova droga e deve satisfazer os seguintes requisitos: (1) prevenção primária em indivíduos saudáveis de alto risco, (2) prevenção do câncer em indivíduos que já desenvolveram lesões pré-malignas; (3) prevenção de formas secundárias de câncer em pacientes já tratados de um câncer primário (KAKIZOE, 2003; TSAO *et al.*, 2004). O agente quimiopreventivo deve possuir ainda características como baixo custo, praticidade na administração, eficácia, segurança e ter seu mecanismo de ação elucidado (MORSE & STONER, 1993; De FLORA & FERGUSON, 2005).

Geralmente, os compostos quimiopreventivos são classificados em duas categorias: agentes bloqueadores ou supressores. Os agentes bloqueadores são aqueles que inibem a fase mais inicial da carcinogênese por mecanismos que alteram enzimas metabolizadoras de drogas (enzimas de fase I e fase II do metabolismo de xenobióticos), capturam compostos que reagem com ativadores de carcinógenos, espécies reativas de oxigênio (EROs) e outros radicais livres, e alteram as taxas de reparo do DNA. Os agentes supressores inibem a evolução do processo neoplásico, prevenindo a proliferação e a diferenciação das células geneticamente alteradas, assim como induzindo a apoptose, evitando o acúmulo dessas células iniciadas (WATTENBERG, 1992; MANSON *et al.*, 2000; De FLORA & FERGUSON, 2005, KHAN & MUKHTAR, 2010).

Existem três níveis de prevenção, dependendo do alvo da intervenção: primária, secundária e terciária. A prevenção primária é aquela focada em indivíduos aparentemente saudáveis. Tem como objetivo prevenir a ocorrência da neoplasia maligna e inclui a inibição da mutação e subsequente iniciação do processo de carcinogênese. A prevenção secundária é

dirigida a pacientes em fase pré-clínica ou inicial do câncer e tem como objetivo a inibição do processo de malignidade de um tumor recém-diagnosticado e benigno. A prevenção terciária é endereçada a pacientes de câncer após seu tratamento e tem como objetivo prevenir a recorrência da doença e inibir a invasão e metástase (De FLORA *et al.*, 2001; De FLORA & FERGUSON, 2005).

Estima-se que 30-40% dos casos de câncer no mundo possam ser prevenidos por mudanças no estilo de vida, incluindo mudanças na dieta (DONALDSON, 2004; EYRE *et al.*, 2004). O consumo diário de frutas, vegetais e/ou suplementos fitoterápicos é um método eficaz e fácil de administração de fitoquímicos benéficos ao organismo humano, uma vez que muitos deles apresentam compostos biologicamente ativos na prevenção do câncer (PARK & PEZZUTO, 2002; DIVISI *et al.*, 2006; VAINIO & WEIDERPASS, 2006; ANAND *et al.*, 2008). Os compostos derivados da dieta são ainda de especial interesse, pois é esperado que sua administração a longo prazo seja mais segura que a dos medicamentos convencionais (KELLOFF, 2000). Portanto, uma das formas mais simples de prevenção do câncer para a população em geral seria a orientação nutricional sobre o controle na qualidade da ingestão de alimentos. A menor ingestão de produtos sintéticos comprovadamente cancerígenos em roedores, como conservantes, corantes, pesticidas agrícolas, álcool, combinada com uma dieta rica em alimentos funcionais, como vitaminas do complexo B, folato, metionina, fenóis, indóis, terpenoides, flavonoides e outros agentes antioxidantes poderia ser considerada uma das melhores formas de evitar o desenvolvimento de neoplasias (SLATTERY *et al.*, 2000; BOFFETTA & HASHIBE, 2006).

Diversos alimentos presentes em nossa dieta têm sido estudados com relação ao seu potencial quimiopreventivo e muitos deles já possuem seus mecanismos moleculares elucidados. Um dos alimentos mais estudados é a soja. O interesse dos pesquisadores em estudá-la vem de observações epidemiológicas que mostram o reduzido risco de diversos

tipos de câncer (mama, ovário, próstata, entre outros) e de doenças crônicas nos países asiáticos onde seu consumo é elevado (ADLERCREUTZ, 2002). Os efeitos benéficos da soja sobre a saúde humana são atribuídos, principalmente, à presença das isoflavonas.

3.2. ISOFLAVONAS DA SOJA (*Glycine max*)

As isoflavonas da soja são substâncias pertencentes ao grupo dos polifenóis, subgrupo dos flavonoides. São encontrados em vegetais, nozes, frutas e bebidas derivadas, como café, chá; óleo de oliva e vinho tinto, e em muitas ervas medicinais (*Silybum marianum* – “cardo mariano”, *Alpina officinarum* – “galanda da China”, *Hypericum perforatum* – “erva de São João”) (HOLLMAN & KATAN, 1997). Os flavonoides constituem uma família de difenilpropanos, os quais são caracterizados estruturalmente por um esqueleto de carbono $C_6C_3C_6$ (Figura 1) (STOPPER *et al.*, 2005). Vários compostos são formados por combinações de radicais químicos substituintes sobre o esqueleto básico do flavonoide; deste modo o grupo dos flavonoides abrange os subgrupos: antocianinas, flavanas, flavanonas, flavonas, flavonóis, chalconas e isoflavonoides (PETERSON & DWYER, 1998; DI CARLO *et al.*, 1999; MOON *et al.*, 2006).

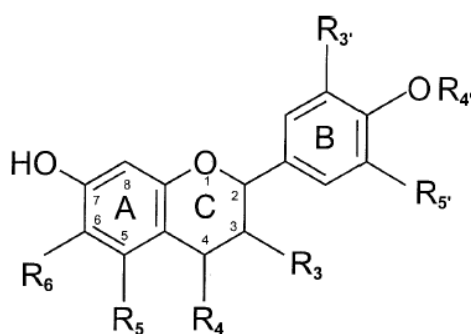


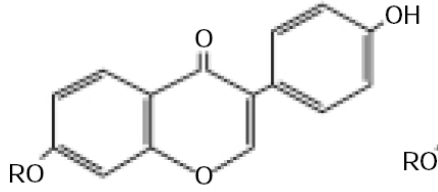
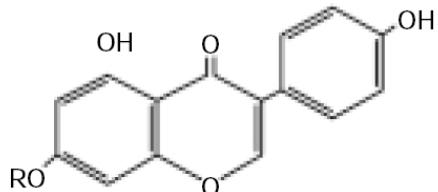
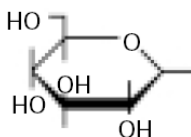
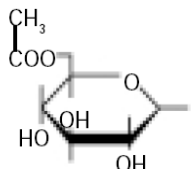
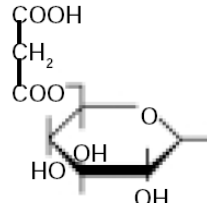
FIGURA 1. Estrutura básica e sistema de numeração dos flavonoides. R = radicais. Fonte: BEECHER (2003).

Os isoflavonoides (isoflavonas e coumestanos) são caracterizados pelos grupos hidroxil (-OH) e/ou metoxi (-OCH₃) em sua estrutura (PETERSON & DWYER, 1998; MURKIES *et al.*, 1998; DI CARLO *et al.*, 1999). Representam este grupo: genisteína, daidzeína, biochanina A, formononetina, gliciteína, coumestrol, entre outros.

As isoflavonas podem ser encontradas em pequenas quantidades em frutas, como maçã e morango, sementes de gergelim e girassol (MAZUR & ADLECREUTZ, 2000; LIGGINS *et al.*, 2000), porém a maior fonte de isoflavonas é o grão da soja (PRICE & FENWICK, 1985; REINLI & BLOCK, 1996; MAZUR & ADLECREUTZ, 2000; LIGGINS *et al.*, 2000). As isoflavonas foram encontradas pela primeira vez no grão da soja há mais de 65 anos com o isolamento da genistina a partir do extrato metanólico do grão (WALTER, 1941). A concentração e a composição de isoflavonas encontradas nos grãos ou nos produtos derivados variam de acordo com as cultivares de soja, condições geográficas e climáticas e até mesmo com a forma de processamento industrial dos grãos (MURPHY, 1982; ELDRIDGE & KWOLEK, 1983; COWARD *et al.*, 1993; DWYER *et al.*, 1994; FRANKE *et al.*, 1995).

A maior parte das isoflavonas é encontrada nos grãos da soja na forma de glicosídeos, ou seja, ligado a açúcares. Três compostos (daidzeína, genisteína e gliciteína) e suas respectivas espécies conjugadas são predominantes (Tabela 1).

Tabela 1 - Estrutura das agliconas daidzeína e genisteína e seus glicosídeos.

R/H		
		
	DAIDZEÍNA 7,4'-dihidroxiisoflavona	GENISTEÍNA 4', 5, 7-trihidroxiisoflavona
	DAIDZINA	GENISTINA
		
	ACETILDAIDZINA	ACETILGENISTINA
		
	MALONILDAIDZINA	MALONILGENISTINA
		

Adaptado de King (2002). Os mesmos radicais formam os glicosídeos da gliciteína.

As formas glicosiladas das isoflavonas (por exemplo, daidzina e genistina), uma vez ingeridas, são hidrolizadas por β -glicosidases bacterianas na parede intestinal humana, resultando nas agliconas daidzeína e genisteína, que por sua vez serão absorvidas no trato intestinal e são consideradas, portanto, as formas biologicamente ativas das isoflavonas (CEDERROTH & NEF, 2009). As agliconas podem ainda ser metabolizadas por outras bactérias da microbiota intestinal ou pelas enzimas do citocromo P-450 (CYP17, CYP1A1, CYP2A2, CYP4A4, CYP6B6, CYP9C9) por reações de dehidrogenação, hidroxilação ou O-demetilação (CREMOUX *et al.*, 2010). O metabolismo de fase II (conjugação) das isoflavonas ajuda a aumentar sua excreção urinária. Nesta etapa temos a ação de enzimas como catecol-O-metiltransferases (COMT), sulfotransferases (SULTs) e β -glucuronidases

(CREMOUX *et al.*, 2010). O metabolismo das isoflavonas, sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, seus efeitos biológicos sobre o organismo humano, dependem, portanto, da flora intestinal e dos polimorfismos de CYP450 que o indivíduo possui (CEDERROTH & NEF, 2009; CREMOUX *et al.*, 2010; MEDJAKOVIC *et al.*, 2010).

As isoflavonas da soja genisteína e daidzeína também são conhecidas como fitoestrógenos. São assim denominadas devido a sua estrutura química similar ao estrógeno - 17 β -estradiol (Figuras 2 e 3). Segundo Whitten & Patisaul (2001), os fitoestrógenos são definidos como compostos derivados de plantas que são, estrutural ou funcionalmente, similares aos estrógenos ovarianos ou placentários. As principais classes de fitoestrógenos são as isoflavonas, lignanos (ex. enterolactona), coumestanos (ex. coumestrol), flavonoides, como a quercetina, resveratrol, crisina, naringenina, entre outros, além de micoestrógenos, como zearalenol (CLAPAUCH *et al.*, 2002; MOUSTSATSOU, 2007; LIU *et al.*, 2010; PATISOUL & JEFFERSON, 2010).

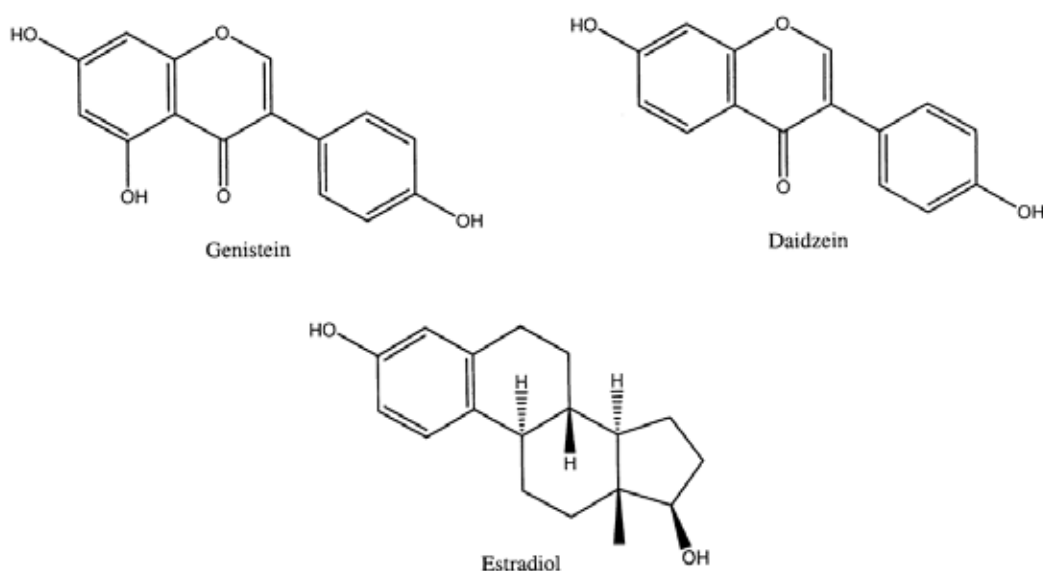


FIGURA 2. Semelhança estrutural das isoflavonas genisteína, daidzeína e o hormônio sexual feminino 17- β -estradiol. Retirado de McCue & Shetty (2004).

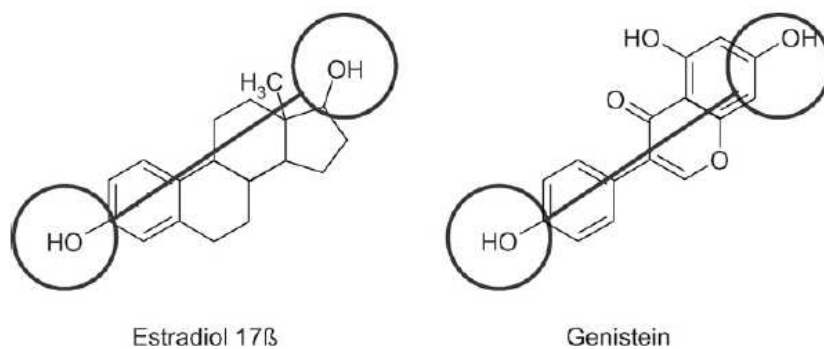


FIGURA 3. Similaridade estrutural entre 17-β-estradiol e genisteína. Ambos possuem anéis aromáticos com grupamento –OH na posição C3 e outro grupo –OH a uma distância idêntica do primeiro. Isto permite a ligação dos dois compostos ao domínio de ligação dos receptores de estrogênio (ERs). Retirado de Wuttke *et al.* (2007).

Devido a sua estrutura, os fitoestrógenos como a genisteína e daidzeína são capazes de se ligar aos receptores estrogênicos (ER α e ER β) presentes nas células e induzir efeitos equivalentes aos induzidos pelos hormônios naturais. Esta atividade estrogênica das isoflavonas constitui a base da terapia de reposição hormonal da menopausa utilizada por muitas mulheres para alívio de sintomas como as ondas de calor, mudanças no humor, osteoporose e outros trazidos pelo climatério (CLAPAUCH *et al.*, 2002; McCUE & SHETTY, 2004; CREMOUX *et al.*, 2010). Devido às suas propriedades estrogênicas, ditas como fracas, a terapia de reposição hormonal com as isoflavonas ganhou muitos adeptos, pois acredita-se que possua menos riscos que a terapia com reposição de hormônios sintéticos (UPMALIS *et al.*, 2000; WUTTKE *et al.*, 2007). Entretanto, esta afirmação ainda não é conclusiva, devido a variações nos estudos realizados e digna ainda de bastante discussão.

Diversos autores atribuem uma maior afinidade de ligação das isoflavonas genisteína e daidzeína ao receptor estrogênico beta (ER β) (MOUTATSOU, 2007; REITER *et al.*, 2009). Dependendo do tipo de ensaio utilizado, a seletividade da genisteína pelo ER β é de 7 a 48 vezes maior que pelo ER α (PATISAUL & JEFFERSON, 2010; CEDERROTH *et al.*, 2012).

As isoflavonas daidzeína e genisteína podem atuar como agonistas ou como antagonistas do hormônio endógeno 17 β -estradiol nos receptores celulares, dependendo de sua concentração e do tecido em que se localizam estes receptores (MOLTENI *et al.*, 1995; NEVEN, 1998; SETCHELL, 1998; HWANG, *et al.*, 2006). Muitos dos genes-alvo regulados pelo estrógeno são responsáveis pela regulação do ciclo celular e, sendo assim, o próprio hormônio e as isoflavonas que mimetizam seu efeito já foram associados à proliferação aumentada de células tumorais de câncer de mama e de útero ER-positivas, favorecendo a promoção do tumor (TOMAR & SHIAO, 2008). Entretanto, segundo Gustafsson (1999), a susceptibilidade de um tecido à carcinogênese induzida pelo estrógeno é determinada pela razão entre a expressão de ER β e ER α . Segundo alguns autores, a expressão de ER β teria papel protetor contra o desenvolvimento do câncer (ex. tumor mamário), regulando negativamente a expressão de genes ligados à proliferação celular (ex. c-myc; ciclina D1, ciclina A, p21^{Cip1}, p27^{Kip1}) (HILAKIVI-CLARKE *et al.*, 2002; PARUTHIYIL *et al.*, 2004).

Devido a esse comportamento ora agonista, ora antagonista, as isoflavonas daidzeína e genisteína também são classificadas como moduladores seletivos do receptor de estrógeno ou SERMs (da sigla em Inglês para *Selective Estrogen Receptor Modulators*), termo cunhado no início da década de 1990 (NILSSON *et al.*, 2011). Estas substâncias, naturais ou sintéticas, variam no nível e na maneira como agem sobre os ERs, dependendo do tecido e da fase de desenvolvimento do indivíduo (infantil, adulta, pré- ou pós-menopausa, no caso das mulheres) (OSENÍ *et al.*, 2008). Essa atividade diferencial dos fitoestrógenos e demais SERMs é, em parte, resultado do perfil de proteínas co-ativadoras e co-repressoras presentes na célula. Sabe-se agora que cada ligante do ER induz mudanças conformacionais únicas que influenciam o recrutamento desses co-reguladores e conseqüentemente sua interação com os genes-alvo (MANAS *et al.*, 2004).

Outra classificação na qual os fitoestrógenos como as isoflavonas daidzeína e genisteína se enquadram, é o de disruptores endócrinos. De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA), os disruptores endócrinos são compostos que alteram a estrutura ou função do sistema endócrino e causam efeitos colaterais, tais como, interrupção da lactação e variações no tempo de puberdade; alteração na viabilidade e fertilidade da prole; alteração do comportamento sexual; senescência reprodutiva imatura e comprometimento da fertilidade (PATISAUL & JEFFERSON, 2010; CEDERROTH *et al.*, 2012). Efeitos já foram reportados em modelos animais (em laboratório) e na natureza (criação de ovelhas na Austrália e animais de zoológico).

Conforme será abordado nos próximos tópicos (3.2.3 e 3.2.4), é importante ressaltar que os efeitos biológicos das isoflavonas daidzeína e genisteína não são mediados somente via ativação dos ERs.

3.2.1. Consumo diário de isoflavonas

As populações asiáticas são as maiores consumidoras de isoflavonas da soja. Em muitos países (Japão, Coreia e China), a soja constitui a base alimentar e está presente em diversos produtos consumidos diariamente como tofu, missô, tempeh (alimento de soja fermentado de textura firme, semelhante a uma barra de cereais), iogurtes, extrato aquoso (conhecido popularmente como o leite de soja), entre outros. A diferença no consumo de alimentos derivados da soja e, portanto de isoflavonas, é muito grande quando comparamos países asiáticos e países ocidentais. Estima-se que a população asiática consuma em média 50 g de alimentos derivados de soja e 30 mg de isoflavonas por dia, enquanto essa média cai para 1 g de ingestão diária de alimentos à base de soja nos países ocidentais, resultando em 1 mg de isoflavonas (COS *et al.*, 2003). A quantidade média de alimentos à base de soja e isoflavonas ingeridas pelas populações asiáticas e ocidentais varia entre os diversos estudos

disponíveis na literatura, porém a média de consumo diária de isoflavonas não passa de 3 mg nos países ocidentais (exceto pela população vegetariana ou que faz uso de suplementos à base de soja) e pode chegar até 50-80 mg/dia nos países asiáticos (ex. população idosa japonesa e chinesa) (ALBERTAZZI *et al.*, 2002; ROSS & KASUM, 2002; MESSINA *et al.*, 2006a).

O alto consumo de isoflavonas nos países orientais pode estar associado à menor ocorrência de doenças crônicas em suas populações. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o consumo de soja diminui o risco de diversas doenças crônicas, incluindo câncer de mama (ADLERCREUTZ *et al.* 1991, LEE *et al.* 1991), de próstata (SEVERSON *et al.* 1989), de cólon (WATANABE & KOESSEL, 1993), osteoporose, doenças cardíacas, além de melhorar os sintomas de menopausa (CLARKSON *et al.* 1995; NAMS, 2011). O estudo de caso-controle de Iwasaki *et al.* (2008) mostra que a diminuição no risco de câncer de mama está relacionado com níveis plasmáticos mais altos de genisteína no grupo que consumia soja do que no grupo controle.

A relação entre o efeito quimioprotetor das isoflavonas e suas concentrações plasmáticas é um fator relevante. As isoflavonas possuem efeitos de inibição e estimulação da proliferação celular de acordo com a concentração estudada. Em concentrações baixas, a genisteína, por exemplo, possui atividade proliferativa, enquanto em maiores concentrações, efeitos inibitórios e citotóxicos são encontrados. Segundo De Lemos (2001), em concentrações baixas, as atividades estrogênicas da genisteína são predominantes; por outro lado, em concentrações altas, outras atividades anticancerígenas predominam. De acordo com Sathyamoorthy & Wang (1997), Guo *et al.* (2004), Rice & Whitehead (2006) entre outros, esses efeitos são também atribuídos à daidzeína.

A maior parte dos resultados que evidenciam os efeitos quimiopreventivos (indução de apoptose, por exemplo) das isoflavonas genisteína e daidzeína provém de estudos que

utilizaram altas concentrações destas substâncias (maiores que 30 μM); concentrações consideradas irrelevantes por muitos pesquisadores, pois não são encontrados níveis plasmáticos semelhantes no organismo humano (HOWELLS *et al.*, 2007).

Existem muitos dados disponíveis na literatura sobre os níveis plasmáticos das isoflavonas genisteína e daidzeína. Alguns autores encontraram níveis na ordem de nanomolar (nM) enquanto outros sugerem que esta pode chegar a níveis de micromolar (μM). A tabela seguinte exemplifica o que é encontrado na literatura sobre os níveis plasmáticos de isoflavonas no organismo humano. Podemos observar que não há um consenso. Entretanto a concentração de 10 μM parece ser a concentração máxima encontrada após o consumo da soja pela dieta, sendo considerada fisiologicamente relevante para alguns autores.

Tabela 2 - Concentrações plasmáticas de isoflavonas encontradas no organismo humano, alguns exemplos.

Concentração plasmática encontrada	Referência
Concentração plasmática de 0,2 μM em humanos com dieta rica em soja;	ADLERCREUTZ & MARKKANEN (1993)
Pode atingir 7 μM , quando ocorre suplementação com farinha de extrato de soja	KING & BURSILL (1998)
Ingestão de 50 mg/dia de isoflavonas resulta em concentração plasmática variando de 200 a 3000 nM. Níveis plasmáticos de isoflavonas podem variar de 10 nM a 10 μM	SETCHEL & CASSIDY (1999)
Concentrações de até 10 μM são consideradas relevantes fisiologicamente. Níveis plasmáticos maiores que 10 μM são difíceis de ser atingidos por meio de dieta.	De LEMOS (2001) DUFFY et al. (2007)
Após administração de dose única de isoflavona (50 mg ou 16 mg/Kg), a concentração plasmática variou de 4 a 10 μM .	BLOEDON et al. (2002)
Concentração sérica de genisteína encontrada na população japonesa pode chegar a 0.5 μM , enquanto na população inglesa chega somente a 33 nM. Após administração de pílulas contendo genisteína, a concentração sérica pode chegar a 27 μM .	MORTON et al. (2002); IWASAKI et al. (2008)
Concentração plasmática de genisteína após administração de pílulas varia de 4 a 27 μM .	MILTYK et al. (2003) HARRIS et al. (2005)
Concentração plasmática média de genisteína na população japonesa varia de 475 e 501 nM, enquanto na população ocidental varia entre 10 e 33,2 nM.	HANDAYANI (2004)
Concentrações até 10 μM das isoflavonas são consideradas relevantes fisiologicamente.	MAGEE & ROWLAND (2004)
Níveis plasmáticos de genisteína pode chegar a 20–40 nM após 2h de ingestão de uma refeição contendo 125g de soja.	McCARTY (2006)
Concentrações maiores que 5 μM são consideradas irrelevantes fisiologicamente para estes autores.	KLEIN & KING (2007)
Concentração plasmática média de isoflavonas totais atingiu 5 μM após administração de tabletes ou refeição à base de soja, porém a biodisponibilidade dessas isoflavonas foi maior nos indivíduos que receberam a refeição.	GARDNER et al. (2008)

Observação: podemos notar claramente que não há um consenso sobre qual seria realmente a concentração plasmática fisiologicamente relevante; a concentração máxima atingida pela dieta seria de 10 μM . A variabilidade nos resultados encontrados por cada pesquisador pode ser decorrente da forma de processamento da soja, da fonte de isoflavonas utilizada, do tempo decorrido entre a ingestão de soja e a coleta de sangue para análise, além dos fatores individuais.

3.2.2. Benefícios gerais do consumo de soja

As isoflavonas da soja parecem beneficiar diversos sistemas de nosso organismo, contribuindo para redução ou melhora de diversas doenças crônicas nos indivíduos/populações que as consomem rotineiramente. Estudos em cultura de células, modelos animais e alguns ensaios clínicos em humanos têm mostrado que as isoflavonas representam uma alternativa promissora na prevenção e/ou tratamento de tumores, doenças cardiovasculares, osteoporose e alívio dos sintomas da menopausa, entre outros (CLAPAUCH, 2002; BEDANI & ROSSI, 2005; WUTTKE *et al.*, 2007; TOMAR & SHIAO, 2008; CEDERROTH & NEF, 2009; PATISAUL & JEFFERSON, 2010; NAMS 2011).

Talvez o efeito benéfico mais conhecido das isoflavonas da soja seja o alívio dos sintomas da menopausa. Embora estudos clínicos em humanos ainda não apontem resultados significativos e definitivos para suportar ou refutar a eficácia do consumo de alimentos ou suplementos a base de soja, esta suplementação continua sendo popular entre as mulheres que passam pela menopausa em diversos países (CLAPAUCH, 2002; NAMS, 2011). Para algumas mulheres, o consumo desses alimentos ou suplementos ajuda a melhorar as ondas de calor e outros sintomas decorrentes da falta do hormônio feminino, resultando em uma melhora na qualidade de vida como um todo (NAMS, 2011). A observação de que as mulheres asiáticas sofrem menos com a menopausa (BOULET *et al.*, 1994) também ajuda a tornar popular essa prática. Entretanto, estudos com resultados mais expressivos ainda não são comuns, devido às próprias limitações na condução destes estudos. De acordo com a Sociedade Norte-Americana de Menopausa (NAMS, 2011), o período da suplementação, a concentração de isoflavonas, quais isoflavonas estão presentes nesse complemento, entre outras variáveis, devem ser levadas em consideração. Segundo a última avaliação dessa sociedade, apenas 11 estudos mostraram melhora significativa nos sintomas vasomotores quando comparadas mulheres suplementadas com isoflavonas e com placebo. Ainda de

acordo com esses 11 estudos, concluiu-se que houve uma diminuição de 24 a 60% na frequência de ondas de calor. A duração dessa suplementação deve ser de, pelo menos, 12 semanas e a dose de 50 a 60 mg/dia de isoflavonas foi suficiente para a melhorar os sintomas nas mulheres que participaram da pesquisa (NAMS, 2011). De acordo com a revisão feita por Song e colaboradores (2007), os efeitos benéficos sobre os sintomas da menopausa foram mais consistentes em estudos que usaram suplementos à base de isoflavonas em contraste com aqueles que usaram proteína da soja. Segundo a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia – SBEM (CLAPAUCH, 2002), as evidências para recomendar os fitoestrógenos como substitutos da terapia de reposição hormonal ainda são insuficientes.

A associação do consumo de soja e prevenção ou melhora do quadro de osteoporose (geralmente mais frequente em mulheres pós-menopausa) está fundamentada em estudos que mostram que as isoflavonas reduzem a perda de massa óssea, diminuindo a reabsorção óssea e aumentando a densidade mineral. Em recente meta-análise, realizada por Wei e colaboradores (2012) concluiu-se que as isoflavonas aumentaram a densidade mineral óssea em 54% e diminuíram o marcador urinário de reabsorção óssea (DPD – deoxipiridinolina) em 23% (WEI *et al.*, 2012). Novamente, os efeitos hormonais das isoflavonas, aliados à baixa incidência de osteoporose em mulheres asiáticas, propiciaram a investigação da ação dessas substâncias sobre o tecido ósseo. A genisteína, por exemplo, pode inibir a formação e diferenciação de osteoclastos provenientes da medula óssea e induzir apoptose em osteoclastos maduros, inibindo assim a reabsorção óssea (YAMAGUCHI & GAO, 1997; GAO & YAMAGUCHI, 1999). A soja e suas isoflavonas também promovem aumento da atividade osteoblástica pela produção do fator do crescimento IGF-I (*insulin-like growth factor I*) nestas células (ARJMANDI *et al.*, 1998), o que se relaciona positivamente com a massa óssea de mulheres na pré- e pós-menopausa (ROMAGNOLI *et al.*, 1993). Muitos estudos *in vitro*, *in vivo* e em humanos, evidenciando esses resultados positivos surgiram na

década de 90, porém a eficácia desse tratamento depende da dose, via e duração da administração das isoflavonas e do modelo animal utilizado (PATISAUL & JEFFERSON, 2010; NAMS, 2011). Em um estudo de longo prazo (3 anos) com macacas ovariectomizadas e em pós-menopausa, Register *et al.* (2003) mostraram que o consumo de fitoestrógenos da soja não foi eficaz. Outros estudos sugerem ainda que as isoflavonas não são as responsáveis pela melhora no tecido ósseo, mas sim o estrógeno (NAMS, 2011), ressaltando outra vez a inconsistência de dados disponíveis na literatura sobre a segurança e eficácia do uso das isoflavonas da soja.

A observação de maior incidência de casos de doenças cardiovasculares em indivíduos orientais que se mudaram para o Ocidente e passaram a ter uma dieta com baixo teor de soja aliada à informação de baixa frequência dessas doenças em países asiáticos (NAGATA, 2000; ZHANG *et al.*, 2003) ajudaram a despertar o interesse da população e dos pesquisadores pelos benefícios da soja relacionados à saúde do sistema cardiovascular.

Neste caso, os efeitos biológicos do consumo da soja incluem diminuição dos níveis séricos de LDL (lipoproteína de baixa densidade; o colesterol “ruim”), triglicerídeos, lipoproteína A, proteína C-reativa, homocisteína, diminuição da pressão arterial e aumento de HDL (lipoproteína de alta densidade), também conhecido como colesterol “bom” (CANO, 2010). Além disso, o consumo de soja está associado à melhora da obesidade e diabetes tipo-2, resultando na melhora do estado metabólico do indivíduo como um todo (CEDERROTH & NEF, 2009). A quantidade de proteína de soja e isoflavonas administradas nestes estudos é bem variada: de 30 a mais de 50g da proteína, e concentrações de isoflavonas que chegaram a 185mg/dia (SONG *et al.*, 2007; NAMS, 2011).

Em 1999, o FDA (*Food and Drug Administration*) e a AHA (*American Heart Association*) passaram a recomendar a suplementação de 25g/dia de proteína de soja a uma dieta balanceada (rica em vegetais e pobre em gordura saturada e colesterol) na redução do

risco de doenças do coração. Entretanto, conforme mais dados foram surgindo, a AHA retirou essa recomendação, concluindo que a soja e suas isoflavonas devem ter menos efeitos sobre a saúde do sistema cardiovascular que o esperado (SACKS *et al.*, 2006). Para Messina (2010), mesmo que a redução nos níveis de LDL seja baixa (3 a 5%), é importante ressaltar que do ponto de vista da saúde pública, essa redução em longo prazo pode ser significativa, uma vez que a redução de 1% nos níveis de LDL representa diminuição no risco/mortalidade das doenças coronárias entre 2 a 5% (LAW *et al.*, 1994a; LAW *et al.*, 1994b).

Em resumo, até o presente momento, evidências que indicam que a soja e seus produtos derivados proporcionam benefícios à saúde humana variam de meras especulações a observações encorajadoras.

3.2.3. Daidzeína

A daidzeína (7,4'-dihidroxiisoflavona) é a segunda isoflavona mais encontrada nos produtos à base de soja e, por esta razão, juntamente com a genisteína, são as isoflavonas mais estudadas. O conteúdo de daidzeína/daidzina no grão de soja pode chegar a 40% do total (MESSINA *et al.*, 2006b). Assim como à genisteína, diversos efeitos benéficos são atribuídos à daidzeína.

Após a ingestão de daidzina e/ou daidzeína (meia-vida de 9,3h), diversos metabólitos são formados. Como descrito anteriormente, diversos fatores influenciam a biodisponibilidade de isoflavonas no organismo humano (CEDERROTH & NEF, 2009; CREMOUX *et al.*, 2010; MEDJAKOVIC *et al.*, 2010). A microbiota intestinal parece ser de fundamental importância no metabolismo da daidzeína, e diferenças entre grupos étnicos já foram descritas na formação do principal metabólito da daidzeína, o equol (S-equol) (Figura 4). Diversos estudos mostram que 25 a 30% da população adulta dos países ocidentais são capazes de metabolizar a daidzeína a equol (LAMPE *et al.*, 1998; ROWLAND *et al.*, 2000; ATKINSON *et al.*, 2005),

enquanto nos países orientais (Japão, Coreia e China), a frequência dos chamados “*equol-producers*” aumenta para 50 a 60% (WATANABE *et al.*, 1998; ARAI *et al.*, 2000; AKAZA *et al.*, 2004; SONG *et al.*, 2006).

