



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

KALIANA LARISSA MACHADO

**ESTRESSE OXIDATIVO NA AÇÃO DA CAFEÍNA SOBRE A  
PROLIFERAÇÃO E MORTE DE CÉLULAS DE CÂNCER DE  
MAMA MCF-7 E MDA-MB-231**

KALIANA LARISSA MACHADO

**ESTRESSE OXIDATIVO NA AÇÃO DA CAFEÍNA SOBRE A  
PROLIFERAÇÃO E MORTE DE CÉLULAS DE CÂNCER DE  
MAMA MCF-7 E MDA-MB-231**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de mestre em Patologia Experimental.

Orientadora: Prof. Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani.

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

MACHADO, KALIANA LARISSA.  
ESTRESSE OXIDATIVO NA AÇÃO DA CAFEINA SOBRE A PROLIFERAÇÃO E MORTE DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA MCF-7 E MDA-MB-231 / KALIANA LARISSA MACHADO. - Londrina, 2015.  
57 f.

Orientador: ALESSANDRA LOURENÇO CECCHINI ARMANI.  
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2015.  
Inclui bibliografia.

1. CÂNCER DE MAMA - Teses. 2. CAFEÍNA - Teses. 3. ESTRESSE OXIDATIVO - Teses. I. CECCHINI ARMANI, ALESSANDRA LOURENÇO. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

KALIANA LARISSA MACHADO

**ESTRESSE OXIDATIVO NA AÇÃO DA CAFEÍNA SOBRE A  
PROLIFERAÇÃO E MORTE DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA  
MCF-7 E MDA-MB-231**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de mestre em Patologia Experimental.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof. Dra. Alessandra Lourenço  
Cecchini Armani  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dra. Clairce Luzia Salgueiro  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Prof. Dra. Ivete Conchon Costa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de julho de 2015.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sempre me guiar e dar grandes oportunidades em minha vida.

A professora Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani, pela oportunidade que me foi dada e pela dedicação com que aceitou ser minha orientadora e me auxiliou ao longo do meu trabalho.

Ao professor Dr. Rubens Cecchini, por ter aberto as portas de seu laboratório e pelo compartilhamento de seu enorme conhecimento.

Aos professores Rodrigo Cabral Luiz, Flávia Alessandra Guarnier e Jair Tonon, por sempre estarem dispostos a me ajudar em todas as dúvidas e dificuldades encontradas no desenvolver do trabalho.

Aos meus pais, Maria José e Osvaldo Machado, meu infinito agradecimentos. Sempre acreditaram e apoiaram minhas escolhas, me dando todo suporte necessário para eu alcançar meus objetivos.

Aos meus colegas de laboratório, pelos momentos divididos juntos, em especial Thamara Nishida, Laís Sábio, Nichele Antunes Vieira e Fernando Borges que se tornaram verdadeiros amigos e deixaram meu trabalho mais leve e divertido. Obrigada por dividirem comigo as angústias e alegrias, além de sempre ouvirem minhas bobagens. Foi bom poder contar com vocês!

Agradeço muito à Poliana Marinello, que com toda sua serenidade me ensinou e ajudou em cada passo que dei durante o mestrado. Obrigada por sua amizade e por ser um grande exemplo pra mim.

Aos técnicos do laboratório, Jesus Antônio Vargas e Pedro Sebastião Raimundo Dionízio Filho, por sempre se mostrarem prestativos, não medindo esforços para colaborar e repassar seus conhecimentos. Às amigas de longa data, Maira Rossi, Tiemi Takeda, Priscila Sayuri Akasaka, Carolina Tatessuji, Lisiane Ganassin, Cinthia Hidalgo Molina, Camile Coabianco Poliana Carlesso, por sempre estarem ao meu lado, mesmo que distantes, me ajudando a superar momentos difíceis e proporcionando momentos de alegria. Amo vocês!

Às parceiras de apartamento, Carolina Fávero e Regimara Azevedo, que suportaram meu estresse durante o mestrado, sempre me ouvindo e me aconselhando.

Agradeço a todos, que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho e para meu crescimento pessoal e profissional. A todos vocês meus sinceros agradecimentos.

MACHADO, Kaliana Larissa. **Estresse Oxidativo na ação da cafeína sobre a proliferação e morte de células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231.** 2015. 57 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia com maior taxa de mortalidade entre as mulheres no mundo todo. A cafeína é uma substância consumida mundialmente e vem sendo muito estudada devido à sua capacidade de induzir apoptose em células tumorais, porém os mecanismos pelos quais age sobre células de câncer de mama ainda não foram totalmente esclarecidos. Portanto, os objetivos desse trabalho foram verificar a participação do estresse oxidativo na ação da cafeína sobre a proliferação e morte de células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, analisando se a cafeína altera a viabilidade e proliferação celular e se ocorre alteração do estado oxidativo, correlacionando essa alteração com a presença ou não de lesão de DNA e alteração da taxa de apoptose celular. Para isso as duas linhagens foram tratadas com quatro concentrações de cafeína (1,0; 2,5; 5,0 e 10mM) e em seguida foram avaliadas a viabilidade, proliferação e os padrões de morte celular. Também foram analisados os parâmetros de estresse oxidativo através dos níveis de lipoperóxidos de membrana, malondialdeído e tióis totais e o efeito da cafeína no material genético das células através dos níveis de 8-hidroxi-2- deoxiguanosina e teste do cometa. Para avaliar a participação do estresse oxidativo na citotoxicidade da cafeína o teste do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio (MTT) foi realizado após o tratamento com 10mM de cafeína na ausência e presença de sequestradores de espécies reativas de oxigênio (ERO) específicos histidina, superóxido dismutase e trolox para sequestro de oxigênio singlete, ânion radical superóxido e radical peroxil, respectivamente. Os resultados demonstraram que a cafeína apresenta efeito citotóxico em células de mama tumorais, sendo observado, nas concentrações mais elevadas (5 e 10mM), indução de apoptose e necrose. Esse efeito parece estar relacionado com seu potencial de indução de estresse oxidativo e dano ao DNA. Reações distintas entre as linhagens celulares frente ao tratamento com cafeína foram observadas, verificando uma maior resistência das células MCF-7. Esses resultados ajudam a entender os mecanismos de ação da cafeína sobre células de câncer de mama e sugerem que seu uso possa ser eficaz como adjuvante no tratamento do câncer de mama.

**Palavras-Chave:** Cafeína. Câncer de mama. Tratamento do câncer. Estresse oxidativo.

MACHADO, Kaliana Larissa. **Oxidative stress in caffeine action on the proliferation and cell death of breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231.** 2015. 57 f. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## ABSTRACT

Breast cancer is the neoplasia with the highest mortality rate among women worldwide. Caffeine is a substance consumed worldwide and has been extensively studied because of its ability to induce apoptosis in tumor cells, but the mechanisms by which acts on breast cancer cells have not yet been fully clarified. Therefore, the objectives of this study were to verify the involvement of oxidative stress in the action of caffeine on the proliferation and death of breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231, analyzing if caffeine alters the viability and cell proliferation, the occurrence of oxidative stress and whether this could be associated with alterations in DNA and apoptosis rate injury. For this the two lines cells were treated with four concentrations of caffeine (1.0, 2.5, 5.0 and 10mM) and analyzed for several parameters indicative of the oxidative state, including membrane lipoperoxide levels, malondialdehyde and total thiol contents as well as effect of caffeine in the genetic material of cells, by measuring levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and comet assay. The viability, proliferation and cell death patterns were also evaluated. To evaluate the role of oxidative stress in caffeine cytotoxicity the MTT test was performed after treatment with caffeine (10mM) in the absence and presence of scavengers of reactive oxygen species (ROS) specific: histidine, superoxide dismutase and trolox. The results demonstrated that caffeine has a cytotoxic effect on breast tumor cells and, at highest concentrations (5 and 10mM), apoptosis and necrosis induction. This effect seems to be related to its potential for oxidative stress and DNA damage induction. Different behaviors among cell lines before the caffeine treatment were observed checking a greater resistance of MCF-7 cells. These results help to understand the caffeine mechanisms of action on breast cancer cells and suggest that its use can be effective as an adjuvant therapy for breast cancer.

**Keywords:** Caffeine. Breast cancer. Cancer treatment. Oxidative stress.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Classificação molecular do câncer de mama.....	13
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cAMP	monofosfato cíclico de adenosina
ASK1	quinase 1 reguladora do sinal de apoptose
ATM	proteína ataxia telangiectasia mutada
ATR	proteína relacionada à ataxia-telangiectasia e Rad3
BRCA1	gene do câncer de mama 1
BRCA2	gene do câncer de mama 2
Cdk1	quinase dependente de ciclina 1
Cdk2	quinase dependente de ciclina 2
CHEK2	quinase de ponto de checagem
CYP1A2	citocromo P450 1A2
EGF	fator de crescimento epidermal
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
GSH	glutathiona reduzida
HER2	fator de crescimento epidermal 2
HIF-1	fator induzível pela hipóxia 1
HMOX1	heme oxigenase 1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
KEAP-1	proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch
LOO-	radical peroxil
LO <sup>•</sup>	radical alcóxil
LOOH	peróxidos orgânicos
NADPH	nicotinamida adenina de nucleotídeo fosfato
NO	óxido nítrico
NRF-2	fator eritróide relacionado ao fator 2
NQO1	quinona oxidoreductase
OH <sup>•</sup>	radical hidroxil
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	ânion superóxido
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	oxigênio singlet
ONOO	peroxinitrito
PARP	poli-ADP-ribose polimerase
RE	receptor de estrogênio

RP	receptor de progesterona
TGF- $\beta$	fator de crescimento transformador do tipo $\beta$
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa
TP53	gene da proteína p53
Trx	tioredoxina
TrxR	tioredoxina redutase
UGTs	UDP- glucuronosiltransferases
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1</b>	<b>CÂNCER DE MAMA</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2</b>	<b>TRATAMENTOS DO CÂNCER DE MAMA</b> .....	<b>14</b>
<b>1.3</b>	<b>CÉLULAS MCF-7 E MDA-MB-231</b> .....	<b>16</b>
<b>1.4</b>	<b>ESTRESSE OXIDATIVO E CÂNCER DE MAMA</b> .....	<b>16</b>
<b>1.5</b>	<b>CAFEÍNA</b> .....	<b>19</b>
<b>1.6</b>	<b>CAFEÍNA E CÂNCER DE MAMA</b> .....	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICO</b> .....	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>24</b>
	<b>ANEXO 1: ARTIGO</b> .....	<b>25</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>48</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é a neoplasia mais frequentemente diagnosticada e com a maior taxa de mortalidade entre as mulheres, representando aproximadamente 25% (1,67 milhões) do total de casos de câncer diagnosticados na população feminina no ano de 2012 (TORRE et al., 2015).

Diversos fatores estão associados ao aumento de susceptibilidade ao câncer de mama. Entre eles, a idade, localização geográfica, predisposição genética e a exposição a hormônios são consideradas os mais importantes (MCPHERSON et al., 2000). Dados de Jemal et al. (2011) demonstram uma grande variação da incidência do câncer de mama em diferentes regiões do mundo, onde cerca de metade dos casos e 60% das mortes por câncer de mama são estimadas para países desenvolvidos. Esta variação resulta de diferenças nos fatores reprodutivos e hormonais e da disponibilidade de serviços de detecção precoce assim como diferentes hábitos alimentares, tabagismo e exposição a agentes mutagênicos (JEMAL et al., 2011).

Estima-se que 5-10% dos casos da doença sejam hereditários e essa frequência aumenta para 25% em casos diagnosticados antes dos 30 anos (LARSEN et al., 2014; ERTURK et al., 2014). Esse alto risco tem sido relacionado com mutações em diversos genes como o gene do câncer de mama 1 e 2 (BRCA1/2) e gene da proteína p53 (TP53) (SAPKOTA, 2014). Uma vez detectadas, permitem que as pacientes iniciem uma triagem a partir de idade mais jovem, optem por métodos de detecção mais sensíveis e cirurgias profiláticas (WALSH et al., 2006).

O câncer de mama apresenta também distintas características morfológicas e moleculares, sendo considerada uma doença clinicamente heterogênea (MALHOTRA et al., 2010). Análises de perfis de expressão gênica puderam verificar desigualdades entre os tumores e também diferença nas características biológicas como velocidade de crescimento via de sinalização e composição celular (PEROU et al., 2000). A existência destas variações levou à classificação desta doença em subtipos distintos, os quais nem sempre são coincidentes. Segundo uma das

classificações, bastante difundida, o tumor de mama pode ser subdividido em luminal A, luminal B, subtipo com superexpressão do receptor para fator de crescimento epidermal 2 (HER-2) e subtipo basal-símile e posteriormente foi identificado um novo subtipo, designado como claudina baixa (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2001; SORLIE et al., 2003; PRAT et al., 2010). As características moleculares destes subtipos estão resumidas na Tabela 1.

**Tabela 1. Classificação molecular do câncer de mama**

<b>Subtipos</b>	<b>Imunoexpressão</b>	<b>Características</b>
<b>Luminal A</b>	RE+; RP+; HER2-	Ki67 baixa, responsivo à terapia endócrina, responsivo à quimioterapia
<b>Luminal B</b>	RE+; RP+; HER2±	Ki67 alta, geralmente responsivo à terapia endócrina, resposta variável à quimioterapia. Responsivo ao trastusumab
<b>HER-2</b>	RE- RP- HER+	Ki67 alta, responsivo ao trastusumab, responsivo à quimioterapia
<b>Basal</b>	RE-; RP-; HER-	Ki67 alta, não responsivo à terapia endócrina, frequentemente responsivo à quimioterapia
<b>Claudina Baixa</b>	RE-; RP-; HER-	Ki67, E-caderina, claudina-3,4,7 baixa. Resposta intermediária à quimioterapia

A compreensão dessas diferentes classes moleculares pode ajudar a identificar características clínicas importantes, como potencial invasivo e metastático (SORLIE et al., 2001). Tumores positivos para receptor de estrógeno, por exemplo, são mais propensos a desenvolver metástases ósseas e apresentam uma evolução clínica mais lenta. Já em pacientes com câncer de mama basal-símile, as metástases pulmonares são mais freqüentes e a evolução clínica é mais rápida (JOLLY et al., 2012).

## 1.2 TRATAMENTOS DO CÂNCER DE MAMA

Além de diferirem no prognóstico da doença, essas subclasses de câncer de mama também mostram sensibilidades distintas ao tratamento (DUDA-SZYMANSKA; SPORNY, 2011).

Atualmente diferentes tipos de tratamentos estão disponíveis para pacientes com tumor mamário. Dentre os mais tradicionais pode-se citar a cirurgia para remoção do tumor primário, irradiação e drogas anticâncer, que ajudam a eliminar e impedir a proliferação das células cancerosas (NWABO KAMDJE et al., 2014). Os avanços no desenvolvimento tecnológico nas áreas de diagnóstico e biologia molecular permitiram uma reformulação das técnicas cirúrgicas e a utilização de drogas mais eficazes no tratamento sistêmico o que levou a uma menor utilização de técnicas invasivas (BRASIL, 2013).

Ao longo das últimas décadas, grandes mudanças ocorreram em relação às técnicas cirúrgicas o que lhes conferiram um melhor resultado estético. Em estágio inicial a cirurgia conservadora, passou a ser o procedimento padrão (TIEZZI, 2007).

Em casos de tumores de maior extensão, a quimioterapia neoadjuvante passou a ser muito utilizada (CHEN et al, 2004). Apesar desse tratamento anteriormente ter sido utilizado apenas para tumores inoperáveis, estudos mostraram que a quimioterapia neoadjuvante pode trazer muitos benefícios sendo o principal deles a possibilidade de realizar a cirurgia conservadora em pacientes cuja mastectomia total era o tratamento de escolha (BERIWAL et al., 2006).

Para a escolha do tratamento adequado, o fenótipo da célula tumoral é um fator importante a ser considerado atualmente. As diferentes mutações genéticas encontradas em cada subtipo tumoral constituem alvos terapêuticos cuja inativação pode suprimir a progressão do câncer (CORTÉS et al., 2014). Sendo assim, o termo terapia alvo passou a ser muito utilizado para descrever novas drogas que foram planejadas com base no conhecimento da patologia molecular da doença, visando marcadores específicos moleculares (WICKI e ROCHLITZ, 2012).

Dentre as terapias alvo, temos aquelas que são destinadas ao tratamento do câncer de mama luminal A e B, que possuem receptores hormonais, através da utilização de moduladores seletivos de receptores de estrogênio e progesterona e através de inibidores da enzima aromatase, responsável pela síntese de estrogênio (REIS-FILHO, WESTBURY, PIERGA, 2006).

Ainda dentro das terapias alvo, existem aquelas que são específicas para células que superexpressam o receptor HER-2. A família HER é composta por quatro receptores transmembrana do tipo tirosina quinase (1, 2, 3 e 4) que são capazes de desencadear a ativação de vias sinalizadoras a favor da proliferação, motilidade e invasão celular tanto na forma de homo, como heterodímeros (HOWE; BROWN, 2011). O Trastuzumab foi o primeiro anticorpo monoclonal desenvolvido como terapia anti- HER-2 que se liga ao domínio do receptor HER-2 inibindo a proliferação das células tumorais além de induzir a atividade de p21 ou p27, dois inibidores do ciclo celular, induzindo citotoxicidade mediada por anticorpo (ADCC) (MILLER et al., 2014).

Para o tratamento dos outros subtipos do câncer de mama e também para os casos onde a terapia-alvo não atinge uma resposta adequada, a quimioterapia sistêmica é indicada (HOWE e BROWN, 2011). Diversas classes de agentes quimioterápicos estão disponíveis atualmente para o tratamento da doença, como antraciclinas, taxanos, quimioterápicos baseados em platina, agentes antimetabólitos, alcalóides da vinca, inibidores da enzima poli-ADP-ribose polimerase (PARP) e terapia anti-angiogênica (LEIDY, KHAN, KANDIL, 2014; HANAHAN e WEINBERG, 2011). Essa grande variedade de agentes tem sido utilizada, isoladamente ou em associação, na tentativa de induzir remissão em pacientes em que a quimioterapia inicial falhou (ESTEVA et al., 2001).

Em vários países, a quimioterapia padrão adotada para o tratamento do câncer de mama em estágios iniciais é a combinação de antraciclinas com administração de taxanos de forma simultânea ou sequencial (WARDLEY, 2006). Dentre os agentes pertencentes a essas duas classes, os mais comumente utilizados são a doxorrubicina, epirubicina, docetaxel e paclitaxel (KHASRAW; BELL, DANG, 2012; ALKEN e KELLY, 2013).

Apesar dos diferentes tipos de medicamentos disponíveis para o tratamento do câncer de mama, muitos pacientes apresentam tumores não responsivos ao tratamento, e boa parte dos pacientes que respondem inicialmente ao tratamento, acaba desenvolvendo resistência posteriormente (MURRAY et al., 2012). Além disso, o tratamento quimioterápico resulta em muitos efeitos adversos para o paciente e desistência. Por esses motivos, diversos estudos têm sido realizados utilizando cultura de células de câncer de mama humano a fim de pesquisar novas substâncias com atividades terapêuticas para tratamento do câncer de mama.

### **1.3 CÉLULAS MCF-7 E MDA-MB-231**

Duas linhagens celulares de câncer de mama tem sido utilizadas como ferramentas para o estudo de câncer de mama. Uma delas, a linhagem MCF-7, foi isolada primeiramente em 1970 (SOULE et al., 1973) e por apresentar quantidades significantes de RE, vem sendo amplamente utilizada para estudo do câncer de mama positivo para receptores hormonais (BROOKS, LOCKE, SOULE, 1973).

Outra linhagem de células, MDA-MB-231, foi isolada a partir de pacientes com câncer de mama em 1973 (CAILLEAU et al., 1974). Essa linhagem é negativa para RE, RP e negativa para HER-2, sendo muito utilizada, portanto, para estudos do câncer de mama triplo negativo (NEVE et al., 2006). Além disso, essas células tumorais apresentam rápido crescimento celular, provavelmente devido à alta afinidade de seus receptores de membrana por vários fatores de crescimento, como fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento transformador do tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) assim como uma produção autócrina desses mesmos fatores de crescimento (MARTÍNEZ-CARPIO et al., 1999).

### **1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E CÂNCER**

Diversas espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), entre outras espécies, são produzidas durante o metabolismo humano, sendo observado em distintas condições biológicas (Finkel e Holbrook, 2000). Dentre essas espécies podemos citar o radical hidroxil ( $\bullet$ OH), ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), os radicais peroxil e alcoxil ( $LOO^{\bullet}$  e  $LO^{\bullet}$ ), o oxigênio singlet ( $^1O_2$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e

orgânicos (LOOH), óxido nítrico (NO) e peroxinitrito (ONOO-) (HALLIWELL, 2006). Essa produção é contrabalanceada por um sistema de defesa antioxidante, onde se destacam o sistema glutatona, catalase e superóxido dismutase (SOD) (Finkel e Holbrook, 2000).

Sendo assim, o estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes podendo levar a possíveis danos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Esses danos, também chamados de danos oxidativos, podem trazer inúmeras consequências caso não sejam removidos e já é bem estabelecida sua relação com diversas doenças (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004).

Em relação ao câncer de mama, foi observado que o estresse oxidativo é capaz de promover a formação tumoral de diferentes maneiras, tanto através da modulação de vias de sinalização que iniciam a tumorigênese, como através da geração de mutações no material genético celular (ACHARYA et al., 2010). Essa associação também foi verificada em um estudo no qual as pacientes analisadas, que estavam em estágios avançados da doença, sem quimioterapia prévia, apresentavam altos níveis de estresse oxidativo sistêmico, sugerindo a participação do estresse oxidativo na progressão da doença (PANIS et al., 2011).

Entretanto, se de um lado, o estresse oxidativo leva à iniciação do processo tumoral, de outro lado, os produtos gerados nas reações de oxiredução também podem influenciar na modulação de vias que favorecem a apoptose das células tumorais. Este é o mecanismo de ação de diversos agentes farmacológicos, como a doxorrubicina, que exerce toxicidade tumoral através da indução de estresse oxidativo celular (PELICANO et al., 2004; TRACHOOTHAM et al., 2009). Adicionalmente, já tem sido demonstrado que as células tumorais são capazes de aumentar seus mecanismos de defesa contra as ERO e nisto reside sua sobrevivência, proliferação e resistência a radio e quimioterapia (ROTBLAT et al., 2013).

Células tronco tumorais, por exemplo, que apresentam auto renovação e diferenciação, também possuem baixos níveis de ERO devido ao aumento da atividade de sistemas antioxidantes. Essa característica pode estar envolvida na dificuldade de sucesso em muitos tratamentos que se baseiam na indução de estresse oxidativo, já que as células tronco são poupadas e selecionadas por esses tratamentos (GORRINI, HARRIS e MAK, 2013; YOO et al., 2013).

Esses mecanismos de resistência acontecem em parte através da ativação do fator eritróide relacionado ao fator 2 (NRF-2) e sua proteína reguladora, a (KEAP-1) (ACHARY et al., 2010). O NRF-2 é um fator de transcrição responsável por mediar a indução da transcrição de genes responsáveis pela produção de enzimas metabolizadoras de drogas e substâncias antioxidantes intracelulares como glutathiona (GSH), nicotinamida adenina dinucleotídeo difosfato (NADPH), quinona oxidoreductase (NQO1), heme oxigenase (HMOX1), UDP-glucuronosiltransferases (UGTs), entre outras (ACHARYA et al., 2010). A indução dessas enzimas ocasiona um aumento da detoxificação e eliminação de inúmeros produtos químicos e também de ERO. Em condições basais, a proteína KEAP-1 se liga a NRF-2 e promove sua degradação, já na presença de ERO, KEAP-1 é inativada favorecendo a liberação de NRF-2 e sua translocação para o núcleo (ACHARYA et al., 2010).

A presença de polimorfismo genético em NRF-2 e KEAP-1 que aumentam a proteção tumoral vêm sendo associada a diversas neoplasias, incluindo o câncer de mama (MA, 2013). Polimorfismos genéticos em componentes da via NRF-2 afetam tanto a susceptibilidade ao câncer de mama quanto o quadro clínico dos pacientes (HARTIKAINEN et al., 2012).

Outro importante sistema antioxidante intracelular é o sistema tioredoxina (Trx), que participa do balanço redox intracelular e de inúmeras vias de sinalização (ACHARYA et al., 2010). Nos mamíferos, tanto a Trx quanto a tioredoxina redutase (TrxR) são expressos como isoformas exclusivas para cada localização, sendo predominantemente citosólica (Trx1 e TrxR1) ou mitocondrial (TRX2 e TrxR2) (LIU et al., 2013). Uma terceira forma é encontrada ainda nos espermatozoides (SpTrx) (LIU et al., 2013).

A Trx liga-se as ERO, neutralizando seus efeitos sobre as células. Além disso, a Trx possui outros papéis na regulação celular, como na ativação de ribonucleotídeo redutase, na inibição da quinase 1 reguladora do sinal de apoptose (ASK1), indução do fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1) e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fatores estes que interferem no desenvolvimento do câncer (CADENAS et al., 2010).

A proteína Trx está superexpressa em muitos tipos de câncer podendo ser associado com o crescimento agressivo do tumor e diminuição da sobrevida do paciente e, por esses motivos, vem sendo alvo de estudos para o desenvolvimento de drogas anticâncer (JAMIL & MUSTAFA, 2012; LIU et al., 2013).