Outro metabólito importante da daidzeína é a O-desmetilangolensina (O-DMA). Este metabólito também é produzido pelas bactérias intestinais humanas (Figura 4). A O-DMA, ao contrário do equol, é produzida por aproximadamente 80 a 90% da população (ATKINSON *et al.*, 2005). Os dois compostos, equol e O-DMA, já foram encontrados no sangue, urina, fezes, fluido prostático e tecido mamário humano (MORTON *et al.*, 1997; WATANABE *et al.*, 1998; FRANKE *et al.*, 2002; MAUBACH *et al.*, 2003; MAUBACH *et al.*, 2004).

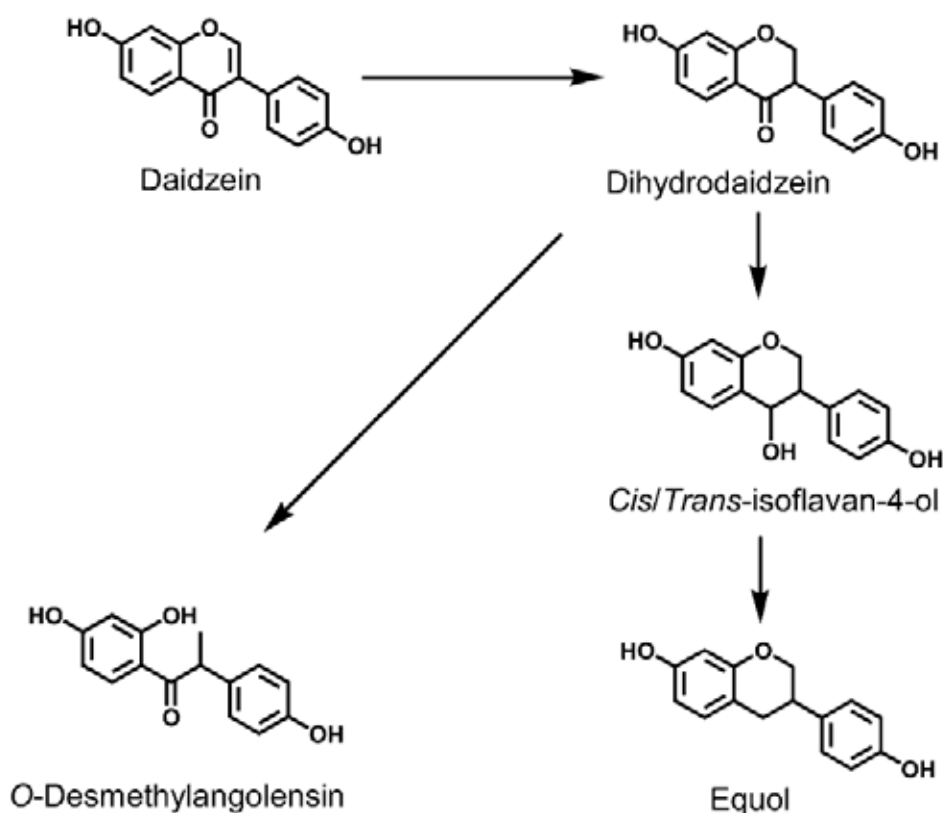


FIGURA 4. Estrutura química dos metabólitos intermediários e finais (equol e O-DMA) da daidzeína. Retirado de LAMPE (2009).

A daidzeína e seus metabólitos exercem diversos efeitos sobre o organismo humano e estão diretamente relacionados com os benefícios de uma dieta rica em soja, sendo a atividade anticancerígena uma das mais estudadas. Diversos autores já demonstraram a indução de morte celular em linhagens tumorais após o tratamento com daidzeína. De acordo com Jin *et al.* (2010), os dados publicados na literatura (em número menor do que os publicados com genisteína) indicam que a atividade anticancerígena da daidzeína é mediada por meio do atraso do ciclo celular e da apoptose, porém a atividade citotóxica da daidzeína, quando encontrada, é menos intensa do que a da genisteína (ONozAWA *et al.*, 1998; CHEN & ANDERSON, 2001; FEITELSON *et al.*, 2003). Dependendo do tipo celular tumoral estudado, a apoptose induzida pela daidzeína está associada ao atraso do ciclo celular em G0/G1 ou G2/M (WANG *et al.*, 2002; GUO *et al.*, 2004a; GUO *et al.*, 2004b). De acordo com Jin *et al.* (2010), a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela daidzeína nas células MCF-7 foi responsável pela apoptose encontrada em seu estudo. Houve comprometimento da integridade da membrana mitocondrial, liberação do citocromo c, o que resultou em ativação das caspases 9 e 7, e finalmente, em morte celular (JIN *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, os metabólitos da daidzeína acima citados, especialmente o equol, têm despertado bastante interesse dos pesquisadores, pois alguns estudos demonstram que este metabólito é biologicamente mais ativo do que a daidzeína (ATKINSON *et al.*, 2005; PATISAUL & JEFFERSON, 2009). Alguns autores já levantam a hipótese de que a capacidade de produção do equol é crítica para obtenção dos efeitos benéficos associados a uma dieta rica em soja (LAMPE, 2009). Assim como a daidzeína, o equol também se liga aos receptores estrogênicos ER α e ER β (SETCHELL *et al.*, 2002; COS *et al.*, 2003; SETCHELL & CLERICI, 2010) e também tem demonstrado efeito pró-apoptótico *in vitro* e *in vivo* (CHOI & KIM, 2008; CHOI, 2009; SHI *et al.*, 2011).

Outra atividade biológica bastante estudada dos flavonóides, como a daidzeína, é a atividade antioxidante (CAZAROLLI *et al.*, 2008). Esta atividade já foi reportada em muitos modelos experimentais e também é importante na quimioprevenção do câncer uma vez que ajuda a evitar os danos celulares e no DNA causados pelo estresse oxidativo crônico, seja este inerente às células (resultante, por exemplo, do processo de respiração celular) ou causado por substâncias que induzam o aumento dos radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO) (RUNDHAUG & FISCHER, 2010).

Os mecanismos antioxidantes dos flavonoides, incluindo daidzeína e genisteína, incluem a captura direta dos radicais livres e a modulação de enzimas que fazem parte do sistema de defesa antioxidante das células (catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, superóxido desmutase) (RUSSO, 2007; CAZAROLLI *et al.*, 2008).

3.2.4. Genisteína

A isoflavona genisteína (4', 5, 7-trihidroxiisoflavona) é a isoflavona mais encontrada nos produtos à base de soja e, juntamente com a genistina, corresponde a aproximadamente 50% do total de isoflavonas encontradas no grão de soja (MESSINA *et al.*, 2006b). Diversos efeitos benéficos à saúde humana são atribuídos à genisteína e, por esta razão, ela é a isoflavona mais extensivamente estudada.

O interesse pelas isoflavonas começou na década de 40, quando os pesquisadores descobriram que os problemas reprodutivos que estavam ocorrendo em criações de ovelhas na Austrália estavam relacionados com um tipo de trevo rico em isoflavonas (BENNETTS *et al.*, 1946; LUNDH *et al.*, 1990). Anos depois, problemas de fertilidade também foram vistos em animais de zoológicos americanos alimentados com soja (SETCHELL *et al.*, 1987) e em roedores (CHENG *et al.*, 1954; CARTER *et al.*, 1953; CARTER *et al.*, 1955). Em 1987, a publicação do estudo de Akiyama e colaboradores, mostrando a inibição da proteína tirosina-

quinase pela genisteína, foi um marco importante no estudo dos mecanismos moleculares pelos quais a genisteína exerce seu efeito anticancerígeno (SARKAR & LI, 2003).

A genisteína atua em diversas cascatas de sinalização celular envolvidas no balanço de sobrevivência/proliferação e morte celular, seja esta relacionada ou não a sua ligação com os receptores estrogênicos. Assim como a daidzeína, a genisteína pode atrasar o ciclo celular e induzir apoptose (RAMOS, 2007; REITER *et al.*, 2008; STEINER *et al.*, 2008). Estes são os mecanismos de quimioprevenção do câncer mais estudados.

A parada no ciclo celular parece ocorrer mais frequentemente na fase G2/M, como demonstrado em estudos com linhagens tumorais de mama (MDA-MB-231, MCF-7), próstata (PC3 e LNCaP), ovário (SKOV-3; HO-8910), pulmão (H460, H322), cólon (Caco-2), entre outras (BANERJEE *et al.*, 2008; STEINER *et al.*, 2008; OUYANG *et al.*, 2009; MEDJAKOVIC *et al.*, 2010; SHANMUGAM *et al.*, 2011). Porém, em células de melanoma e fibroblasto de camundongos, houve atraso no ciclo celular na fase G0/G1 (BANERJEE *et al.*, 2008; STEINER *et al.*, 2008; OUYANG *et al.*, 2009; MEDJAKOVIC *et al.*, 2010; SHANMUGAM *et al.*, 2011).

Para que ocorra o atraso em G2/M, a genisteína diminui a expressão de ciclina B, necessária para a progressão da fase G2 para M do ciclo celular. Além disso, a genisteína pode aumentar a expressão de proteínas quinase inibidoras de ciclinas (CDKIs), como p21^{WAF1}, p27^{KIP1} e p16^{INK4a}. O bloqueio da transição G1/S e consequente parada do ciclo em G0/G1, induzida pela genisteína em fibroblastos BALB/c 3T3 e células de melanoma B16-F1, é resultante da indução de p21 e consequente supressão da ciclina E nestas células (KUZUMAKI *et al.*, 1996; KUZUMAKI *et al.*, 1998).

Os efeitos antiproliferativo e pró-apoptótico da genisteína já foram relatados em vários tipos de câncer: mama (EL-ZARRUK & VAN DE BERG, 1999), próstata (ZHOU *et al.*, 1999), cabeça e pescoço (ALHASAN *et al.*, 1999), pulmonar (LIAN *et al.*, 1998),

pancreático (DOUZIECH *et al.*,1998; DOUZIECH *et al.*,1999; BOROS *et al.*, 2001;), bexiga (SU *et al.*, 2000), fígado (TACCHINI *et al.*, 2000), endométrio (KONSTANTAKOPOULOS *et al.*, 2006), linfomas (PARK *et al.*,2005) e leucemias refratárias à quimioterapia, como a linfoblástica aguda da criança e a linfoblástica crônica do adulto (UCKUN *et al.*,1999).

A apoptose induzida pela genisteína pode ser resultante da diminuição na expressão das proteínas Bcl-2 e Bcl-xL (função anti-apoptótica), aumento na expressão de Bax, Bak (função pró-apoptótica) e ativação das caspases (proteínas executoras da morte celular), especialmente a caspase-3 (RAMOS, 2007; BANERJEE *et al.*, 2008). De acordo com Murata *et al.*, (2004) e Jin *et al.* (2010), essas alterações nas proteínas de membrana mitocondriais (família Bcl-2) e a consequente ativação das caspases, que leva à apoptose, também são devidas à geração de espécies reativas de oxigênio pelas isoflavonas genisteína e daidzeína.

A indução de p21^{WAF1}, p27^{Kip1}, IκBα e inibição de proteossomo também são mecanismos pelos quais a genisteína leva à morte apoptótica das células (LI *et al.*, 1999; KAZI *et al.*, 2003). Além desses mecanismos, o dano ao DNA, causado pelo tratamento das células com genisteína, também já foi reportado. A genisteína é capaz de causar danos ao DNA devido à inibição da topoisomerase I e II (OKURA *et al.*, 1988; MARKOVITS *et al.*, 1989; McCABE Jr. & ORRENIUS, 1993) e por sua ação oxidativa, tempo e dose dependente (STEINER *et al.*, 2008; OUYANG *et al.*, 2009).

Na verdade, a genisteína é capaz de atuar em muitas vias de sinalização celular. São muitos os estudos e artigos de revisão sobre esta isoflavona e seus efeitos quimiopreventivos contra o câncer. Ela modula a expressão e/ou atividade de moléculas envolvidas na sinalização de apoptose, regulação do ciclo celular, defesa antioxidante, metabolismo xenobiótico, sobrevivência celular (ex. PI3K/Akt, NFκB, MAPK, etc), inflamação (ex. COX-2), metástase e angiogênese (ex. inibição de VEGF; metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, entre outros) (NEERGHEEN *et al.*, 2010; GUPTA *et al.*, 2010; SHU *et al.*, 2010).

3.2.5. Considerações sobre o uso de isoflavonas: resultados controversos

Embora exista um número significativo de pesquisas sobre as isoflavonas da soja e sua relação com a saúde humana, os efeitos do seu consumo em longo prazo ou de sua exposição precoce, principalmente sobre o desenvolvimento e saúde do sistema reprodutor, ainda permanecem desconhecidos e em debate. Em recente revisão, publicada por Cederroth e colaboradores (2012), os autores afirmam que são poucos os estudos em humanos, porém as evidências em animais sugerem que a fertilidade das fêmeas é comprometida pela exposição neonatal ou *in utero* às isoflavonas. Dentre as alterações descritas estão o tempo de abertura genital das roedoras, mudanças no ciclo estral, na função ovariana e subfertilidade (CEDERROTH *et al.*, 2012).

No final da década de 1990 e início dos anos 2000, alguns estudos sugeriram alteração neonatal/pós-natal do epigenoma frente à exposição de fitoestrógenos (LYN-COOK *et al.*, 1995; DAY *et al.*, 2002). Em 2006, Dolinoy e colaboradores mostraram pela primeira vez que a genisteína afeta a expressão de genes *in utero* (camundongos Agouti) e altera a susceptibilidade à obesidade dos indivíduos na fase adulta devido a modificações permanentes no epigenoma. Além disso, essas modificações epigenéticas causadas pela exposição materna à genisteína também alteraram o fenótipo da pelagem da prole (DOLINOY *et al.*, 2006). A partir daí, estudos que buscam compreender os mecanismos de quimioprevenção dos nutrientes por meio de modificações epigenéticas ganharam destaque. Muitos dados promissores surgem a cada dia, uma vez que do ponto de vista clínico, as alterações epigenéticas podem ser reversíveis, ao contrário das mutações (LINK *et al.*, 2010).

Apesar da menor prevalência de câncer de mama e ovário em populações que consomem altas quantidades de soja, alguns estudos (HSIEH *et al.*, 1998; ALLRED *et al.*, 2001 ; ALLRED *et al.*, 2004; JU *et al.*, 2006a) provocaram um grande debate sobre a

segurança das isoflavonas na dieta, especialmente para pacientes com tumor estrógeno-dependente e mulheres com alto risco de desenvolver câncer de mama (BOLCA *et al.*, 2010). A preocupação sobre os efeitos estimuladores de tumor das isoflavonas é fundamentada em estudos que mostraram o efeito proliferativo da genisteína em células MCF-7 *in vitro* e em tumores mamários de roedores. As propriedades de estimulação da proliferação celular das isoflavonas daidzeína e genisteína podem ser atribuídas à capacidade de ligação aos receptores de estrógeno (MATSUMURA *et al.* 2005), o que, por sua vez, pode estimular a entrada na fase S do ciclo celular (FOSTER *et al.*, 2001) ou pode inibir a apoptose (SCHMIDT *et al.*, 2005). Em concentrações baixas, estas isoflavonas possuem atividade proliferativa, enquanto em maiores concentrações, efeitos inibitórios e citotóxicos podem ser encontrados (De LEMOS, 2001). Alguns estudos mostraram ainda que a genisteína (JU *et al.*, 2006b) e os produtos à base de soja que sofreram maior processamento (ALLRED *et al.*, 2004) possuem maior efeito sobre a proliferação desses tumores. Ainda, a genisteína seria capaz de inibir drogas como o tamoxifeno, SERM (*Selective Estrogen Receptor Modulator*) bastante usado no tratamento de câncer de mama (JU *et al.*, 2002). Alguns pesquisadores, no entanto, apontam falhas nos modelos animais e no delineamento experimental utilizado (MESSINA & WOOD, 2008). Dados contraditórios a estes, como a supressão desse mesmo tipo de tumor em roedores e o aumento da eficácia do tamoxifeno, também já foram relatados por outros pesquisadores (GOTOF *et al.*, 1998; MAI *et al.*, 2007). De acordo com Messina & Wood (2008), o potencial estrogênico das isoflavonas tem impacto limitado sobre a saúde da mulher e sobre o tecido mamário, uma vez que muitos estudos clínicos apontam ausência de efeito proliferativo na mama e pouca ou nenhuma interferência sobre a densidade mamária. Além disso, há estudos epidemiológicos que mostram efeito protetor das isoflavonas com relação ao risco de câncer de mama. Outra limitação encontrada em muitos estudos é a falta de informação sobre a biodistribuição das isoflavonas no tecido mamário, ou seja, qual

concentração de isoflavonas é encontrada neste tecido após a ingestão de alimentos e/ou suplementos à base de soja. De acordo com Bolca e colaboradores (2010), a concentração de isoflavonas encontrada no tecido mamário foi de 100 a 1000 vezes menor do que aquela necessária para resultar em efeitos celulares proliferativos mediados pelos receptores de estrógeno (ERs).

Em resumo, a variabilidade de resultados e a falta de um consenso sobre o tema são resultantes da falta de padronização dos estudos. A obtenção de uma resposta quimiopreventiva favorável vai depender de diversos fatores individuais, tais como o tempo de exposição a essas isoflavonas, os hábitos alimentares, origens étnicas, microbiota intestinal do indivíduo, níveis hormonais no qual o indivíduo está exposto no momento, modificações epigenéticas sofridas, entre outros.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Substâncias-teste: isoflavonas da soja

As isoflavonas da soja daidzeína (CAS 486-66-8) e genisteína (CAS 446-72-0) foram adquiridas comercialmente (Acros Organics) e dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) para preparo de uma solução estoque de concentração alta. Quando em cultura, a porcentagem de DMSO não ultrapassou 1%.

As concentrações utilizadas nos experimentos de citotoxicidade variaram de 0,1 a 100 μM para as duas isoflavonas. Nos demais ensaios biológicos foram utilizadas as concentrações de 10 μM ou 25 μM , representando respectivamente, a máxima concentração sérica encontrada após dieta à base de soja ou após suplementação com pílulas (De LEMOS, 2001; BLOEDON *et al.*, 2002; MILTYK *et al.*, 2003; DUFFY *et al.*, 2007).

4.2. Substâncias utilizadas como controle positivo dos ensaios

No ensaio de citotoxicidade e cinética de proliferação celular, a doxorrubicina (CAS 29042-30-6; Adriblastina[®]) foi utilizada em concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ de meio de cultura. Para os ensaios de indução de apoptose e análise do ciclo celular por citometria de fluxo, foi utilizada a camptotecina (CAS 7689-03-4; Acros Organics) em concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$. Um segundo agente indutor de apoptose, a vincristina (CAS 2068-78-2; Oncovin[®]; 4 $\mu\text{g/mL}$), foi utilizado para verificar a indução de apoptose em gel de agarose. Estas concentrações foram determinadas por testes-piloto.

As propriedades citotóxicas da doxorrubicina sobre as células malignas e os efeitos tóxicos em vários órgãos parecem estar relacionadas à intercalação nas bases nucleotídicas (FERGUSON & PEARSON, 1996). A intercalação inibe a replicação nucleotídica e a ação da DNA e RNA-polimerase. A interação da doxorrubicina com a topoisomerase-II para formar

complexos de DNA passíveis de clivagem parece ser um importante mecanismo da atividade citotóxica do fármaco (FERGUSON & BAGULEY, 1996). A citotoxicidade induzida pela doxorubicina também é resultante da geração de radicais livres (GRANADOS-PRINCIPAL *et al.*, 2010).

A camptotecina possui mecanismo de ação semelhante ao da doxorubicina, entretanto ela se intercala no complexo topoisomerase I-DNA, resultando em danos de fita dupla do DNA (DSBs) e causando morte celular (HSIANG *et al.*, 1989). A camptotecina também modula fatores pró e anti-apoptóticos, levando à indução deste tipo de morte celular (LEGARZA & YANG, 2006).

A vincristina, conhecida por ser um alcaloide derivado da planta *Vinca rosea*, tem como principal mecanismo de ação a inibição da formação dos microtúbulos, o que resulta em parada da mitose e morte celular. O processo apoptótico é induzido devido ao aumento nas concentrações intracelulares de fatores como o p53 e p21, além de inibição da atividade da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (WANG *et al.*, 1995; HALDAR *et al.*, 1995; JORDAN & WILSON, 2004; GASCOIGNE & TAYLOR, 2009).

4.3. Linhagens celulares

As linhagens celulares utilizadas no estudo foram a MCF-7 (carcinoma de mama), HB4a (linhagem não tumoral de mama) e OVCAR-3 (carcinoma ovariano).

As linhagens tumorais MCF-7 e OVCAR-3 foram gentilmente cedidas pelo Professor João Ernesto de Carvalho da Universidade de Campinas (UNICAMP, Campinas, SP). A linhagem HB4a foi gentilmente doada pela Professora Silvia R. Rogatto do Hospital do Câncer A. C. Camargo (São Paulo, SP). As linhagens tumorais foram cultivadas em meio DMEM (Gibco 12800-058) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco) e 0,1% de antibiótico/antimicótico (Gibco 15240-062). A linhagem HB4a foi cultivada no mesmo meio

de cultura descrito acima, porém com adição de insulina (Gibco) e hidrocortisona (Pharma Nostra), ambas em concentração final de 5 µg/mL. As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C, 5% CO₂ e 95% de umidade relativa.

4.4. Ensaio de citotoxicidade com resazurina

No ensaio de citotoxicidade com resazurina, as células vivas reduzem a resazurina (coloração azul, não fluorescente) de maneira mais eficiente do que as células mortas ou em vias de morte. O produto desta reação, resofurina (coloração rosa, fluorescente), pode ser detectado por equipamentos colorimétricos ou que detectam a fluorescência (McMILLIAN *et al.*, 2002). Os ensaios foram feitos da seguinte maneira: as células MCF-7, OVCAR-3 ou HB4a foram semeadas em placas de 24 poços. Após o período de 24 horas de estabilização, o tratamento com as isoflavonas foi feito por 24, 48h e 72h. Após este tempo foi adicionando a resazurina 60 µM (CAS 62758-13-8; Acros Organics) por 3 horas. A leitura da fluorescência foi realizada em leitor de microplacas (VICTOR 3, PERKIN ELMER) na faixa de 530-560 nm de excitação e 580-600 nm de emissão. Para o experimento, foram semeadas $4,5 \times 10^4$ células/poço (determinado por teste piloto), e os tratamentos com as isoflavonas foram feitos com concentrações variáveis de 0,1 µM a 100 µM, de acordo com a disposição a seguir:

	1	2	3	4	5	6
A	mc	mc	mc	C(-)	C(-)	C(-)
B	C(+)	C(+)	C(+)	[1]	[1]	[1]
C	[2]	[2]	[2]	[3]	[3]	[3]
D	[4]	[4]	[4]	[5]	[5]	[5]

FIGURA 5. Esquema da placa de cultivo celular para o Ensaio citotoxicidade com resazurina. mc: meio de cultura sem célula; C(-): controle; meio de cultura com célula; C(+): controle positivo, doxorubicina (Adriplastina®), 10 µg/mL; [1] genisteína ou daidzeína 0,1µM; [2] genisteína ou daidzeína 1,0 µM; [3] genisteína ou daidzeína 10µM; [4] genisteína ou daidzeína 50 µM; [5] genisteína ou daidzeína 100µM.

4.5. Ensaio da cinética de proliferação celular e teste de viabilidade celular

A cinética de proliferação das células é um método indireto para analisar se as isoflavonas genisteína e daidzeína alteram o ciclo celular, atrasando-o ou acelerando-o, ou se ocorre diminuição da viabilidade celular (determinada pela coloração com azul de tripan). Dessa forma, foi feita uma curva de cinética de proliferação nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas, de acordo com o breve protocolo abaixo. Neste experimento, as células OVCAR-3 (10^5) foram semeadas em tubos de cultura de 10 cm² de superfície, em meio de cultura suplementado com soro bovino fetal, já contendo os respectivos tratamentos: controle – 1% DMSO; controle positivo – doxorubicina 10 µg/mL; genisteína 10 µM ou daidzeína 10 µM. Portanto, quatro tubos de cultura foram semeados para cada um dos dias de contagem (após 24, 48, 72 e 96h), em três repetições independentes. A contagem das células foi feita na câmara de Neubauer, fazendo-se a média dos 4 quadrantes multiplicando pelo fator 10^4 . A mesma amostra é utilizada para a análise da cinética de proliferação e da viabilidade celular. Para análise da viabilidade celular, são contadas as células viáveis (translúcidas) e não viáveis (azuis). O cálculo da viabilidade celular (%) é feito pela somatória das células viáveis,

dividido pela somatória das células viáveis com as células não viáveis e multiplicando-se por 100.

4.6. Avaliação da expressão de genes relacionados a apoptose por PCR quantitativa em tempo real

Para a realização destes experimentos, foram semeadas 10^6 células MCF-7, OVCAR-3 ou HB4a por frasco experimental. Após 24h de estabilização, foi feito o tratamento das células com DMSO 1% (controle) ou com as isoflavonas (10 μ M ou 25 μ M) por mais 12h. Após este período foram feitos os procedimento de colheita para extração do RNA, síntese do cDNA e a reação de PCR em tempo real.

a) Extração do RNA de cultura de células

A extração do RNA foi feita de acordo com as instruções do fabricante do reagente utilizado, TRIZOL LS[®] (Invitrogen 10296-010). Uma vez extraído o RNA, este foi tratado com DNase I[®] (Invitrogen 18068-015) (também de acordo com instruções do fabricante). Após este tratamento, é necessário verificar se o RNA extraído está degradado. Isto foi feito quantificando-o em espectrofotômetro – Biophotometer Eppendorf - (razão A260/280 deve estar entre 1.9 e 2.1) e através de gel de agarose para verificar o padrão de bandas dos RNAs ribossomais 28S e 18S (Gel 1%, 70-80V, 30mA, 25-30 min).

b) Síntese do cDNA

Para a síntese do cDNA foram seguidos os passos:

b.1. Preparar um mix para a quantidade necessária de microtubos de cDNA a ser sintetizado, sem o RNA. Homogeneizar bem, distribuir 18 μ L em cada microtubo e adicionar os 2 μ L de RNA.

b.2. Incubar no termociclador por 50 min, 37°C, seguido de 15 seg a 70°C.

Reagentes do mix:

- água DEPC (Invitrogen 750023) → 9,9 µL
- dNTP 2,5mM mix (Invitrogen 18427-088) → 2 µL
- OligodT 10 pmol/µL → 1 µL
- Tampão M-MLV → 4 µL
- RNase OutTM (Invitrogen 10777-019) → 0,1 µL
- Transcriptase Reversa M-MLV (Invitrogen 28025-021) → 1 µL
- RNA (500 ng/mL) → 2 µL

c) *PCR em tempo real*

Preparado o cDNA, é necessário verificar se o *primer* a ser analisado na PCR em tempo real é amplificado em uma PCR convencional. Para isso, foi feito um mix (mix 1, conforme descrito adiante) com a lista de reagentes a seguir e então este foi levado para o termociclador (programa utilizado a seguir). Terminada a reação, o produto foi levado para corrida eletroforética para visualização das bandas (gel de agarose 1%; 70-80V, 30mA, 60-70 min). Uma vez que os *primers* tenham sido amplificados, a análise de PCR em tempo real pôde ser realizada. Para esta reação, também foi preparado um mix (mix 2, conforme segue detalhado adiante) para cada *primer* a ser analisado e, após distribuição nos poços da microplaca de PCR e adição do cDNA, este foi levado ao termociclador específico (Engine Opticon[®], Bio-Rad) com a configuração de reação descrita pelo fabricante do sistema Sybr Green (Invitrogen). Os *primers GAPDH* e *COX-2* foram construídos, respectivamente, de acordo com a sequência utilizada por Sugaya *et al.* (2005) e Dussalt & Pouliot (2006). Os demais *primers* (*CASP-3*; *CASP-7*; *BAX*, *BCL-xL*) foram construídos com a ajuda do software disponível no site do fornecedor: <
<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>>. Todos os *primers* foram

desenhados para que apresentassem temperatura de anelamento de aproximadamente 60°C. As sequências destes *primers* estão apresentadas nos capítulos referentes aos artigos científicos (Artigo 1, Artigo 2 e Artigo 3).

Reagentes para o mix 1 de amplificação dos *primers* na PCR convencional:

- Água DEPC → 18,25 µL
- Tampão da Taq 10 X → 2,5 µL
- dNTP 2,5mM (Invitrogen 18427-088) → 0,25 µL
- MgCl₂ 50mM → 0,75 µL
- Taq DNA Polimerase (Invitrogen 11615-010) → 0,25 µL
- Primer F → 1 µL/microtubo
- Primer R → 1 µL/microtubo
- cDNA (500 ng) → 1 µL/microtubo

↳ Incubar no termociclador e programar o aparelho com a temperatura de anelamento do *primer*.

Configuração do termociclador (Techne):

- Desnaturação: 95°C por 3mim,
- 35 ciclos: 95°C por 1mim, 60°C por 1mim, 72°C por 1mim,
- Extensão final: 72°C por 5mim,

Reagentes para o mix 2 de amplificação dos *primers* na PCR em tempo real:

- Água → 7 µL
- Primer F → 0,5 µL
- Primer R → 0,5 µL
- cDNA → 2 µL
- Sybr Green (Invitrogen 11733-046) → 10 µL

↳ Fazer o mix de cada *primer* sem o cDNA. Distribuir em cada poço da microplaca e adicionar os 2 µL do cDNA correspondente. A configuração do termociclador (Engine Opticon, Bio-Rad) seguiu o recomendado pelo fabricante no manual do kit Sybr Green.

A técnica foi realizada com *primers* de genes relacionados a apoptose, bem como com o gene constitutivo *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato), para posterior análise relativa dos dados. Os tratamentos foram analisados em triplicata técnica e em duas repetições biológicas.

A análise ou quantificação relativa realizada se baseia na comparação da expressão do gene alvo com a referência interna, por meio dos Cts ou Cps de cada amostra (método de PFAFFL, 2001).

Durante os ciclos iniciais, o sinal de fluorescência é fraco e não pode ser distinguido da fluorescência basal (*background*). Com o acúmulo da quantidade de produto gerado a cada ciclo, o limiar da fluorescência basal (*threshold*) é ultrapassado. Este ponto é denominado de Ciclo *Threshold* (Ct) ou *Crossing Point* (Cp), e define a quantidade de ciclos requeridos pela amostra para transpor a fluorescência basal. O Ct está diretamente relacionado à quantidade de DNA amplificado (KUBISTA *et al.*, 2006; NOLAN *et al.*, 2006).

De acordo com PFAFFL (2001), a expressão relativa dos genes em estudo é dada pela seguinte equação:

$$R = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta CP_{\text{alvo}} (\text{controle} - \text{amostra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}} (\text{controle} - \text{amostra})}}$$

A razão (R) de um gene alvo é expressa em uma amostra em relação à amostra controle e à expressão do gene endógeno. E_{alvo} é a eficiência do transcrito do gene alvo; E_{ref} é a eficiência do transcrito do gene referência; ΔCP_{alvo} é a diferença de CP do controle – amostra do gene alvo transcrito; ΔCP_{ref} é a diferença de CP do controle – amostra do gene referência transcrito.

Para análise estatística dos dados gerados pela PCR quantitativa em tempo real foi utilizado o software REST© (*Relative Expression Software Tool*), de PFAFFL *et al.* (2002).

4.7. Avaliação da indução de apoptose em gel de agarose

O princípio desta técnica está na visualização do padrão de escada da fragmentação do DNA que ocorre durante este processo de morte celular.

Para esse teste, foram semeadas 10^6 células (OVCAR-3) por frasco experimental. Após 24h de estabilização, foi feito o tratamento das células com as isoflavonas ou com os indutores de apoptose (camptotecina e vincristina) por mais 24h. Após este período foi feito o procedimento de colheita que se segue.

O tratamento das células por 24h foi determinado através de teste piloto, onde o período de 12h não foi suficiente para a visualização da fragmentação do DNA apoptótico no gel. A concentração das isoflavonas testada foi a mesma dos demais experimentos, ou seja, 10 μ M. Os indutores de apoptose utilizados foram a camptotecina (4 μ g/mL) e a vincristina (4 μ g/mL). Ao final do tratamento, o meio de cultura foi removido e reservado, as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas. A suspensão celular foi então centrifugada por 5 min, 1200 rpm. Foi adicionado ao pellet de células a solução de lise (Tris-HCl 10mM; NaCl 5mM, EDTA 2mM), juntamente com SDS 20%; e proteinase K (Invitrogen - 5 mg/mL) por 3 horas, a 37°C. Em seguida foi acrescentado fenol /clorofórmio (v/v) e o material foi centrifugado a 12000 rpm, 10 min, 4°C. A fase aquosa foi então isolada em novos microtubos, onde foi adicionado NaCl 6M e isopropanol para precipitação do DNA (-20°C overnight). Após nova centrifugação (12000 rpm, 10 min, 4°C), o DNA foi dissolvido com tampão TE (Tris; EDTA) e tratado com RNase A (Invitrogen, 20 mg/mL; 1h, 37°C). A corrida eletroforética foi feita nas seguintes condições: gel de agarose 1,2% corado com Syber Safe[®] (Invitrogen) em tampão TEB (Tris; EDTA; Ácido Bórico) 1X por aproximadamente 2 horas, a 50 V e 30 mA. Após este período o padrão de escada do DNA apoptótico foi visualizado com ajuda do transluminador.

4.8. Avaliação da indução de apoptose por citometria de fluxo (Anexina-V/PI)

A avaliação de apoptose por citometria de fluxo foi feita através da marcação com anexina-V conjugada com o fluorocromo fluoresceína (FITC). A anexina-V liga-se a fosfatidilserina exposta na membrana celular no início do processo apoptótico. Juntamente com o iodeto de propídeo (PI), é possível identificar células viáveis (marcação negativa para anexina-V-FITC e PI), células em apoptose inicial (marcação positiva para anexina-V-FITC e negativa para PI), células em apoptose tardia/mortas (marcação positiva para anexina-V-FITC e PI) ou células em necrose (marcação negativa para anexina-V-FITC e positiva para PI) (VAN ENGELAND *et al.*, 1998).

Para esta análise, aproximadamente 10^5 células HB4a e MCF-7/poço foram semeadas em microplacas de 6 poços. Após 24h de estabilização, foram realizados os tratamentos: controle (1% DMSO), camptotecina (4 $\mu\text{g/mL}$) e isoflavonas em concentração de 10 e 25 μM por 24 horas. Ao final do tratamento, o meio foi removido e as células lavadas com PBS para posterior tripsinização. A suspensão celular foi centrifugada (1000 rpm, 5 min, 4°C) e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspensionado em PBS gelado e submetido à nova centrifugação. Após o descarte do sobrenadante, as células foram marcadas com a anexina-V-FITC (BD Pharmigen™ 1:100) e o iodeto de propídeo (Sigma; 5 $\mu\text{g/mL}$). Dez mil eventos foram analisados no citometro BD FACS CANTO. Os experimentos foram realizados em duplicata biológica e triplicata técnica.