Ainda sobre proteínas redox relacionadas ao câncer, podemos citar o sistema glutationa(GSH)/Glutaredoxina (GRx). Essas proteínas estão envolvidas em diversas funções celulares incluindo a regulação redox e sua superexpressão tem sido associada à proteção de células neoplásicas contra apoptose (Acharya et al., 2010).

Um estudo verificou que a alta expressão de glutationa S-transferase citoplasmática está relacionada com uma menor incidência de recorrência local e pior sobrevida global (WOOLSTON et al., 2011). Entretanto, a baixa expressão de glutationa peroxidase citoplasmática relaciona-se com o aumento de recorrência local, o que as tornam possíveis alvos terapêuticos que aumentariam a eficácia de tratamentos baseados na produção de ERO (WOOLSTON et al., 2011).

Diante dessas observações pode-se concluir que o estresse oxidativo participa de maneira expressiva no câncer, sendo associado tanto à carcinogênese e progressão tumoral, como a resposta ao tratamento. Devido a isso, inúmeras substâncias com possíveis efeitos sobre o estado redox, como por exemplo, a cafeína vem sendo estudada no tratamento do câncer de mama.

## **1.5 CAFEÍNA**

A cafeína é um dos compostos mais consumidos no mundo e foi isolada pela primeira vez a partir do café, por volta de 1820. Muitas bebidas comuns como chás e refrigerantes, alimentos contendo cacau ou chocolate, assim como certos medicamentos são fontes importantes de cafeína, porém o café é a fonte mais rica de cafeína podendo ser encontrado aproximadamente 100 mg de cafeína em 240 ml de café na bebida pronta (LUDWIG et al., 2014).

Absorvida rapidamente pelo estômago e intestino, a cafeína se distribui por todos os tecidos, incluindo o cérebro (LUDWIG et al., 2014). No fígado, a cafeína é desmetilada através do citocromo P450 1A2 (CYP1A2) levando à formação de três dimetilxantinas: paraxantina, teobromina e teofilina (BUTT, SULTAN, 2011). Em seguida, esses metabólitos são também desmetilados resultando na formação de metilxantinas que subseqüentemente são oxidados aos correspondentes ácidos úricos (LEE, 2000).

Ainda não há um consenso, mas as doses de cafeína consideradas seguras para o humano são em média 400-450mg para adultos saudáveis, 300mg para mulheres grávidas e 45mg para crianças de 4-6 anos, porém essa dose pode variar

de acordo com alguns fatores genéticos que podem influenciar na metabolização da cafeína (BUTT e SULTAN, 2011).

Uma vez absorvida, a cafeína apresenta inúmeros efeitos fisiológicos e psicológicos como aumento do estado de alerta, redução da fadiga, elevação da pressão arterial, entre outros (Dömötör, Szemerszky, Köteles, 2014). Esses diferentes efeitos devem-se à sua ação em diferentes locais. Uma de suas principais ações é o antagonismo de receptores de adenosina do tipo A1 e A2, que são responsáveis pelo aumento ou diminuição da concentração de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) (NAWROT et al., 2003). Esse antagonismo ocasiona uma inibição da adenosina resultando na liberação de dopamina, norepinefrina e serotonina, substâncias responsáveis por vários efeitos estimulantes do sistema nervoso central (PETZER e PETZER, 2014).

Outra ação que vem sendo muito estudada é sua provável capacidade antioxidante. Já foi relatado que a cafeína, em concentrações milimolares, foi capaz de inibir a peroxidação lipídica ocasionada por três principais espécies reativas de oxigênio (ERO), o radical hidroxil, radical peroxil e ânion superóxido (DEVASAGAYAM et al., 1996). Essa função antioxidante também foi vista em outro trabalho que verificou uma redução dos níveis de óxido nítrico e aumento dos níveis de antioxidante total no soro e tecidos investigados quando administrado uma dosagem de 4,7mg/kg de cafeína em ratos (INKIELEWICZ-STEPNIAK e CZARNOWSKI, 2010). Apesar dessa atividade antioxidante observada, um estudo revelou que essa proteção não ocorre em concentrações mais baixas de cafeína e somente seus metabólitos (metilxantina e ácido úrico) foram capazes de prevenir a lipoperoxidação (LEE, 2000).

Devido a seus inúmeros efeitos, a cafeína passou a ser analisada em estudos epidemiológicos os quais evidenciaram sua participação na redução da incidência de vários tipos de cânceres em humanos e também uma ação protetora em modelos de carcinogênese experimental, Doença de Parkinson e diabetes tipo 2 (SVILAAS et al., 2003; NKONDJOCK, 2009).

Em relação ao câncer, os estudos foram iniciados a partir da década de 70 e desde então esse tema vem sendo bem explorado (STOCKS,1970). Muitas evidências demonstram que a cafeína apresenta efeitos anticâncer via inibição do crescimento celular e indução da apoptose em diferentes linhagens celulares

(HASHIMOTO et al, 2004). Os mecanismos pelo qual a cafeína inibe o crescimento celular podem variar de acordo com a linhagem celular (OKANO et al, 2007).

Um mecanismo muito evidenciado em estudos com cafeína é a sua influência no ciclo celular. Um estudo com a linhagem celular epidérmica murina JB6 Cl 41 observou que a cafeína em altas concentrações (>5mM) ocasionou uma parada do ciclo celular na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> e isso ocorreu devido à inibição da ativação do complexo ciclina - cdk2 (quinase dependente de ciclina 2), essencial para a transição da fase G<sub>1</sub> do ciclo celular para a fase S (HASHIMOTO et al, 2004). Outro estudo analisou o efeito da cafeína em células de carcinoma pulmonar humano após serem expostas a irradiação e verificou que além de induzir a parada do ciclo na fase G<sub>1</sub>, também foi capaz de inibir a parada do ciclo na fase G<sub>2</sub>/M, fato normalmente observado devido ao dano ocasionado pela irradiação, sendo essa ação explicada através do aumento da atividade de Cdk1 (quinase dependente de ciclina 1) (QI, QIAO, MARTINEZ, 2002).

A interrupção no ponto de checagem na fase G<sub>2</sub>/M induz as células a entrarem em mitose antes que a correção dos danos ao DNA aconteça, resultando em posterior morte dessas células (BODE E DONG, 2007). Além dos mecanismos já citados acima, a cafeína apresenta outros alvos moleculares que também influenciam no ciclo celular. Dentre os mais importantes estão as proteínas ATM, a proteína relacionada à ataxia-telangiectasia e Rad3 (ATR) e o p53 (BODE e DONG, 2007).

A indução da apoptose pela cafeína também foi observada em células de adenocarcinoma cervical humano (HeLa) através do aumento da expressão dos níveis de PARP (Poli ADP-ribose polimerase) clivado e fragmentos da clivagem da caspase-3, ocorrendo de maneira dependente da concentração e tempo de exposição a cafeína (LU et al., 2014). Além disso, essa inibição do reparo do DNA pela cafeína faz com que o efeito citotóxico de drogas antineoplásicas seja aumentado (HAYASHI et al., 2005).

Em 1989, pesquisadores apresentaram que a cafeína mostrou sinergismo na inibição do crescimento de células de sarcoma quando associada à cisplatina, ciclofosfamida, mitomicina C e adriamicina (TOMITA e TSUCHIYA, 1989). KAWAHARA e colaboradores também verificaram que a cafeína (0,4 mM) potencializou o efeito antitumoral da cisplatina em ratos portadores de osteosarcoma (KAWAHARA et al, 2008).

## 1.6 CAFEÍNA E O CÂNCER DE MAMA

Poucos estudos apresentam uma relação direta do consumo de cafeína com o câncer de mama, porém vários estudos avaliam essa associação através da observação dos efeitos da ingestão do café, principal fonte de cafeína. Apesar do grande número de estudos epidemiológicos relacionando o consumo do café e o risco de câncer de mama, os resultados não são conclusivos.

Muitos estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de café diminui o risco de câncer de mama (NKONDJOCK et al., 2006; OH et al., 2015; VATTEN, SOLVOLL e LØKEN, 1990), enquanto outros estudos mostram que a sua ingestão não tem nenhuma associação com essa neoplasia (ISHITANI et al., 2008; BHOO et al., 2010; LI et al 2013).

Essas divergências encontradas nos estudos podem estar relacionadas à utilização de populações com características distintas. Há relatos que a associação entre o risco de câncer de mama e a ingestão de café seja distinta de acordo com o condição hormonal (pré e pós menopausa) da mulher (BHOO-PATHY et al., 2015). Além disso, essas diferenças podem ser atribuídas a fatores relacionados ao café, tais como o tipo de grão utilizado e método de preparo, os quais alteram o teor dos principais compostos ativos do café, como a cafeína.

Após esses indícios, alguns trabalhos *in vitro* foram realizados visando identificar a participação da cafeína em células tumorais mamárias e estabelecer possíveis mecanismos de ação da droga. Dentro desse contexto, a cafeína já demonstrou citotoxicidade em linhagens de células de câncer de mama, *in vitro*. Já foi demonstrado que o tratamento com concentrações de 5 - 20mM de cafeína reduziu significativamente a proliferação de algumas linhagens celulares de câncer de mama como a MCF-7. Esta redução variou entre 10 e 40% quando a cafeína foi utilizada isoladamente, porém um efeito sinérgico também foi observado quando a droga foi adicionada às células após tratamento com o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (BELIZARIO, TILLY e SHERWOOD, 1993). Foi relatado também que a cafeína é capaz de sensibilizar células de câncer de mama à radiação ionizante através do aumento da indução de apoptose (ESSMANN et al., 2004).

O trabalho mais recente onde se investigou o efeito da cafeína sobre células de câncer de mama foi realizado por Rosendhal e colaboradores (2015). Esse estudo demonstrou que a cafeína exerce efeitos inibitórios em duas linhagens de câncer de mama, MCF-7 e MDA-MB-231, sendo esse mecanismo atribuído à sua capacidade de alterar os níveis de receptores de estrogênio e fator de crescimento semelhante à insulina 1. Apesar desses efeitos observados, nenhum estudo analisou a participação do estresse oxidativo na ação antiproliferativa da cafeína.

Baseado nisso, o presente trabalho buscou investigar os mecanismos citotóxicos e antiproliferativos da cafeína em células MCF-7 e MDA-MB-231, avaliando o estado oxidativo celular, dano de DNA e as diferentes ações entre as duas linhagens.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Verificar o envolvimento do estresse oxidativo sobre a atividade citostática ou citotóxica da cafeína sobre células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar atividade citotóxica ou citostática da cafeína através de testes de viabilidade e proliferação celular, bem como padrões de morte celular observados.
- Avaliar a geração de estresse oxidativo nas células tratadas com cafeína.
- Determinar se o estresse oxidativo está relacionado com uma ou mais espécies radiculares.
- Avaliar se o estresse oxidativo é capaz de induzir danos no DNA celular.
- Comparar os resultados observados entre as linhagens de células de câncer de mama humano, MCF-7 e MDA-MB-231.

## **4 CONCLUSÃO**

No presente trabalho observamos que embora as células MCF-7 e MDA-MB-231 tenham apresentado diferentes comportamentos ao tratamento com cafeína, em ambas as linhagens a cafeína induz estresse oxidativo e morte celular predominantemente por apoptose. Apesar do aumento das defesas antioxidantes nas células MCF-7, o estresse oxidativo gerado foi capaz de induzir lesões oxidativas no DNA, o que não foi encontrado nas células MDA-MB-231. Por fim, concluímos que o processo de citotoxicidade ocasionado pela cafeína nas linhagens celulares estudadas não foi totalmente dependente da indução do estresse oxidativo, sendo necessários estudos complementares para entender outros mecanismos envolvidos na citotoxicidade da cafeína em células de câncer de mama.

**ANEXO 1: ARTIGO**

**Este artigo foi formatado de acordo com as normas da revista Food &  
Chemical Toxicology**

**Oxidative stress in caffeine action on the proliferation and cell death of breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231.**

Kaliana Larissa Machado <sup>a</sup>, Poliana Camila Marinello <sup>a</sup>, Thamara Nishida Xavier da Silva <sup>c</sup>, Cássio Fernando Nunes da Silva<sup>a</sup>, Flávia Alessandra Guarnier <sup>c</sup>, Rodrigo Cabral Luiz <sup>a</sup>, Rubens Cecchini <sup>b</sup>, Alessandra Lourenço Cecchini <sup>a</sup>.

a Laboratory of Molecular Pathology, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

b Laboratory of Pathophysiology and Free Radicals, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

c Laboratory of Pathophysiology of Muscular Adaptations, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

Corresponding author: Alessandra Lourenço Cecchini

E-mail: [alcecchini@uel.br](mailto:alcecchini@uel.br)

Fax: +55 (43) 3371 42 67

Phone: +55 (43) 3371 4529

Laboratório de Patologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR445, Km 380 Campus Universitário, Londrina, CEP 86051-990, Paraná, Brasil.

## Abbreviations

AChE, Acetylcholinesterase; AO, acridine Orange; ATM, ataxia telangiectasia mutated; ATR, ataxia telangiectasia Rad3-related; BSA, bovine serum albumin; EB, ethidium bromide; ER, estrogen receptor; IGF-IR, insulin-like growth factor-I receptor; MTT, (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide); NR, neutral red; OS, oxidative stress; pAkt, phosphorylated protein kinase B; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; 8-OH-dG, 8-hydroxy-2-deoxy Guanosine.

## Highlights

Caffeine plays cytotoxic properties in MCF-7 and MDA-MB-231 cells

Experimental doses of caffeine is able to induce oxidative stress in MCF-7 and MDA-MB-231 cells

Caffeine induce oxidative DNA lesions in MCF-7 cells

Oxidative stress is not exclusively associated with the cytotoxic effect of caffeine

## Abstract

Epidemiological and experimental studies indicate that caffeine may influence carcinogenic events and increase cellular sensitivity to anticancer agents. Although the effects of caffeine have been investigated, many of their mechanisms are not completely understood. In the present study, the effects of oxidative stress related to the action of caffeine in MCF-7 (estrogen and progesterone receptor) and MDA-MB-231 (triple negative) human breast cancer cells were investigated. The results demonstrated that caffeine has a cytotoxic effect on breast tumor cells. The MCF-7 and MDA-MB-231 cells exhibited different behaviors to caffeine treatment, but in both cell lines the drug induced oxidative stress (OS) and predominantly cell apoptosis. Despite the increased antioxidant defenses in MCF-7 cells, the OS generated was able to induce oxidative DNA lesions in these cells, which was not found in MDA-MB-231 cells. Finally, we concluded that the process of caffeine-driven cytotoxicity to the cell lines investigated in this study had the participation of OS induction, but further studies are necessary to better understand another mechanism involved in caffeine cytotoxicity to breast cancer cells.

Keywords: Caffeine, Breast Cancer, Cancer treatment, Oxidative Stress.

## 1. Introduction

Present in numerous dietary sources, including coffee, tea, energetic drinks and chocolate, caffeine is the most consumed active substance in the world (Sabisz, Skladanowski, 2008). Many studies have highlighted the association of caffeine with various diseases, including cancer (Svilaas et al., 2003; Nkondjock, 2009; Butt, Sultan, 2011).

Otherwise, it has been reported that caffeine affects cell cycle, suppresses cell proliferation, induces cell death and enhances the toxicity of antitumor agents (Hashimoto et al., 2004; Kawahara et al., 2008; Sabisz, Skladanowski, 2008; Ku et al., 2011; Niknafs, 2011). All these actions are suggestive that caffeine could be considered a supplement in the prevention or coadjuvant in the treatment of cancer.

In relation to breast cancer, epidemiological studies have shown that coffee intake, whose main component is caffeine, may have a protective effect (Li et al., 2011; Tang et al., 2009; Vatten et al., 1990). It was demonstrated that moderate to high coffee consumption is associated with low recurrence for breast cancer in tamoxifen-treated patients (Rosendahl et al., 2015). Furthermore, studies have demonstrated that caffeine is cytotoxic to breast cancer cells *in vitro* and radiosensitizes cells through apoptosis induction (Belizario et al., 1993; Essmann et al., 2004).

It was seen that caffeine impaired cell cycle progression and enhanced cell death in human breast cancer cells positive to hormone receptors, MCF-7, and triple negative, MDA-MB-231 cells. This effect occurred by reduction of estrogen receptor (ER) and cyclin D1 in MCF-7 cells and also by the reduction in the insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) and in the phosphorylated Akt in both cell lines (Rosendahl et al., 2015). Besides this, the drug sensitizes MCF-7 cells to ionizing radiation-mediated lethal mitosis by abrogation of G2-M arrest (Essmann et al., 2004). This effect on cell cycle was observed only in tumor cells, showing no abrogation of the cell cycle in normal cells (Jha et al., 2002). In addition to effects on cell cycle, it was found that caffeine induces two forms of cell death (apoptotic and nonapoptotic) in MCF-7 cells, individually or in combination with cisplatin (Niknafs, 2011).

Although caffeine has presented interesting effects against breast cancer cells, its mechanisms of action are not fully understood and there are no reports about participation of oxidative stress in the cytotoxic effect of caffeine.

It was demonstrated that oxidative stress (OS) is related with the progression of breast cancer, (Panis et al., 2012). Furthermore, it is known that several anticancer drugs used in breast cancer possess OS-dependent cytotoxic mechanisms (Pelicano et al., 2004; Trachootham et al., 2009). With this in mind, we hypothesize that caffeine could be cytotoxic to human breast cancer cells through the induction of OS. To answer this question, in this work we compared the caffeine effects in two different subtypes of breast cancer cells: MCF-7 and MDA-MB- 231 cells, investigating the participation of OS in the mechanisms of drug cytotoxicity.

## **2. Methods and Materials**

### *2.1. Cell culture*

MCF-7 cells (ATCC® HTB-22™, ATCC, Manassas, VA, USA) were seeded in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient mixture (DMEM) (Gibco® Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (DMEM 10% FBS), and 1% penicillin-streptomycin mixture. Cells were maintained in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C (Sanyo CO<sub>2</sub> Incubator; Sanyo, Japan). MDA-MB-231 cells (ATCC® CRM-HTB-26D™, ATCC, Manassas, VA, USA) were grown in the same culture medium (DMEM) and supplements, with the addition of 8,4mM HEPES (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) buffer, and maintained at the same conditions.

### *2.2 Treatment*

Caffeine (Labsynth, Sao Paulo, Brazil) was dissolved in culture media for each experiment and concentrations (1; 2.5; 5 and 10mM) were used in accordance with previous studies. Control cells received only culture media. Cells were then treated for 24 hours, only proliferation curves were performed after 24 and 48 hours of treatment. All experiments were performed in triplicate and three independent replicates.

### 2.3. Total protein analysis

Protein was determined by the method of Lowry et al., 1951 modified by Miller, 1959. It was used bovine serum albumin (BSA) as standard and total protein content was measured using a microplate reader (Multiskan GO; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at 660nm. The results were used to adjust the values of total thiol and intracellular malondialdehyde (MDA) levels.

### 2.4. Cell viability

Cell viability was measured by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, MTT) and NEUTRAL RED (NR) assay, as described by Mosmann, 1983 and Borenfreund, Puerner, 1984 respectively. To perform the MTT assays, the cells were seeded in 24-well plates at a density of  $1 \times 10^5$  cells/well. After overnight incubation, they were treated with 1, 2.5, 5 and 10 mM of caffeine at 37 °C for 24 h. After treatment, 0.4mM MTT solution was added and incubated at 37°C for 4h. The formazan crystals formed were dissolved using dimethylsulfoxide . Results were measured using a microplate reader (Multiskan GO; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at 540 nm.

To perform the NR assay, the cells were seeded, incubated and treated in the same conditions of MTT assay. After 24 hours of treatment, 114  $\mu$ M NR solution was added. The incorporation of NR by living cells was observed after 3 hours of incubation, at 37°C. The cells were washed with acetic acid-ethanol mixture (1.0 ml glacial acetic acid in 100 ml 50% ethanol) and measured using a microplate reader (Multiskan GO; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at 540 nm. Results were expressed as the percentage of viability (%) compared to control.

### 2.5. Cell proliferation

The cells were seeded in 24-well plates at a density of  $1 \times 10^5$  cells/well. After treatment for 24 h and 48 h, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and trypsinized (trypsin 0.5%). The cells were then enumerated using a Neubauer chamber. The results were expressed in number of cells.

### 2.7. Determination of the rates of cellular apoptosis and necrosis

The rates of cellular apoptosis and necrosis were assessed by Ethidium bromide (EB) and acridine orange (AO) staining. After treatment, the coverslip-adherent cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and incubated

with 10  $\mu$ L PBS containing 10  $\mu$ g/mL of EB and 3  $\mu$ g/mL of AO as described by Sun et al. (2011). The cells stained by EB and AO were immediately visualized under an Olympus Fluorescence System Microscope BX3-URA (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Multiple photos were taken at randomly-selected areas of the coverslips to ensure that the data obtained were representative.

## 2.8. Oxidative stress parameters

### 2.8.1. Determination of lipid peroxidation levels

To reveal if oxidative stress was involved in cytotoxic mechanisms of caffeine, the lipid peroxidation levels were measured by two methods: through tert-butyl hydroperoxide (*t*-BHP)-initiated chemiluminescence, as previously described by Gonzalez Flecha et al., 1991 and by the detection of MDA, as described by Victorino et al., 2013, with some modifications. In the first case, it was used a cell suspension in culture medium and, to improve the reaction, 10  $\mu$ L of a hemin solution was used (Zamburlini et al., 1995). The luminescence was measured in a luminometer Turner Designers TD 20/20 with 300-650nm response at 30 °C in low light and temperature controlled environment for 30 min. The results were expressed in relative light units (URL)/number of cells.

We also analyzed the lipid peroxidation by the detection of the malondialdehyde intracellular levels, a secondary product of lipid peroxidation. To do this, it was used a high performance liquid chromatograph (Shimadzu HPLC-20AT) equipped with a pump and LC20AT UV absorbance detector SPDM20A diode-array employing a reverse phase C18 column, without the use of pre-column. The cells suspension were incubated with perchloric acid and then with 0.5M thiobarbituric acid at 100 °C for 30 minutes. The reaction was stopped by cooling on ice and centrifuged at 5,000  $\times$ g at 4°C. The absorbances were recorded at 535nm during 11 min and the results were expressed in nM MDA/protein (g).

### 2.8.2. Determination of total thiol levels

To determine the antioxidant profile of the caffeine-treated cells, total thiol levels were measured as previously described by Panis et al., 2013. Total thiol groups were calculated using a calibration curve prepared by GSH (Sigma Aldrich) and the results were expressed in  $\mu$ M thiol/ protein (g).

## 2.9. Determination of DNA damage

The oxidative DNA damage was analyzed through of detection of free 8-hydroxy-2-deoxy Guanosine (8-OH-dG) in fetal bovine serum-free medium by EIA kit (Caymam Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) and comet assays. The first assay is based on the competition between oxidatively damage guanine species and an 8-OH-dG- acetylcholinesterase (AChE) conjugate for a limited amount of DNA oxidative damage monoclonal antibody. Because the concentration of the 8-OH-dG Tracer is held constant while the concentration of 8-OH-dG varies, the amount of 8-OH-dG Tracer that is able to bind to the 8-OH-dG monoclonal antibody will be inversely proportional to the concentration of 8-OH-dG in the well.

The antibody- 8-OH-dG complex binds to the goat polyclonal anti-mouse IgG that has been previously attached to the well. The plate was washed to remove any unbound reagents and then Ellman's reagent (which contains the substrate to AChE) was added to the well. The product of this enzymatic reaction has a distinct yellow color. The intensity of this color was measured using a microplate reader at 412nm and the results were expressed in pg/mL of 8-OHdG.

The comet assay was performed according to Tice (1995). After 24 hours of drug exposure, the cells were trypsinized and subsequently mixed with low melting point agarose (LMP 0.5%) and deposited on pre-gelatinized slides (1.5% agarose). After solidification of agarose gel, the coverslip was removed and slides were incubated in a lysis solution for 40 minutes. After this period, the slides were then subjected to alkaline electrophoresis (pH 13.0; 25 V; 300 mA; 4°C). All steps were performed under indirect light. Finally, the slides were treated with pH-neutralizing buffer, fixed with ethanol, and stained with GelRed (33%). For each slide, 100 random nucleoids were blindly examined at a magnification of 400x, using a fluorescence microscope (excitation filter: 420–490 nm; emission filter: 520 nm) connected to an image capture system. To determine the % DNA in tail of each nucleoid, CometScore™ freeware (version: 1.5; TriTek, Sumerduck, VA, USA) was used. Apoptotic/necrotic nucleoids with extensive DNA damage were not included in the analysis. The mean value of the % DNA in tail was considered an index of DNA damage.

## 2.10. Role of ROS in caffeine cytotoxicity

To investigate the possible reactive species that were involved in the caffeine mechanisms of cytotoxicity, the cells were treated with 10mM of caffeine and stimulated in presence and absence of three different specific reactive oxygen species ROS scavengers: histidine, superoxide dismutase (SOD) and TROLOX (singlet oxygen, superoxide anion and peroxy radical scavengers, respectively) and then the cell viability was measured by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, MTT) as described by Mosmann, 1983.

## 2.11. Statistical analysis

Results were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. Data were analyzed for normality. For parametric data it was used one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's post test. For nonparametric data, it was used Kruskal-Wallis test for comparisons against control group. For comet assay, t-test was used. Data analysis was conducted using GraphPad Prism (version 5; San Diego, CA, USA) and significance was assigned for  $p < 0.05$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$  and \*\*\*  $p < 0.0001$ .