4.9. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

A análise do ciclo celular por citometria de fluxo foi feita a partir da marcação do núcleo celular com iodeto de propídeo (PI). Células em fase G1 possuem uma cópia do material genético e a partir disso terão um padrão de intensidade de fluorescência “X”. Células em fase G2/M terão duas cópias do material genético e, portanto, intensidade de

fluorescência dobrada. Células em fase S terão valores de fluorescência intermediários, uma vez que elas ainda estão em processo de síntese do DNA (BRAYLAN *et al.*, 1982; JAYAT & RATINAUD, 1993).

Nestes experimentos, também foram semeadas aproximadamente 10^5 células HB4a e MCF-7/poço em microplacas com 6 poços. Após a estabilização das células (24h), foram feitos os seguintes tratamentos: controle (1% DMSO), camptotecina (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e isoflavonas em concentração de 10 e 25 μM . Vinte e quatro horas depois, as células foram tripsinizadas, centrifugadas (1000 rpm, 5 min, 4°C) e foi adicionado ao pellet de células, PBS e etanol 70% gelado. O material foi armazenado em -20°C por 24h. Após nova centrifugação (1000 rpm, 5 min, 4°C), foi feito o tratamento com RNase A (Invitrogen; 10 mg/mL; 30 min, 37°C) seguido da marcação das células (PI 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; citrato de sódio 0,1% e Triton X-100 0,1%) por 1 hora antes da análise (10.000 eventos; BD FACS CANTO). Assim como no item anterior, os experimentos foram realizados em duplicata biológica e triplicata técnica.

4.10. Análise estatística

Os dados obtidos na avaliação da citotoxicidade, cinética de proliferação celular e análises de apoptose e ciclo celular por citometria de fluxo foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), seguido de teste de Dunnett, com $\alpha = 0,05$ (GraphPad Prism[®] 5 software). Para a construção da curva de proliferação celular da linhagem OVCAR-3, foi utilizado o recurso de equação exponencial de crescimento celular do mesmo software (GraphPad Prism[®] 5). A análise da expressão gênica determinada pela qRT-PCR foi feita pelo método de quantificação relativa, utilizando o *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) como referência. Foi utilizado o software REST[©] (*Relative Expression Software Tool*), disponível no endereço eletrônico: < <http://www.gene-quantification.de> > (PFAFFL, 2001; PFAFFL *et al.*, 2002).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

ESTE TÓPICO SERÁ APRESENTADO A SEGUIR NA FORMA DE ARTIGOS CIENTÍFICOS.

ARTIGO 1:

Physiological achievable concentrations of daidzein and genistein do not interfere on cell viability of human ovarian carcinoma cell line OVCAR-3.

ARTIGO 2:

Physiological levels of daidzein do not cause apoptosis and arrest cell cycle only in tumoral cell line.

ARTIGO 3:

Genistein at maximal physiologic serum levels induces G0/G1 arrest in MCF-7 and HB4a cells, but not apoptosis.

5.1. ARTIGO 1

Physiological achievable concentrations of daidzein and genistein do not interfere on cell viability of human ovarian carcinoma cell line OVCAR-3.

Marcela S. Tsuboy¹, Juliana C. Marcarini¹, Rodrigo C. Luiz², Daniele Sartori³, Mário S. Mantovani³, Lúcia R. Ribeiro¹.

¹- Instituto de Biociências, UNESP, Univ Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil.

²- Universidade Estadual de Londrina – UEL – Departamento de Ciências Patológicas, Londrina, PR, Brasil.

³- Universidade Estadual de Londrina – UEL – Departamento de Biologia Geral, Londrina, PR, Brasil.

Corresponding author

Marcela S. Tsuboy
Universidade Estadual Paulista – UNESP
Instituto de Biociências, campus Rio Claro, SP, Brazil.
CEP: 13506-900
E-mail: tsuboyma@yahoo.com.br
Phone: +55 (19) 3526-4136

Manuscrito submetido à revista *Journal of Medicinal Food*

Resumo

O consumo de soja é associado à quimioprevenção para diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer de ovário, um dos mais letais que afetam as mulheres. Os efeitos quimiopreventivos da soja estão relacionados às isoflavonas daidzeína e genisteína e, muitas vezes, tais efeitos são controversos. Além disso, muitos estudos observam esses efeitos somente com o uso de concentrações irrelevantes dessas isoflavonas. Neste estudo, nós investigamos os efeitos das concentrações fisiologicamente relevantes da daidzeína e genisteína em relação à citotoxicidade e expressão de genes relacionados a apoptose em células humanas derivadas de tumor ovariano, OVCAR-3. Em nossas condições experimentais, a daidzeína não foi citotóxica às células, e a genisteína apresentou citotoxicidade somente em concentração de 100 μM , após prolongado tempo de tratamento (72h). Ambas as isoflavonas em concentração de 10 μM não interferiram na proliferação celular e não induziram apoptose. As concentrações de 10 e 25 μM também não alteraram de maneira significativa a expressão dos genes *CASP-3*, *CASP-7*, *BAX*, *BCL-xL* e *COX-2*. Portanto, as concentrações fisiologicamente relevantes de daidzeína e genisteína aqui estudadas não interferiram na viabilidade celular da linhagem OVCAR-3.

Palavras-chave: daidzeína, genisteína, OVCAR-3, citotoxicidade, apoptose, expressão gênica

Abstract

Soy consumption is associated with chemopreventive properties for different types of cancer, including ovarian cancer, one of the most lethal malignancies that affect women health. The chemopreventive effects of soy are related to isoflavones daidzein and genistein, and sometimes these effects are controversial. Also, some studies report protective effects only for physiological unachievable concentrations of these isoflavones. In the present study we investigated the effects of physiological achievable concentrations of daidzein and genistein in relation to cytotoxicity and expression of apoptosis related genes on human ovarian cancer cells OVCAR-3. In our experimental conditions, daidzein did not show cytotoxicity and genistein was cytotoxic only in concentration of 100 μM after a prolonged time of exposure of the cells (72h). Both daidzein and genistein at 10 μM did not interfere on cell proliferation and did not induce apoptosis. Neither at 10 μM nor at 25 μM of the isoflavones there was significantly mRNA expression of *CASP-3*, *CASP-7*, *BAX*, *BCL-xL* and *COX-2*. Therefore, physiological achievable concentrations of daidzein and genistein showed no ability to interfere on cell viability of OVCAR-3.

Keywords: daidzein, genistein, OVCAR-3, cytotoxicity, apoptosis, gene expression

1. INTRODUCTION

Although ovarian cancer is not as prevalent as mammary cancer in women, almost 60% of those who have this type of cancer eventually succumb to the disease¹. According to American Cancer Society, 21.990 new cases of ovarian cancer were expected in the United States in 2011². Nowadays, hormone- and genetics-related risk factors for ovarian cancer are known, but not easily modified. So, dietary interventions have been suggested for helping to prevent the disease or to improve survival of patients after surgery and initial treatment³. It has been shown that many beneficial biological compounds for the prevention of cancer have been found in fruits and vegetables⁴⁻⁷. In fact, according to various authors, 30-40% of cancer cases worldwide could be prevented through changes in lifestyle, especially with changes in the diet^{8,9}.

Soy consumption is associated to lower risk of cancer development (including ovarian cancer) among Asiatic population due to the presence of isoflavones (flavonoids compounds), specially genistein and daidzein¹⁰⁻¹³. Zhang *et al.*¹⁴, in their case-control study confirmed that higher intakes of soy foods reduced incidence of ovarian cancer risk. Gates *et al.*¹⁵ showed that dietary intake of certain flavonoids may reduce ovarian cancer risk in the participants of their study. The case-control study conducted by Rossi *et al.*¹⁶ in Italy also infer that isoflavones and other flavonoids may have favorable effects with respect to ovarian cancer risk.

Cancer chemoprevention properties of daidzein and genistein include induction of apoptosis and cell cycle arrest^{11,12,17,18}. However, in most studies, high concentrations of isoflavones were tested, and they are difficultly found in human plasma after ingestion of soy-based foods or supplements. According to Moiseeva and Manson¹⁹ such studies may produce results that are physiologically irrelevant, thus hindering predictions of efficacy.

In front of these observations, the aim of our study was to evaluate the cytotoxicity and expression of apoptosis related genes focusing on concentration of daidzein and genistein considered the maximal physiologically achievable through diet (10 μ M), using human ovarian carcinoma cell line OVCAR-3.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Test compounds

Soy isoflavones daidzein (DAID) (CAS 486-66-8) and genistein (GEN) (CAS 446-72-0) were purchased from Acros Organics. They were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and used in culture with DMSO maximum concentration of 1%. Doxorubicin, camptothecin and vincristine were used as positive controls of the experiments. Doxorubicin (CAS 29042-30-6; Adriblastina[®]) was used at 10 μ g/mL in cytotoxicity and cell proliferation kinetics assay (item 2.3 and 2.4). Camptothecin (CAS 7689-03-4; Acros Organics) and vincristine (CAS 2068-78-2; Oncovin[®]) were used in detection of apoptotic DNA fragments (item 2.5) both at 4 μ g/mL.

2.2. Cell line

Human ovarian carcinoma OVCAR-3 cell line was kindly provided by Professor João Ernesto de Carvalho (UNICAMP, São Paulo, Brazil). The cells were cultivated in DMEM (Gibco 12800-058) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS) (Gibco) and antibiotics (Gibco 15240-062). Cell cultures were maintained at 37°C, 5% CO₂ and 95% relative humidity.

2.3. Cytotoxicity evaluation – resazurin-based assay

The cytotoxicity assay was performed according to the protocol described by Nakayama *et al.*²⁰, O'Brien *et al.*²¹ and McMillian *et al.*²² with modifications. In this assay, cytotoxicity of daidzein and genistein were tested using resazurin. The higher fluorescent unit values are observed, more viable cells were present in the well of the microplate, since only these cells can convert resazurin into fluorescent resofurin²⁰⁻²².

Approximately 4.5×10^4 cells were seeded in each well of a 24 wells-microplate. After 24h stabilization, cells were treated with daidzein or genistein for 24, 48h and 72h. At the end of this period, medium was removed, wells were washed with phosphate buffer saline (PBS) and cells were incubated with resazurin 60 μ M (CAS 62758-13-8; Acros Organics) for 3h. Fluorescence was measured with VICTOR 3 (Perkin Elmer) at 530-560 nm of excitation and 580-600 nm of emission ranges.

Final concentrations of daidzein and genistein used in cytotoxicity experiments were 0.1; 1; 10; 50 and 100 μ M. Control treatment was medium with 1% DMSO and control of cytotoxicity induction was doxorubicin at final concentration of 10 μ g/mL. Experiments were performed in triplicate.

2.4. Cell proliferation kinetics and viability assay

Cell proliferation kinetics assay was performed according to Marcarini *et al.*²³. A total of 10^5 cells were seeded in culture tubes together with the respective treatments: (a) control (medium 1% DMSO); (b) doxorubicin (10 μ g/mL), (c) daidzein 10 μ M (physiological achievable plasmatic concentration) and (d) genistein 10 μ M. The test was performed in triplicate and the cell proliferation kinetics curve was constructed using treatment times of 24, 48, 72 and 96h. Four culture tubes were seeded for each treatment, each corresponding to a time of harvest (24, 48, 72 or 96h). Thus, cells in tube 1 were counted 24h after seeding, in tube 2 after 48h and so forth. The proliferation curve was constructed based on the cell counts

at the different times. Cell viability was determined by Trypan Blue dye exclusion method in the same collected sample.

2.5. Detection of apoptotic DNA fragments by gel electrophoresis

For this experiment, 10^6 cells were seeded in 25 cm² culture flasks. After 24h stabilization, cells were treated according to the groups: (a) control (medium 1% DMSO); (b) camptothecin (4 µg/mL), (c) vincristine (4 µg/mL), (d) daidzein 10 µM and (e) genistein 10 µM. Cells were incubated for another 24h. Experiments were performed in triplicate.

At the end of treatment, media was removed, cells were washed twice with PBS and trypsinized (500 µL; 0.01% trypsin) at 37 °C. Cell suspension was centrifuged (12000 rpm, 10 min, 4°C) and cell pellet was lysed for 3h, 37°C (Tris-HCl 10mM; NaCl 5mM; EDTA 2mM; SDS 20%; proteinase K – Invitrogen - 5 mg/mL). Then phenol/chloroform (v/v) was added to the microtubes for 10 min followed by another centrifugation (12000 rpm, 10 min, 4°C). Aqueous phase was isolated to new microtubes with NaCl 6M and isopropanol (remained at -20°C overnight). After centrifugation (12000 rpm, 10 min, 4°C), DNA was dissolved with TE buffer and treated with RNase A (Invitrogen, 20 mg/mL; 1h, 37°C). Electrophoresis run was performed for 2 hours at 50V in 1.2% agarose gel stained with Sybr Safe[®] (Invitrogen) in TBE buffer. DNA ladder pattern (characteristic of apoptosis) was visualized with an UV transilluminator.

2.6. Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

For analysis of gene expression, 10^6 cells were seeded in 25 cm² culture flasks. After 24h stabilization, cells were treated with 10 µM (dietary dose) and 25 µM (pharmacological dose) of daidzein or genistein for 12h. Experiments were performed in biological duplicate and technical triplicate.

Total RNA was prepared using Trizol LS reagent (Invitrogen) followed by DNase I (Invitrogen) treatment, both according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized subsequent to verification of RNA quality in agarose gel 1% (28S and 18S rRNA pattern of bands) and by A_{260}/A_{280} ratio (Biophotometer – Eppendorf). Synthesis of cDNA used oligodT primers (10 pmol/mL) and M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). Real time PCR experiments were performed in Engine Opticon detection system (Bio-Rad) using Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG kit (Invitrogen) in a total of 20 μ L of reaction mix (2 μ L cDNA – diluted 1:5; 10 μ L SYBR[®] Green; 0.5 μ L of 10 μ M of each specific gene primer, and 7 μ L of H₂O). Target cDNAs were amplified in separate tubes: 3 min at 95°C, then 35 cycles of denaturation (95°C for 20 s), annealing (at 60°C for 30 s) and extension (72°C for 20 s) per cycle. Melting curves (50 to 95°C ready every 0, 5°C) for each PCR reaction were generated to ensure the purity of the amplification product.

Expression of apoptosis related genes were assessed in OVCAR-3 using primers of apoptosis-related cysteine peptidases *CASP-3* (caspase-3) and *CASP-7* (caspase-7), *BAX* (BCL2-associated X protein), *BCL-xL* (BCL2-like 1) and *COX-2* (cyclooxygenase-2)²⁴, as well as *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)²⁵ as reference gene. Primers sequences of *CASP-3*, *CASP-7*, *BAX* and *BCL-xL* (Table 1) were designed with IDT tool available at <<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest>>.

2.7. Statistical analysis

Results obtained in cytotoxicity evaluation and in cell proliferation kinetics were submitted to ANOVA followed by Dunnett test compared to control group ($\alpha = 0.05$), using GraphPad Prism[®] 5 software. Data obtained in qRT-PCR were analyzed using REST[©] (*Relative Expression Software Tool*) software, developed by Pfaffl *et al.*²⁶. Software is available at: <<http://www.gene-quantification.de>>.

3. RESULTS

3.1. *Cytotoxicity evaluation – resazurin-based assay*

Figures 1 and 2 shows that doxorubicin were cytotoxic to OVCAR-3 in all experimental times. For all tested concentrations, daidzein was not cytotoxic to OVCAR-3 cells (Figure 1). For genistein, only the highest tested concentration (100 μ M) was cytotoxic to OVCAR-3 after 72h of exposure (Figure 2).

3.2. *Cell proliferation kinetics and viability assay*

Cell proliferation kinetics of OVCAR-3 treated with 10 μ M of daidzein or genistein did not show statistical significant results in relation to control group (Figure 3). The same response was observed in cell viability (Figure 4). Both figures demonstrate that only doxorubicin affected cell proliferation and viability of OVCAR-3 cells.

3.3. *Detection of apoptotic DNA fragments by gel electrophoresis*

Apoptotic pattern of DNA fragmentation was observed only for treatments with camptothecin or vincristine (Figure 5). Daidzein or genistein 10 μ M was not able to induce apoptotic or necrotic pattern of DNA fragmentation (absolute absence of DNA fragments in ladder pattern).

3.4. *Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)*

Figure 6 and Table 2 shows the values of R (ratio) obtained in REST© software. We can observe that neither dietary concentration (10 μ M) nor pharmacological concentration (25 μ M) of isoflavones daidzein or genistein modified mRNA expression of the analyzed genes significantly.

4. DISCUSSION

Although a significant number of studies investigate the association of soy intake and the reduction of ovarian cancer risk^{14,27}, this relation is not well established²⁸ since most of chemoprevention results found in literature (such as induction of apoptosis) are obtained when high concentrations of isoflavones are tested. Considering this, we evaluated soy isoflavones daidzein and genistein in relation to cytotoxicity, cell proliferation kinetics and gene expression in ovarian carcinoma cells OVCAR-3, focusing on concentrations considered relevant to human health.

Controversies are described in relation to maximal concentration found in human plasma; however the concentration of 10 μM is considered by many authors the maximal relevant physiological concentration found in the organism after soy food intake^{29, 30, 28}. Pharmacological concentration of 25 μM was found in plasma of men with prostate cancer after administration of genistein pills³¹.

There are few data in literature regarding the biological effects of isoflavones daidzein and genistein in ovarian tumoral cells. In our experiments, daidzein did not show cytotoxicity; only genistein 100 μM (after 72h treatment) showed cytotoxic effect to OVCAR-3 cells. These results are not in accordance to Chen and Anderson³² that reported cytotoxic effects on OVCAR-3 cells for daidzein and genistein with lower concentrations (0.01 μM) and time of exposure (48h) using MTT assay. Other studies also reported cytotoxic effects for daidzein and/or genistein on other cell lineages at lower concentrations and/or time of exposure. Gercel-Taylor *et al.*³³ found 23% of cell growth inhibition by genistein 9 μM after 96h of incubation, and observed that daidzein has a lower growth inhibitory capability, in comparison to genistein for all cell lines studied (lineages established from ascites or tumor samples from patients with ovarian cancer). Choi *et al.*³⁴ reported that genistein 5, 10, 50 and 100 μM was cytotoxic in SKOV-3 cell line after 24h and 48h of incubation and the lower

concentration investigated (1 μM) showed cytotoxic effect only after 48h. Contrary, but in accordance with our results, Ouyang *et al.*³⁵ found that only genistein 50 and 100 μM (72h treatment) were able to induce cytotoxicity in HO-8910 cells (also ovarian tumoral lineage) using MTT assay. Moreover, concentrations of 1, 10 and 25 μM of genistein promoted HO-8910 proliferation³⁵. It is valuable to note that the number of cells seeded in each well of cell cultures plates can interfere in results, since a cytotoxic effect can be due to the limited space for cell growing. Generally, in monolayer cell cultures, when cells reach the limit of space available for growth, they begin to detach from the surface of the culture flask, which can lead to false results.

In our study, cell proliferation kinetics tests confirm that concentration of 10 μM of the studied isoflavones is not cytotoxic to OVCAR-3 (high cell viability) and do not affect OVCAR-3 proliferation (cell count similar and not statistical different from control group). The concentration of 10 μM of daidzein or genistein also did not induced apoptosis or necrosis, as seen in the test for detection of apoptotic DNA fragments.

All data presented here suggest that, for OVCAR-3 cells, concentrations of 10 and 25 μM of daidzein or genistein do not act in the apoptotic pathway significantly. Expression of *CASP-7*, *BAX* and *COX-2* mRNAs were practically unchanged. Expression of *CASP-3* mRNA (gene that encodes caspase 3 protein that plays a central role in the execution-phase of cell apoptosis) showed a slight increase when cells were treated with 25 μM of the isoflavones. Concentration of 10 μM of daidzein and genistein tend to increase *BCL-xL* mRNA (member of the Bcl-2 anti-apoptotic gene family) while the concentration of 25 μM tends to decrease the expression of *BCL-xL* transcripts.

Decrease in BCL-2 and BCL-xL levels of transcripts or proteins and increased levels of Bax protein with caspases activation by high concentration of genistein (50 μM and higher) have been demonstrated in different human tumoral cell lines^{17, 11, 36}. Alterations in

mitochondrial membrane proteins (Bcl-2 family) and consequent caspases activation leading to apoptosis can also be due to generation of ROS (reactive oxygen species) by daidzein and genistein^{37, 38}. The prooxidant effect of genistein was also reported by Salvi *et al.*³⁹. In this case, mitochondrial permeability transition (MPT) is induced by the generation of ROS by genistein due to its interaction with the electron transport chain of cellular respiration³⁹.

The absence of cytotoxic effect through apoptosis induction in OVCAR-3, as demonstrated in our study, can be related to cell biology of OVCAR-3 itself. Fraser *et al.*¹ describe several mechanisms by which cells derived from ovarian cancer are resistant to chemotherapeutic agents such as cisplatin, a drug used routinely for treatment of this disease. According to the authors, tumoral ovarian cells possess aberrantly regulated expression of gene families with important roles in the induction or inhibition of apoptosis (p53, Akt, PI3K), leading to chemoresistance and, consequently, high mortality for this type of cancer. Active state of PI3K/Akt pathway, along with high expression of Xiap proteins, help ovarian cancer cells to evade apoptosis and survive in front of treatment with chemotherapeutic drugs¹.

High expression of *COX-2* (generally found in cancer cells) can also be associated with inhibition of apoptosis or activation of cell survival signaling, resulting in absence of cytotoxicity. In various cell types, it has been demonstrated that prostaglandin E₂ (PGE₂; *COX-2* product) induces *Bcl-2* expression, leading to inhibition of apoptosis^{40, 41, 42, 43}. According to Villa *et al.*⁴⁴, *COX-2* mediated inhibition of apoptosis can be, at least in part, due to suppression of caspase-3 activity. Besides these effects, *COX-2* expression can also activate cell survival signs through PI3K/Akt pathway^{45, 46}.

The absence of responses of OVCAR-3 when cells were treated with daidzein or genistein cannot be explained by absence of estrogen receptors (ERs). Chen and Anderson³²,

and O'Donnell *et al.*⁴⁷ reported that OVCAR-3 cells express at least the ER β , ER that daidzein and genistein have higher binding affinity^{10, 12}.

The data from literature suggests that soy isoflavones daidzein and genistein are able to induce apoptosis in tumoral cell lines, but our results and other scientific studies report that this induction depends on cell type, isoflavones concentration and time of exposure. Some cells lineages are more sensitive to these substances, while others (like OVCAR-3) seem to be more resistant.

Despite over 20 years of studies, researches investigating soy isoflavones effects have not yet reached a consensus on their use, especially when it is related to the health of the woman going through menopause and / or have higher risk of developing hormone-dependent cancer. Such contradictions in the literature only confirm the need for continuous research aimed to a better understanding of the benefits of soy for human health. Researches should pay special attention to dietary and pharmacological concentrations of daidzein and genistein.

Acknowledgements

The study was sponsored by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; 471938/2008-4) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

REFERENCES

1. Fraser M, Leung B, Jahani-Asl A, Yan X, Thompson WE, Tsang BK: Chemoresistance in human ovarian cancer: the role of apoptotic regulators. *Reprod Biol Endocrin* 2003; 1: 66-79.

2. AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011. Cancer Facts & Figures. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-029771.pdf>> Accessed 20 July 2011
3. Dolecek TA, Mccarthy BJ, Joslin CE, Peterson CE, Kim S, Freels SA, Davis FG: Prediagnosis food patterns are associated with length of survival from epithelial ovarian cancer. *J Am Diet Assoc* 2010; 110: 369-382.
4. Park EJ, Pezzuto JM: Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev* 2002; 21: 231–255.
5. Divisi D, Di Tommaso S, Salvemini S, Garramone M, Crisci R, Diet and cancer. *Acta Biomed* 2006; 77: 118-123.
6. Vainio H, Weiderpass E: Fruit and vegetables in cancer prevention. *Nutr Cancer* 2006; 54: 111-142.
7. Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB: Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* 2008; 25(9): 2097–2116.
8. Donaldson MS: Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutr J* 2004; 3:19-39.
9. Eyre H, Kahn R, Robertson RM, Clark NG, Doyle C, Hong Y, Gansler T, Glynn T, Smith RA, Taubert K, et al: Preventing cancer, cardiovascular disease, and diabetes: a common agenda for the American Cancer Society, the American Diabetes Association, and the American Heart Association. *Stroke* 2004; 35: 1999–2010.
10. Moutsatsou P: The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. *Hormones* 2007; 6: 173-193.
11. Steiner C, Arnould S, Scalbert A, Manach C: Isoflavones and the prevention of breast cancer: new perspectives opened by nutrigenomics. *Br J Nutr* 2008; 99: ES78-ES108.
12. Reiter E, Beck V, Medjakovic S, Jungbauer A: Isoflavones are safe compounds for therapeutical applications – Evaluation of in vitro data. *Gynecol Endocrinol* 2009; 25: 554-580.
13. Messina M: A brief historical overview of the past two decades of soy and isoflavone research. *J. Nutr* 2010; (Suppl): 1S -5S.
14. Zhang M, Xie X, Lee AH, Binns CW: Soy and isoflavone intake are associated with reduced risk of ovarian cancer in Southeast China. *Nutr Cancer* 2004; 49(2): 125-130.

15. Gates MA, Tworoger SS, Hecht JL, De Vivo I, Rosner B, Hankinson SE: A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int. J. Cancer* 2007; 121: 2225–2232.
16. Rossi M, Negri E, Lagiou P, Talamini R, Dal Maso L, Montella M, Franceschi S, La Vecchia C: Flavonoids and ovarian cancer risk: A case–control study in Italy. *Int J Cancer* 2008; 123: 895–898.
17. Ramos S: Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem* 2007; 18: 427-442.
18. Medjakovic S, Mueller M, Jungbauer A: Potential health-modulating effects of isoflavones metabolites via activation of PPAR and AhR. *Nutrients* 2010; 2: 241-279.
19. Moiseeva EP, Manson MM: Dietary chemopreventive phytochemicals: too little or too much? *Cancer Prev Res* 2009; 2(7): 611-616.
20. Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z: Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods* 1997; 204: 205-208.
21. O' Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F: Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 2000; 267: 5421-5426.
22. Mcmillian MK, Li L, Parker JB, Patel L, Zhong Z, Gunnett JW, Powers WJ, Johnson MD: An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. *Cell Biol Toxicol* 2002; 18: 157-173.
23. Marcarini JC, Tsuboy MSF, Luiz RC, Ribeiro LR, Hoffman-Campo CB, Mantovani MS: Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. *Exp Toxicol Pathol* 2011; 63(5): 459-465.
24. Dussalt AA, Pouliot M: Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol Proced Online* 2006; 8(1): 1-10.
25. Sugaya S, Nakanishi H, Tanzawa H: Down-regulation of SMT3A gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) cells. *Mutation Res* 2005; 578: 327–332.
26. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L: Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 1-10.
27. Messina M, Wu AH: Perspectives on the soy–breast cancer relation. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 1S-7S.

28. Duffy C, Perez K, Partridge A: Implications of phytoestrogen intake for breast cancer. *CA: a cancer journal for clinicians* 2007; 57: 260-277.
29. De Lemos ML: Effects of soy phytoestrogens genistein and daidzein on breast cancer growth. *Ann Pharmacother* 2001; 35:1118–1121.
30. Bloedon LT, Jeffcoat AR, Lopaczynski W, Schell MJ, Black TM, Dix KJ, Thomas BF, Albright C, Busby MG, Crowell JA, Zeisel SH: Safety and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 1126–1137.
31. Miltyk W, Craciunescu CN, Fischer L, Jeffcoat RA, Koch MA, Lopaczynsky W, Mahoney C, Crowell J, Paglieri J, Zeisel SH: Lack of significant genotoxicity of purified soy isoflavones (genistein, daidzein and glycitein) in 20 patients with prostate cancer. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 875-882.
32. Chen X, Anderson JJB: Isoflavones inhibit proliferation of ovarian cancer cells in vitro via an estrogen receptor-dependent pathway. *Nutr Cancer* 2001; 4 (1-2): 165-171.
33. Gercel-Taylor C, Feitelson AK, Taylor DD: Inhibitory effect of genistein and daidzein on ovarian cancer cell growth. *Anticancer Res* 2004; 24: 795-800.
34. Choi EJ, Kim T, Lee MS: Pro-apoptotic effect and cytotoxicity of genistein and genistin in human ovarian cancer SK-OV-3 cells. *Life Sci*, 2007; 80(15): 1403-1408.
35. Ouyang G, Yao L, Ruan K, Song G, Mao Y, Shideng B: Genistein induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis of human ovarian cancer cells via activation of DNA damage checkpoints pathways. *Cell Biol Int* 2009; 33: 1237-1244.
36. Banerjee S, Li Y, Wang Z, Sarkar FH: Multi-target therapy of cancer by genistein. *Cancer Lett* 2008; 269: 226-242.
37. Murata M, Midorikawa K, Koh M, Umezawa K, Kawanishi S: Genistein and daidzein induce cell proliferation and their metabolites cause oxidative DNA damage in relation to isoflavone-induced cancer of estrogen-sensitive organs. *Biochemistry* 2004; 43: 2569-2577.
38. Jin S, Zhang QY, Kang XM, Wang JX, Zhao WH: Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway. *Ann Oncol* 2010; 21: 263-268.
39. Salvi M, Brunati AM, Clari G, Toninello A: Interaction of genistein with the mitochondrial electron transport chain results in opening of the membrane transition pore. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1556: 187-196.
40. Gately S: The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: 19-27.

41. Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll H-S: Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127: 411-417.
42. Cao Y, Prescott SM: Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol* 2002; 190: 279-286.
43. Trifan OC, Hla T: Cyclooxygenase-2 modulates cellular growth and promotes tumorigenesis. *J Cell Mol Med* 2003; 7: 207-222.
44. Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC: Caspases and caspase inhibitors. *Trend Biochem Sci* 1997; 22: 388-393.
45. Sheng H, Shao J, Washington MK, Dubois RN: Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 18075-18081.
46. Lin MT, Lee RC, Yang PC *et al.*: Cyclooxygenase-2 inducing Mcl-1 dependent survival mechanism in human lung adenocarcinoma CL1.0. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 48997-49002.
47. O'Donnell AJM, Macleod KG, Burns DJ, Smyth JF, Langdon SP: Estrogen receptor- α mediates gene expression changes and growth response in ovarian cancer cells exposed to estrogen. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: 851-866.

Table 1. Primer sequences of the analyzed genes, NCBI Access number and amplicon size.

Gene	NCBI Access number	Sequence	Amplicon size
<i>CASP-3</i>	NM_032991.2	5'-GTGCTACAATGCCCTGGAT-3' 5'-GCCCATTCATTTATTGCTTTCC-3'	199pb
<i>CASP-7</i>	NM_001227.3	5'-TCACCATGCGATCCATCAAGACCA-3' 5'-TTTGTCTGTTCCGTTTCGAACGCC-3'	149pb
<i>BAX</i>	NM_004324.3	5'-TTTCTGACGGCAACTTCAACTGGG-3' 5'-TGTCCAGCCCATGATGGTTCTGAT-3'	122pb
<i>BCL-xL</i>	NM_138578.1	5'-TGGGCTCACTCTTCAGTCGGAAAT-3' 5'-ATGTAGTGGTTCTCCTGGTGGCAA-3'	121pb

NCBI: National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

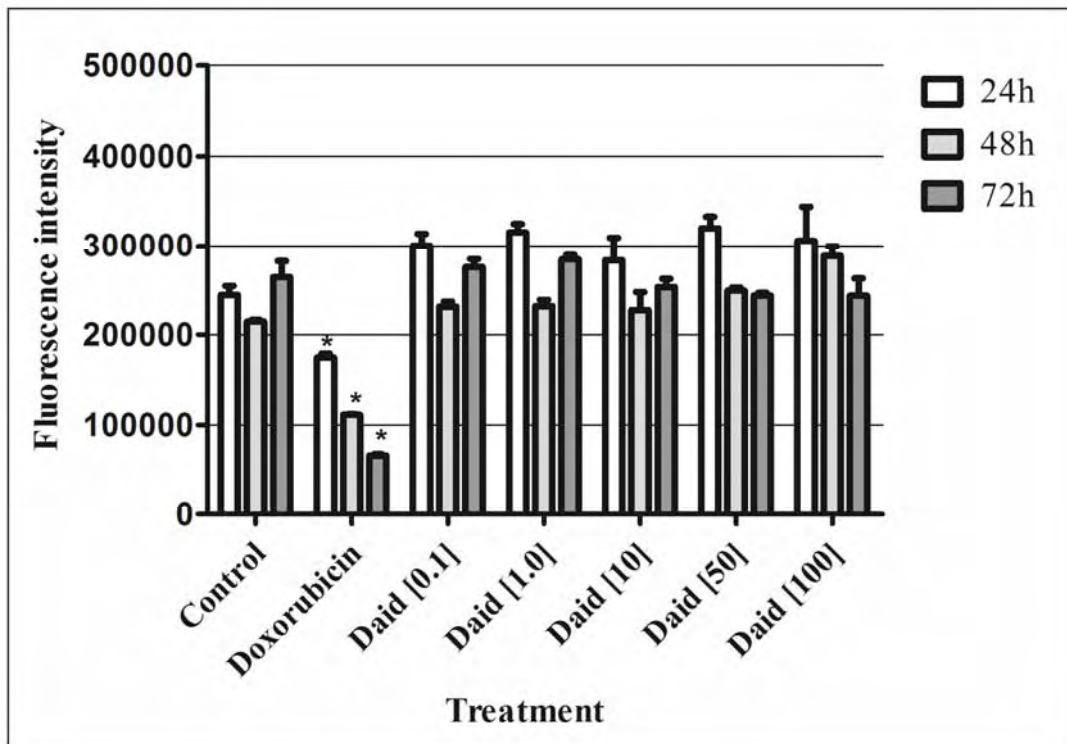


Figure 1. Fluorescence intensity measured after treatment of OVCAR-3 (24, 48 and 72h) with different concentrations of daidzein (Daid) in resazurin-based assay. Daid [0.1] = cells treated with daidzein 0.1 μ M; Daid [1] = cells treated with daidzein 1 μ M; Daid [10] = cells treated with daidzein 10 μ M; Daid [50] = cells treated with daidzein 50 μ M; Daid [100] = cells treated with daidzein 100 μ M; Doxorubicin = cells treated with doxorubicin 10 μ g/mL. * indicates cytotoxic effect ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).

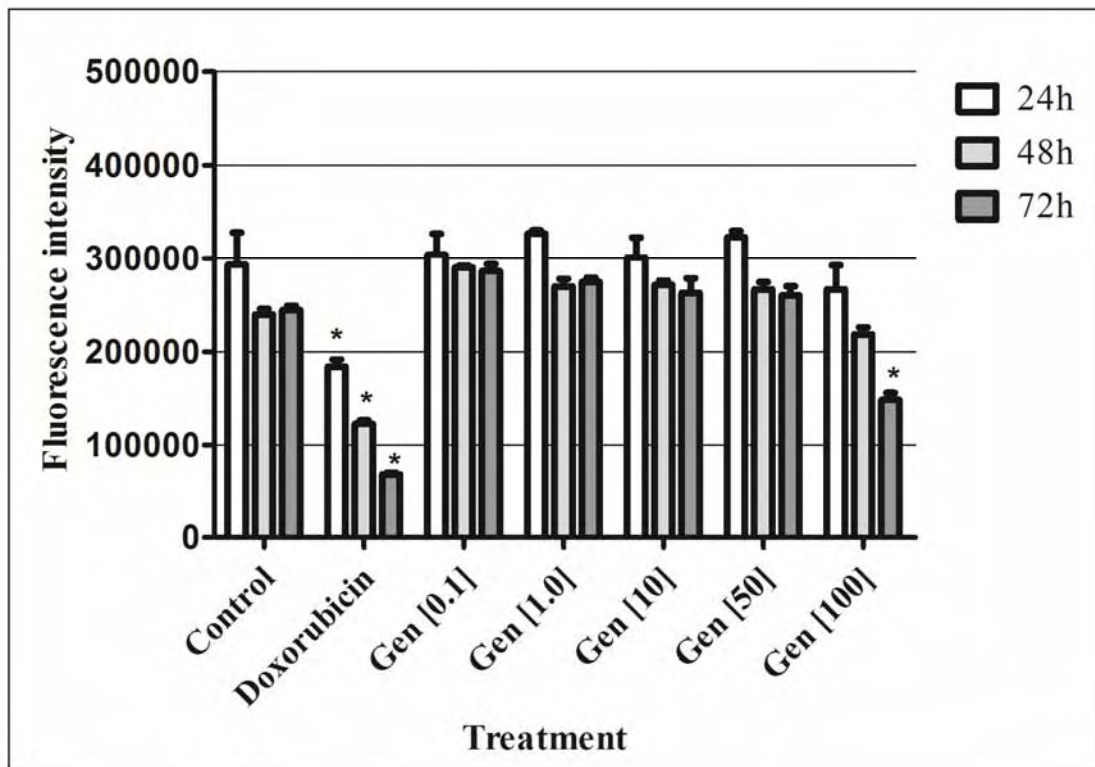


Figure 2. Fluorescence intensity measured after treatment of OVCAR-3 (24, 48 and 72h) with different concentrations of genistein (Gen) in resazurin-based assay. Gen [0.1] = cells treated with genistein 0.1 μM ; Gen [1] = cells treated with genistein 1 μM ; Gen [10] = cells treated with genistein 10 μM ; Gen [50] = cells treated with genistein 50 μM ; Gen [100] = cells treated with genistein 100 μM ; Doxorubicin = cells treated with doxorubicin 10 $\mu\text{g/mL}$. * indicates cytotoxic effect ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).

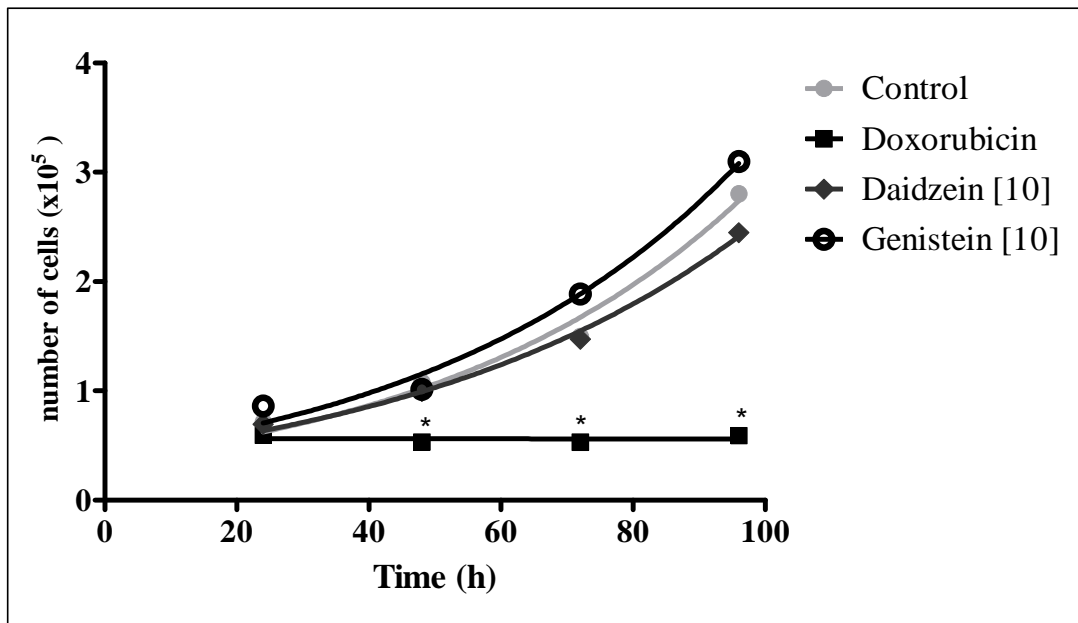


Figure 3. Curve of cell proliferation of OVCAR-3 treated with 10 μ M of the isoflavones (daidzein or genistein). Doxorubicin = cells treated with doxorubicin 10 μ g/mL. Total experimental time of 96h. * Statistical significant ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group). Exponential growth equation was used by GraphPad Prism[®] 5 software to determine the curve of cell proliferation.

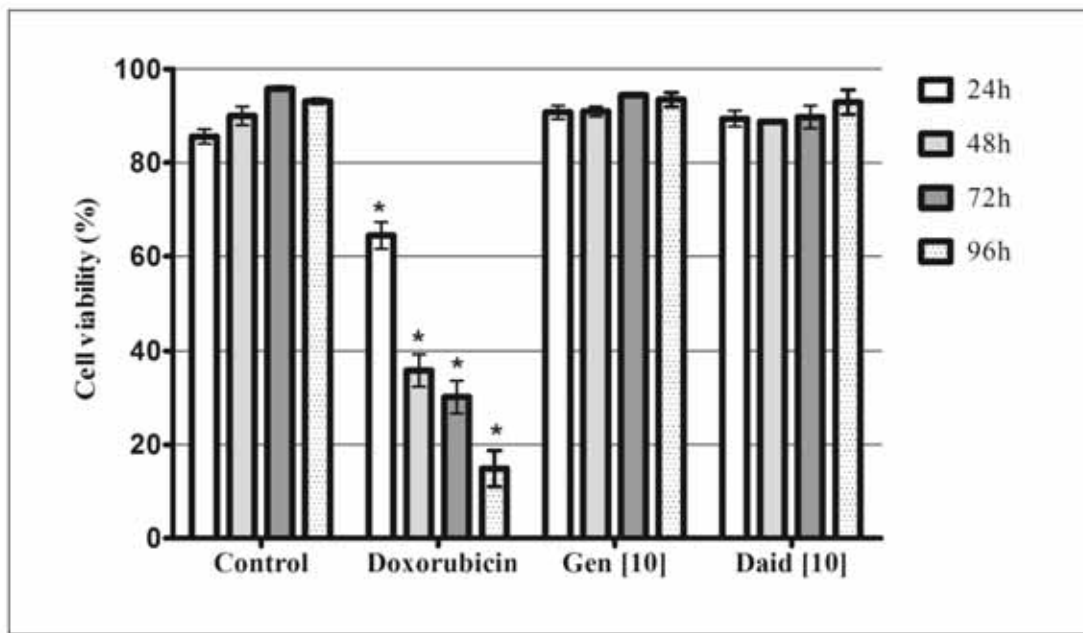


Figure 4. Cell viability of OVCAR-3 during cell proliferation kinetics assay treated with 10 μ M of the isoflavones (daidzein or genistein). Doxorubicin = cells treated with doxorubicin 10 μ g/mL. Experimental time of 96h. * Statistical significant ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).

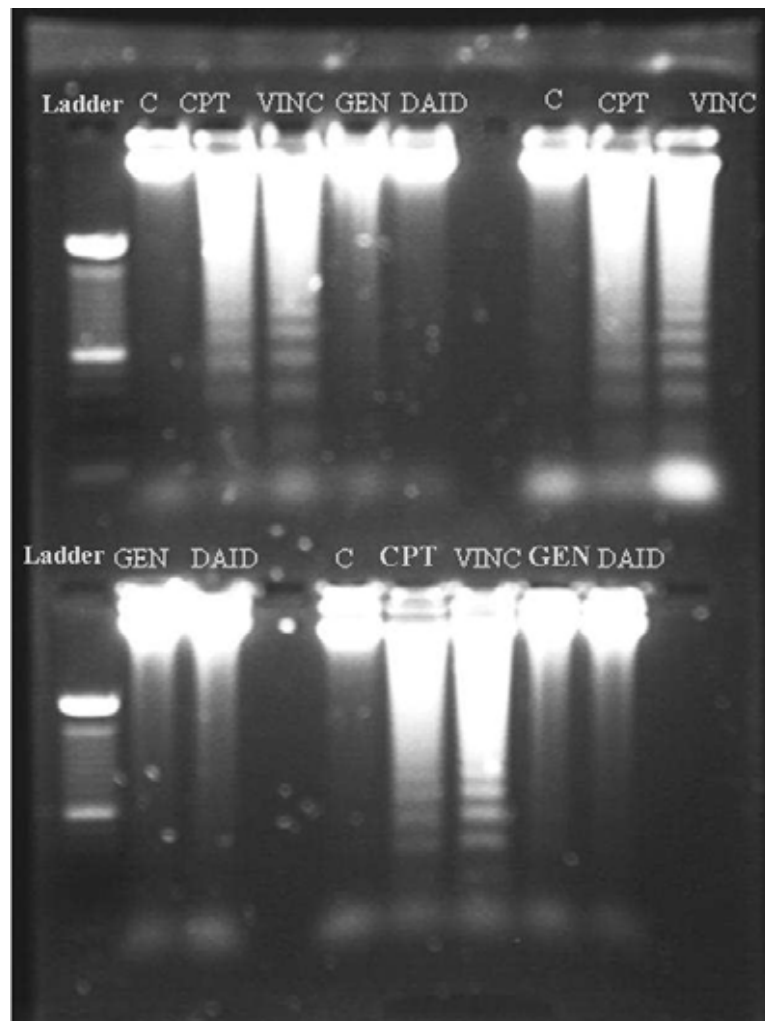


Figure 5. Apoptotic DNA fragments analysis. DNA samples of three repetitions are showed in this figure. Ladder (100 pb – Invitrogen); C = control; CPT = camptotecin 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$; VINC = vincristine 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$; GEN = genistein 10 μM ; DAID = daidzein 10 μM .

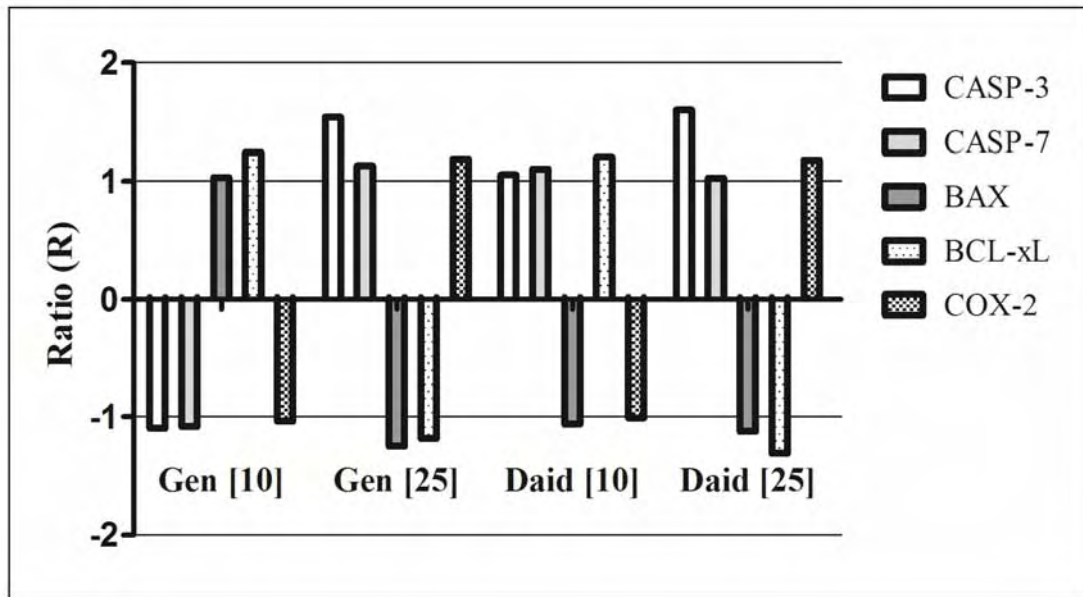


Figure 6. Relative gene expression (R value) of *CASP-3*, *CASP-7*, *BAX*, *BCL-xL* and *COX-2* after treatment of 10 or 25 μM of the isoflavones (daidzein or genistein). Data were submitted to software REST© (PFAFFL *et al.*, 2002). Ratio value (R) of control group is considered as 1.

Table 2. Relative gene expression (R value) of *CASP-3*, *CASP-7*, *BAX*, *BCL-xL* and *COX-2* after treatment of 10 or 25 μM of the isoflavones (daidzein or genistein). R value \pm SD and p value.

	Daidzein 10 μM	Daidzein 25 μM	Genistein 10 μM	Genistein 25 μM
<i>CASP-3</i>	1.053 \pm 0.152 p = 0.753	1.599 \pm 0.623 p = 0.067	-1.096 \pm 0.146 p = 0.518	1.54 \pm 0.619 p = 0.071
<i>CASP-7</i>	1.103 \pm 0.171 p = 0.473	1.027 \pm 0.245 p = 0.783	-1.082 \pm 0.143 p = 0.344	1.132 \pm 0.289 p = 0.262
<i>BAX</i>	-1.061 \pm 0.175 p = 0.694	-1.123 \pm 0.195 p = 0.666	1.032 \pm 0.221 p = 0.717	-1.249 \pm 0.202 p = 0.416
<i>BCL-xL</i>	1.206 \pm 0.144 p = 0.229	-1.31 \pm 0.51 p = 0.236	1.245 \pm 0.225 p = 0.085	-1.183 \pm 0.195 p = 0.446
<i>COX-2</i>	-1.01 \pm 0.298 p = 0.974	1.18 \pm 0.317 p = 0.424	-1.037 \pm 0.324 p = 0.907	1.19 \pm 0.333 p = 0.445

Data were submitted to software REST© (PFAFFL *et al.*, 2002). Negative R value means downregulation of the gene.

5.2. ARTIGO 2

Physiological levels of daidzein do not cause apoptosis and arrest cell cycle only in the tumoral cell line.

Marcela S. Tsuboy¹, Juliana C. Marcarini¹, Alecsandra O. de Souza², Natália A. de Paula³, Daniel J. Dorta², Mário S. Mantovani⁴, Lucia R. Ribeiro¹.

¹ Instituto de Biociências, UNESP, Univ Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil.

² Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras; Departamento de Química; USP, Univ de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

³ Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina; Departamento de Clínica Médica, USP, Univ de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

⁴ Departamento de Biologia Geral, UEL, Univ Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

Corresponding author

Marcela S. Tsuboy
Universidade Estadual Paulista – UNESP
Instituto de Biociências, campus Rio Claro, SP, Brazil.
CEP: 13506-900
E-mail: tsuboyma@yahoo.com.br
Phone/Fax: +55 (19) 3526-4136

Resumo

A daidzeína (7,4'-dihidroxiisoflavona) juntamente com a genisteína (4', 5, 7-trihidroxiisoflavona) são isoflavonas da soja associadas ao baixo risco de cancer encontrado na população asiática, incluindo o câncer de mama. Tem sido demonstrado que as isoflavonas podem interferir em vários estágios do processo de carcinogênese, prevenindo o desenvolvimento do câncer. A indução de apoptose e parada no ciclo celular são as atividades mais estudadas dessas isoflavonas. Em nosso estudo, foram analisados os efeitos dos níveis fisiológicos de daidzeína em duas linhagens celulares de mama: HB4a (não tumoral) e MCF-7 (tumoral). Foram realizados experimentos de citotoxicidade, indução de apoptose, análise do ciclo celular e PCR em tempo real. A daidzeína em concentrações de 0,1 a 100 μM (24 e 48h de tratamento) não foram citotóxicas às células HB4a e MCF-7. As concentrações fisiológicas de 10 e 25 μM não induziram apoptose em nenhuma linhagem celular. Ambas as concentrações de daidzeína (10 e 25 μM) atrasaram o ciclo das células MCF-7 na fase G0/G1, porém não das células HB4a. Mesmo com ausência de indução de apoptose, os experimentos de qRT-PCR mostraram que a daidzeína é capaz de agir na cascata apoptótica. Em resumo, a daidzeína, em máximas concentrações fisiologicamente relevantes, atrasou o ciclo celular de maneira seletiva, ou seja, somente na linhagem tumoral MCF-7. Este é o primeiro estudo investigando os efeitos da daidzeína na linhagem celular não tumoral HB4a.

Palavras-chave: daidzeína, concentração fisiológica, apoptose, ciclo celular, MCF-7, HB4a

Abstract

Daidzein (7, 4'-dihydroxyisoflavone) along with genistein (4', 5, 7-trihydroxyisoflavone) are soy isoflavones associated with the lower cancer risk found in Asiatic population, including breast cancer. It has been demonstrated that they can interfere in various stages of carcinogenesis process, preventing the development of cancer. Induction of apoptosis and cell cycle arrest are one of the most studied activities of these isoflavones. In our study, we investigated the effects of physiological levels of daidzein in two human breast cell lines: HB4a (non-tumoral) and MCF-7 (tumoral). Cytotoxicity, induction of apoptosis, cell cycle arrest and quantitative real time PCR experiments were performed. Daidzein ranging from 0.1 to 100 μ M (24 and 48h treatment) were not cytotoxic to both cell lines. Physiological concentrations of 10 and 25 μ M did not induce apoptosis neither in HB4a nor in MCF-7. Both concentrations of daidzein (10 and 25 μ M) arrested MCF-7 cell cycle in G0/G1 phase, but not in HB4a cells. Even with no evident induction of apoptosis, qRT-PCR experiments showed that daidzein are able to act in apoptotic cascade. Thus, daidzein at maximal achievable physiologic serum levels, selectively arrested cell cycle only in the tumoral lineage (MCF-7). It is the first study investigating daidzein effects in this non-tumoral cell line (HB4a).

Keywords: daidzein, physiological concentration, apoptosis, cell cycle, MCF-7, HB4a.

1. INTRODUCTION

It has been passed 30 years since Doll and Peto called attention for the association between lifestyle and cancer (Doll and Peto, 1981) and now it is becoming clearer as research continues that nutrition plays a major role in cancer. Epidemiological studies also point out for this association as many of these show that the incidence and mortality of some kinds of cancer are higher in Western countries with meat-based diets than in Asian countries with plant-based diets (Aldercreutz et al., 1995; Anand et al., 2008). One of the best examples of this situation is the association between the high intake of soy-based food in Asian population and the reduced risk of breast, ovarian, prostate and other types of cancer and chronic diseases (Aldercreutz, 2002). Because of these beneficial health effects, soy-based products have gained worldwide popularity and are especially consumed by women in menopause to alleviate its symptoms (Powles, 2004; Williamson-Hughes, 2006). However there have been concerns that isoflavones (the main compounds found in soybean and soy products), may increase the risk of recurrence or stimulate the growth of existing tumors (Messina et al, 2006). Despite significant research in the area, the role of isoflavones in breast and hormone-related cancers remains controversial (Duffy et al, 2007; NAMS, 2011).

The main compounds found in soy that are responsible for the human health benefits are the isoflavones daidzein (7,4'-dihydroxyisoflavone) and genistein (4', 5, 7-trihydroxyisoflavone). Before ingestion, daidzein and genistein are present as β -D-glycosides namely daidzin and genistin, which according to Setchell (1998), are biologically inactive. Only after hydrolyzed by intestinal bacteria, isoflavone glycosides become bioactive aglycones daidzein and genistein and are absorbed by intestinal tract (Cederroth and Nef, 2009).

Daidzein and genistein, also known as phytoestrogens, are able to bind to estrogen receptors, inducing cell transcription and eliciting biological effects similar to those of other

natural estrogens (Setchell et al. 2002) and, for this reason, interest has focused primarily on their effects on hormone-dependent conditions, such as breast, ovarian and prostate cancers.

Cancer chemoprevention properties of daidzein include induction of apoptosis and cell cycle arrest (Ramos, 2007; Steiner et al., 2008; Reiter et al., 2009). However, in most studies, high concentrations of isoflavones (daidzein or genistein) were tested, and they are difficultly found in human plasma after ingestion of soy-based foods or supplements. According to Moiseeva and Manson (2009) such studies may produce results that are physiologically irrelevant, thus hindering predictions of efficacy. According to Steiner *et al.* (2008), another limitation to investigate the preventive effects of isoflavones is the use of tumoral cell lines, although very well established in most areas.

In front of these observations, the aim of our study was to evaluate the cytotoxicity, induction of apoptosis, cell cycle arrest and expression of pro- and anti-apoptotic genes focusing on concentrations of daidzein considered the maximal physiologically achievable through diet or through pharmacological administration, using two human mammary cell lines: a non-tumoral lineage (HB4a) and a tumoral one (MCF-7).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Test compound

Soy isoflavone daidzein (DAID) (CAS 486-66-8) was purchased from ACROS Organics. It was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and used in culture with DMSO maximum concentration of 1%. In cytotoxicity assay, we evaluate five concentrations of daidzein: 0.1; 1; 10; 50 and 100 μM . In the other tests, we focused on concentrations of 10 and 25 μM of daidzein, representing, respectively, maximal dietary and pharmacological concentrations found in human plasma (De Lemos, 2001; Bloedon et al., 2002; Miltyk et al., 2003; Duffy et al., 2007).

Doxorubicin (CAS 29042-30-6; Adriblastina[®]) was used at 10 µg/mL in cytotoxicity assay (item 2.3) and camptothecin (CAS 7689-03-4; Acros Organics) was used at 4 µg/mL in flow cytometry tests (item 2.4 and 2.5).

2.2. Cell lines

Human mammary cells (MCF-7 and HB4a) were used in the experiments. MCF-7 were kindly provided by Professor João Ernesto de Carvalho (UNICAMP, São Paulo, Brazil), and HB4a cell line was kindly provided by Professor Silvia R. Rogatto from Hospital do Câncer A. C. Camargo (São Paulo, Brazil). Tumoral cell line (MCF-7) were cultivated in DMEM (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (Gibco 15240-062). HB4a cells were cultivated with the same medium (DMEM, FBS and antibiotics) supplemented with insulin (Gibco) and hydrocortisone (Pharma Nostra) (both at final concentration of 5 µg/mL). Cells cultures were maintained at 37 °C, 5% CO₂ and 95% relative humidity.

2.3. Cytotoxicity evaluation – resazurin-based assay

The cytotoxicity assay was performed according to the protocol described by Nakayama *et al.* (1997), O'Brien *et al.* (2000) and McMillian *et al.* (2002). Approximately 4.5×10^4 cells were seeded in each well of a 24 wells-microplate. After 24h stabilization, cells were treated with daidzein for 24 or 48h. At the end of this period, medium was removed, wells were washed with phosphate buffer saline (PBS) and cells were incubated with resazurin 60 µM (CAS 62758-13-8; Acros Organics) for 3h. Fluorescence was measured with VICTOR 3 (Perkin Elmer) at 530-560 nm of excitation and 580-600 nm of emission ranges. Final concentrations of daidzein used in cytotoxicity experiments were 0.1; 1; 10; 50 and 100 µM. Control treatment was medium with 1% DMSO and control of cytotoxicity induction

was doxorubicin at final concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$. Experiments were performed in triplicate.

2.4. Analysis of apoptosis induction by flow cytometry (FITC-annexin V)

In this test, approximately 10^5 cells HB4a or MCF-7 were seeded in each well of a 6 wells-microplate. After 24h stabilization, cells were treated with camptothecin (4 $\mu\text{g/mL}$) and daidzein 10 or 25 μM for 24 hours. At the end of treatment, medium was removed from the plates, which were then washed once in PBS before adding trypsin (500 μL ; 0.01%) to the cells. The same medium and PBS (reserved in falcon tubes), were added to cells and centrifuged (1000 rpm, 5 min, 4°C). Supernadant was discarded and cell pellet was resuspended in cold PBS followed by another centrifugation (1000 rpm, 10 min, 4°C). Cells were then labeled with annexin V-FITC (BD Pharmigen™ 1:100) and propidium iodide (Sigma; 5 $\mu\text{g/mL}$), protected from the light. Ten thousand events were analyzed in BD FACS CANTO flow cytometer. Experiments were performed in biological duplicate with three wells/treatment each one.

2.5. Cell cycle analysis by flow cytometry

The same way as in the previous experiment (item 2.4), cells (10^5 /well) were seeded in 6 wells-microplate and after 24h stabilization, treated with camptothecin (4 $\mu\text{g/mL}$) and daidzein 10 or 25 μM for another 24 hours. After trypsinization of the cells (500 μL ; 0.01%) and centrifugation (1000 rpm, 5 min, 4°C), it was added PBS and ice cold ethanol 70% to the pellet. Then, it was resuspended and left in freezer -20°C for 24 hours. At the end of this period, cells were centrifuged (1000 rpm, 5 min, 4°C), supernadant was discarded and it was added cold PBS and RNase A (Invitrogen; 10 mg/mL) to each tube. Samples were incubated 30 minutes at 37°C, followed by staining with hypothonic fluorochrome solution (propidium

iodide 5µg/mL; sodium citrate 0.1% and Triton X-100 0.1%) one hour before flow cytometry analysis (10.000 events; BD FACS CANTO). Experiments were performed in biological duplicate with three wells/treatment each one.

2.6. Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

For analysis of gene expression, 10^6 cells were seeded in 25 cm² culture flasks. After 24h stabilization, cells were treated with 10 µM or 25 µM of daidzein for 12h. Experiments were performed in biological duplicate and technical triplicate.

Total RNA was prepared using Trizol LS reagent (Invitrogen) followed by DNase I (Invitrogen) treatment, both according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was synthesized subsequent to verification of RNA quality in agarose gel (28S and 18S rRNA pattern of bands) and by A₂₆₀/A₂₈₀ ratio (Biophotometer – Eppendorf). Real time PCR experiments were performed in Engine Opticon detection system (Bio-Rad) using Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG kit (Invitrogen) in a total of 20 µL of reaction mix (2 µL cDNA – diluted 1:5; 10 µL SYBR[®] Green; 0.5 µL of each specific gene primer (10 µM), and 7 µl of H₂O). Target cDNAs were amplified in separate tubes: 3 min at 95°C, then 35 cycles of denaturation (95°C for 20 s), annealing (at 60°C for 30 s) and extension (72°C for 20 s) per cycle. Melting curves (50 to 95°C ready every 0.5°C) for each PCR reaction were generated to ensure the purity of the amplification product.

In order to assess induction of apoptosis in these mammary cell lines, primers of *CASP-3*, *CASP-7*, *BAX* and *BCL-xL* were used, as well as *GAPDH* (NM_002046.3) (Sugaya *et al.*, 2005) as reference gene and *COX-2* (Dussalt and Pouliot, 2006). Primers sequences were designed with IDT tool available at <<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest>>: *CASP-3* (NM_032991.2) 5'-GTGCTACAATGCCCTGGAT-3' and 5'-GCCCATTCATTTATTGCTTTCC-3' (199 bp);

CASP-7 (NM_001227.3) 5'-TCACCATGCGATCCATCAAGACCA-3' and 5'-TTTGTCTGTTCCGTTTCGAACGCC-3' (149bp); *BAX* (NM_004324.3) 5'-TTTCTGACGGCAACTTCAACTGGG-3' and 5'-TGTCCAGCCCATGATGGTTCTGAT-3' (122bp); *BCL-xL* (NM_138578.1) 5'- TGGGCTCACTCTTCAGTCGGAAAT-3' and 5'-ATGTAGTGGTTCTCCTGGTGGCAA-3' (121bp).

2.6. Statistical analysis

Results obtained in cytotoxicity evaluation and in flow cytometry tests were submitted to ANOVA followed by Dunnett test compared to control group ($\alpha = 0.05$), using GraphPad Prism5 software. Relative quantification method of analysis was employed in qRT-PCR using *GAPDH* as reference gene according to Pfaffl (2001) with REST© software (*Relative Expression Software Tool*) (Pfaffl *et al.*, 2002). Software is available at: <<http://www.gene-quantification.de>>.

3. RESULTS

3.1. Cytotoxicity evaluation – resazurin-based assay

Data obtained with resazurin-based assay showed that none of the tested concentrations of daidzein was cytotoxic, neither for non-tumoral cells nor for the tumoral lineage (Figures 1 and 2).

3.2. Analysis of apoptosis induction by flow cytometry

Figures 3 and 4 show results obtained in analysis of apoptosis induction by flow cytometry. Both concentrations of daidzein (10 or 25 μ M) were not able to induce apoptosis in HB4a or in MCF-7 cells; it was observed only when cells were treated with camptothecin.

3.3. Cell cycle analysis by flow cytometry

Figures 5 and 6 show the cell cycle distribution of HB4a and MCF-7 cells after treatment with daidzein. Both concentrations of daidzein (10 or 25 μM) were not able to arrest cell cycle of non-tumoral cells HB4a. There was only a significant slight decrease in cells at S phase.

For MCF-7 (Figure 6) we can observe significant cell cycle arrest at G0/G1 phase after treatment of both concentrations of daidzein (10 or 25 μM) for 24 hours. As a consequence of this arrest, percentage of cells in S phase also has decreased.

3.4. Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Figures 7 and 8, along with Tables 1 and 2 show the values of R (ratio) obtained in REST© software for gene expression of the selected primers.

For HB4a cells, we can observe that dietary concentration of daidzein (10 μM) did not modified mRNA expression of the analyzed genes significantly; however, the gene expression ratios for *CASP-3*, *BAX*, *BCL-xL* and *COX-2* become statistical significant when pharmacological concentration of daidzein (25 μM) is used to treat these lineage.

Daidzein 10 μM also did not modified expression of the studied genes in MCF-7 cells. Only when MCF-7 cells are treated with 25 μM of daidzein, *CASP-3*, *CASP-7* and *BCL-xL* expression is significantly altered. It is important to report that *COX-2* expression in mammary tumoral MCF-7 cells was null.

4. DISCUSSION

Soy based-food and supplements are among the most worldwide consumed because of their various beneficial health effects. They are very popular among women at climacteric, which have been used soy isoflavones to manage menopausal symptoms (NAMS, 2011).

Although there are a significant number of studies on soy isoflavones, their preventive effects on breast cancer are still under consideration because of the lack of consistent human data from long-term dietary intervention trials and because of the tumor stimulating effects found in *in vitro* and *in vivo* studies. Classical examples are the proliferating effect of tumoral MCF-7 cells in low daidzein concentrations, increase in breast tumor growth in mice fed with daidzein (xenograft mouse model) or even the absence of protective effect of the animals fed with isoflavones (Allred et al., 2001; Sathyamoorthy and Wang, 1997; Ju et al., 2006; Wuttke et al., 2007; Cederroth et al., 2012). Besides, there is much more studies and data on molecular mechanisms of the effects of genistein than of daidzein.

In our study, daidzein at low (0.1-10 μM) and at high ($> 10 \mu\text{M}$) concentrations were not cytotoxic to tumoral MCF-7 cells or to non-tumoral HB4a cells, in both experimental points analyzed (24 and 48h). In the study performed by Röhrdanz et al. (2002) with H4IIE rat hepatoma cells, cytotoxicity was apparent only with concentrations of daidzein above 200 μM (MTT assay). Daidzein at concentrations of 0.05, 0.5, 5, 50 μM also did not show cytotoxicity to porcine granulosa cells harvested from large, preovulatory follicles, in Alamar BlueTM assay (Nynca et al., 2009). Blay et al. (2010) found a range of non-cytotoxic concentration of 0–25 μM for daidzein in RAW 264.7 cells. Lee et al. (2011) also did not found cytotoxicity in their study with HCT-116 human colon cancer cells with high concentrations of daidzein (25, 50 and 100 μM). Moreover, Wang and Kurzer (1997) found that daidzein 0.01-100 μM was not cytotoxic and stimulated DNA synthesis (proliferation) in MCF-7. Contrary, some authors have found cytotoxic activity of daidzein in different cells types, including breast cancer cells lines. Choi and Kim (2008) demonstrated that daidzein significantly decreased the proliferation of both MCF-7 and MDA-MB-453 cells in a dose- and time-dependent manner, with significant decreases at concentrations of 10 μM in MCF-7 and 1 μM in MDA-MB-453 after 24 hours of treatment. Jin et al. (2010) also observed cytotoxic effect of daidzein in

MCF-7 cells, but they used only high concentrations of 25, 50 and 100 μM . These contradictory results are in accordance with the well documented biphasic effect of soy isoflavones, i.e., they can promote or inhibit cell proliferation (Wang and Kurzer, 1997; De Lemos, 2001).

Daidzein, like other isoflavones, can exert a wide range of effects through activation/inhibition of several cellular pathways (Steiner et al., 2008; Reiter et al., 2009). Isoflavones activities on apoptotic and cell cycle cascades are one of the most investigated by researches in searching to obtain a cancer chemopreventive effect. Another desirable characteristic of a chemopreventive agent is to affect only tumoral cells. In our study, at maximal achievable physiologic serum levels (10 or 25 μM), daidzein was not able to induce apoptosis in the breast cells analyzed (HB4a and MCF-7). Together with qRT-PCR results, we can conclude that daidzein are able to act in apoptotic cascade, but it was not sufficient to produce a chemopreventive response in the studied cells through this classical pathway of cell death.