## 3. Results

### 3.1. Effects of caffeine on cell viability

To study the cytotoxicity of caffeine it was employed two different assays, MTT and Neutral Red, after 24 hours of treatment. In the MTT assay, caffeine significantly reduced MCF-7 cell viability in concentrations equal or higher than 2.5 mM and in MDA-MB-231 cell this effect only was observed at 5 and 10mM (Figure 1A).

In Neutral Red assay, the reduction in cell viability was observed in all tested concentrations, in both cell lines (Figure 1B).

### 3.2. Effects of caffeine on cell proliferation

The effect of caffeine on cell proliferation was also investigated. As shown in figure 1C, treatment with caffeine for 24h in both cell lines did not show any decline in cell proliferation. However, after 48h of exposure, caffeine decrease MCF-7 cell growth in all tested concentrations and reduced MDA-MB-231 proliferation cells at 5 and 10mM.

### 3.3. Cell death patterns

The analysis of cell death patterns by EB / AO stain revealed that caffeine was able to induce apoptosis (gray column) and necrosis (black column) in MCF-7 (2A) and in MDA-MB-231 cells at 5 and 10mM (2B).

### 3.4. Oxidative stress parameters

When measured by the *t*-BHP chemiluminescence, the lipid peroxidation levels were increased in MCF-7 cells treated with 5 and 10mM of caffeine (Fig. 4A). However, in MDA-MB-231 cells this effect was only observed at 10mM of caffeine (Fig. 4B). However, the MDA levels were not altered in MCF-7 cells (Fig.4C), but in MDA-MB-231 cells, it was observed increases in MDA levels in concentrations equal to or higher than 2.5mM of caffeine (Fig. 4D). The quantification of total thiol levels demonstrated that caffeine increased the cellular antioxidant defenses at 2.5, 5 and 10mM of caffeine in MCF-7 cells (Fig. 4E) but not cause any alteration in MDA-MB-231 cells (Fig. 4F).

### 3.5. Alterations in DNA

The effect of caffeine on the genetic material of human breast cancer cells was investigated by 8-OhdG levels and comet assay. The 8-OhdG levels increased in MCF-7 cells at all concentrations of caffeine but no alteration was observed in MDA-MB-231 cells (Fig. 4A). The comet assay did not show any alteration in the cells MCF-7 and MDA-MB-231 treated with caffeine (Fig. 4B).

### 3.6. Role of ROS in caffeine cytotoxicity

In the Fig 5A and 5B are presented the cellular viability of both lineages of cells, after treating them with 10mM of caffeine and incubation in the presence and absence of three different specific reactive oxygen species ROS scavengers: histidine (singlet oxygen), SOD (superoxide anion) and TROLOX (peroxyl radical scavengers). The presence of all scavengers were not able to restore cell viability at control levels in both cell lines, demonstrating that these oxygen reactive species were not directly involved in the mechanism of caffeine cytotoxicity.

#### 4. Discussion and Conclusion

The activity of caffeine in cancer disease has been studied since decade of 1970 (Stocks, 1970). Studies have demonstrated that caffeine has cytotoxic effect alone or in combination with different chemotherapeutic agents in several types of cancer (Qi et al., 2002; Okano et al., 2008; Kimura et al., 2009; Ku et al., 2011; Motegi et al., 2013). In breast cancer, it was related that the indirect consumption of the drug decrease breast cancer risk (Baker et al., 2006; Li et al., 2011). Experimental studies reported that the drug interferes with cell cycle and induces apoptosis (Essmann et al., 2004; Rosendahl et al., 2015).

It is known that breast cancer is a heterogeneous disease and that the prognosis and treatment response differ between disease subtypes. Therefore, in the present study the effect of caffeine was analyzed in two breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231, which corresponds to luminal and triple negative breast cancer, respectively.

The results showed that caffeine was efficient in reducing cell viability by interfering with the cell metabolism and the lysosomal function after 24 hours of treatment. This can be observed by the MTT assay, which measures NAD(P)H-dependent cellular metabolic activity and predominantly occurs in the mitochondria and by the neutral red assay, which measures lysosomal function based on the capacity of viable cells incorporate the neutral red dye, a weakly cationic dye that readily diffuses through the plasma membrane and concentrates in the lysosomes (Mosmann, 1983; Borenfreund, Puerner, 1984). As well as reported by Rosendahl et al, the MCF-7 cells apparently was more liable to the cytotoxic effects of caffeine. The concentrations that significantly reduced cell viability in MCF-7 cells were from 2.5mM whereas in MDA-MB-231 cells we observed a reduction only from 5mM of caffeine. This difference between the line cells was also observed for proliferative capacity which was more evident in MCF-7 cells, showing that these cells were more susceptible to the cytotoxic and cytostatic effect of caffeine.

Since caffeine may trigger apoptosis in several cancer type (Dubrez et al., 2001; Qi et al., 2002; Ku et al., 2011) we further conducted EB/AO staining to qualitatively and quantitatively estimate the effects of caffeine on cell death. Our results showed that the amount of dead cells was elevated after treatment with 5 and 10mM of caffeine, and that apoptosis predominated over necrosis in both cell lines. Despite the similarity in apoptosis rate between the two lineages, MCF-7 cells seems

to be more susceptible to the effects of caffeine than MDA-MB-231, showing a higher percentage of necrotic cells and consequently reduction in the number of viable cells.

It was reported that ROS play an important role in apoptosis and many substances have showed ability to induce apoptosis in cancer cells by increasing ROS (Akimoto et al., 2015; Jiang et al., 2015; Zhang et al., 2015). Alteration of normal homeostasis of ROS can also inflict direct damage to lipids which is followed by formation of many secondary products, as MDA. This metabolite is one of the most mutagenic products formed and has been widely used as a biomarker for lipid peroxidation (Ayala et al., 2014). On the other hand, antioxidant plays important role for maintaining the balance of ROS levels since they inhibits formation of free radicals and prevents lipid peroxidation by inactivating free radicals. Much of this protective effect is attributed to the thiol groups, a class of organic compounds that contain a sulfhydryl group (-SH).

In MCF-7 cells, caffeine significantly increased the level of membrane lipid peroxides at concentrations of 5.0 and 10mM but interestingly, these levels were not followed by an increase in MDA levels, which remained close to the control values. However, despite the increased membrane lipid peroxides, cellular total thiol levels increased with caffeine treatment in these cells. In MDA-MB-231 cells, the increase in membrane lipid peroxides occurred only with the highest concentration (10mM), however, MDA levels increased at concentrations equal to or higher than 2.5 mM of caffeine, and total thiol levels did not alter. Our findings suggest that MCF-7 cells responded to oxidative damage increasing significantly the antioxidant defenses that impaired the action of free radicals and thus prevented the formation of MDA. The MDA-MB-231 cells in turn did not exhibit any alteration in antioxidant levels, demonstrating that there was not any protective action against lipid peroxidation, which led to a significant production of MDA.

The exposition of cells to oxidative stress frequently causes DNA damage (Halliwell, Aruoma, 1991). When DNA is oxidized several products are formed. One of these products, 8-OHdG, have been used as an indicator of DNA oxidative damage (Pilger, Rüdiger, 2006). Thus, we investigated if caffeine was able to induce oxidative lesions in DNA and we observed different response patterns between lineages. Treatment increased the levels of 8-OHdG in MCF-7 cells and it was accompanied by alterations in DNA integrity. Whereas, in MDA-MB-231 cells there was no alteration in 8-OHdG levels and the DNA damage was only observed in the

highest concentration of caffeine indicating that these cells were more resistant to DNA damage caused by caffeine than MCF-7 cells. Despite the observation that caffeine significantly increased OS in both cell lines studied here, the association of different scavengers with caffeine (10 mM) did not recover the viability of cells (MCF-7 and MDA-MB-231) suggesting the participation of other ROS, different from anion superoxide, singlet oxygen or peroxy radical as causative agents of the oxidative damage. Additionally, other mechanisms should not be discarded and deserve to be investigated.

In conclusion, the analysis of the results demonstrated that although MCF-7 and MDA-MB-231 cells exhibited different behaviors to caffeine treatment, in both cell lines the drug induced OS and predominantly apoptosis cell death. Moreover, despite the increased antioxidant defenses in MCF-7 cells, the OS generated was able to induce oxidative DNA lesions in these cells, which was not found in MDA-MB-231 cells. Finally, we concluded that oxidative stress is present in the process of caffeine-driven cytotoxicity to the cell lines investigated in this study. Furthermore, that at least, oxygen singlet, superoxide and peroxy radical do not participate in this process alone. Also, further studies are necessary to better understand another mechanism involved in caffeine cytotoxicity to breast cancer cells.

### **Acknowledgments**

This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### **Conflict of Interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## References

- AKIMOTO M, IIZUKA M, KANEMATSU R, YOSHIDA M, TAKENAGA K., 2015 Anticancer Effect of Ginger Extract against Pancreatic Cancer Cells Mainly through Reactive Oxygen Species-Mediated Autotic Cell Death. PLoS One. 10
- AYALA A, MUÑOZ MF, ARGÜELLES S., 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxid Med Cell Longev.
- BAKER JA, BEEHLER GP, SAWANT AC, JAYAPRAKASH V, MCCANN SE, MOYSICH KB., 2006. Consumption of coffee, but not black tea, is associated with decreased risk of premenopausal breast cancer. J. Nutr. 136, 166-171.
- BELIZARIO J.E., TILLY J.L., SHERWOOD S.W., 1993. Caffeine potentiates the lethality of tumor necrosis factor in cancer cells. Br. J. Cancer. 67, 1229-1235.
- BORENFREUND E, PUERNER JA., 1984. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). J. Tissue Culture Methods 9, 7-9.
- BUTT MS, SULTAN MT. 2011. Coffee and its consumption: benefits and risks. Crit Rev. Food Sci Nutr. 51, 363-373.
- DUBREZ L, COLL JL, HURBIN A, SOLARY E, FAVROT MC., 2001. Caffeine sensitizes human H358 cell line to p53-mediated apoptosis by inducing mitochondrial translocation and conformational change of BAX protein. J Biol Chem. 276, 38980-38987.
- ESSMANN F, ENGELS IH, TOTZKE G, SCHULZE-OSTHOFF K, JÄNICKE RU., 2004. Apoptosis resistance of MCF-7 breast carcinoma cells to ionizing radiation is independent of p53 and cell cycle control but caused by the lack of caspase-3 and a caffeine-inhibitable event. Cancer Res. 64, 7065-7072.

GONZALEZ-FLECHA B, LLESUY S, BOVERIS A., 1991. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med.* 10, 93-100.

HALLIWELL B, ARUOMA OI. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 281, 9-19.

HASHIMOTO T, HE Z, MA WY, SCHMID PC, BODE AM, YANG CS, DONG Z., 2004. Caffeine inhibits cell proliferation by G0/G1 phase arrest in JB6 cells. *Cancer Res.* 64, 3344-3349.

JHA MN, BAMBURG JR, BERNSTEIN BW, BEDFORD JS., 2002. Caffeine eliminates gamma-ray-induced G2-phase delay in human tumor cells but not in normal cells *Radiat Res.* 157, 26-31.

KAWAHARA M, TAKAHASHI Y, TAKAZAWA K, TSUCHIYA H, TOMITA K, YOKOGAWA K, MIYAMOTO K., 2008. Caffeine dose-dependently potentiates the antitumor effect of cisplatin on osteosarcomas. *Anticancer Res.* 28,1681-1685.

KIMURA H, TSUCHIYA H, SHIRAI T, NISHIDA H, HAYASHI K, TAKEUCHI A, OHNARI I, TOMITA K., 2009. Caffeine-potentiated chemotherapy for metastatic osteosarcoma. *J Orthop Sci.* 14, 556-565.

KU BM, LEE YK, JEONG JY, RYU J, CHOI J, KIM JS, CHO YW, ROH GS, KIM HJ, CHO GJ, CHOI WS, KANG SS., 2011. Caffeine inhibits cell proliferation and regulates PKA/GSK3 $\beta$  pathways in U87MG human glioma cells. *Mol Cells.* 31(3), 275-279.

LI J, SEIBOLD P, CHANG-CLAUDE J, FLESCHE-JANYS D, LIU J, CZENE K, HUMPHREYS K, HALL P., 2011. Coffee consumption modifies risk of estrogen-receptor negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 13, R49.

LOWRY OH, ROSENBOUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265–275.

MILLER GL. Protein determination for larger numbers of samples.,1959. Anal Chem 31, 964.

MOSMANN T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 65, 55-63.

MOTEGI T, KATAYAMA M, UZUKA Y, OKAMURA Y., 2013. Evaluation of anticancer effects and enhanced doxorubicin cytotoxicity of xanthine derivatives using canine hemangiosarcoma cell lines. Res Vet Sci. 95(2), 600-605.

NIKNAFS B., 2011. Induction of apoptosis and non-apoptosis in human breast cancer cell line (MCF-7) by cisplatin and caffeine. Iran Biomed J. 15, 130-133.