Anti-apoptotic effect of daidzein has been found by many authors, and despite it might be not desirable in cancer chemoprevention, it might be useful in the prevention/treatment of neurodegenerative diseases. Adams et al. (2012), for example, showed that addition of daidzein attenuated the upregulation of active caspase-3 expression in neurons cultures. Wu et al. (2010) demonstrated that daidzein (1 or 5 μM) decreased the rate of apoptosis in MCF-7 cells through downregulation of bax protein. Moreover, daidzein improved antiapoptotic effect in an E_2 (17β -Estradiol) dose-dependent manner, suggesting that daidzein may enhance deleterious effect of endogenous E_2 in hormone-dependent breast cancer (Wu et al., 2010).

Pro-apoptotic activities of daidzein have also been demonstrating in different cell lines, however with supraphysiological concentrations in most of the studies. According to Jin et al. (2010), generation of reactive oxygen species (ROS) by daidzein was responsible for the

apoptosis found in their study with MCF-7 cells. There was disruption of mitochondrial transmembrane potential, downregulation of bcl-2, upregulation of bax, which led to release of cytochrome c, resulting in caspases 9 and 7 activation, and ultimately in cell death. In the study of Choi and Kim (2008), caspase 9 activity (early biomarker of apoptosis) was increased by daidzein 100 μ M treatment for 72 hours in both MCF-7 and MDA-MB-453, but it only caused the accumulation of cells in sub-G0 phase (apoptotic peak) in MDA-MB-453.

As it can observe with our results, daidzein arrested cell cycle in a selective manner: both tested concentrations (10 and 25 μ M) increased percentage of cells at G0/G1 phase only for MCF-7. This effect on cell cycle was observed by Casagrande and Darbon (2001) in OCM-1 melanoma cells, however with high daidzein concentration of 150 μ M for 72 hours. Consistently with this result, they also verified CDK2 inhibition (cyclin-dependent kinase protein that controls G1/S transition) and increased expression of p21^{CIP1} (CDK inhibitor) (Casagrande and Darbon, 2001). Daidzein (50 and 100 μ M) can also arrest cells at G2/M phase, as demonstrated by Choi and Kim (2008) in the MCF-7 and in MDA-MB-453, with more pronounced results in the latter. Upregulation of p21^{CIP1} (and G2/M arrest) was also observed in human tumoral prostate cells (PC-3) with soy isoflavone concentrate, which according to the authors reflects the natural composition found in soybeans (Handayani et al., 2006).

Lack of COX-2 mRNA expression in our results with MCF-7 cells is consistent with data found in literature (Liu and Rose, 1996; Half et al., 2002; Zhao et al., 2008). In our experiments with HB4a cells, daidzein caused dose-dependent increase in COX-2 transcripts. This observation, together with the fact of selective cell cycle arrest, lead us to infer that absence of COX-2 expression sensitizes MCF-7 cells to daidzein treatment, thus resulting in cell cycle arrest. It is well known that various drugs are COX-2 inhibitors, and because of this property, they can arrest cell cycle and induce apoptosis in different tumoral cell lines. On the

other hand, overexpression of COX-2 has been associated with many aspects of tumorigenesis (Trifan and Hla, 2003); including mechanisms that confers chemoresistance to cancerous cells.

Taken together, our results and data from literature confirm that daidzein at maximal achievable physiological levels can be an effective cancer chemopreventive agent, arresting cell cycle only in the tumoral breast cell line (MCF-7) and maintaining the normal balance between survival and cell death signs in non malignant breast cells (HB4a).

Acknowledgements

Authors thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; 471938/2008-4) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the financial support.

References

- ADAMS SM, AKSENOVA MV, AKSENOV MY, MACTUTUS CF, BOOZE RM Soy isoflavones genistein and daidzein exert anti-apoptotic actions via a selective ER-mediated mechanism in neurons following HIV-1 Tat1–86 exposure. *PLoS ONE* 7, e37540, 2012.
- ADLERCREUTZ H. Phytoestrogens and cancer. *Lancet Oncology* 3, 364-373, 2002.
- ADLERCREUTZ CH, GOLDIN BR, GORBACH SL, HOCKERSTEDT KA, WATANABE S, HAMALAINEN EK, MARKKANEN MH, MAKEL TH, WAHALA KT, ADLERCREUTZ T. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *Journal of Nutrition* 125, 757S-770S, 1995.
- ALLRED CD, ALLRED KF, JU YH, VIRANT SM, HELFERICH WG. Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose dependent manner. *Cancer Research* 61, 5045–5050, 2001.
- ANAND P, KUNNUMAKARA AB, SUNDARAM C, HARIKUMAR KB, THARAKAN ST, LAI OS, SUNG B, AGGARWAL BB. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research* 25, 2097-2116, 2008.

- BLAY M, ESPINEL AE, DELGADO MA, BAIGES I, BLADÉ C, AROLA L, SALVADÓ J. Isoflavone effect on gene expression profile and biomarkers of inflammation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51, 382–390, 2010.
- BLOEDON LT, JEFFCOAT AR, LOPACZYNSKI W, SCHELL MJ, BLACK TM, DIX KJ, THOMAS BF, ALBRIGHT C, BUSBY MG, CROWELL JA, ZEISEL SH. Safety and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76, 1126–1137, 2002.
- CASAGRANDE F, DARBON J-M. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochemical Pharmacology* 61, 1205–1215, 2001.
- CEDERROTH CR, NEF S. Soy, phytoestrogens and metabolism: a review. *Molecular and Cellular Endocrinology* 340, 30-42, 2009.
- CEDERROTH CR, ZIMMERMANN C, NEF S. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. *Molecular and Cellular Endocrinology* 355, 192–200, 2012.
- CHOI EJ, KIM G-H. Daidzein causes cell cycle arrest at G1 and G2/M phases in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-435. *Phytomedicine* 15, 683-690, 2008.
- DE LEMOS ML. Effects of soy phytoestrogens genistein and daidzein on breast cancer growth. *The Annals of Pharmacotherapy* 35, 1118–1121, 2001.
- DOLL R, PETO R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Journal of the National Cancer Institute* 66, 1191–308, 1981.
- DUFFY C, PEREZ K, PARTRIDGE A. Implications of phytoestrogen intake for breast cancer. *CA: a cancer journal for clinicians* 57, 260-277, 2007.
- DUSSALT AA, POULIOT M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biological Procedures Online* 8, 1-10, 2006.
- HALF E, TANG XM, GWYN K et al. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma *in situ*. *Cancer Research* 62, 1676-1681, 2002.
- HANDAYANI R, RICE L, CUI Y, MEDRANO TA, SAMEDI VG, BAKER HV, SZABO N, SHIVERICK KT. Soy isoflavones alter expression of genes associated with cancer progression, including Interleukin-8, in androgen-independent PC-3 human prostate cancer cells. *Journal of Nutrition* 136, 75–82, 2006.
- JIN S, ZHANG QY, KANG XM, WANG JX, ZHAO WH. Daidzein induces MCF-7 breast cancer cells apoptosis via the mitochondrial pathway. *Annals of Oncology* 21, 263–268, 2010.

- JU YH, FULTZ J, ALLRED KF, DOERGE DR, HELFERICH WG. Effects of dietary daidzein and its metabolite, equol, at physiological concentrations on the growth of estrogen dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in ovariectomized athymic mice. *Carcinogenesis* 27, 856–863, 2006.
- LEE DE, KIWON L, KEUN S, LEE EJ, HWANG JA, LIM T-G, KIM BY, BODE AM, LEE HJ, DONG Z. 6,7,4-Trihydroxyisoflavone inhibits HCT-116 human colon cancer cell proliferation by targeting CDK1 and CDK2. *Carcinogenesis* 32, 629–635, 2011.
- LIU X, ROSE D. Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. *Cancer Research* 56, 5125–5127, 1996.
- MCMILLIAN MK, LI L, PARKER JB, PATEL L, ZHONG Z, GUNNETT JW, POWERS WJ, JOHNSON MD. An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. *Cell Biology and Toxicology* 18, 157-173, 2002.
- MESSINA M, MCCASKILL-STEVENSON W, LAMPE JW. Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings. *Journal of the National Cancer Institute* 98,1275–1284, 2006.
- MILTYK W, CRACIUNESCU CN, FISCHER L, JEFFCOAT RA, KOCH MA, LOPACZYNSKY W, MAHONEY C, CROWELL J, PAGLIERI J, ZEISEL SH. Lack of significant genotoxicity of purified soy isoflavones (genistein, daidzein and glycitein) in 20 patients with prostate cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition* 77, 875-882, 2003.
- MOISEEVA EP, MANSON MM. Dietary Chemopreventive phytochemicals: Too little or too much? *Cancer Prevention Research* 2, 611-616, 2009.
- NAKAYAMA GR, CATON MC, NOVA MP, PARANDOOSH Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of Immunological Methods* 204, 205-208, 1997.
- NAMS (North American Menopause Society). The role of soy isoflavones in menopausal health: report of The North American Menopause Society/Wulf H. Utian Translational Science Symposium in Chicago, IL (October 2010). *Menopause* 18, 732-753, 2011.
- NYNCA A, JABLONSKA O, SŁOMCZYŃSKA M, PETROFF BK, CIERESZKO RE. Effects of phytoestrogen daidzein and estradiol on steroidogenesis and expression of estrogen receptors in porcine luteinized granulosa cells from large follicles. *Journal of Physiology and Pharmacology* 60, 95-105, 2009.
- O' BRIEN J, WILSON I, ORTON T, POGNAN F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* 267, 5421-5426, 2000.

- PFAFFL MW, HORGAN GW, DEMPFLER L. Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30, 1-10, 2002.
- PFAFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, 2003-2007, 2001.
- POWLES T. Isoflavones and women's health. *Breast Cancer Research* 6,140-142, 2004.
- RAMOS, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *Journal of Nutritional Biochemistry* 18, 427-442, 2007.
- REITER E, BECK V, MEDJAKOVIC S, JUNGBAUER A. Isoflavones are safe compounds for therapeutical applications – Evaluation of in vitro data. *Gynecological Endocrinology* 25, 554–580, 2009.
- RÖHRDANZ E, OHLER S, TRAN-THI Q-H, KAHL R. The phytoestrogen daidzein affects the antioxidant enzyme system of rat hepatoma H4IIE cells. *Journal of Nutrition* 132, 370–375, 2002.
- SATHYAMOORTHY N, WANG TTY. Differential Effects of Dietary Phyto-oestrogens Daidzein and Equol on Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *European Journal of Cancer* 33, 2384-2389, 1997.
- SETCHELL KD, BROWN NM, LYDEKING-OLSEN E. The clinical importance of the metabolite equol - a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *Journal of Nutrition* 132, 3577-3584, 2002.
- SETCHELL KDR. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology and implications for human health of soy isoflavones. *The American Journal of Clinical Nutrition* 68, 1333S-1346S, 1998.
- STEINER C, ARNOULD S, SCALBERT A, MANACH C. Isoflavones and the prevention of breast cancer: new perspectives opened by nutrigenomics. *British Journal of Nutrition* 99, ES78-ES108, 2008.
- SUGAYA S, NAKANISHI H, TANZAWA H. Down-regulation of SMT3A gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) cells. *Mutation Research* 578, 327–332, 2005.
- TRIFAN OC, HLA T. Cyclooxygenase-2 modulates cellular growth and promotes tumorigenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 7, 207-222, 2003.
- WANG C, KURZER MS. Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. *Nutrition and Cancer* 28, 236-247, 1997.

WILLIAMSON-HUGHES PS, FLICKINGER BD, MESSINA MJ, EMPIE MW. Isoflavone supplements containing predominantly genistein reduce hot flash symptoms: a critical review of published studies. *Menopause* 13, 831–839, 2006.

WU X-F, WANG Y-J, XIA G-L, ZHANG M-J. Dietary daidzein enhances antiapoptotic effect of 17 β -estradiol (E2) on breast cancer MCF-7 cells. *Chinese Journal of Cancer Research* 22, 10-16, 2010.

WUTTKE W, JARRY H, SEIDLOVÁ-WUTTKE D. Isoflavones – safe food additives or dangerous drugs? *Ageing Research Reviews* 6, 150-188, 2007.

ZHAO X, GOSWAMI M, POKHRIYAL N, MA H, DU H, YAO J, VICTOR TA, POLYAK K, STURGIS CD, BAND H, BAND V. Cyclooxygenase-2 expression during immortalization and breast cancer progression. *Cancer Research* 68, 467–475, 2008.

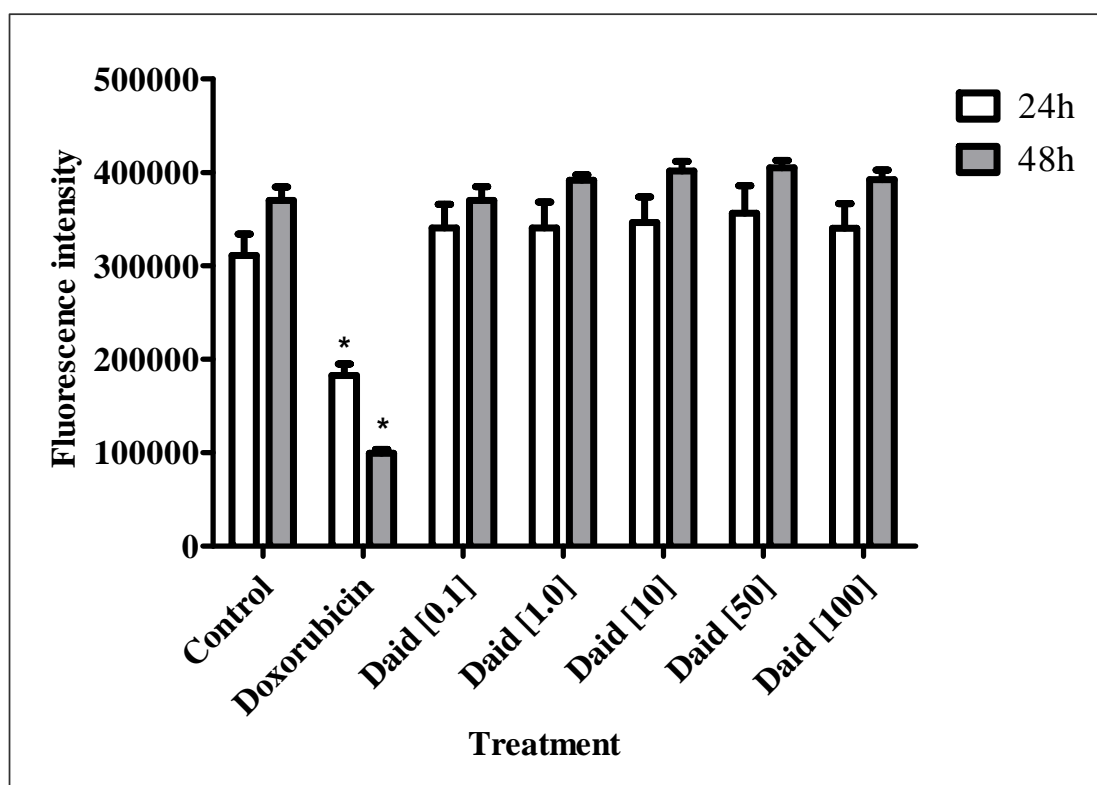


Figure 1. Fluorescence intensity measured after treatment of HB4a (24, 48h) with different concentrations of daidzein (Daid) in resazurin-based assay. Daid [0.1] = cells treated with daidzein 0.1 μM ; Daid [1] = cells treated with daidzein 1 μM ; Daid [10] = cells treated with daidzein 10 μM ; Daid [50] = cells treated with daidzein 50 μM ; Daid [100] = cells treated with daidzein 100 μM ; Doxorubicin = cells treated with doxorubicin 10 $\mu\text{g/mL}$. * indicates cytotoxic effect ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).

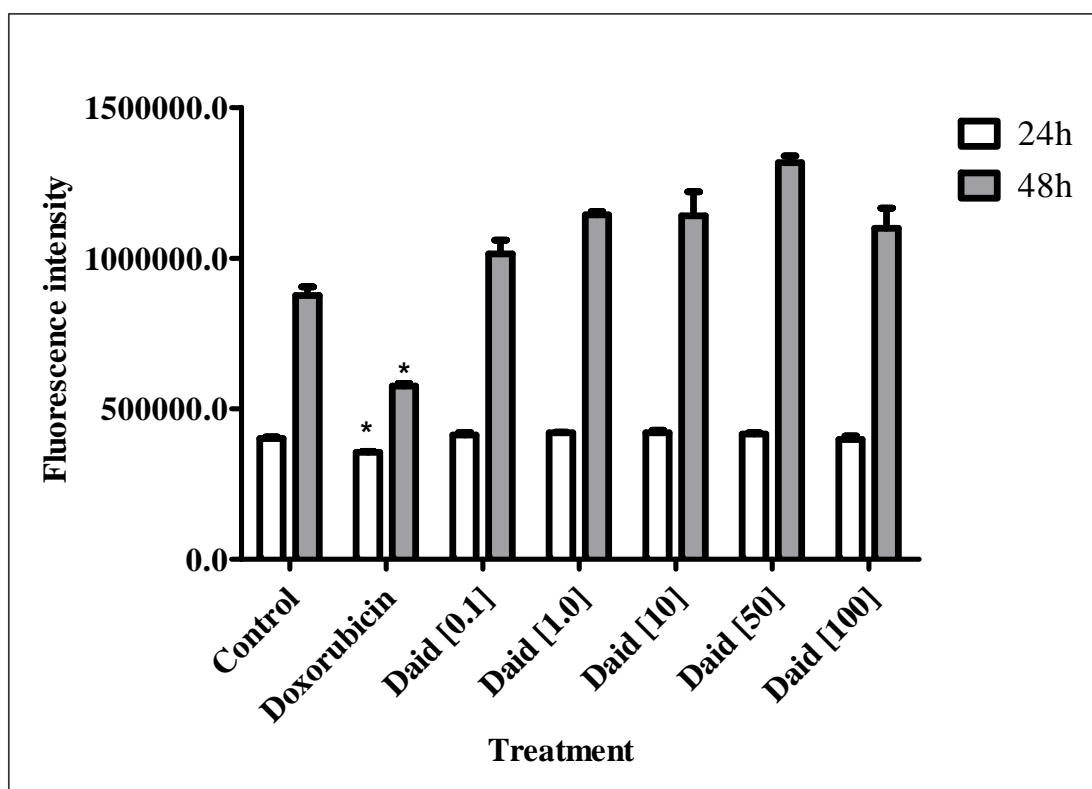
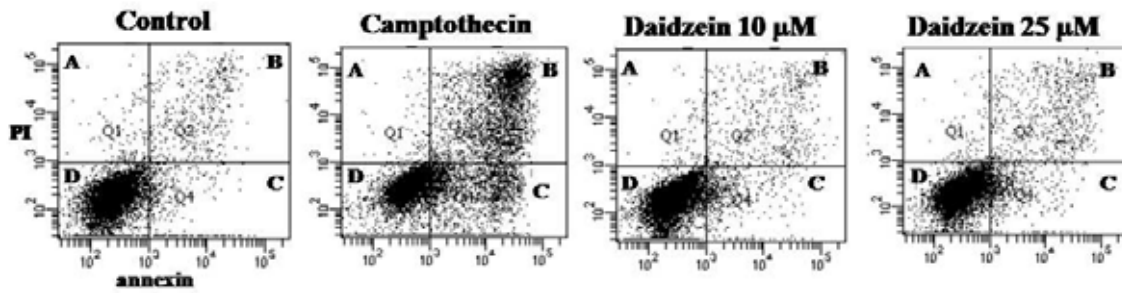
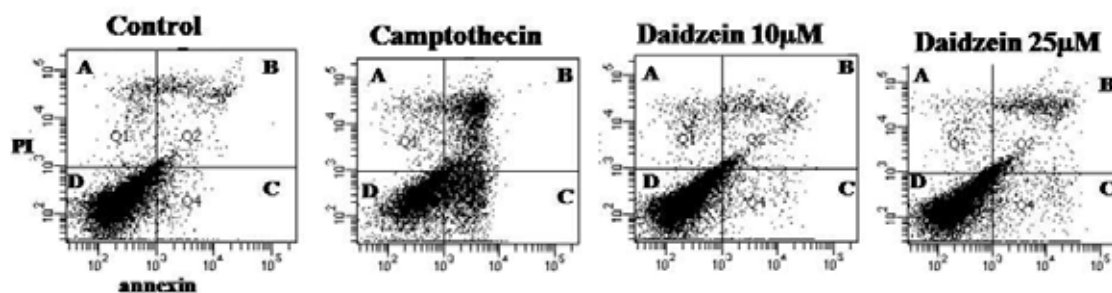


Figure 2. Fluorescence intensity measured after treatment of MCF-7 (24, 48h) with different concentrations of daidzein (Daid) in resazurin-based assay. Daid [0.1] = cells treated with daidzein 0.1 μ M; Daid [1] = cells treated with daidzein 1 μ M; Daid [10] = cells treated with daidzein 10 μ M; Daid [50] = cells treated with daidzein 50 μ M; Daid [100] = cells treated with daidzein 100 μ M; Doxorubicin = cells treated with doxorubicin 10 μ g/mL. * indicates cytotoxic effect ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).



Treatment HB4a cells	Viable cells (D)	Apoptotic cells (C)	Late apoptotic cells (B)	Total of apoptotic cell (B+C)	Necrotic cells (A)
Control	86.66 ± 3.21	6.32 ± 1.93	5.72 ± 1.54	12.04 ± 3.25	1.2 ± 0.4
Camptothecin	36.78 ± 10.79*	32.26 ± 7.81*	30.38 ± 3.90*	62.64 ± 11.3*	0.6 ± 0.51
Daidzein 10 μM	81.66 ± 5.4	9.53 ± 3.92	7.86 ± 2.02	17.4 ± 5.58	0.84 ± 0.27
Daidzein 25 μM	80.7 ± 6.71	8.86 ± 3.34	9.48 ± 4.37	18.35 ± 6.01	0.82 ± 0.19

Figure 3. Analysis of apoptosis induction by flow cytometry (FITC-annexin-V) in HB4a cells treated with daidzein for 24 hours. *statistical significant ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).



Treatment MCF-7 cells	Viable Cells (D)	Apoptotic Cells (C)	Late apoptotic cells (B)	Total of apoptotic cells (B+C)	Necrotic cells (A)
Control	78.75 ± 6.22	10.51 ± 8.1	6.35 ± 1.34	16.86 ± 7.25	5.58 ± 2.13
Camptothecin	50.3 ± 13.72*	26.35 ± 8.95*	15.4 ± 9.36*	41.75 ± 18.31*	6.17 ± 4.11
Daidzein 10 µM	68.51 ± 8.60	16.01 ± 12.58	9.54 ± 2.23	27.42 ± 9.37	4.9 ± 1.98
Daidzein 25µM	70.45 ± 8.55	15.45 ± 11.07	9.36 ± 4.09	24.81 ± 9.24	4.43 ± 1.57

Figure 4. Analysis of apoptosis induction by flow cytometry (FITC-annexin-V) in MCF-7 cells treated with daidzein for 24 hours. *statistical significant ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).

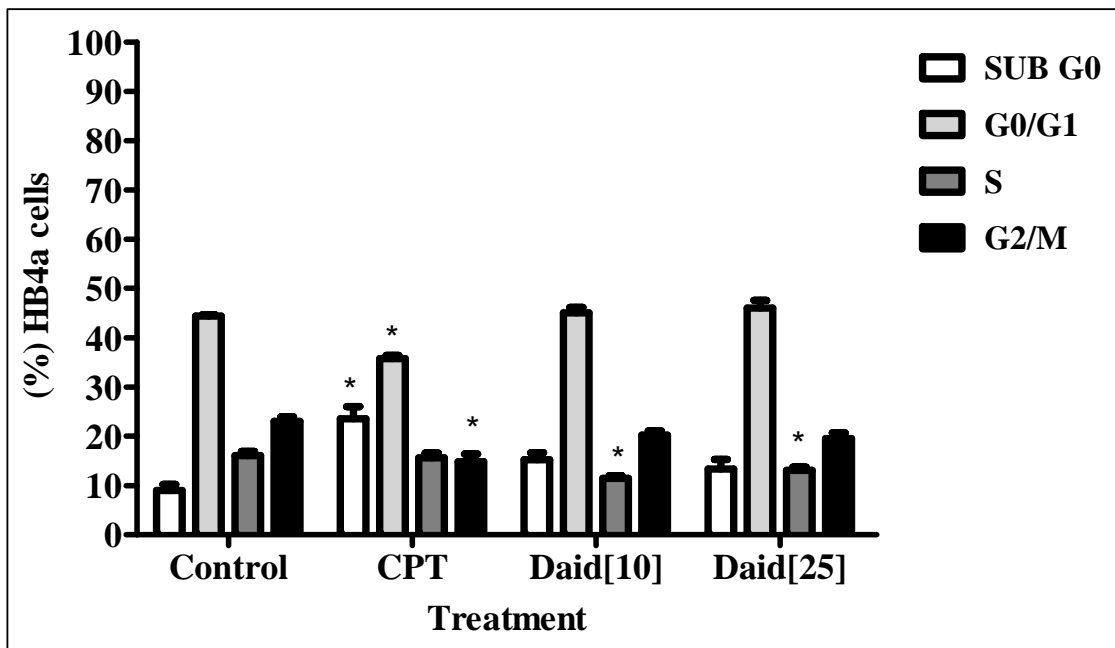


Figure 5. Cell cycle distribution of HB4a after daidzein treatment for 24 hours. CPT = cells treated with camptothecin 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Daid [10] = cells treated with daidzein 10 μM ; Daid [25] = cells treated with daidzein 25 μM . *statistical significant ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).

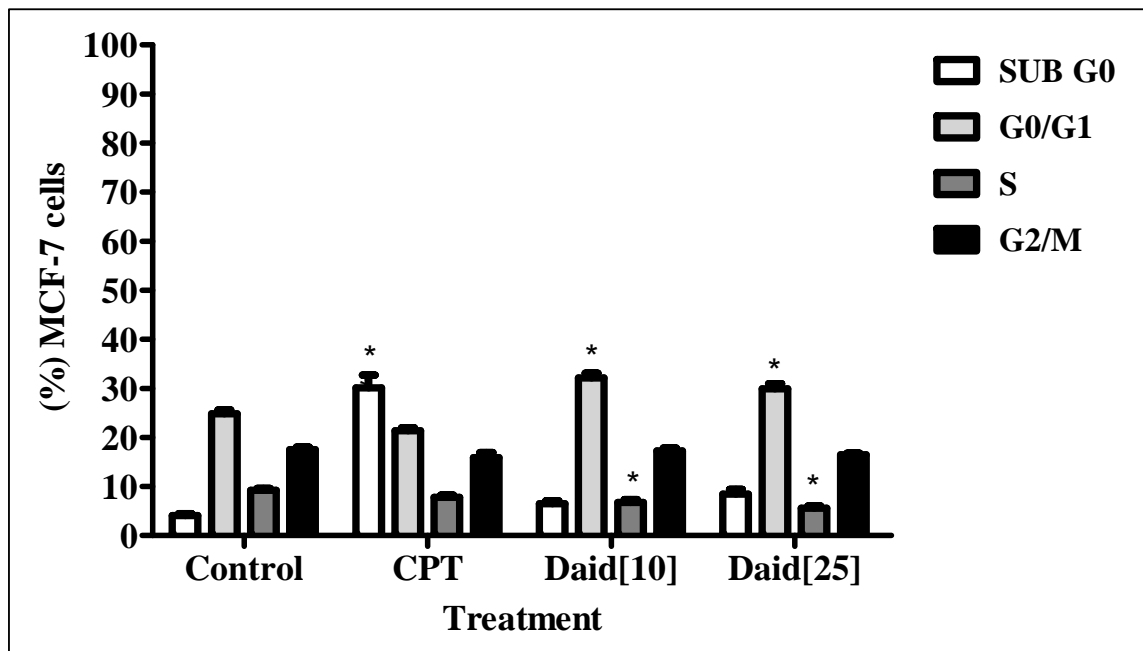


Figure 6. Cell cycle distribution of MCF-7 after daidzein treatment for 24 hours. CPT = cells treated with camptothecin 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Daid [10] = cells treated with daidzein 10 μM ; Daid [25] = cells treated with daidzein 25 μM . *statistical significant ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).

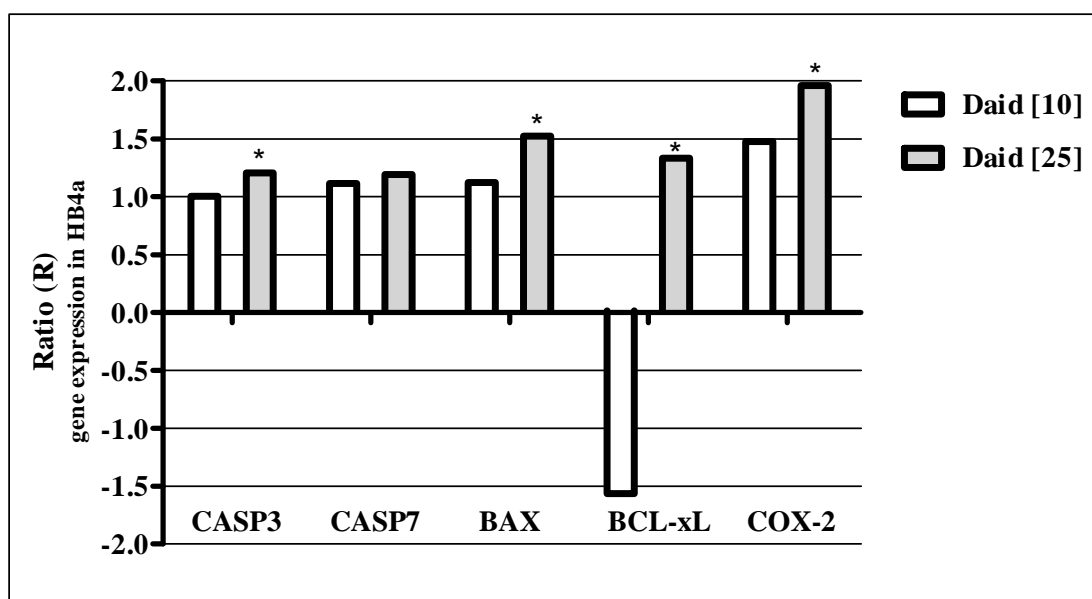


Figure 7. HB4a relative gene expression (R value) of *CASP-3*, *CASP-7*, *BAX*, *BCL-xL* and *COX-2* after treatment of 10 or 25 μM of daidzein (12h). Data were submitted to software REST© (PFAFFL *et al.*, 2002). Ratio value (R) of control group is considered as 1. Daid [10] = cells treated with daidzein 10 μM ; Daid [25] = cells treated with daidzein 25 μM .

Table 1. Relative gene expression (R value) of *CASP-3*, *CASP-7*, *BAX*, *BCL-xL* and *COX-2* after treatment of 10 or 25 μM of daidzein in HB4a cells. R value \pm SD and p value.

	Daidzein 10 μM	Daidzein 25 μM
<i>CASP-3</i>	1.003 \pm 0.232 p = 0.987	1.208 \pm 0.185 p = 0.031
<i>CASP-7</i>	1.114 \pm 0.193 p = 0.522	1.191 \pm 0.149 p = 0.204
<i>BAX</i>	1.124 \pm 0.156 p = 0.461	1.524 \pm 0.176 p = 0.014
<i>BCL-xL</i>	-1.562 \pm 0.176 p = 0.058	1.335 \pm 0.168 p = 0.010
<i>COX-2</i>	1.477 \pm 0.477 p = 0.11	1.96 \pm 0.478 p = 0.001

Data were submitted to software REST© (PFAFFL *et al.*, 2002). Negative R value means downregulation of the gene.

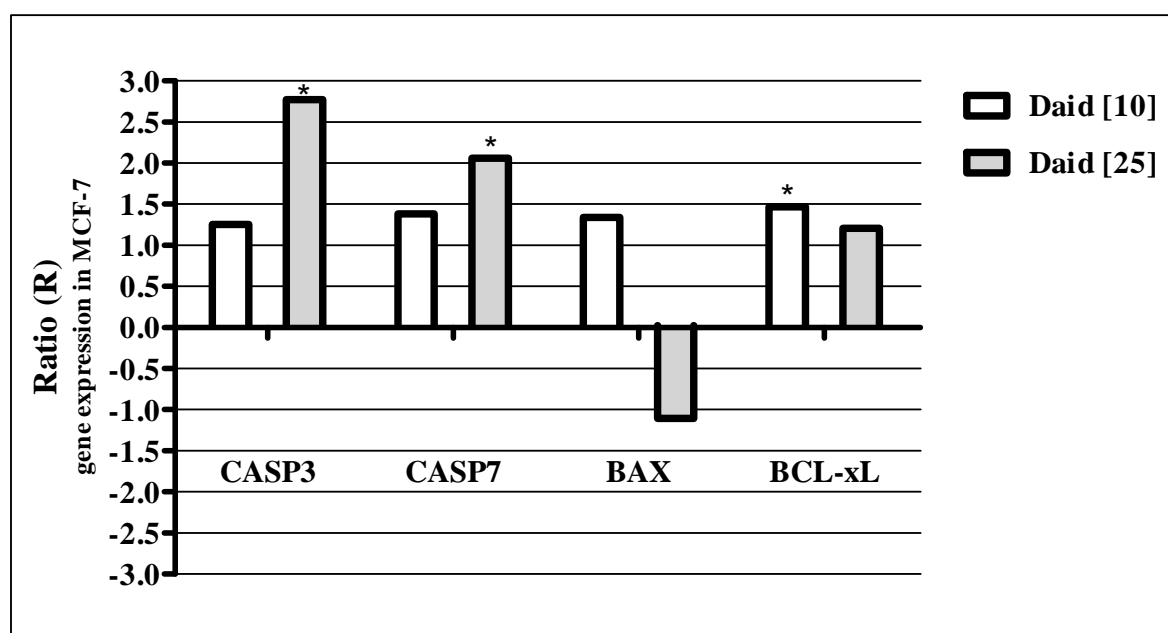


Figure 8. MCF-7 relative gene expression (R value) of *CASP-3*, *CASP-7*, *BAX*, and *BCL-xL* after treatment of 10 or 25 μM of daidzein (12h). Data were submitted to software REST© (PFAFFL *et al.*, 2002). Ratio value (R) of control group is considered as 1. Daid [10] = cells treated with daidzein 10 μM ; Daid [25] = cells treated with daidzein 25 μM . *COX-2* expression was null in this cell line.

Table 2. Relative gene expression (R value) of *CASP-3*, *CASP-7*, *BAX* and *BCL-xL* after treatment of 10 or 25 μM of daidzein in MCF-7 cells. R value \pm SD and p value.

	Daidzein 10 μM	Daidzein 25 μM
<i>CASP-3</i>	1.253 \pm 0.254 p = 0.251	2.773 \pm 0.489 p = 0.045
<i>CASP-7</i>	1.38 \pm 0.297 p = 0.171	2.059 \pm 0.371 p = 0.004
<i>BAX</i>	1.34 \pm 0.238 p = 0.151	-1.107 \pm 0.213 p = 0.418
<i>BCL-xL</i>	1.467 \pm 0.259 p = 0.037	1.209 \pm 0.218 p = 0.368

Data were submitted to software REST© (PFAFFL *et al.*, 2002). Negative R value means downregulation of the gene.

5.3. ARTIGO 3

Genistein at maximal physiologic serum levels induces G0/G1 arrest in MCF-7 and HB4a cells, but not apoptosis.

Marcela S. Tsuboy¹, Juliana C. Marcarini¹, Alecsandra O. de Souza², Natália A. de Paula³, Daniel J. Dorta², Mário S. Mantovani⁴, Lucia R. Ribeiro¹.

¹ Instituto de Biociências, UNESP, Univ Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil.

² Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras; Departamento de Química; USP, Univ de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

³ Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina; Departamento de Clínica Médica, USP, Univ de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

⁴ Departamento de Biologia Geral, UEL, Univ Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

Corresponding author

Marcela S. Tsuboy
Universidade Estadual Paulista – UNESP
Instituto de Biociências, campus Rio Claro, SP, Brazil.
CEP: 13506-900
E-mail: tsuboyma@yahoo.com.br
Phone/Fax: +55 (19) 3526-4136

Resumo

Muitos estudos têm demonstrado que uma dieta balanceada pode contribuir para a melhora da saúde humana. Por esta razão, alimentos à base de soja ou isoflavonas isoladas são muito consumidos. A associação da ingestão de soja e baixos riscos de doenças crônicas e câncer na população asiática é bem estabelecida, o que tem atraído a atenção da população mundial, especialmente das mulheres que passam pela menopausa e que desejam aliviar os sintomas da falta do hormônio estrogênio. Apesar dos dados epidemiológicos positivos, controversas ainda existem devido aos resultados conflitantes encontrados na literatura científica em relação ao papel das isoflavonas na carcinogênese de tumores de mama e outros tipos de tumores hormônio-dependentes. Em nosso estudo, foram investigadas a citotoxicidade, a indução de parada do ciclo celular e da apoptose, além de alterações na expressão de genes relacionados à esse tipo de morte celular em células tumorais MCF-7 e não tumorais HB4a, após tratamento com os máximos níveis séricos da isoflavona genisteína. Os resultados mostraram que somente níveis supra-fisiológicos de genisteína (50 e 100 μM) foram citotóxicos a essas células. As concentrações de 10 e 25 μM não induziram apoptose e mudanças significativas na expressão dos genes estudados também não foram observados. Resultados positivos foram encontrados somente na análise do ciclo celular, ou seja, parada na fase G0/G1 nas células MCF-7 para ambas as concentrações de genisteína e, em 25 μM nas células HB4a. Este é o primeiro estudo investigando os efeitos da genisteína nesta linhagem celular não tumoral, HB4a. Em resumo, apesar da ausência de indução de apoptose (geralmente encontrada em altas concentrações), a genisteína em níveis séricos fisiologicamente relevantes ainda exerce efeito quimiopreventivo (atraso no ciclo celular).

Palavras-chave: genisteína, concentração fisiológica, parada em G0/G1, MCF-7, HB4a

Abstract

Several studies have demonstrated that a balanced diet can contribute to a better human health. For this reason, soy-based food and pure isoflavones (pills) are one of the most consumed. The association of this consumption and lower risks of chronic diseases and cancer is well established for Asian population and has been attracted attention of people worldwide, special from women at menopause, who seeks to alleviate the symptoms of the lack of estrogen. Despite positive epidemiological data, concerns still exists because of conflicting results found in scientific literature in relation to the role of isoflavones in breast and hormone-related cancers. In our study we investigated the cytotoxicity, induction of cell cycle arrest, apoptosis, and changes in apoptosis-related genes of maximal physiological serum levels of the isoflavone genistein in MCF-7 tumoral cells and in HB4a non-tumoral cells. Only supraphysiological levels of genistein (50 and 100 μM) were cytotoxic to these cell lines. Concentrations of 10 and 25 μM did not induce apoptosis and significant changes in expression of the studied genes. Positive results were found in cell cycle analysis: G0/G1 delay of MCF-7 cells in both concentrations of genistein and, at 25 μM in HB4a cells. It is the first study investigating genistein effects in this non-tumoral cell line (HB4a). Thus, despite the lack of apoptosis induction (generally found with high concentrations), genistein at physiological relevant serum levels still exerts chemopreventive effect (cell cycle arrest).

Keywords: genistein, physiological concentration, G0/G1 arrest, apoptosis, MCF-7, HB4a

1. INTRODUCTION

Genistein (4', 5, 7-trihydroxyisoflavone) is one of the most studied soy isoflavones but it still arouses the interest of researches worldwide. Many beneficial health effects have been attributed to consumption of genistein, including reduction of cancer risk, osteoporosis and cardiovascular diseases (CEDERROTH & NEF, 2009; PATISAUL & JEFFERSON, 2010). Also, genistein and soy-based food and supplements have gained special attention from women at menopause because of the association of their ingestion with ameliorating of symptoms caused by climacteric (NAMS, 2011). These evidences are supported by epidemiological observations from Asian populations which have lower rates of cancer incidence and other chronic diseases. Nevertheless, the role of soyfoods in an overall healthy diet has become a confusing and contentious issue in recent years because of the conflicting results found in scientific literature (MESSINA & MESSINA, 2010). One unresolved issue relates to the effect of isoflavones on breast tissue and reproductive system. There have been studies that indicate that there may be promotion or inhibition of breast cancer by the isoflavones (FITZPATRICK, 2008). Besides, depending on the study, genistein can inhibit or increase the action of tamoxifen, SERM generally prescribed for patients with breast cancer. So, understanding and interpreting the enormous amount of soy research conducted is challenging, because it requires understanding the strengths and weaknesses of a wide variety of experimental models and designs (MESSINA & MESSINA, 2010).

In relation to cancer, genistein chemopreventive effects includes modulation of various signaling cascades, but induction of apoptosis and cell cycle arrest are among the most studied ones. However, in most of these studies, non-physiological concentrations of genistein are tested. Such data may produce results that are physiologically irrelevant, thus hindering predictions of efficacy (MOISEEVA & MANSON, 2009). According to Steiner *et*

al. (2009), another limitation to investigate the preventive effects of isoflavones is the lack of data regarding their effects in non-tumoral cell lines.

In front of these observations, the aim of our study was to evaluate the cytotoxicity, induction of apoptosis, cell cycle arrest and expression of pro- and anti-apoptotic genes focusing on concentrations of genistein considered the maximal physiologically achievable through diet or through pharmacological administration, using two human mammary cell lines: a non-tumoral lineage (HB4a) and a tumoral one (MCF-7).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Test compounds

Soy isoflavone genistein (GEN.) (CAS 446-72-0) was purchased from Acros Organics. It was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and used in cell culture with DMSO maximum concentration of 1%. In cytotoxicity assay (item 2.3), doxorubicin (CAS 29042-30-6; Adriblastina[®]) was used at 10 µg/mL and in flow cytometry tests (item 2.4 and 2.5) camptothecin (CAS 7689-03-4; Acros Organics) was used at 4 µg/mL.

2.2. Cell lines

MCF-7 cells were kindly provided by Professor João Ernesto de Carvalho (UNICAMP, São Paulo, Brazil) and HB4a cell line was kindly provided by Professor Silvia R. Rogatto from Hospital do Câncer A. C. Camargo (São Paulo, Brazil). Both lineages were cultivated in DMEM (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (Gibco 15240-062) at 37 °C, 5% CO₂ and 95% relative humidity. Insulin (Gibco) and hydrocortisone (Pharma Nostra) (both at final concentration of 5 µg/mL) were also added to HB4a culture.

2.3. Resazurin-based assay – cytotoxicity evaluation

Approximately 4.5×10^4 cells were seeded in each well of a 24 wells-microplate. After 24h stabilization, cells were treated with genistein for 24 or 48h. After this period, medium was removed, wells were washed with phosphate buffer saline (PBS) and cells were incubated with resazurin $60 \mu\text{M}$ (CAS 62758-13-8; Acros Organics) for 3h. Fluorescence was measured with VICTOR 3 (Perkin Elmer) at 530-560 nm of excitation and 580-600 nm of emission ranges.

Final concentrations of genistein used were 0.1; 1; 10; 50 and $100 \mu\text{M}$. Medium with 1% DMSO constituted control treatment and doxorubicin $10 \mu\text{g/mL}$ was control of cytotoxicity induction. Experiments were performed in triplicate. The tests were performed according to the protocol described by Nakayama *et al.* (1997), O'Brien *et al.* (2000) and McMillian *et al.* (2002).

In the other tests (item 2.4; 2.5; 2.6), we focused on concentrations of 10 and $25 \mu\text{M}$ of genistein, which represents, respectively, maximal dietary and pharmacological concentrations that have been found in human plasma (DE LEMOS, 2001; BLOEDON *et al.*, 2002; MILTYK *et al.*, 2003; DUFFY *et al.*, 2007).

2.4. Cell cycle analysis by flow cytometry

MCF-7 and HB4a cells (10^5 /well) were seeded in 6 wells-microplate and after 24h stabilization, treated with camptothecin ($4 \mu\text{g/mL}$) and genistein 10 or $25 \mu\text{M}$ for another 24 hours. After detachment of the cells ($500 \mu\text{L}$; 0.01% trypsin) and centrifugation (1000 rpm, 5 min, 4°C), it was added PBS and ice cold 70% ethanol to the pellet. Then, pellet was resuspended and left at -20°C for 24 hours. After this period, cells were centrifuged (1000 rpm, 5 min, 4°C), supernadant was discarded and it was added cold PBS and RNase A (Invitrogen; 10 mg/mL) to each tube. Samples were incubated 30 minutes at 37°C , followed

by staining with hypotonic fluorochrome solution (propidium iodide 5 μ g/mL; sodium citrate 0.1% and Triton X-100 0.1%) one hour before flow cytometric analysis (10.000 events; BD FACS CANTO). Experiments were performed in biological duplicate with three wells/treatment each one.

2.5. Annexin V-FITC/PI analysis of apoptosis induction

Approximately 10^5 cells HB4a or MCF-7 were seeded in each well of a 6 wells-microplate. After 24h stabilization, cells were treated with camptothecin (4 μ g/mL) and genistein 10 or 25 μ M for 24 hours. At the end of treatment, medium was removed from the wells, then they were washed with PBS before adding trypsin (500 μ L; 0.01%) to the cells. The same medium and PBS (that were reserved in falcon tubes), were added to cells and centrifuged (1000 rpm, 5 min, 4°C). Supernadant was discarded and cell pellet was resuspended in cold PBS followed by another centrifugation (1000 rpm, 10 min, 4°C). Cells were then labeled with annexin V-FITC (BD Pharmigen™ 1:100) and propidium iodide (Sigma; 5 μ g/mL), protected from the light. Ten thousand events were analyzed in BD FACS CANTO flow cytometer. As in the previous experiments (item 2.3.), tests were performed in biological duplicate with three wells/treatment each one.

2.6. Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Gene expression was analyzed after 12h treatment of cells ($10^6/25\text{cm}^2$ flasks) with genistein 10 μ M or 25 μ M. Experiments were performed in biological duplicate and technical triplicate.

According to the manufacturer's instructions, total RNA was extracted using Trizol LS reagent (Invitrogen), followed by DNase I (Invitrogen) treatment. Verification of RNA quality was done in agarose gel (28S and 18S rRNA pattern of bands) and by A_{260}/A_{280} ratio

(Biophotometer – Eppendorf). Complementary DNA (cDNA) was synthesized using dNTP 2.5mM mix; OligodT 10 pmol/ μ L; RNase OutTM (Invitrogen); M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen); RNA 500 ng/mL; DEPC water (Invitrogen). Real time PCR reactions (triplicate) were performed in Engine Opticon detection system (Bio-Rad) using Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG kit (Invitrogen) in a total of 20 μ L of reaction mix (2 μ L of 1:5 cDNA; 10 μ L SYBR[®] Green; 0.5 μ L of 10 μ M of each specific gene primer, and 7 μ L of H₂O). Target cDNAs were amplified in separate tubes: 3 min at 95°C, then 35 cycles of denaturation (95°C for 20 s), annealing (at 60°C for 30 s) and extension (72°C for 20 s) per cycle. Melting curves (50 to 95°C ready every 0.5°C) for each PCR reaction were generated to ensure the purity of the amplification product. Primers sequences were designed with IDT tool available at <<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest>>. In order to assess induction of apoptosis in these mammary cell lines, primers of *CASP-3*, *CASP-7*, *BAX* and *BCL-xL* were used, as well as *GAPDH* (NM_002046.3) (SUGAYA *et al.*, 2005) as reference gene, besides *COX-2* (DUSSALT & POULIOT, 2006). Primers sequences used and amplicon size (bp) was as followed: *CASP-3* (NM_032991.2) 5'-GTGCTACAATGCCCCTGGAT-3' and 5'-GCCCATTCATTTATTGCTTTCC-3' (199bp); *CASP-7* (NM_001227.3) 5'-TCACCATGCGATCCATCAAGACCA-3' and 5'-TTTGTCTGTTCCGTTTCGAACGCC-3' (149bp); *BAX* (NM_004324.3) 5'-TTTCTGACGGCAACTTCAACTGGG-3' and 5'-TGTCCAGCCCATGATGGTTCTGAT-3' (122bp); *BCL-xL* (NM_138578.1) 5'-TGGGCTCACTCTTCAGTCGGAAAT-3' and 5'-ATGTAGTGGTTCTCCTGGTGGCAA-3' (121bp).

2.7. Statistical analysis

Results obtained in cytotoxicity and in flow cytometry tests were submitted to ANOVA followed by Dunnett test compared to control group ($\alpha = 0.05$), using GraphPad

Prism5 software. Gene expression was analyzed with relative quantification method using *GAPDH* as reference gene according to Pfaffl (2001) with REST© software (*Relative Expression Software Tool*) (PFAFFL *et al.*, 2002). This software is available online at: <<http://www.gene-quantification.de>>.

3. RESULTS

3.1. Resazurin-based assay– cytotoxicity evaluation

After 24 hours of treatment with genistein, HB4a cells were not affected by any of the investigated concentrations, but genistein 100 μM was cytotoxic to MCF-7 cells after the same period (Figures 1 and 2). Treatment with genistein 50 and 100 μM for 48 hours induced cytotoxicity in HB4a and MCF-7 (Figures 1 and 2). Genistein 10 μM was not cytotoxic for both cells in these conditions.

3.2. Cell cycle analysis by flow cytometry

Figures 3 and 4 show the cell cycle distribution of HB4a and MCF-7 cells after treatment with genistein 10 and 25 μM . Percentage of cells in sub-G0 phase had significantly increased only with treatment of cells with camptothecin (Figures 3 and 4). Genistein 10 μM slightly decrease the number of HB4a cells at S phase. Genistein 25 μM was able to arrest HB4a cycle at G0/G1 phase and in consequence of this arrest, percentage of cells in S and G2/M phases also have decreased (Figure 3). For MCF-7 cells, genistein 10 and 25 μM arrested cell cycle at G0/G1 phase (Figure 4).

3.3. Annexin V-FITC/PI analysis of apoptosis induction

Analysis of apoptosis induction by flow cytometry in HB4a and MCF-7 is shown in Figures 5 and 6. Cell viability decreased significantly with treatment of HB4a cells with

camptothecin (< 40%) (Figure 4) while with genistein, cell viability remained similar to that found in control group (about 80%). HB4a cells in apoptosis were found only after treatment of cells with camptothecin, i.e., genistein 10 and 25 μM were not able to induce apoptosis in this non-tumoral cell line in these conditions (Figure 5). For MCF-7 cells, genistein 10 and 25 μM also did not caused apoptosis induction, and similar results were found in all the other parameters between cells treated with genistein and control group (Figure 6).

3.4. Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Values of R (ratio) obtained in REST© software for gene expression of the studied primers pairs are presented in Figures 7 and 8, and Tables 1 and 2. As can be seen, *COX-2* expression in mammary tumoral MCF-7 cells was null and in HB4a, it was practically similar to control group.

We can observe that expression of the investigated genes was practically unchanged in the tested conditions for both cell lineages. Gene expression of caspases 3 and 7 (*CASP3*; *CASP7*; known as execution caspases) was very similar to those found in control HB4a and MCF-7 cells. *BAX* expression slightly changed in HB4a cells with treatment of genistein 25 μM and in MCF-7 with treatment of genistein 10 μM . *BCL-xl* expressions was negatively regulated in HB4a cells in front of genistein 10 μM treatment, and in MCF-7 cells with genistein 25 μM treatment.

4. DISCUSSION

Recently, different societies and institutes (ex. National Cancer Institute and North American Menopause Society) have called attention to the possible estrogen-like effects of natural isoflavones (ex. genistein) and possible promotion or propagation of estrogen-sensitive cancers, like breast one. Data supporting this idea is based on *in vitro* and *in vivo*

studies showing stimulating tumor cell proliferation and growth (HSIEH et al., 1998; ALLRED et al., 2001; ALLRED et al., 2004; JU *et al.*, 2006). It is well known that diverse phytoestrogens like genistein possess biphasic effect, i.e. they can promote or inhibit cell proliferation depending on the concentration. Accordingly, our results of resazurin-based assay clearly showed this effect: cytotoxic effect of genistein only at high concentrations (50 and 100 μM). Genistein 100 μM was cytotoxic to tumoral MCF-7 cells in both experimental times analyzed (24 and 48h), but it showed cytotoxicity in non-tumoral HB4a cells only after 48 hours. Genistein 50 μM was cytotoxic to both cells lines only after 48 hours of treatment. Increase in fluorescence measured was observed in MCF-7 cells treated with genistein 0.1 -10 μM . In resazurin-based assay, the higher fluorescent signals the more viable cells are present in the sample, since only viable cells convert resazurin into resofurin (NAKAYAMA et al., 1997; O'BRIEN et al., 2000; MCMILLIAN et al., 2002). Contradictory results have long been demonstrated in front of genistein treatment of different cell lines. Depending on the study, inhibitory effects of genistein are found even at low concentrations, generally found as non-cytotoxic and to stimulate cell proliferation of cancer cells. Results from Zava and Duwe (1997), for example, revealed that genistein has cell growth-inhibitory actions over a physiologically achievable concentration range (10 nM-20 μM) in MCF-7. Cytotoxic effect of low genistein (0.01 μM) was also reported by Chen and Anderson (2001) in OVCAR-3 (ovarian cancer cell). Despite such observations, cytotoxic effects are generally found with high isoflavones concentrations (STEINER et al., 2008) and in the majority of studies using MCF-7 as experimental model, low concentrations of soy extracts or pure isoflavones stimulated cell growth (WUTTKE et al., 2007). As mentioned earlier, cytotoxicity of high genistein concentrations (above 30 μM) has been found in different cell lines: MCF-7 (PAGLIACCI et al., 1993; MAGGIOLINI et al., 2001; SINGLETARY et al., 2002; SHON et al., 2006), and MDA-MB-231 (SHON et al., 2006), HeLa (MAGGIOLINI et al., 2001), SK-

OV-3 (CHOI et al., 2008), HO-8910 (OUYANG et al., 2009); V79 (Di VIRGILIO et al., 2004), JURKART-T (PAGLIACCI et al., 1993), WM451 (WANG et al., 2002), PC-3 (LI and SARKAR, 2002a; LI and SARKAR, 2002b), nontumorigenic CRL-2221 human prostate epithelial (LI and SARKAR, 2002b), NIH 3T3 (RUCINSKA et al., 2008) and so on.

As reviewed by many authors (NEERGHEEN *et al.*, 2010; GUPTA *et al.*, 2010; SHU *et al.*, 2010 and others) genistein modulates expression or activity of various molecules involved in apoptosis signaling, cell cycle regulation, antioxidant defense, xenobiotic metabolism, cell survival, inflammation, metastasis and angiogenesis. One of the most reported biological activity of genistein is the induction of apoptosis. However, when we deeply analyze and compare the results, we can see that in most of the studies, genistein-induced apoptosis is through supraphysiological concentrations. Our qRT-PCR and annexin V-FITC/PI analysis showed that maximal dietary and pharmacological concentrations investigated (10 and 25 μ M) did not induce apoptosis neither in non-tumoral HB4a cells nor in tumoral MCF-7 cells. Positive results were found in our flow cytometer analysis of cell cycle: genistein delayed MCF-7 cells at G0/G1 phase in both treatments (10 and 25 μ M) and for HB4a cells, G0/G1 phase arrest was seen only after treatment of cells with 25 μ M of genistein.

Cell cycle modulation is another known chemopreventive effect attributed to genistein; nevertheless, G2/M arrest is most encountered (UPADHYAY et al, 2001; KLEIN and KING, 2007; BANERJEE et al., 2008; STEINER et al., 2008; TAYLOR et al., 2009; MEDJAKOVIC et al., 2010; ANDRES et al., 2011; SHANMUGAM et al., 2011). Consistent with our results, Kuzumaki and co-workers (1996 and 1998) found G0/G1 arrest induced by genistein (up to 60 μ M) in BALB/c 3T3 and B16-F1 cells mediated through induction of p21 and suppression of cyclin E, key protein regulators of G1/S transition of cell cycle. In the study of Chen and Donovan (2004), Caco-2BBe cells were arrested in G0/G1 stage after low

dose of genistein (3.7 μM – for 48h). In this case, the lower cyclin D level suggested that cells were not entering the cell cycle, since it regulates entry into and progression of the cell cycle at G1 (CHEN AND DONOVAN, 2004; VERMEULEN et al., 2003). Genistein treatment (10, 20 and 40 μM for 24, 48 and 72h) of LNCaP also increased the percentage of cells in G0/G1 phase (SHEN et al., 2000). The authors demonstrated that this antiproliferative effect was mediated by upregulation of p21^{WAF1} and p27^{KIP1}, two negative cell-cycle regulators that act as cyclin-dependent kinase inhibitors (SHEN et al., 2000).

Cancer chemoprevention strategies include prospection of phytochemicals and new synthetic drugs that show higher cytotoxicity (and other desirable effects) in cancer cells than in their normal counterparts (RAMOS, 2008). In our study we observed cell cycle arrest induced by genistein not only in the tumoral cell line MCF-7, but also in the non-tumoral HB4a, although MCF-7 cells were more sensitive to genistein treatment. Results seen in HB4a cells (decreased percentage of cells in S phase with both concentrations; accumulation of cells in G0/G1 and decrease of cells in G2/M with genistein 25 μM) can also indicate a chemoprevention action of genistein, since cell cycle arrest allows time for damaged cells to be repaired and to not accumulate mutations that are favorable for cancer development at earlier stages. As reviewed by Klein and King (2007), genistein itself can induce mutagenicity. So, genistein can induce and protect cells from its own biological damage. The balance between cell survival and death signs will determine cell fate after treatment of genistein.

Despite of the absence of apoptosis in our study, genistein at physiological relevant serum levels still exerts chemopreventive effect, as seen by the induction of G0/G1 arrest of the cells. This is the first study investigating genistein effects in non-tumoral cell line HB4a, and one of the few comparing the breast cancerous cell line and its normal lineage. We hope

our data help to understand the biological effects of genistein in order to reach a consensus in the controversial issue “isoflavones and breast carcinogenesis”.

Acknowledgements

Authors are grateful to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; 471938/2008-4) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the financial support.

References

- Allred CD, Allred KF, Ju YH, Goepfing TS, Doerge DR, Helferich WG. Soy processing influences growth of estrogen-dependent breast cancer tumors. *Carcinogenesis* 25, 1649–1657, 2004.
- Allred CD, Allred KF, Ju YH, Virant SM, HELFERICH WG. Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen dependent
- Andres S, Abraham K, Appel KE, Lampen A. Risks and benefits of dietary isoflavones for câncer. *Critical Reviews in Toxicology* 41, 463–506, 2011.
- Banerjee S, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. Multi-target therapy of cancer by genistein. *Cancer Letters* 269, 226-242, 2008.
- Bloedon LT, Jeffcoat AR, Lopaczynski W, Schell MJ, Black TM, Dix KJ, Thomas BF, Albright C, Busby MG, Crowell JA, Zeisel SH. Safety and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76, 1126–1137, 2002.
- Cederroth CR, Nef S. Soy, phytoestrogens and metabolism: a review. *Molecular and Cellular Endocrinology* 340, 30-42, 2009.
- Chen A-C, Donovan SM. Genistein at a concentration present in soy infant formula inhibits CACO-2BBE cell proliferation by causing G2/M cell cycle arrest. *Journal of Nutrition*. 134, 1303–1308, 2004.
- Chen X, Anderson JJB: Isoflavones inhibit proliferation of ovarian cancer cells in vitro via an estrogen receptor-dependent pathway. *Nutrition Cancer* 4, 165-171, 2001.

- Choi EJ, Kim T, Lee MS. Pro-apoptotic effect and cytotoxicity of genistein and genistin in human ovarian cancer SK-OV-3 cells. *Life Sciences* 80, 1403-1408, 2007.
- De Lemos ML. Effects of soy phytoestrogens genistein and daidzein on breast cancer growth. *The Annals of Pharmacotherapy* 35, 1118–1121, 2001.
- Di Virgilio AL, Iwami K, Wätjen W, Kahl R, Degen GH. Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. *Toxicology Letters* 151, 151–162, 2004.
- Duffy C, Perez K, Partridge A. Implications of phytoestrogen intake for breast cancer. *CA: a cancer journal for clinicians* 57, 260-277, 2007.
- Dussalt AA, Pouliot M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biological Procedures Online* 8, 1-10, 2006.
- Fitzpatrick LA. Soy isoflavones: hope or hype? *Maturitas* 61, 132–140, 2008.
- Gupta SC, Kim JH, Prasad S, Aggarwal BB. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Reviews* 29, 405–434, 2010.
- Half E, Tang XM, Gwyn K et al. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Research* 62, 1676-1681, 2002
- Hsieh CY, Santell RC, Haslam SZ, Helferich WG. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer MCF-7 cells in vitro and in vivo. *Cancer Research* 58 3833–3838, 1998.
- Ju YH, Allred KF, Allred CD, Helferich WG. Genistein stimulates growth of human breast cancer cells in a novel, postmenopausal animal model, with low plasma estradiol concentrations. *Carcinogenesis* 27, 1292–1299, 2006.
- Klein CB, King AA. Genistein genotoxicity: Critical considerations of in vitro exposure dose. *Toxicology and Applied Pharmacology* 224, 1–11, 2007.
- Kuzumaki T, Kobayashi T, Ishikawa K. Genistein induces p21^{Cip1/WAF1} expression and blocks G1 to S phase transition in mouse fibroblast and melanoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 251, 291-295, 1998.
- Kuzumaki T, Matsuda A, Ito K, Ishikawa K. Cell adhesion to substratum and activation of tyrosine kinases are essentially required for G1/S phase transition in BALB/c 3T3 fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 1310, 185-192, 1996.
- Li Y, Sarkar FH. Gene expression profiles of genistein-treated PC3 prostate cancer cells. *Journal of Nutrition* 132, 3623–3631, 2002a.
- Li Y, Sarkar FH. Inhibition of nuclear factor K β activation in PC3 cells by genistein is mediated via AKT signaling pathway. *Clinical Cancer Research* 8, 2369–2377, 2002b.

- Liu X, Rose D. Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. *Cancer Research* 56, 5125–5127, 1996.
- Maggiolini M, Bonofiglio D, Marsico S, Panno L, 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* 60, 595–602, 2001.
- MCF-7 tumors in a dose-dependent manner. *Cancer Research* 61, 5045–5050, 2001.
- McMillian MK, Li L, Parker JB, Patel L, Zhong Z, Gunnett JW, Powers WJ, Johnson MD. An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. *Cell Biology and Toxicology* 18, 157-173, 2002.
- Medjakovic S, Mueller M, Jungbauer A. Potential health-modulating effects of isoflavones and metabolites via activation of PPAR and AhR. *Nutrients* 2, 241-279, 2010.
- Messina M, Messina V. The role of soy in vegetarian diets. *Nutrients* 2, 855-888, 2010.
- Miltyk W, Craciunescu CN, Fischer L, Jeffcoat RA, Koch MA, Lopaczynsky W, Mahoney C, Crowell J, Paglieri J, Zeisel SH. Lack of significant genotoxicity of purified soy isoflavones (genistein, daidzein and glycitein) in 20 patients with prostate cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition* 77, 875-882, 2003.
- Moiseeva EP, Manson MM. Dietary Chemopreventive phytochemicals: Too little or too much? *Cancer Prevention Research* 2, 611-616, 2009.
- Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of Immunological Methods* 204, 205-208, 1997.
- NAMS (North American Menopause Society). The role of soy isoflavones in menopausal health: report of The North American Menopause Society/Wulf H. Utian Translational Science Symposium in Chicago, IL (October 2010). *Menopause* 18, 732-753, 2011.
- NeergheenVS, Bahorun T, Taylor EW, Jen L-S, Aruoma OI. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicology* 278, 229-241, 2010
- O' Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* 267, 5421-5426, 2000.
- Ouyang G, Yao L, Ruan K, Song G, Mao Y, Shideng B. Genistein induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis of human ovarian cancer cells via activation of DNA damage checkpoints pathways. *Cell Biology International* 33, 1237-1244, 2009.

- Pagliacci MC, Spinuzzi F, Migliorati G, Fumi G, Smacchia M, Grignani F, Riccardi C, Nicoletti I. Genistein inhibits tumor cell growth in vitro but enhances mitochondrial reduction of tetrazolium salts: a further pitfall in the use of MTT assay for evaluating cell growth and survival. *European Journal of Cancer* 11, 1573-1577, 1993.
- Patisaul HB, Jefferson W. The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in Neuroendocrinology* 31, 400–419, 2010.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30, 1-10, 2002.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, 2003-2007, 2001.
- Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular Nutrition & Food Research* 52, 507 – 526, 2008.
- Rucinska A, Roszczyk M, Gabryelak T. Cytotoxicity of the isoflavone genistein in NIH 3T3 cells. *Cell Biology International* 32, 1019-1023, 2008.
- Shanmugam MK, Kannaiyan R, Sethi G. Targeting cell signaling and apoptotic pathways by dietary agents: role in the prevention and treatment of cancer. *Nutrition and Cancer* 63, 161–173, 2011.
- Shen J-C, Klein RD, Wei Q, Guan Y, Contois JH, Wang TTY, Chang S, Hursting SD. Low-dose genistein induces cyclin-dependent kinase inhibitors and G1 cell-cycle arrest in human prostate cancer cells. *Molecular Carcinogenesis* 29, 92-102, 2000.
- Shon Y-H, PARK S-D, NAM K-S. Effective chemopreventive activity of genistein against human breast cancer cells. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 39, 448-451, 2006.
- Shu L, Cheung K-L, Khor TO, Chen C, Kong A-N. Phytochemicals: cancer chemoprevention and suppression of tumor onset and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews* 29, 483–502, 2010.
- Singletary KW, Frey RS, Li JY. Differential effects of genistein on cell proliferation, cyclin b1, and p34cdc2 in transformed and nontransformed human breast cells. *Pharmaceutical Biology* 40, 35–42, 2002.
- Steiner C, Arnould S, ScalberT A, Manach C. Isoflavones and the prevention of breast cancer: new perspectives opened by nutrigenomics. *British Journal of Nutrition* 99, ES78-ES108, 2008.

- Steiner C, Arnould S, Scalbert A, Manach C. Isoflavones and the prevention of breast cancer: new perspectives opened by nutrigenomics. *British Journal of Nutrition* 99, ES78-ES108, 2008.
- Sugaya S, Nakanishi H, Tanzawa H. Down-regulation of SMT3A gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) cells. *Mutation Research* 578, 327–332, 2005.
- Taylor CK, Levy RM, Elliott JC, Burnett BP. The effect of genistein aglycone on cancer and cancer risk: a review of in vitro, preclinical, and clinical studies. *Nutrition Reviews* 67, 398–415, 2009.
- Upadhyay S, Neburi M, Alhasan S, Miller F, Sarkar FH. Differential sensitivity of normal and malignant breast epithelial cells to genistein is partly mediated by p21^{WAF1}. *Clinical Cancer Research* 7, 1782–1789, 2001.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation* 36, 131–149, 2003.
- Wang H-Z, Zhang Y, Xi L-P, Yu X-Y, Zhang R-Q. Effects of genistein and daidzein on the cell growth, cell cycle, and differentiation of human and murine melanoma cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 421–426, 2002.
- Wuttke W, Jarry H, Seidlová-Wuttke D. Isoflavones – safe food additives or dangerous drugs? *Ageing Research Reviews* 6, 150-188, 2007.
- Zava DT, Duwe, G. Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro. *Nutrition Cancer* 27, 31-40, 1997.
- Zhao X, Goswami M, Pokhriyal N, Ma H, Du H, Yao J, Victor TA, Polyak K, Sturgis CD, Band H, Band V. Cyclooxygenase-2 expression during immortalization and breast cancer progression. *Cancer Research* 68, 467–475, 2008.