NKONDJOCK A., 2009 Coffee consumption and the risk of cancer: an overview. Cancer Lett. 277, 121-125.

OKANO J, NAGAHARA T, MATSUMOTO K, MURAWAKI Y., 2008. Caffeine inhibits the proliferation of liver cancer cells and activates the MEK/ERK/EGFR signaling pathway. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 102, 543-551.

PANIS C, HERRERA AC, VICTORINO VJ, CAMPOS FC, FREITAS LF, DE ROSSI T, COLADO SIMÃO AN, CECCHINI AL, CECCHINI R., 2012. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. Breast Cancer Res Treat. 133, 89-97.

PANIS C, HERRERA AC, VICTORINO VJ, ARANOME AM, CECCHINI R. 2013. Screening of circulating TGF- $\beta$  levels and its clinicopathological significance in human breast cancer. Anticancer Res. 33, 737-742.

PELICANO H, CARNEY D, HUANG P., 2004. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. Drug Resist Updat. 7, 97-110.

PILGER A, RÜDIGER HW., 2006. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Occup Environ Health.* 80, 1-15.

QI W, QIAO D, MARTINEZ JD., 2002. Caffeine induces TP53-independent G(1)-phase arrest and apoptosis in human lung tumor cells in a dose-dependent manner. *Radiat Res.* 157,166-174.

REPETTO, M. et al., 1996. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. In: (Ed.). *Clin Chim Acta. Netherlands* 255, 107-117.

ROSENDAHL AH, PERKS CM, ZENG L, MARKKULA A, SIMONSSON M, ROSE C, INGVAR C, HOLLY JM, JERNSTRÖM H., 2015. Caffeine and caffeic acid inhibit growth and modify estrogen receptor (ER) and insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) levels in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 21, .CCR-14-1748.

SABISZ M, SKLADANOWSKI A., 2008. Modulation of cellular response to anticancer treatment by caffeine: inhibition of cell cycle checkpoints, DNA repair and more. *Curr Pharm Biotechnol.* 9, 325-336.

STOCKS P., 1970. Cancer mortality in relation to national consumption of cigarettes, solid fuel, tea and coffee. *Br. J. Cancer* 24, 215-225.

SUN Y, LI Y, WU H, WU S, WANG YA, LUO D, LIAO DJ., 2011. Effects of an Indolocarbazole-Derived 16 CDK4 Inhibitor on Breast Cancer Cells. *J Cancer.* 2, 36–51.

SVILAAS, A., SAKHI, A.K., ANDERSEN, L.F., SVILAAS, T., STRÖM, E.C., JACOBS, D.R., OSE, L., BLOMHOFF, R., 2004. Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. *J. Nutr.* 134, 562–567.

TANG N, ZHOU B, WANG B, YU R. 2009. Coffee consumption and risk of breast cancer: a metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol.* 200, 290.e1-9.

TICE R.R., AGURELL E., ANDERSON D., BURLINSON B., HARTMANN A., KOBAYASHI H., MIYAMAE Y., ROJAS E., RYU J.C., SASAKI Y.F., 2000. Single Cell Gel/Comet assay: Guideline for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206-221.

TRACHOOTHAM D, ALEXANDRE J, HUANG P., 2009. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov.* 8, 579-591.

VATTEN LJ, SOLVOLL K, LØKEN EB. 1990. Coffee consumption and the risk of breast cancer. A prospective study of 14,593 Norwegian women. *Br J Cancer.* 62, 267-270.

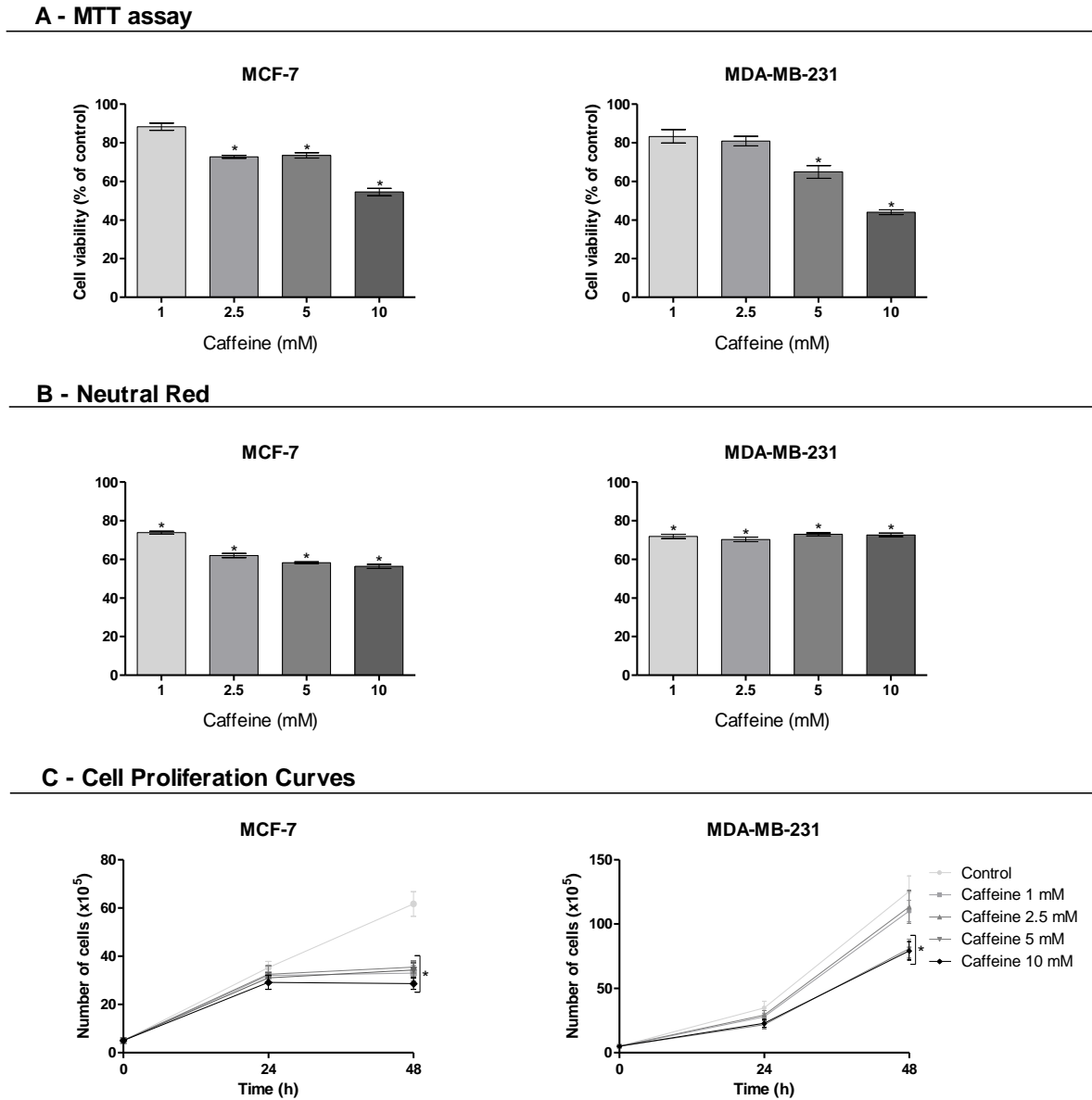
VICTORINO VJ, PANIS C, CAMPOS FC, CAYRES RC, COLADO-SIMÃO AN, OLIVEIRA SR, HERRERA ACSA, CECCHINI AL, CECCHINI R., 2013. Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal women. *AGE* 35, 1411-1421.

ZAMBURLINI A, MAIORINO M, BARBERA P, ROVERI A, URSINI F., 1995. Direct Measurement by Single Photon Counting of Lipid Hydroperoxides in Human Plasma and Lipoproteins. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 232, 107–113.

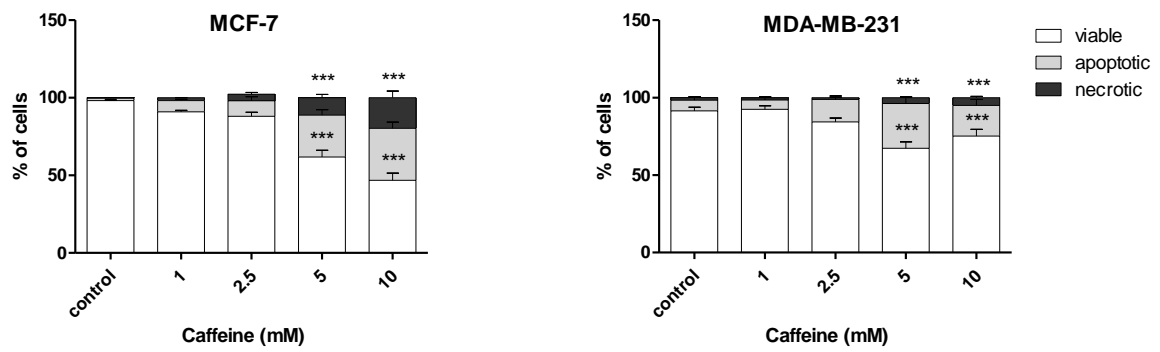
ZHANG Q, CUI C, CHEN CQ, HU XL, LIU YH, FAN YH, MENG WH, ZHAO QC., 2015. Anti-proliferative and pro-apoptotic activities of *Alpinia oxyphylla* on HepG2 cells through ROS-mediated signaling pathway. *J Ethnopharmacol.* 169, 99-108.

## FIGURES

Figure 1



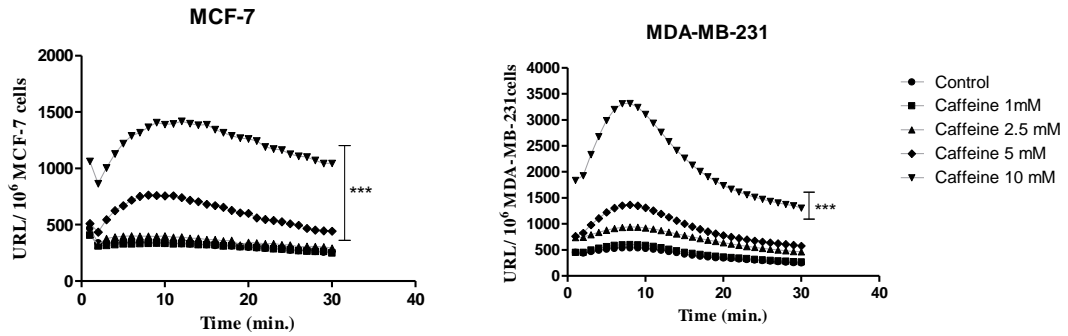
**Figure 1. Cytotoxic effect of caffeine in human breast cancer.** Evaluation of caffeine cytotoxicity at different concentrations (1, 2.5, 5 and 10 mM) in MCF-7 and MDA-MB-231 cells, after 24 h and 48 h (only in proliferation curves) of treatment. A: MTT assay, B: Neutral red assay, C: Proliferation curve. Statistical analyses were performed. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ ; \*\*\* $p < 0.0001$  statistically different from the control group.

**Figure 2**

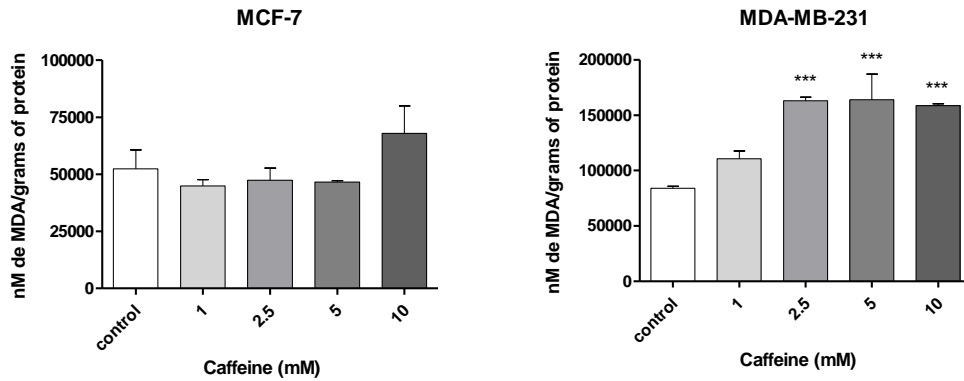
**Figure 2. Effect of caffeine on death pattern.** Pattern of cell death studied through of differential between apoptosis (gray columns) and necrosis (black columns) in MCF-7 cells and MDA-MB-231 cells (2B) after 24 hours of treatment with 1, 2.5, 5 and 10mM of caffeine. Statistical analyses were performed. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  statistically different from the control group.

**Figure 3**

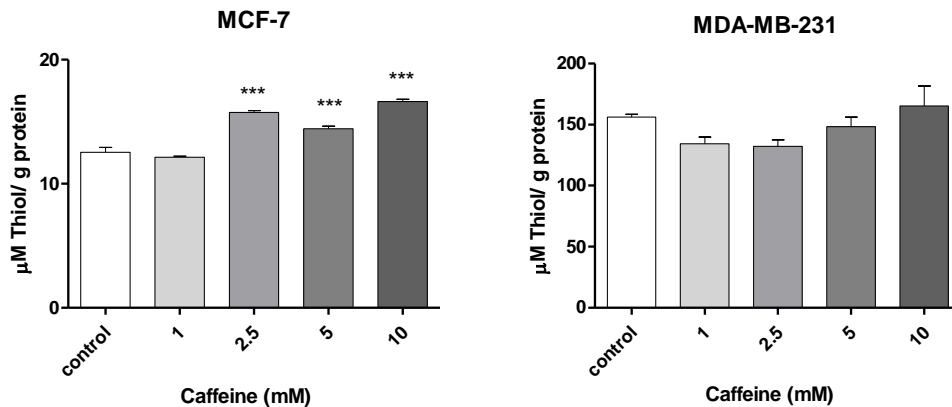
**A- Lipid Peroxidation**



**B - Malondialdehyde Levels**



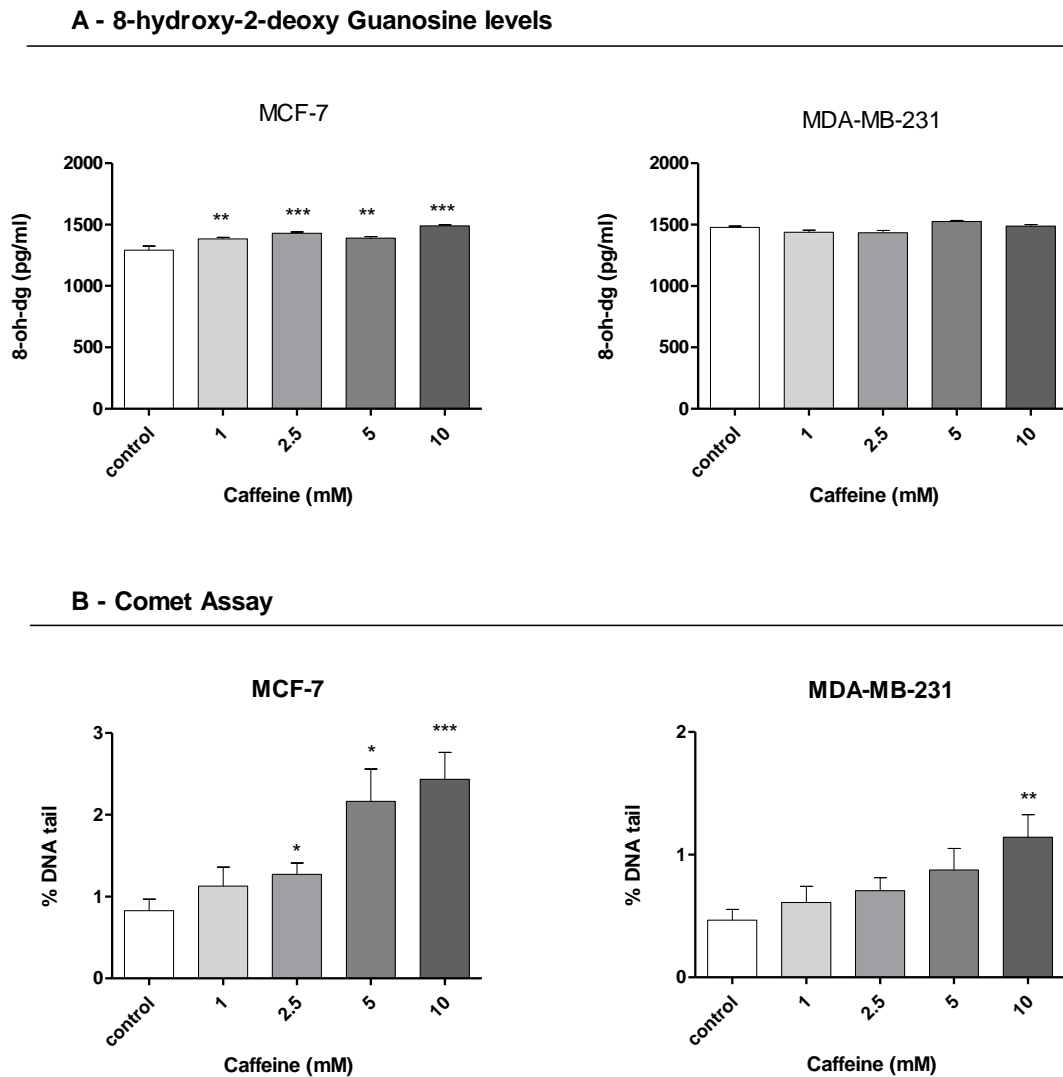
**C - Total Thiol**



**Figure 3. Caffeine induces oxidative stress in human breast cancer.** Induction of oxidative stress after caffeine treatment at different concentrations (1, 2.5, 5 and 10mM) in MCF-7 and MDA-MB-231 cells after 24 h of treatment. A: Membrane lipid peroxide levels. B: Malondialdehyde levels. C: Total Thiol levels. Statistical analyses

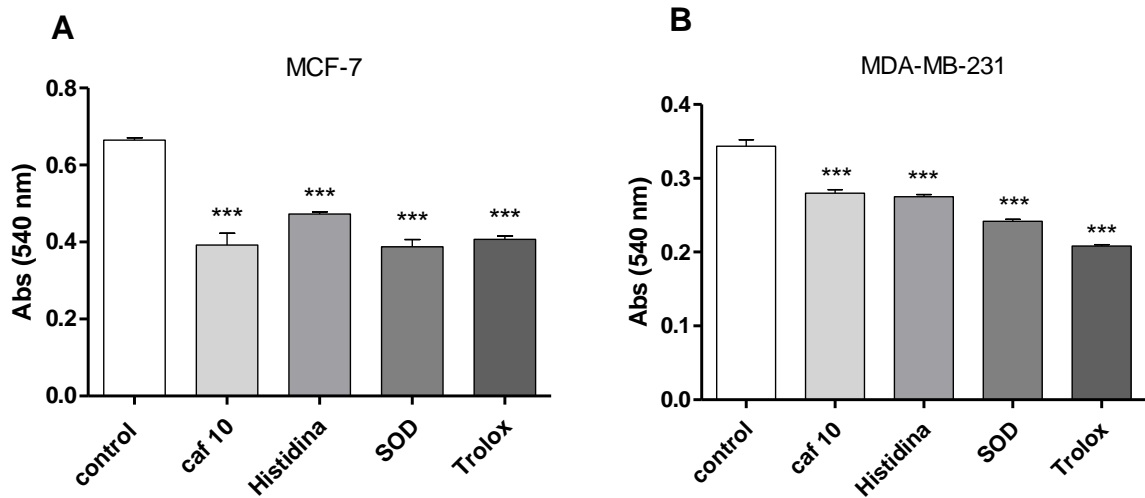
were performed. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  statistically different from the control group.

**Figure 4**



**Figure 4. DNA alterations.** Evaluation of oxidative DNA damage after 24 hours of treatment with 1, 2.5, 5 and 10 mM of caffeine in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. A: 8-hydroxy-2-deoxy Guanosine levels. B: Comet Assay. Statistical analyses were performed. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  statistically different from the control group.

Figure 5



**Figure 5. Oxidative stress mediates caffeine cytotoxicity.** Evaluation of caffeine cytotoxicity by MTT assay at 10 mM in presence and absence of specific ROS scavengers: histidine, SOD and Trolox in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Statistical analyses were performed. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  statistically different from the control.

## REFERÊNCIAS

ACHARYA, A., DAS,I., CHANDHOK D. AND SAHA T. Redox regulation in câncer: A double-edged sword with therapeutic potential. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.3, p. 23-34, 2010.

ALKEN, S., KELLY, C. M. Benefit risk assessment and update on the use of docetaxel in the management of breast cancer. **Cancer Management and Research**. v.5, p. 357–365, 2013.

BERIWAL S, SCHWARTZ GF, KOMARNICKY L, GARCIA-YOUNG JA. Breast-conserving therapy after neoadjuvant chemotherapy: long-term results. **Breast Journal**. v.12, n.2, p.159-64, 2006.

BODE AM, DONG Z. The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. **Cancer Letter**. v.247, n.1, p.26-39, 2007.

BHOO PATHY N, PEETERS P, VAN GILS C, BEULENS JW, VAN DER GRAA Y, BUENO-DE-MESQUITA B, BULGIBA A, UITERWAAL CS. Coffee and tea intake and risk of breast cancer. **Breast Cancer Research Treatment** . v.121, n.2, p.461-7, 2010.

1.

BHOO-PATHY N, PEETERS PH, UITERWAAL CS, BUENO-DE-MESQUITA HB, BULGIBA AM, BECH BH, OVERVAD K, TJØNNELAND A, OLSEN A, CLAVEL-CHAPELON F, FAGHERAZZI G, PERQUIER F, TEUCHER B, KAAKS R, SCHÜTZE M, BOEING H, LAGIOU P, ORFANOS P, TRICHOPOULOU A, AGNOLI C, MATTIELLO A, PALLI D, TUMINO R, SACERDOTE C, VAN DUIJNHOFEN FJ, BRAATEN T, LUND E, SKEIE G, REDONDO ML, BUCKLAND G, PÉREZ MJ, CHIRLAQUE MD, ARDANAZ E, AMIANO P, WIRFÄLT E, WALLSTRÖM P, JOHANSSON I, NILSSON LM, KHAW KT, WAREHAM N, ALLEN NE, KEY TJ, RINALDI S, ROMIEU I, GALLO V, RIBOLI E, VAN GILS CH. Coffee and tea consumption and risk of pre- and postmenopausal breast cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort study. **Breast Cancer Research**. v.17, n.1, p.15, 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Controle dos cânceres do colo do útero e da mama / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, **Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2013.** 124 p.: il. (Cadernos de Atenção Básica, n. 13)

BUTT MS, SULTAN MT. Coffee and its consumption: benefits and risks. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.** v.51, n.4, p.363-73, 2011.

BROOKS SC, LOCKE ER, SOULE HD. Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. **Journal of Biological Chemistry.** v.248, n.17, p.6251-3, 1973

CADENAS C., FRANCKENSTEIN D., SCHMIDT M., GEHRMANN M., HERMES M., GEPPERT B., SCHORMANN W., MACCOUX L. J. et al. Role of thioredoxin reductase 1 and thioredoxin interacting protein in prognosis of breast cancer. **Breast Cancer Research.** v.12, n.3, 2010.

CAILLEAU R, YOUNG R, OLIVÉ M, REEVES WJ JR. Breast tumor cell lines from pleural effusions. **Journal of the National Cancer Institute.** v.53, n.3, p.661-74, 1974.

CHEN AM, MERIC-BERNSTAM F, HUNT KK, THAMES HD, OSWALD MJ, OUTLAW ED, STROM EA, MCNEESE MD, KUERER HM, ROSS MI, SINGLETARY SE, AMES FC, FEIG BW, SAHIN AA, PERKINS GH, SCHECHTER NR, HORTOBAGYI GN, BUCHHOLZ TA. Breast conservation after neoadjuvant chemotherapy: the MD Anderson cancer center experience. **Journal of Clinical Oncology.** v.22, n.12, p.2303-12, 2004.

CORTÉS J, CALVO E, VIVANCOS A, PEREZ-GARCIA J, RECIO JA, SEOANE J. New approach to cancer therapy based on a molecularly defined cancer classification. **CA Cancer Journal for Clinical.** v. 64, n.1, p.70-4, 2014.

DEVASAGAYAM TP, KAMAT JP, MOHAN H, KESAVAN PC. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1282, n.1, p.63-70, 1996.

DÖMÖTÖR Z, SZEMERSZKY R, KÖTELES F. Subjective and objective effects of coffee consumption - caffeine or expectations? **Acta Physiologica Hungarica**. v.6, p.1-9, 2014.

DUDA-SZYMAŃSKA J, SPORNY S. The practical value of breast cancer molecular classification. **Pol Merkur Lekarski**. v.31, n.181, p.5-8, 2011.

ERTURK E, CECENER G, POLATKAN V, GOKGOZ S, EGELI U, TUNCA B, TEZCAN G, DEMIRDOGEN E, AK S, TASDELEN I. Evaluation of Genetic Variations in miRNA-Binding Sites of BRCA1 and BRCA2 Genes as Risk Factors for the Development of Early-Onset and/or Familial Breast Cancer. **Asian Pacific journal of cancer prevention**. v.15, n.19, p.8319-24, 2014.

FINKEL T, HOLBROOK NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**. v.408,n.6809, p.239-47, 2000.

GORRINI C., HARRIS I.S., & MAK T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.12, p.931–947, 2013.

HALLIWELL B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**. v.141, n.2, p.312-22, 2006.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Free Radical in Biology and Medicine. Oxford University Press, New York, 4 ed., 2007.