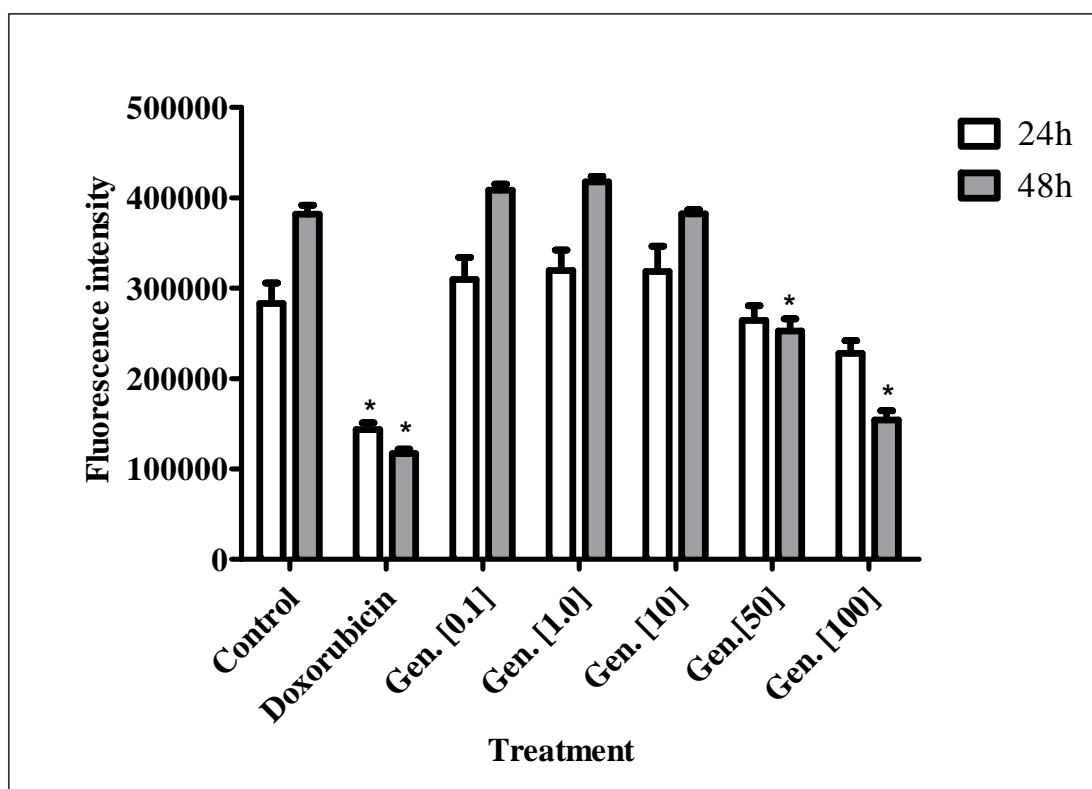


Figure 1. Fluorescence intensity measured after treatment of HB4a (24, 48h) with different concentrations of genistein (Gen.) in resazurin-based assay. Gen. [0.1] = cells treated with genistein 0.1 μM ; Gen. [1] = cells treated with genistein 1 μM ; Gen. [10] = cells treated with genistein 10 μM ; Gen. [50] = cells treated with genistein 50 μM ; Gen. [100] = cells treated with genistein 100 μM ; Doxorubicin = cells treated with doxorubicin 10 $\mu\text{g/mL}$. * indicates cytotoxic effect ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).

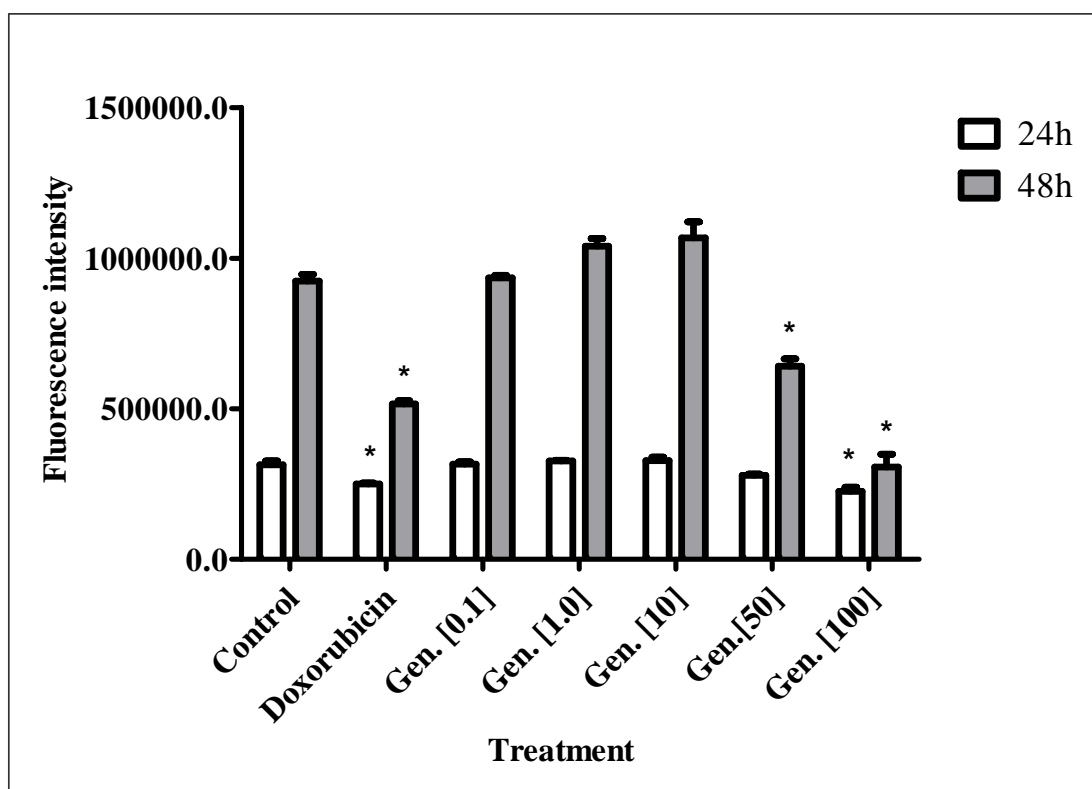


Figure 2. Fluorescence intensity measured after treatment of MCF-7 (24, 48h) with different concentrations of genistein (Gen.) in resazurin-based assay. Gen. [0.1] = cells treated with genistein 0.1 μ M; Gen. [1] = cells treated with genistein 1 μ M; Gen. [10] = cells treated with genistein 10 μ M; Gen. [50] = cells treated with genistein 50 μ M; Gen. [100] = cells treated with genistein 100 μ M; Doxorubicin = cells treated with doxorubicin 10 μ g/mL. * indicates cytotoxic effect ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).

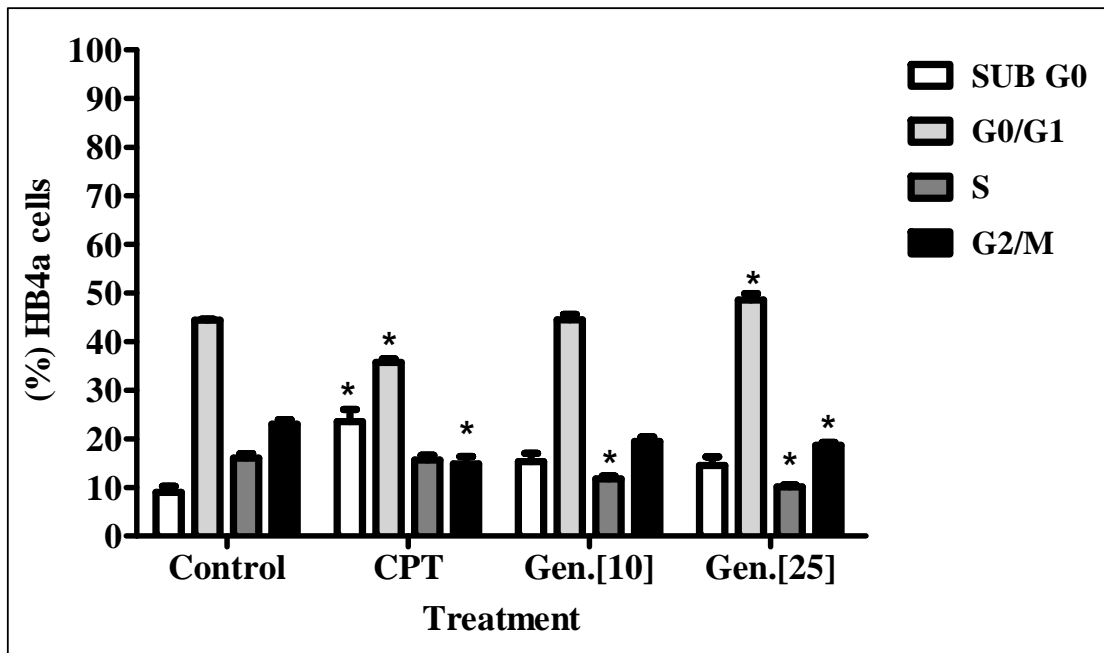


Figure 3. Cell cycle distribution of HB4a after genistein treatment for 24 hours. CPT = cells treated with camptothecin 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Gen. [10] = cells treated with genistein 10 μM ; Gen. [25] = cells treated with genistein 25 μM . *statistical significant ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).

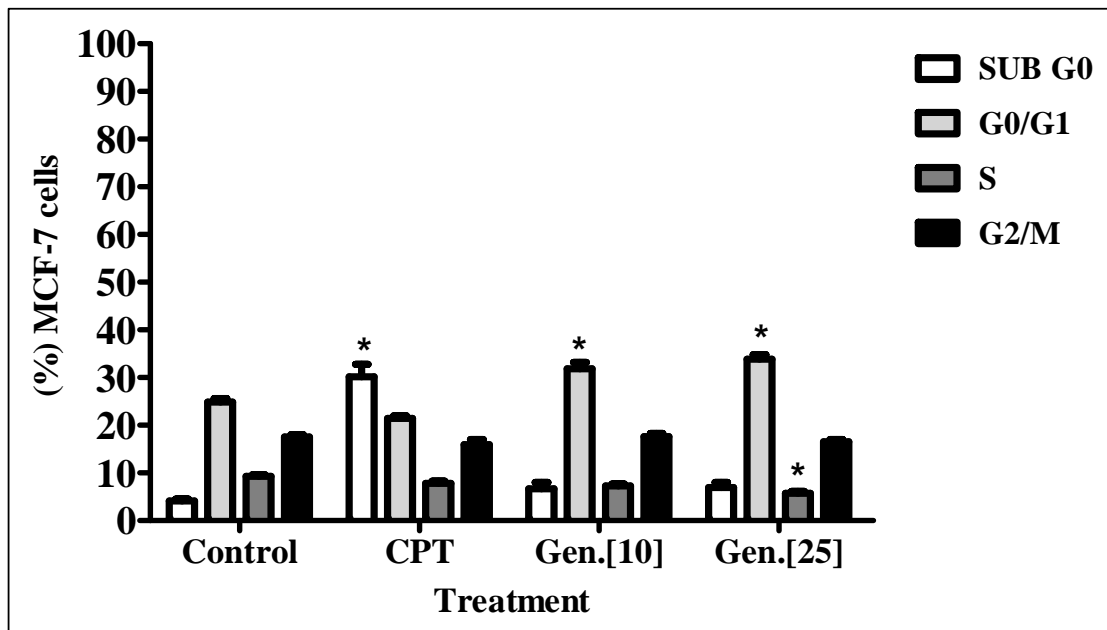
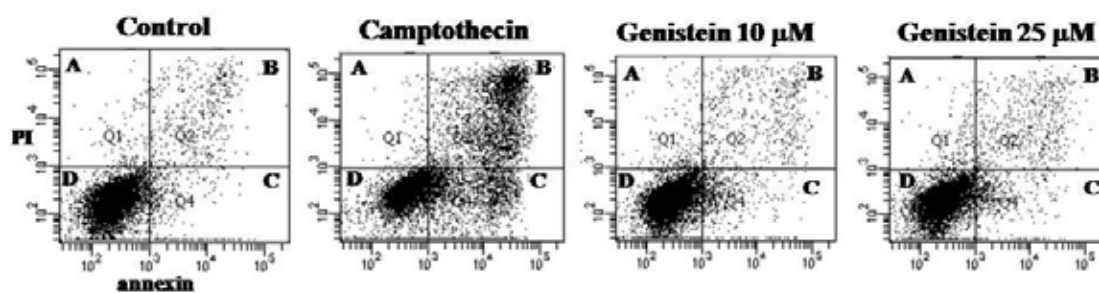
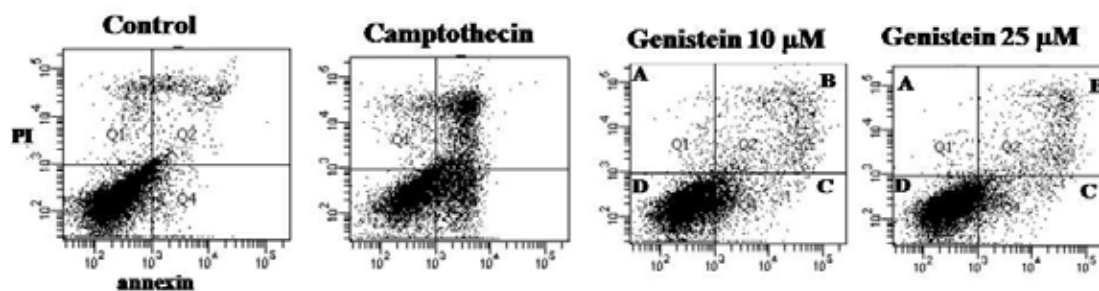


Figure 4. Cell cycle distribution of MCF-7 after genistein treatment for 24 hours. CPT = cells treated with camptothecin 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Gen. [10] = cells treated with genistein 10 μM ; Gen. [25] = cells treated with genistein 25 μM . *statistical significant ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).



Treatment HB4a cells	Viable cells (D)	Apoptotic cells (C)	Late apoptotic cells (B)	Total of apoptotic cell (B+C)	Necrotic cells (A)
Control	86.66 ± 3.21	6.32 ± 1.93	5.72 ± 1.54	12.04 ± 3.25	1.2 ± 0.4
Camptothecin	36.78 ± 10.79*	32.26 ± 7.81*	30.38 ± 3.90*	62.64 ± 11.3*	0.6 ± 0.51
Genistein 10μM	81.34 ± 7.12	9.94 ± 4.73	7.65 ± 2.37	17.4 ± 7.16	1.4 ± 0.4
Genistein 25μM	80.05 ± 7.22	9.00 ± 2.37	9.68 ± 5.55	18.68 ± 6.86	0.9 ± 0.49

Figure 5. Analysis of apoptosis induction by flow cytometry (Annexin V-FITC/PI) in HB4a cells treated with genistein for 24 hours. *statistical significant ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).



Treatment MCF-7 cells	Viable cells (D)	Apoptotic cells (C)	Late apoptotic cells (B)	Total of apoptotic cell (B+C)	Necrotic cells (A)
Control	78.75±6.22	10.51± 8.1	6.35±1.34	16.86± 7.25	5.58± 2.13
Camptothecin	50.3± 13.72*	26.35± 8.95*	15.4± 9.36*	41.75± 18.31*	6.17±4.11
Genistein 10 μM	70.6± 4.63	13.13± 7.43	9.65± 1.93	22.78± 6.26	6.63± 3.11
Genistein 25 μM	73.85± 6.83	10.61± 8.00	8.26± 2.23	18.88± 7.6	6.12± 1.17

Figure 6. Analysis of apoptosis induction by flow cytometry (Annexin V-FITC/PI) in MCF-7 cells treated with genistein for 24 hours. *statistical significant ($p < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett test compared to control group).

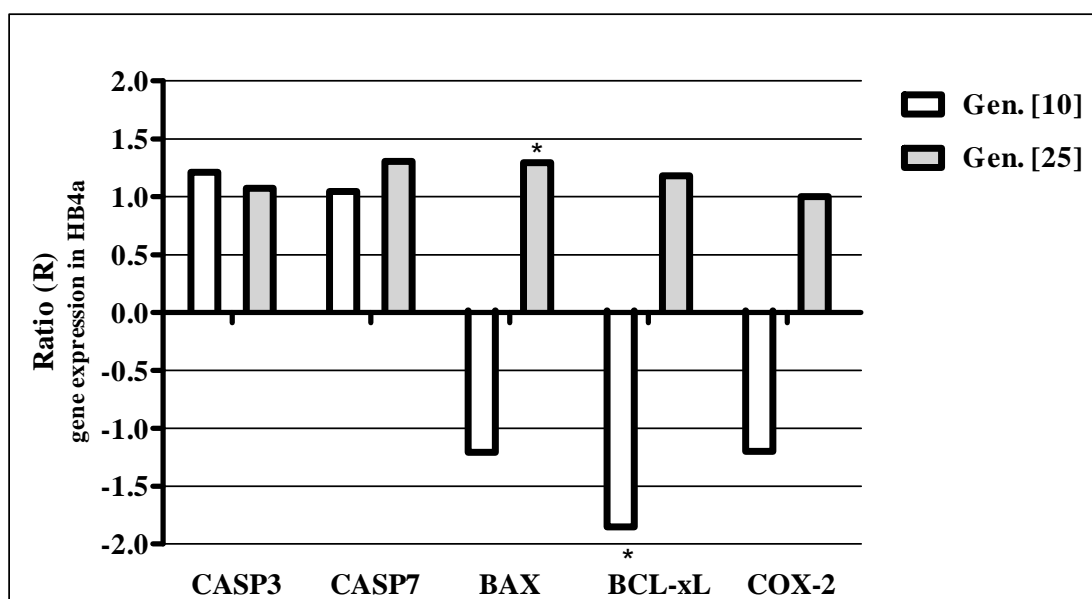


Figure 7. Relative gene expression (R value) of *CASP-3*, *CASP-7*, *BAX*, *BCL-xL* and *COX-2* after treatment of HB4a cells with 10 or 25 μ M of genistein (12h). Data were submitted to software REST© (PFAFFL *et al.*, 2002). Ratio value (R) of control group is considered as 1. Gen. [10] = cells treated with genistein 10 μ M; Gen. [25] = cells treated with genistein 25 μ M.

Table 1. Relative gene expression (R value) of *CASP-3*, *CASP-7*, *BAX*, *BCL-xL* and *COX-2* after treatment of 10 or 25 μ M of genistein in HB4a cells. R value \pm SD and p value.

	Genistein 10 μ M	Genistein 25 μ M
<i>CASP-3</i>	1.212 \pm 0.213 p = 0.184	1.074 \pm 0.207 p = 0.647
<i>CASP-7</i>	1.046 \pm 0.173 p = 0.86	1.305 \pm 0.259 p = 0.104
<i>BAX</i>	1.208 \pm 0.161 p = 0.244	1.295 \pm 0.125 p = 0.031
<i>BCL-xL</i>	-1.85 \pm 0.169 p = 0.008	1.181 \pm 0.237 p = 0.168
<i>COX-2</i>	-1.198 \pm 0.256 p = 0.37	1.002 \pm 0.278 p = 0.983

Data were submitted to software REST© (PFAFFL *et al.*, 2002). Negative R value means downregulation of the gene.

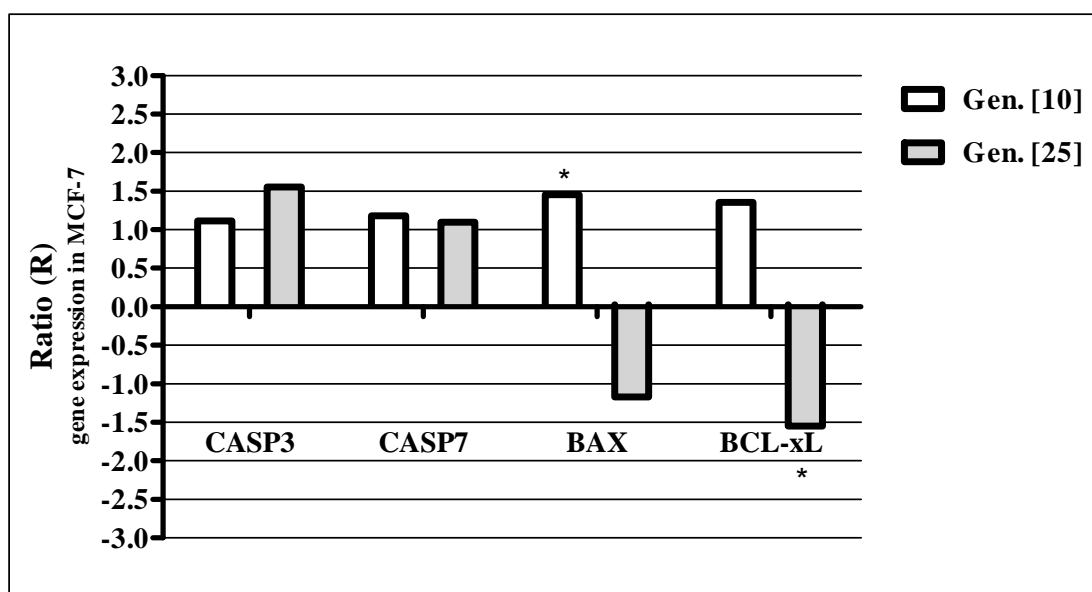


Figure 8. Relative gene expression (R value) of *CASP-3*, *CASP-7*, *BAX*, and *BCL-xL* after treatment of MCF-7 cells with 10 or 25 μM of genistein (12h). Data were submitted to software REST© (PFAFFL *et al.*, 2002). Ratio value (R) of control group is considered as 1. Gen. [10] = cells treated with genistein 10 μM ; Gen. [25] = cells treated with genistein 25 μM . *COX-2* expression was null in this cell line and it is according to literature (Liu and Rose, 1996; Half *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2008).

Table 2. Relative gene expression (R value) of *CASP-3*, *CASP-7*, *BAX* and *BCL-xL* after treatment of 10 or 25 μM of genistein in MCF-7 cells. R value \pm SD and p value.

	Genistein 10 μM	Genistein 25 μM
<i>CASP-3</i>	1.113 \pm 0.231 p = 0.601	1.556 \pm 0.389 p = 0.142
<i>CASP-7</i>	1.181 \pm 0.261 p = 0.457	1.098 \pm 0.278 p = 0.862
<i>BAX</i>	1.452 \pm 0.224 p = 0.040	-1.172 \pm 0.268 p = 0.105
<i>BCL-xL</i>	1.356 \pm 0.247 p = 0.134	-1.546 \pm 0.18 p = 0.027

Data were submitted to software REST© (PFAFFL *et al.*, 2002). Negative R value means downregulation of the gene.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca constante da humanidade por qualidade de vida trouxe muitos avanços tecnológicos e científicos. Devido aos recentes avanços no campo da Nutrigenômica, sabemos que a dieta influencia diretamente a expressão de nossos genes e, conseqüentemente, pode ajudar a prevenir ou a promover o desenvolvimento de uma doença. A relação entre a dieta e promoção de saúde fica bem evidente quando nos remetemos aos países asiáticos. Estudos epidemiológicos apontam que as populações desses países sofrem menos com doenças crônicas, dentre elas, o câncer. O alto consumo de frutas e vegetais, especialmente o de soja (contém isoflavonas daidzeína e genisteína), está associado a este fato.

Apesar de as isoflavonas daidzeína e genisteína serem objeto de estudo há mais de 20 anos, pesquisadores de vários países alertam para o consumo consciente da soja, principalmente pela população feminina (merecem especial atenção as mulheres em menopausa, gestantes, crianças e aquelas que já sofreram com câncer hormônio-dependente ou que possuem algum fator de risco que leve ao desenvolvimento desse tipo de tumor). Embora possuam atividade quimiopreventiva, efeitos controversos das isoflavonas sobre a carcinogênese de tumores estrógeno-dependentes (como o de mama e de ovário) têm sido relatados. Em grande parte dos estudos, tais efeitos adversos foram encontrados em estudos que fazem uso de concentrações ditas fisiologicamente relevantes, ou seja, concentrações que são atingidas no plasma de indivíduos após o consumo de soja pela dieta.

Nossos resultados buscam contribuir para a compreensão destes efeitos contraditórios, ora promotores, ora protetores de tumor. Para isso foram utilizadas linhagens celulares humanas de mama e ovário e as máximas concentrações séricas de isoflavonas encontradas após uma dieta rica em soja (10 μ M) ou após sua suplementação com pílulas de genisteína (em torno de 25 μ M). A tabela 3 resume os resultados obtidos:

Tabela 3 - Comparação dos resultados obtidos com as duas substâncias-teste e as três linhagens celulares.

Linhagem celular	DAIDZEÍNA	GENISTEÍNA
OVCAR-3	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Nenhuma concentração foi citotóxica (0,1 – 100 µM) após 24, 48 e 72h; ✓ A concentração de 10 µM não induziu apoptose; ✓ A expressão dos genes analisados não foi alterada significativamente após tratamento com 10 ou 25 µM. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ A concentração de 100 µM foi citotóxica após 72h; ✓ A concentração de 10 µM não induziu apoptose; ✓ A expressão dos genes analisados não foi alterada significativamente após tratamento com 10 ou 25 µM.
HB4a	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Nenhuma concentração foi citotóxica (0,1 – 100 µM) após 24 e 48h; ✓ As concentrações de 10 e 25 µM não induziram apoptose; ✓ As concentrações de 10 e 25 µM não induziram atraso no ciclo celular; ✓ A expressão dos genes analisados não foi alterada significativamente após tratamento com 10 µM. ✓ A alteração estatisticamente significativa de alguns genes frente tratamento com daidzeína 25 µM não foi biologicamente significante, uma vez que não foi observada apoptose nessas células. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ As concentrações de 50 e 100 µM foram citotóxicas após 48h; ✓ As concentrações de 10 e 25 µM não induziram apoptose; ✓ A concentração de 25 µM induziu atraso no ciclo celular em G0/G1; ✓ A alteração estatisticamente significativa de alguns genes frente tratamento com genisteína não foi biologicamente significante, uma vez que não foi observada apoptose nessas células.
MCF-7	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Nenhuma concentração foi citotóxica (0,1 – 100 µM) após 24 e 48h; ✓ As concentrações de 10 e 25 µM não induziram apoptose; ✓ As concentrações de 10 e 25 µM induziram atraso no ciclo celular em G0/G1; ✓ A expressão dos genes analisados não foi alterada significativamente após tratamento com 10 µM. ✓ A alteração estatisticamente significativa de alguns genes frente tratamento com daidzeína 25 µM não foi biologicamente significante, uma vez que não foi observada apoptose nessas células. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ A concentração de 100 µM foi citotóxica após 24 e 48h; ✓ A concentração de 50 µM foi citotóxica após 48h; ✓ As concentrações de 10 e 25 µM não induziram apoptose; ✓ As concentrações de 10 e 25 µM induziram atraso no ciclo celular em G0/G1; ✓ A alteração estatisticamente significativa de alguns genes frente tratamento com genisteína não foi biologicamente significante, uma vez que não foi observada apoptose nessas células.

Podemos observar pelos nossos resultados que a concentração de 10 μ M não é citotóxica para nenhuma das linhagens estudadas, seja tumoral ou não-tumoral. Outra constatação importante foi a de que a análise da expressão gênica, por meio da PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR), embora muito sensível, não mostrou resultados biologicamente significativos. Embora o software de análise utilizado considere estatisticamente significativas algumas alterações gênicas frente ao tratamento com as isoflavonas, elas não levaram ao efeito biológico esperado (neste caso, indução de apoptose). Talvez algumas condições experimentais (como o tempo de tratamento) possam ser modificadas em trabalhos futuros, a fim de que se consiga um melhor desempenho desta técnica. Além disso, as isoflavonas podem interagir com outras moléculas, interferindo no fluxo da informação do mRNA até a produção da proteína (neste caso as executoras da morte celular). Sabe-se hoje, por exemplo, que a genisteína pode modular a expressão dos miRNAs (microRNA).

Um dos mecanismos de ação das isoflavonas daidzeína e genisteína bastante relatado na literatura científica é a indução de apoptose. Para verificar se este efeito também seria encontrado em nossas condições experimentais, realizamos testes para constatar a indução deste tipo de morte celular. Como pudemos observar, não foi encontrada morte celular por apoptose em nenhuma linhagem celular estudada, mesmo com a aplicação de ensaios diferentes (verificação de fragmentação de DNA apoptótico em gel de agarose e análise da exposição da fosfatidilserina na membrana celular por citometria de fluxo).

Com os nossos resultados e pela revisão da literatura realizada, fica claro que concentrações menores de isoflavonas exercem efeito sobre o ciclo celular. Geralmente ocorre acúmulo de células em G2/M, porém em nossos resultados encontramos somente atraso do ciclo celular na fase G0/G1. Esta ação sobre o ciclo celular foi seletiva no caso da daidzeína, ou seja, ocorreu somente nas células tumorais MCF-7 e não nas células HB4a. A genisteína,

por sua vez, atrasou o ciclo em G0/G1 da MCF-7 e da HB4a, porém nesta última só houve indução de parada do ciclo celular com a maior concentração analisada (25 μ M). A parada do ciclo celular na linhagem não-tumoral também pode ser vantajosa, uma vez que permite que as células com danos no DNA sejam reparadas e não propaguem mutações que possam culminar no surgimento de uma célula neoplásica. Na tabela 4 podemos rever as principais observações derivadas de nosso estudo.

Os nossos resultados, como um todo, permitem concluir que as concentrações fisiologicamente relevantes de daidzeína e genisteína aqui estudadas, embora não induzam à morte celular por apoptose nas linhagens tumorais, continuam a exercer efeito quimiopreventivo favorável por indução da parada do ciclo celular.

Tabela 4 - Resumo das principais observações derivadas de nosso estudo.

-
- ✓ A ação quimiopreventiva da soja é comprovada pela literatura científica, porém efeitos controversos das isoflavonas sobre a carcinogênese de tumores estrógeno-dependentes têm sido relatados;
 - ✓ É importante observar as concentrações de isoflavonas utilizadas nos estudos, pois os efeitos quimiopreventivos com relação ao câncer podem ser resultado de concentrações fisiologicamente irrelevantes (que não são encontradas no organismo humano);
 - ✓ No nosso estudo, o foco foi analisar o efeito das máximas concentrações séricas das isoflavonas daidzeína e genisteína encontradas após ingestão de uma dieta rica em soja (10 μ M) ou após sua suplementação (em torno de 25 μ M);
 - ✓ Nas condições experimentais aqui apresentadas, a concentração de 10 μ M não foi citotóxica para nenhuma das linhagens estudadas, seja tumoral (OVCAR-3 ou MCF-7) ou não-tumoral (HB4a);
 - ✓ Nas condições experimentais aqui apresentadas, não houve indução de apoptose em nenhuma das linhagens celulares estudadas. As isoflavonas daidzeína e genisteína são capazes de modular vias de sinalização de sobrevivência, proliferação e morte celular, e o balanço entre esses sinais determinará o que ocorrerá com essa célula;
 - ✓ Nas condições experimentais utilizadas em nosso estudo, a daidzeína (10 e 25 μ M) induziu parada do ciclo celular na fase G0/G1 nas células MCF-7. Na linhagem HB4a esse efeito não foi observado;
 - ✓ Nas condições experimentais utilizadas em nosso estudo, a genisteína (10 e 25 μ M) também induziu parada do ciclo celular na fase G0/G1 nas células MCF-7. Na linhagem HB4a esse efeito foi observado somente nas células tratadas com a concentração de 25 μ M;
 - ✓ Em nosso estudo, houve um efeito quimiopreventivo positivo (parada do ciclo celular) das isoflavonas daidzeína e genisteína nas linhagens celulares derivadas do tecido mamário (MCF-7 e HB4a), entretanto, extrapolações devem ser realizadas de maneira cautelosa, pois o efeito benéfico sobre o organismo humano é dependente de muitas outras variáveis individuais e até mesmo do cultivo e processamento da soja, como já foi exposto na revisão da literatura aqui apresentada.
-

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLERCREUTZ, H. Phytoestrogens and cancer. **Lancet Oncology**, v. 3, p. 364-373, 2002.
- ADLERCREUTZ, H.; MARKKANEN, H.; WATANABE, S. Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. **The Lancet**, v. 342, p. 1209–1210, 1993.
- AKAZA, H.; MIYANAGA, N.; TAKASHIMA, N.; NAITO, S.; HIRAO, Y.; TSUKAMOTO, T.; FUJIOKA, T.; MORI, M.; KIM, W.J. et al. Comparisons of percent equol producers between prostate cancer patients and controls: case controlled studies of isoflavones in Japanese, Korean and American residents. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 34, p. 86–89, 2004.
- AKIYAMA, T.; ISHIDA, J.; NAKAGAWA, S.; OGAWARA, H.; WATANABE, S.; ITOH, N.; SHIBUYA, M.; FUKAMI, Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 5592–5595, 1987.
- ALBERTAZZI, P.; PURDIE, D.W. The nature and utility of the phytoestrogens: a review of the evidence. **Maturitas**, v. 42, p. 173-185, 2002.
- ALHASAN, S.A.; PIETRASCZKIWICZ, H.; ALONSO, M. D.; ENSLEY, J.; SARKAR, F.H. Genistein-induced cell cycle arrest and apoptosis in a head and neck squamous cell carcinoma cell line. **Nutrition and Cancer**, v. 34, p. 12-19, 1999.
- ALLRED, C.D.; ALLRED, K.F.; JU, Y.H.; GOEPPINGER, T.S.; DOERGE, D.R.; HELFERICH, W.G. Soy processing influences growth of estrogen-dependent breast cancer tumors. **Carcinogenesis**, v. 25, p. 1649–1657, 2004.
- ALLRED, C.D.; ALLRED, K.F.; JU, Y.H.; VIRANT, S.M.; HELFERICH, W.G. Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen dependent MCF-7 tumors in a dose-dependent manner. **Cancer Research**, v. 61, p. 5045–5050, 2001.
- ANAND, P.; KUNNUMAKARA, A.B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K.B.; THARAKAN, S.T.; LAI, O.S.; SUNG, B.; AGGARWAL, B.B. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical Research**, v. 25, p. 2097-2116, 2008.
- ARAI, Y.; UEHARA, M.; SATO, Y.; KIMURA, M.; EBOSHIDA, A.; ADLERCREUTZ, H.; WATANABE, S. Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake. **Journal of Epidemiology**, v. 10, p.127–135, 2000.
- ARJMANDI, B.H.; BIRNBAUM, R.; GOYAL, N.V.; GETLIGER, M.J.; JUMA, S.; ALEKEL, L.; HASLER, C.M.; DRUM, M.L.; HOLLIS, B.W.; KUKREJA, S.C. Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone – deficient rats is related to its isoflavone content. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 1364S-13648S, 1998.

ATKINSON, C.; FRANKENFELD, C.L.; LAMPE, J.W. Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. **Experimental Biology and Medicine**, v. 230, p.155–170, 2005.

BANERJEE, S.; LI, Y.; WANG, Z.; SARKAR, F.H. Multi-target therapy of cancer by genistein. **Cancer Letters**, v. 269, p. 226-242, 2008.

BEDANI, R.; ROSSI, E.A. Isoflavonas: bioquímica, fisiologia e implicações para a saúde. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 23, p. 231-264, 2005.

BENNETTS, H.W.; UNDERWOOD, E.J.; SHIER, F.L. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 22, p.131–138. 1946.

BLOEDON, L.T.; JEFFCOAT, A.R.; LOPACZYNSKI, W.; SCHELL, M.J.; BLACK, T.M.; DIX, K.J.; THOMAS, B.F.; ALBRIGHT, C.; BUSBY, M.G.; CROWELL, J.A.; ZEISEL, S.H. Safety and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 1126–1137, 2002.

BOFFETTA, P.; HASHIBE, M. Alcohol and cancer. **The Lancet Oncology**, v. 7, p. 149-156, 2006.

BOROS, L.G.; BRASSILIAN, S.; LIM, S.; LEE W–N.P. Genistein inhibits nonoxidative ribose synthesis in MIA pancreatic adenocarcinoma cells: a new mechanism of controlling tumor growth. **Pancreas**; v. 22, p. 1-7, 2001.

BOULET, M.J.; ODDENS, B.J.; LEHERT, P.; VEMER, H.M.; VISSER, A. Climateric and menopause in seven south-east Asian countries. **Maturitas**, v. 19, p. 157-176, 1994.

BRAYLAN, R.C.; BENSON, N.A.; NOURSE, V.; KRUTH, H.S. Correlated analysis of cellular DNA, membrane antigens and light scatter of human lymphoid cells. **Cytometry**, v.2, p. 337-343, 1982.

CANO, A.; GARCÍA-PÉREZ, M.A.; TARÍN, J.J. Isoflavones and cardiovascular disease. **Maturitas**, v. 67, p. 219–226, 2010.

CARTER, M.W.; MATRONE, G.; SMART, W.W. Jr. Effect of genistin on reproduction of the mouse. **Journal of Nutrition**, v. 55, p. 639–645, 1955.

CARTER, M.W.; SMART, W.W. Jr.; MATRONE, G. Estimation of estrogenic activity of genistein obtained from soybean meal. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 84, p. 506–508, 1953.

CAZAROLLI, L.H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E.H.; FIGUEIREDO, M.S.R.B.; FOLADOR, P.; DAMAZIO, R.G.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R.M.B. Flavonoids: Prospective Drug Candidates. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 1429-1440, 2008.

CEDERROTH, C.R.; NEF, S. Soy, phytoestrogens and metabolism: a review, **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 340, p. 30-42, 2009.

CEDERROTH, C.R.; ZIMMERMANN C, NEF, S. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 355, p. 192–200, 2012.

CHENG, E.; YODER, L.; STORY, C.D.; BURROUGHS, W. Estrogenic activity of some isoflavone derivatives. **Science**, v.120, p. 575–576, 1954.

CHOI, E.J. Chronic equol administration attenuates the antioxidant defense system and causes apoptosis in the mouse brain. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1779–1784, 2009.

CHOI, E.J.; KIM, G-H. Daidzein causes cell cycle arrest at G1 and G2/M phases in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-435. **Phytomedicine**, v.15, p. 683-690, 2008.

CLAPAUCH, R.; MEIRELLES, R.M.R.; JULIÃO, M.A.S.G. *et al.* Fitoestrogênios: Posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, p. 679-694, 2002.

COS, P.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; VANDEN BERGHE, D.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. Phytoestrogens: recent developments. **Planta Medica**, v. 69, p. 589–599, 2003.

COWARD, L.; BARNES, N.C.; SETCHELL, K.D.R.; BARNES, S. Genistein and daidzein, and their b-glycoside conjugates: anti-tumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1961–1967, 1993.

CREMOUX, P.; THIS, P.; LECLERCQ, G.; JACQUOTE, Y. Controversies concerning the use of phytoestrogens in menopause management: Bioavailability and metabolism. **Maturitas**, v. 65, p. 334–339, 2010.

DAY, J.K.; BAUER, A.M.; DESBORDES, C.; ZHUANG, Y.; KIM, B.E.; NEWTON, L.G., *et al.* Genistein alters methylation patterns in mice. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p. 2419S–2423S, 2002.

De FLORA, S.; FERGUSON, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**, v. 591, p. 8-15, 2005.

DIVISI, D.; DI TOMMASO, S.; SALVEMINI, S.; GARRAMONE, M.; CRISCI, R. Diet and cancer. **Acta Bio Medica Atenei Parmensis**, v. 77, p. 118–123, 2006.

DOLINOY, D.C.; WEIDMAN, J.R.; WATERLAND, R.A.; JIRTLE, R.L. Maternal genistein alters coat color and protects AVY mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. **Environmental Health Perspective**, v. 114, 567–572, 2006.

DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 66, p. 1191–308, 1981.

DONALDSON, M.S. Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet. **Nutrition Journal**, v. 3, p. 19-40, 2004.

DOUZIECH, N.; CALVO, E.; LAINÉ, J.; MORISSET, J. Activation of MAP kinases in growth responsive pancreatic cancer. **Cellular Signal**; v. 11, p. 591-602, 1999.

DOUZIECH, N.; LAJAS, A.; COULOMBE, Z.; CALVO, E.; LAINÉ, J.; MORISSET, J. Growth effects of regulatory peptides and intracellular signaling routes in human pancreatic cancer cell lines. **Endocrine**, v. 9, p. 71-83, 1998.

DUSSALT, A.A.; POULIOT, M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. **Biological Procedures Online**, v. 8, 1-10, 2006.

DWYER, J.T.; GOLDIN, B.R.; SAUL, N.; GUALTIERI, L.; BARAKAT, S.; ADLERCREUTZ, H. Tofu and soy drinks contain phytoestrogens. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 94, p. 739-743, 1994.

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

EL-ZARRUK, A.A.; VAN DE BERG, H.W. The anti-proliferative effects of tyrosine kinase inhibitors towards tamoxifen-sensitive and tamoxifen-resistant human breast cancer cell lines in relation to the expression of epidermal growth factor receptors (EGF-R) and the inhibition of EGF-R tyrosine kinase. **Cancer Letters**, v. 142, p. 185-193, 1999.

EYRE, H.; KAHN, R.; ROBERTSON, R.M.; CLARK, N.G.; DOYLE, C.; HONG, Y.; GANSLER, T.; GLYNN, T.; SMITH, R.A.; TAUBERT, K.; et al. Preventing cancer, cardiovascular disease, and diabetes: a common agenda for the American Cancer Society, the American Diabetes Association, and the American Heart Association. **Stroke**, v. 35, p. 1999-2010. 2004.

FERGUSON, L.R.; BAGULEY, B.C. Mutagenicity of anticancer drugs that inhibit topoisomerase enzymes. **Mutation Research**, v. 355, p.91-101 1996.

FERGUSON, L.R.; PEARSON, A.E. The clinical use of mutagenic anticancer drugs. **Mutation Research**, v. 355, p.1-12, 1996.

FOSTER, J.S.; HENLEY, D.C.; AHAMED, S.; WIMALASENA, J. Oestrogens and cell-cycle regulation in breast cancer. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 12, p. 320-327, 2001.

FRANKE, A.A.; CUSTER, L.J.; CERNA, C.M.; NARALA, K. Rapid HPLC analysis of dietary phytoestrogens from legumes and from human urine. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 208, p. 18-26. 1995.

FRANKE, A.A.; CUSTER, L.J.; WILKENS, L.R.; LE MARCHAND, L.L.; NOMURA, A.M.; GOODMAN, M.T.; KOLONEL, L.N. Liquid chromatographic-photodiode array mass spectrometric analysis of dietary phytoestrogens from human urine and blood. **Journal of Chromatography B**, v. 777, p. 45-59, 2002.

GAO, Y.H.; YAMAGUCHI, M. Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclasts: apoptosis is induced through Ca²⁺ signaling. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, p. 805-809, 1999.

GASCOIGNE, K.E.; TAYLOR, S.S. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? **Journal of Cell Science**, v. 122, p. 2579-2585, 2009.

GESCHER, A.J.; SHARMA, R.A.; STEWARD, W.P. Cancer chemoprevention by dietary constituents: a tale of failure and promise. **The Lancet Oncology**, v. 2, p. 371-379, 2001.

GÓES-FAVONI, S.P. de; BELÉIA, A.D.P.; CARRÃO-PANIZZI, M.C.; MANDARINO, J.M.G. Isoflavonas em produtos comerciais de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 582-586, 2004.

GÓES-FAVONI, S.P. de; CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BELÉIA, A.D.P. Changes of isoflavone in soybean cotyledons soaked in different volumes of water. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1605–1612, 2010.

GOTOH, T.; YAMADA, K.; ITO, A.; YIN, H.; KATAOKA, T.; DOHI, K. Chemoprevention of N-nitroso-N-methylurea-induced rat mammary cancer by miso and tamoxifen, alone and in combination. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 89, p. 487-495, 1998.

GRANADOS-PRINCIPAL, S.; QUILES, J.L.; RAMIREZ-TORTOSA, C.S.; SANCHEZ-ROVIRA, P.; RAMIREZ-TORTOSA, M.C. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1425–1438, 2010.

GUERRA, M.R.; GALLO, C.V.M.; MENDONÇA, G.A.S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, p. 227-234, 2005.

GUO, J.M.; XIAO, B.X.; DAI, D.J.; LIU, Q.; MA, H.H. Effects of daidzein on estrogen-receptor-positive and negative pancreatic cancer cells in vitro. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, p. 860–863, 2004b.

GUO, J.M.; XIAO, B.X.; LIU, D.H.; GRANT, M.; ZHANG, S.; LAI, Y.F.; GUO, Y.B.; LIU, Q. Biphasic effect of daidzein on cell growth of human colon cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1641–1646, 2004c.

GUPTA, S.C.; KIM, J.H.; PRASAD, S.; AGGARWAL, B.B. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 29, p. 405–434, 2010.

GUSTAFSSON, J.A. Estrogen receptor b—a new dimension in estrogen mechanism of action. **Journal of Endocrinology**, v. 163, p. 379–383, 1999.

HAIL JR, N.; CORTES, M.; DRAKE, E.M.; SPALLHOLZ, J.E. Cancer chemoprevention: a radical perspective. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 45, p. 97-110, 2008.

HALDAR, S.; JENA, N.; CROCE, C.M. Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 92, p. 4507-4511, 1995.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

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

HARRIS, D.M.; BESSELINK, E.; HENNING, S.M.; GO, V.L.W.; HEBER, D. Phytoestrogens induce differential estrogen receptor alpha- or beta-mediated responses in transfected breast cancer cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 230, p. 558-568, 2005.

HILAKIVI-CLARKE, L.; CABANES, A.; OLIVO, S.; KERR, L.; BOUKER, K.B.; CLARKE, R. Do estrogens always increase breast cancer risk? **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 80, p.163–174, 2002.

HOLLMAN, P.C. & KATAN, M.B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 51, p. 305-310, 1997.

HOWELLS, L.M.; MOISEEVA, E.P.; NEAL, C.P.; FOREMAN, B.E.; ANDREADI, C.K.; SUN, Y-Y.; HUDSON, A.; MANSON, M.M., et al. Predicting the physiological relevance of *in vitro* cancer preventive activities of phytochemicals. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, p. 1274-12304, 2007.

HSIANG, Y-H.; LIHOU, M.G.; LIU, L.F. Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. **Cancer Research**, v. 49, p. 5077-5082, 1989.

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

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

INCA, Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>>. Acesso em: 20 jul 2011.

IWASAKI, M.; INOUE, M.; OTANI, T., SASAZUKI, S.; KURAHASHI, N.; MIURA, T.; YAMAMOTO, S.; TSUGANE, S. Plasma isoflavone level and subsequent risk of breast cancer among Japanese women: a nested case-control study from the Japan public health center-based prospective study group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, p. 1677–83, 2008.

JAYAT, C.; RATINAUD, M.H. Cell cycle analysis by flow cytometry: Principles and applications. **Biology of the Cell**, v. 78, p. 15-25, 1993.

JIN, S.; ZHANG, Q.Y.; KANG, X.M.; WANG, J.X.; ZHAO, W.H. Daidzein induces MCF-7 breast cancer cells apoptosis via the mitochondrial pathway. **Annals of Oncology**, v. 21, p. 263–268, 2010.

JORDAN, M.A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 253-265, 2004.

JU, Y.H.; ALLRED, K.F.; ALLRED, C.D.; HELFERICH, W.G. Genistein stimulates growth of human breast cancer cells in a novel, postmenopausal animal model, with low plasma estradiol concentrations. **Carcinogenesis**, v. 27, p. 1292–1299, 2006a.

JU, Y.H.; DOERGE, D.R.; ALLRED, K.F.; ALLRED, C.D.; HELFERICH, W.G. Dietary genistein negates the inhibitory effect of tamoxifen on growth of estrogen-dependent human breast cancer MCF-7 cells implanted in athymic mice. **Cancer Research**, v. 62, p. 2474-2477, 2002.

JU, Y.H.; FULTZ, J.; ALLRED, K.F.; DOERGE, D.R.; HELFERICH, W.G. Effects of dietary daidzein and its metabolite, equol, at physiological concentrations on the growth of estrogen-dependent human breast cancer MCF-7 tumors implanted in ovariectomized athymic mice. **Carcinogenesis**, v. 27, p. 856-863, 2006b.

KAKIZOE, T. Chemoprevention of cancer – focusing on clinical trials. Japanese **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, p. 421-442, 2003.

KAZI, A.; DANIEL, K.G.; SMITH, D.M.; KUMAR, N.B.; DOU, Q.P. Inhibition of the proteasome activity, a novel mechanism associated with the tumor cell apoptosis-inducing ability of genistein. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 965–976, 2003.

KELLOFF, G. J.; CROWELL, J. A.; STEELE, V. E.; LUBET, R. A.; MALONE, W. A.; BOONE, C. W.; KOPELOVICH, L.; HAWK, E. T.; LIEBERMAN, R.; LAWRENCEE, J. A.; ALI, L.; VINER, J. L.; SIGMAN, C. C. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 467-471, 2000.

KHAN, N.; MUKHTAR, H. Cancer Chemoprevention. **Comprehensive Toxicology**, chapter 14.20: 417-431, 2010.

KING, R.A. Soy isoflavones in foods: processing effects and metabolism. **ASA Technical Bulletin**, v. HN36, p. 1-10, 2002.

KING, R.A.; BURSILL, D.B. Plasma and urinary kinetics of the isoflavonas daidzein and genistein after a single soy meal in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, p. 867–872. 1998.

KLEIN, C.B.; KING, A.A. Genistein genotoxicity: Critical considerations of in vitro exposure dose. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 224, p. 1–11, 2007.

KONSTANTAKOPOULOS, N.; MONTGOMERY, K.G.; CHAMBERLAIN, N.; QUINN, M.A.; BAKER, M.S.; RICE, G.E.; GEORGIU, H.M.; CAMPBELL, I.G. Changes in gene

expressions elicited by physiological concentrations of genistein on human endometrial cancer cells. **Molecular Carcinogenesis**, v. 45, p. 752-763, 2006.

KUBISTA, M. *et al.* The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p.95–125, 2006.

KUZUMAKI, T.; KOBAYASHI, T.; ISHIKAWA, K. Genistein induces p21^{Cip1/WAF1} expression and blocks G1 to S phase transition in mouse fibroblast and melanoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 251, p. 291-295, 1998.

KUZUMAKI, T.; MATSUDA, A.; ITO, K.; ISHIKAWA, K. Cell adhesion to substratum and activation of tyrosine kinases are essentially required for G1/S phase transition in BALB/c 3T3 fibroblasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1310, p. 185-192, 1996.

LAMPE, J.W. Is equol the key to the efficacy of soy foods? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, p. 1S–4S, 2009.

LAMPE, J.W.; KARR, S.C.; HUTCHINS, A.M.; SLAVIN, J.L. Urinary equol excretion with a soy challenge: influence of habitual diet. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 217, p.335–339, 1998.

LAW, M.R.; WALD, N.J.; THOMPSON, S.G. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? **British Medical Journal**, v. 308, p. 367–372, 1994a.

LAW, M.R.; WALD, N.J.; WU, T.; HACKSHAW, A.; BAILEY, A. Systematic underestimation of association between serum cholesterol concentration and ischaemic heart disease in observational studies: data from the BUPA study. **British Medical Journal**, v. 308, p. 363–366, 1994b.

LAZAR JR, F.; COSTA-PAIVA, L.; MORAIS, S.S.; PEDRO, A.O.; PINTO-NETO, A.M. The attitude of gynecologists in São Paulo, Brazil 3 years after the Women's Health Initiative study. **Maturitas**, v.56, p. 129–141, 2007.

LEGARZA, K.; YANG, L-X. New molecular mechanisms of action of camptothecin-type drugs. **Anticancer Research**, v. 26, p. 3301-3306, 2006.

LI, Y.; UPADHYAY, S.; BHUIYAN, M.; SARKAR, F.H. Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein. **Oncogene**, v. 18, p. 3166–3172, 1999.

LIAN, F.; BHUIYAN, M.; LI, Y.W, WALL, N.; KRAUT, M.; SARKAR, F.H. Genistein-induced G2-M arrest, p21WAF1 upregulation, and apoptosis in a non-small-cell lung cancer cell line. **Nutrition and Cancer**; v. 31, p. 184-191, 1998.

LINK, A.; BALAGUER, F.; GOEL, A. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, p. 1771–1792, 2010.

LIU, Z-H.; KANJO, Y.; MIZUTANI, S. A review of phytoestrogens: Their occurrence and fate in the environment. **Water Research**, v. 44, p. 567-577, 2010.

LUNDH, T.J.O.; PETTERSON, H.L.; MARTINSSON, K.A. Comparative levels of free and conjugated plant estrogens in blood plasma of sheep and cattle fed estrogenic silage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 1530–1534, 1990.

LYN-COOK, B.D.; BLANN, E.; PAYNE, P.W.; BO, J.; SHEEHAN, D.; MEDLOCK, K. Methylation profile and amplification of proto-oncogenes in rat pancreas induced with phytoestrogens. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 208, p.116–119, 1995.

MAGEE, P.J.; ROWLAND, I.R. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. **British Journal of Cancer**, v. 91, p. 513-531, 2004.

MAI, Z.; BLACKBURN, G.L.; ZHOU, J.R. Soy phytochemicals synergistically enhance the preventive effect of tamoxifen on the growth of estrogen-dependent human breast carcinoma in mice. **Carcinogenesis**, v. 28, p. 1217-1223, 2007.

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.

MANN, J.R.; DuBOIS, R.N. Cancer chemoprevention: myth or reality? **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 1, p. 403-409, 2004.

MANSON, M.M.; GESCHER, A.; HUDSON, E.A.; PLUMMER, S.M.; SQUIRES, M.S.; PRIGENT, S.A. Blocking and suppressing mechanisms of chemoprevention by dietary constituents. **Toxicology Letters**, v. 112–113, p. 499–505, 2000.

MARKOVITS, J.; LINASSIER, C.; FOSS, P.; COUPRIE, J.; PIERRE, 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.

MATSUMURA, A.; GHOSH, A.; POPE, G.S.; DARBRE, P.D. Comparative study of oestrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 94, p. 431–443, 2005.

MAUBACH, J.; BRACKE, M.E.; HEYERICK, A.; DEPYPERE, H.T.; SERREYN, R.F.; MAREEL, M.M.; DE KEUKELEIRE, D. Quantitation of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids by highperformance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 784, p.137–144, 2003.

MAUBACH, J.; DEPYPERE, H.T.; GOEMAN, J.; VAN DER EYCKEN, J.; HEYERICK, A.; BRACKE, M.E.; BLONDEEL, P.; DE KEUKELEIRE, D. Distribution of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids. **Obstetrics & Gynecology**, v. 103, p. 892–898, 2004.

McCARTY, M.F. Isoflavones made simple – Genistein’s agonist activity for the beta-type estrogen receptor mediates their health benefits. **Medical Hypotheses**, v. 66, p. 1093–1114, 2006.

McCUE, P.; SHETTY, K. Health benefits of soy isoflavonoids and strategies for enhancement: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 361–367, 2004.

McMILLIAN, M.K.; LI, L.; PARKER, J.B.; PATEL, L.; ZHONG, Z.; GUNNETT, J.W.; POWERS, W.J.; JOHNSON, M.D. An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 18, p. 157-173, 2002.

MEDJAKOVIC, S.; MUELLER, M.; JUNGBAUER, A. Potential health-modulating effects of isoflavones and metabolites via activation of PPAR and AhR. **Nutrients**, v. 2, p. 241-279, 2010.

MESSINA, M. Insights gained from 20 years of soy research. **Journal of Nutrition**, v. 140, p. 2289S-2295S, 2010.

MESSINA, M.; McCASKILL-STEVENS, W., LAMPE, J.W. Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings. **Journal of the Nacional Cancer Institute**, v. 98, p. 1275–1284, 2006b.

MESSINA, M.; NAGATA, C.; WU, A.H. Estimated Asian adult soy protein and isoflavones intake. **Nutrition and Cancer**, v. 55, p. 1-12, 2006a.

MILTYK, W.; CRACIUNESCU, C.N.; FISCHER, L.; JEFFCOAT, R.A.; KOCH, M.A.; LOPACZYNSKI, W.; MAHONEY, C.; CROWELL, J.; PAGLIERI, J.; ZEISEL, S.H. Lack of significant genotoxicity of purified soy isoflavones (genistein, daidzein, and glycitein) in 20 patients with prostate cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, p. 875–882, 2003.

MOISEEVA, E.P.; MANSON, M.M. Dietary Chemopreventive Phytochemicals: Too Little or Too Much? **Cancer Prevention Research**, v. 2, p. 611-616, 2009.

MOLTENI, A.; BRIZIO-MOLTENI, L.; PERSKY, V. In vitro hormonal effects of soybean isoflavones. **The Journal of Nutrition**, v. 125, p. 751S-756S, 1995.

MOON, Y.J.; WANG, X.; MORRIS, M.E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicology in Vitro**, v. 20, p. 187-210, 2006.

MORSE, M.A.; STONER, G.D. Cancer chemoprevention: principles and prospects. **Carcinogenesis**, v. 14, p. 1737-1746, 1993.

MORTON, M.S.; ARISAKA, O.; MIYAKE, N.; MORGAN, L.D.; EVANS, B.A. Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p. 168–171, 2002.

MORTON, M.S.; CHAN, P.S.F.; CHENG, C.; BLACKLOCK, N.; MATOS-FERREIRA, A.; ABRANCHES-MONTEIRO, L.; CORREIA, R.; LLOYD, S.; GRIFFITHS, K. Lignans and isoflavonoids in plasma and prostatic fluid in men: samples from Portugal, Hong Kong, and the United Kingdom. **Prostate**, v. 32, p.122–128, 1997.

MOUTSATSOU, P. The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. **Hormones**, v. 6, p. 173-193, 2007.

MURPHY, P.A. Phytoestrogen content of processed soybean products. **Food Technology**, v. 36, p. 60–64. 1982.

NAGATA, C. Ecological study of the association between soy product intake and mortality from cancer and heart disease in Japan. **International Journal of Epidemiology**, v. 29, p. 832–836, 2000.

NAKAYAMA, G.R.; CATON, M.C.; NOVA, M.P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of Immunological Methods**, v. 204, p. 205-208, 1997.

NAMS (North American Menopause Society). The role of soy isoflavones in menopausal health: report of The North American Menopause Society/Wulf H. Utian Translational Science Symposium in Chicago, IL (October 2010). **Menopause**, v. 18, p. 732-753, 2011.

NEERGHEEN, V.S.; BAHORUN, T.; TAYLOR, E.W.; JEN, L-S.; ARUOMA, O.I. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. **Toxicology**, v. 278, p. 229-241, 2010.

NEVEN, L. Isoflavones - an overview of benefits for health and market. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v. 9, p. 39-41, 1998.

NILSSON, S.; KOEHLER, K.F., GUSTAFSSON J.A. Development of subtype-selective oestrogen receptor-based therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p. 778-792, 2011.

NOLAN, T.; HANDS, R.E; BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time RTPCR. **Nature Protocols**, v.1, p.1559-1582, 2006.

O' BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

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 3T3 cells. **Biochemical and Biophysics Research Communications**, v.157, p.183–189, 1988.

OSANI, T.; PATEL, R.; PYLE, J.; JORDAN, V.C. Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens, **Planta Medica**, v. 74, p. 1656–1665, 2008.

OUYANG, G.; YAO, L.; RUAN, K.; SONG, G.; MAO, Y.; SHIDENG, B. Genistein induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis of human ovarian cancer cells via activation of DNA damage checkpoints pathways. **Cell Biology International**, v. 33, p. 1237-1244, 2009.

PARK, S.S.; KIM, Y.H.; JEON, Y.K.; KIM, Y.A.; KIM, J.E.; KIM, H.; KIM, C.W. Genistein-induced apoptosis via Akt signaling pathway in anaplastic large-cell lymphoma. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 56, p. 271-278, 2005.

PARUTHIYIL, S.; PARMAR, H.; KEREKATTE, V.; CUNHA, G.R.; FIRESTONE, G.L.; LEITMAN, DC. Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. **Cancer Research**, v. 64, p. 423-428, 2004.

PATISAUL, H.B.; JEFFERSON, W. The pros and cons of phytoestrogens. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 31, p. 400-419, 2010.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 1-10, 2002.

PFAFFL, MW. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2003-2007, 2001.

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

RAMOS, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 427-442, 2007.

REGISTER, T.C.; JAYO, M.J.; ANTHONY, M.S. Soy phytoestrogens do not prevent bone loss in postmenopausal monkeys. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, p. 4362-4370, 2003.

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

REITER, E.; BECK, V.; MEDJAKOVIC, S.; JUNGBAUER, A. Isoflavones are safe compounds for therapeutical applications – Evaluation of in vitro data. **Gynecological Endocrinology**, v. 25, p. 554-580, 2009.

ROMAGNOLI, E.; MINISOLA, S.; CARNEVALE, V.; SCARDA, A.; ROSSO, R.; SCARNECCHIA, L.; PACITTI, M.T.; MAZZUOLI, G. Effect of estrogen deficiency on IGF-I plasma levels: relationship with bone mineral density in premenopausal women. **Calcified Tissue International**, v.53, p. 1-6, 1993.

ROSS, J.A.; KASUM, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 19-34, 2002.

ROWLAND, I.R.; WISEMAN, H.; SANDERS, T.A.; ADLERCREUTZ, H.; BOWEY, E.A. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. **Nutrition and Cancer**, v. 36, p. 27-32. 2000.

RUNDHAUG, J.E.; FISCHER, S.M. Cellular and molecular mechanisms of tumor promotion. **Comprehensive Toxicology**, chapter 14.15, 311-333, 2010.

RUSSO, G.L. Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, p. 533–544, 2007.

SACKS, F.M.; LICHTENSTEIN, A.; VAN HORN, L.; HARRIS, W.; KRIS-ETHERTON, P.; WINSTON, M. Soy protein, isoflavones and cardiovascular health: an American Heart Association Science Advisory for professionals from the Nutrition Committee. **Circulation**, v. 113, p. 1034-1044, 2006.

SARASIN, A. An overview of the mechanisms of mutagens and carcinogens. **Mutation Research**, v. 544, p. 99-106, 2003.

SARKAR, F.H.; LI, Y. Soy isoflavones and cancer prevention. **Cancer Investigation**, v. 21, p.744–757, 2003.

SATHYAMOORTHY, N.; WANG, T.T.Y. Differential Effects of Dietary Phyto-oestrogens Daidzein and Equol on Human Breast Cancer MCF-7 Cells. **European Journal of Cancer**, v. 33, p. 2384-2389, 1997.

SCHMIDT, S.; MICHNA, H.; DIEL, P. Combinatory effects of phytoestrogens and 17 β -oestradiol on proliferation and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. **Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 94, p. 445–449, 2005.

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. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 3577-3584, 2002.

SETCHELL, K.D.; CASSIDY, A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. **The Journal of Nutrition**, v. 129, p. 758S-767S, 1999.

SETCHELL, K.D.; GOSSELIN, S.J.; WELSH, M.B.; JOHNSTON, J.O.; BALISTRERI, W.F.; KRAMER, L.W.; DRESSER, B.L.; TARR, M.J. Dietary estrogens—a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs. **Gastroenterology**, v. 93, p. 225–233, 1987.

SETCHELL, K.D.R. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology and implications for human health of soy isoflavones. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 68, p. 1333S-1346S, 1998.

SETCHELL, K.D.R.; CLERICI, C. Equol: Pharmacokinetics and Biological actions. **The Journal of Nutrition**, v. 140, p. 1363S-1368S, 2010.

SHANMUGAM, M.K.; KANNAIYAN, R.; SETHI, G. Targeting cell signaling and apoptotic pathways by dietary agents: role in the prevention and treatment of cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 63, p.161–173, 2011.

SHU, L.; CHEUNG, K-L.; KHOR, T.O.; CHEN, C.; KONG, A-N. Phytochemicals: cancer chemoprevention and suppression of tumor onset and metastasis. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 29, p. 483–502, 2010.

SONG, K.B.; ATKINSON, C.; FRANKENFELD, C.L.; JOKELA, T.; WAHALA, K.; THOMAS, W.K.; LAMPE, J.W. Prevalence of daidzein-metabolizing phenotypes differs

between Caucasian and Korean American women and girls. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 1347–1351, 2006.

SONG, W.O.; CHUN, O.K.; HWANG, I.; SHIN, H.S., KIM, B.-G., KIM, K.S. LEE, S.-Y.; SHIN, D. LEE, S.G. Soy Isoflavones as Safe Functional Ingredients. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, p. 571–580, 2007.

SPORN, M.B. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. **Cancer Research**, v. 36, p. 2699-2702, 1976.

SPORN, M.B.; SUH, N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 537-543, 2002.

STEINER, C.; ARNOULD, S.; SCALBERT, A.; MANACH, C. Isoflavones and the prevention of breast cancer: new perspectives opened by nutrigenomics. **British Journal of Nutrition**, v. 99, p. ES78-ES108, 2008.

STOPPER, H; SCHMITT, E; KOBRAS, K. Genotoxicity of phytoestrogens. **Mutation Research**, v. 574, p. 139-155, 2005.

SU, S.J.; YE, T.M.; LEI, H.Y.; CHOW, N.H. The potential of soybean foods as a chemoprevention approach for human urinary tract cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 230-236, 2000.

SUGAYA, S.; NAKANISHI, H.; TANZAWA, H. Down-regulation of SMT3A gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) cells. **Mutation Research**, v. 578, p. 327–332, 2005.

TACCHINI, L.; DANSI, P.; MATTEUCCI, E.; DESIDERIO, M.A. Hepatocyte growth factor signal coupling to various transcription factors depends on triggering of Met receptor and protein kinase transducers in human hepatoma cells HepG2. **Experimental Cell Research**, v. 256, p. 272-281, 2000.

TOMAR, R.S.; SHIAO, R. Early Life and Adult Exposure to Isoflavones and Breast Cancer Risk. **Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews**, v. 26, p. 113-173, 2008.

TROSKO, J.E.; CHANG, C-C.; UPHAM, B.L.; TAI, M-H. The role of human adult stem cells and cell-cell communication in cancer chemotherapy strategies. **Mutation Research**, v. 591, p. 187-197, 2005.

TSAO, A.S.; KIM, E.S.; HONG, W.K. Chemoprevention of cancer. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 54, p. 150-180, 2004.

UCKUN, F.M.; MESSINGER, Y.; CHEN, C.L.; O'NEILL, K.; GOLDMAN, F.; HURVITZ, C.; CASPER, J.T.; LEVINE, A. Treatment of therapy refractory B-lineage acute lymphoblastic leukemia with an apoptosis-inducing CD19-directed tyrosine kinase inhibitor. **Clinical Cancer Research**, v. 5, p. 3906-3913, 1999.

UPMALIS, D.H.; LOBO, R.; BRADLEY, L.; WARREN, M.; CONE, F.; LAMIA, C.A. Vasomotor symptom relief by soy isoflavone extract tablets in postmenopausal women: a multicenter, double-blind, randomized, placebo controlled study. **Menopause**, v. 7, p. 236-242, 2000.

VAINIO, H.; WEIDERPASS, E. Fruit and vegetables in cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, v. 54, p. 111-142, 2006.

VAN ENGELAND, M.; NIELAND, L.J.W.; RAMAEKERS, F.C.S.; SCHUTTE, B.; Reutelingsperger, C.P.M. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v. 31, p.1-9, 1998.

WALTER, E.D. Genistein (an isoflavone glucoside) and its aglucone, genistein, from soybeans. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 63, p. 3273–3276, 1941.

WANG, H.Z.; ZHANG, Y.; XIE, L.P.; YU, X.Y.; ZHANG, R.Q. Effects of genistein and daidzein on the cell growth, cell cycle, and differentiation of human and murine melanoma cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 421–426, 2002.

WANG, L.G.; LIU, X.M.; KREIS, W.; BUDMAN, D.R. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 44, 355-361, 1999.

WATANABE, S.; YAMAGUCHI, M.; SOBUE, T.; TAKAHASHI, T.; MIURA, T.; ARAI, Y.; MAZUR, W.; WÄHÄLÄ, K.; ADLERCREUTZ, H. Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 1710–1715, 1998.

WATTENBERG, L.W. Inhibition of Carcinogenesis by Minor Dietary Constituents **Cancer Research**, v. 52, p. 2085s–2091s, 1992.

WEI, P.; LIU, M.; CHEN, Y.; CHEN, D.-C. Systematic review of soy isoflavone supplements on osteoporosis in Women. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, p. 243-248, 2012.

WUTTKE, W.; JARRY, H.; SEIDLOVÁ-WUTTKE. Isoflavones – safe food additives or dangerous drugs? **Ageing Research Reviews**, v. 6, p. 150-188, 2007.

YAMAGUCHI, M.; GAO, Y.H. Anabolic effect of genistein on bone metabolism in the femoral-metaphyseal tissues of elderly rats is inhibited by the anti-estrogen tamoxifen. **Research Experimental Medicine**, v. 197, p. 101-107, 1997.

ZHANG, X.; SHU, X.O.; GAO, Y.T.; et al. Soy food consumption is associated with lower risk of coronary heart disease in Chinese women. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 2874–2878, 2003.

ZHOU, J. R.; GUGGER, E.T.; TANAKA, T.; GUO, Y.; BLACKBURN, G.L.; CLINTON, S.K. Soybean phytochemicals inhibit the growth of transplantable human prostate carcinoma and tumor angiogenesis in mice. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1628-1635, 1999.