HALLIWELL B, WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**. v.142,n.2, p.231-55, 2004.

HANAHAN, D., WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. v. 144, n.5, p. 646-674, 2011.

HASHIMOTO T, HE Z, MA WY, SCHMID PC, BODE AM, YANG CS, DONG Z. Caffeine inhibits cell proliferation by G0/G1 phase arrest in JB6 cells. **Cancer Research**. v.64, n.9, p.3344-9, 2004.

HARTIKAINEN J. M.; TENGSTROM M.; KOSMA V-M. et al. Genetic Polymorphisms and Protein Expression of NRF2 and Sulfiredoxin Predict Survival Outcomes in Breast Cancer. **Cancer Research**. v.72, p.5537-5546, 2012.

HAYASHI M, TSUCHIYA H, YAMAMOTO N, KARITA M, SHIRAI T, NISHIDA H, TAKEUCHI A, TOMITA K. Caffeine-potentiated chemotherapy for metastatic carcinoma and lymphoma of bone and soft tissue. **Anticancer Research**. v.25(3c),p.2399-405, 2005.

HOWE, L. R., BROWN, P. H. Targeting the HER/EGFR/ErbB family to prevent breast cancer. **Cancer Prevention Research**. v. 4, n. 8, p. 1149-1157, 2011.

ISHITANI K, LIN J, MANSON JE, BURING JE, ZHANG SM. Caffeine consumption and the risk of breast cancer in a large prospective cohort of women. **Archives of Internal Medicine**. v.168, n.18, p.2022-31, 2008.

INKIELEWICZ-STEPNIAK I, CZARNOWSKI W. Oxidative stress parameters in rats exposed to fluoride and caffeine. **Food and Chemical Toxicology**. v.48, n.6, p.1607-11, 2010.

ITO K, NAKAZATO T, MIYAKAWA Y, YAMATO K, IKEDA Y, KIZAKI M. Caffeine induces G2/M arrest and apoptosis via a novel p53-dependent pathway in NB4 promyelocytic leukemia cells. **Journal of Cellular Physiology**. v.196, n.2, p.276-83, 2003.

JAMIL K.; MUSTAFA S.M. Thioredoxin System: A Model for Determining Novel Lead Molecules for Breast Cancer Chemotherapy. **Avicenna journal of medical biotechnology**. v.4, p.121-130, 2012.

JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, FERLAY J, WARD E, FORMAN D. Global cancer statistics. **CA Cancer Journal for Clinical**. v.61, pg.69-90, 2011.

JOLLY, T. et al. Treatment of metastatic breast cancer in women aged 65 years and older. **Womens Health (London England)**. v. 8, n. 4, p. 455-71, 2012.

KAWAHARA M, TAKAHASHI Y, TAKAZAWA K, TSUCHIYA H, TOMITA K, YOKOGAWA K, MIYAMOTO K. Caffeine dose-dependently potentiates the antitumor effect of cisplatin on osteosarcomas. **Anticancer Research**. v.28, p.1681-5, 2008.

KHASRAW, M., BELL, R., DANG, C. Epirubicin: Is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. **Breast**. v. 21, n.2, p.142 – 149, 2012.

LARSEN MJ, THOMASSEN M, GERDES AM, KRUSE TA. Hereditary breast cancer: clinical, pathological and molecular characteristics. **Breast cancer : basic and clinical research**. v.15, p.145-55, 2014.

LEE C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. **Clinica Chimica Acta**. v.295, n.1-2, p.141-54, 2000.

LEIDY J, KHAN A, KANDIL D. Basal-like breast cancer: update on clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular features. **Archives of pathology & laboratory medicine**. v.138, n.1, p.37-43, 2014

LI XJ, REN ZJ, QIN JW, ZHAO JH, TANG JH, JI MH, WU JZ. Coffee consumption and risk of breast cancer: an up-to-date meta-analysis. **PLoS One**. v.8, n.1, 2013.

LIU C., LIU Z., LI M., LI X., WONG Y-S, et al. Enhancement of Auranofin-Induced Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cells by Selenocystine, a Synergistic Inhibitor of Thioredoxin Reductase. **PLoS ONE**. v.8, e53945, 2013.

LU GY, HUANG SM, LIU ST, LIU PY, CHOU WY, LIN WS. Caffeine induces tumor cytotoxicity via the regulation of alternative splicing in subsets of cancer-

associated genes. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.47, p.83-92, 2014.

LUDWIG IA, CLIFFORD MN, LEAN ME, ASHIHARA H, CROZIER A. Coffee: biochemistry and potential impact on health. **Food & Function**. v.5, n.8, p.1695-717, 2014.

MA Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v.53, p.401–26, 2013.

MALHOTRA GK, ZHAO X, BAND H, BAND V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biol Ther**. v.10, n.10, p.955-60, 2010.

MARTÍNEZ-CARPIO PA, MUR C, ROSEL P, NAVARRO MA. Constitutive and regulated secretion of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 in MDA-MB-231 breast cancer cell line in 11-day cultures. **Cell Signal**. v.11, n.10, p.753-7, 1999.

MCPHERSON K, STEEL CM, DIXON JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. **BMJ**. v.321, n.7261, p.624-8, 2000.

MURRAY S, BRIASOULIS E, LINARDOU H, BAFALOUKOS D, PAPADIMITRIOU C. TAXANE. Resistance in breast cancer: mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. **Cancer Treatment Reviews**. v.38, p.890-903, 2012.

NAWROT P, JORDAN S, EASTWOOD J, ROTSTEIN J, HUGENHOLTZ A, FEELEY M. Effects of caffeine on human health. **Food Additives and Contaminants**. v.20, n.1, p.1-30, 2003.

NEVE RM, CHIN K, FRIDLYAND J, YEH J, BAEHNER FL, FEVR T, CLARK L, BAYANI N, COPPE JP, TONG F, SPEED T, SPELLMAN PT, DEVRIES S, LAPUK A, WANG NJ, KUO WL, STILWELL JL, PINKEL D, ALBERTSON DG, WALDMAN FM, MCCORMICK F, DICKSON RB, JOHNSON MD, LIPPMAN M, ETHIER S,

GAZDAR A, GRAY JW. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. **Cancer Cell**. v.10, n.6, p.515-27, 2006.

NKONDJOCK A. Coffee consumption and the risk of cancer: an overview. **Cancer Letter**. v. 277, n.2, p.121-5, 2009.

NKONDJOCK A, GHADIRIAN P, KOTSOPOULOS J, LUBINSKI J, LYNCH H, KIM-SING C, HORSMAN D, ROSEN B, ISAACS C, WEBER B, FOULKES W, AINSWORTH P, TUNG N, EISEN A, FRIEDMAN E, ENG C, SUN P, NAROD SA. Coffee consumption and breast cancer risk among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **International Journal of Cancer**. v.118, p.103-7, 2006.

NWABO KAMDJE AH, SEKE ETET PF, VECCHIO L, TAGNE RS, AMVENE JM, MULLER JM, KRAMPERA M, LUKONG KE. New targeted therapies for breast cancer: A focus on tumor microenvironmental signals and chemoresistant breast cancers. **World Journal of Clinical Cases**. v.2,n.12, p.769-86, 2014.

OH JK, SANDIN S, STRÖM P, LÖF M, ADAMI HO, WEIDERPASS E. Prospective study of breast cancer in relation to coffee, tea and caffeine in Sweden. **International Journal of Cancer**. 2015.

PELICANO H, CARNEY D, HUANG P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. **Drug Resistance Updates**. v.7,n. 2p.97-110, 2004

PEROU CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. **Oncologist**. v.16, p.61-70, 2011.

PEROU CM, SØRLIE T, EISEN MB, VAN DE RIJN M, JEFFREY SS, REES CA, POLLACK JR, ROSS DT, JOHNSEN H, AKSLEN LA, FLUGE O, PERGAMENSCHIKOV A, WILLIAMS C, ZHU SX, LØNNING PE, BØRRESEN-DALE AL, BROWN PO, BOTSTEIN D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**. v.406, n.6797, p.747-52, 2000.

PETZER JP, PETZER A. Caffeine As A Lead Compound For The Design Of Therapeutic Agents For The Treatment Of Parkinson's Disease. **Current Medicinal Chemistry**. 2014.

PRAT A, PARKER JS, KARGINOVA O, FAN C, LIVASY C, HERSCHKOWITZ JI, HE X, PEROU CM. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**. v.12, n.5, p.68, 2010.

PRAT A, PEROU CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Molecular Oncology**. v.5,n.1, p.5-23, 2011.

QI W, QIAO D, MARTINEZ JD. Caffeine induces TP53-independent G(1)-phase arrest and apoptosis in human lung tumor cells in a dose-dependent manner. **Radiation Research**. v.157, n.2, p.166-74, 2002.

REIS-FILHO, J. S.; WESTBURY, C.; PIERGA, J. Y. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**. v.59, n.3, p.225-31, 2006.

ROSENDAHL AH, PERKS CM, ZENG L, MARKKULA A, SIMONSSON M, ROSE C, INGVAR C, HOLLY JM, JERNSTRÖM H. Caffeine and Caffeic Acid Inhibit Growth and Modify Estrogen Receptor and Insulin-like Growth Factor I Receptor Levels in Human Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**. v.21, n.8, p.1877-87, 2015.

SAPKOTA Y. Germline DNA Variations in Breast Cancer Predisposition and Prognosis: A Systematic Review of the Literature. **Cytogenetic and Genome Research**. v.15, p.77-91, 2014.

SØRLIE T, PEROU CM, TIBSHIRANI R, AAS T, GEISLER S, JOHNSEN H, HASTIE T, EISEN MB, VAN DE RIJN M, JEFFREY SS, THORSEN T, QUIST H, MATESE JC, BROWN PO, BOTSTEIN D, LØNNING PE, BØRRESEN-DALE AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with

clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v.98, n.19, p.10869-74, 2001.

SORLIE T, TIBSHIRANI R, PARKER J, HASTIE T, MARRON JS, NOBEL A, DENG S, JOHNSEN H, PESICH R, GEISLER S, DEMETER J, PEROU CM, LØNNING PE, BROWN PO, BØRRESEN-DALE AL, BOTSTEIN D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v.100, n.14, pg.8418-23, 2003.

SOULE HD, VAZGUEZ J, LONG A, ALBERT S, BRENNAN M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute.** v. 51, n. 5, p. 1409-16, 1973.

SABISZ M, SKLADANOWSKI A. Modulation of cellular response to anticancer treatment by caffeine: inhibition of cell cycle checkpoints, DNA repair and more. **Current Pharmaceutical Biotechnology.** v.9, n.4, p.325-36, 2008.

SVILAAS, A., SAKHI, A.K., ANDERSEN, L.F., SVILAAS, T., STRÖM, E.C., JACOBS, D.R., OSE, L., BLOMHOFF, R. Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. **Journal of Nutrition.** v.134, n.3, p.562–567, 2004.

TIEZZI D.G. Cirurgia conservadora no câncer de mama. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.** v.29 n.8, 2007.

TOMITA K, TSUCHIYA H. Caffeine enhancement of the effect of anticancer agents on human sarcoma cells. **Japanese Journal of Cancer Research.** v.80, n.1, p.83-8, 1989.

TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, FERLAY J, LORTET-TIEULENT J, JEMAL A. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer Journal for Clinical.** v.65, n.2, p.87-108, 2015.

TRACHOOTHAM D, ALEXANDRE J, HUANG P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nature Reviews Drug Discovery**. v.8, n.7, p.579-91, 2009.

VATTEN LJ, SOLVOLL K, LØKEN EB. Coffee consumption and the risk of breast cancer. A prospective study of 14,593 Norwegian women. **British Journal of Cancer**. v.62, n.2, p.267-70, 1990.

WALSH T, CASADEI S, COATS KH, SWISHER E, STRAY SM, HIGGINS J, ROACH KC, MANDELL J, LEE MK, CIERNIKOVA S, FORETOVA L, SOUCEK P, KING MC. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. **JAMA**. v.295, n.12, p.1379-88, 2006.

WARDLEY, A. Capecitabine: Expanding options for the treatment of patients with early or locally advanced breast cancer. **Oncologist**. v. 11, p. 20-26, 2006.

WICKI, A.; ROCHLITZ, C. Targeted therapies in breast cancer. **Swiss Medical Weekly**. v. 142, p. 13550, 2012.

WOOLSTON CM, AL-ATTAR A, STORR SJ, ELLIS IO, MORGAN DA, MARTIN SG. Redox protein expression predicts radiotherapeutic response in early-stage invasive breast cancer patients. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**. v.79, n.5, p.1532-40, 2011.

YOO YD, HAN DH, JANG JM, ZAKRZEWSKA A, KIM SY, CHOI CY, LEE YJ, KWON YT. Molecular characteristics of cancer stem-like cells derived from human breast cancer cells. **Anticancer Research**. v.33, n.3, p.763-77, 2013