

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

**EFEITO *IN VITRO* DO TUCUMÃ (*Astrocaryum
aculeatum*, MEYER) NA CITOPROTEÇÃO AO
ESTRESSE OXIDATIVO E NA MODULAÇÃO DA
LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA**

TESE DE DOUTORADO

Michele Rorato Sagrillo

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**EFEITO *IN VITRO* DO TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*,
MEYER) NA CITOPROTEÇÃO AO ESTRESSE OXIDATIVO E
NA MODULAÇÃO DA LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA
AGUDA**

Michele Rorato Sagrillo

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Farmacologia do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia (PPGFARM), Área da Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Farmacologia.

Orientador: Profa. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS, Brasil

2014

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

Rorato Sagrillo, Michele
EFEITO IN VITRO DO TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*,
MEYER) NA CITOPROTEÇÃO AO ESTRESSE OXIDATIVO E NA
MODULAÇÃO DA LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA / Michele
Rorato Sagrillo.-2014.
93 p.; 30cm

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

1. *Astrocaryum aculeatum* 2. Carotenoides 3. Cultura
de linfócitos 4. Danos de DNA I. Beatrice Mânica da Cruz,
Ivana II. Título.

© 2014

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

Endereço: Rua Doze, n. 2010, Bairro da Luz, Santa Maria, RS. CEP: 97110-680

Fone (0xx)55 32225678; Fax (0xx) 32251114; E-mail: ufesme@ct.ufsm.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Tese de Doutorado**

**EFEITO *IN VITRO* DO TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*, MEYER) NA
CITOPROTEÇÃO AO ESTRESSE OXIDATIVO E NA MODULAÇÃO
DA LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA**

elaborada por
Michele Rorato Sagrillo

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA

Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dra.
(Presidente/Orientadora)

Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UNIFRA)

Kátia Padilha Barreto, Dra. (UFSM)

Roselei Fachinetto, Dra. (UFSM)

Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Dra. (ULBRA)

Santa Maria, 17 de dezembro de 2014

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese às pessoas mais importantes para mim, meus pais queridos, Moacir e Luizete, principais responsáveis pela minha vida e as quem devo meu caráter e disciplina aos estudos e ao trabalho.

À minha irmã Daniele,

sempre paciente e generosa em meus momentos de desânimo e falta de estímulo.

Ao mesmo tempo, estendo esta dedicatória ao meu irmão Rafael, o meu maior presente e o meu maior exemplo de luta e vitória pela vida.

Dedico também esta tese ao meu anjo da guarda, o Luizinho (*in memorian*), que foi para o céu para cuidar de mim.

AMO MUITO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Início agradecendo a Deus por estar sempre ao meu lado durante esta caminhada! Muitas vezes o caminho tornou-se tortuoso e pensei em desistir, porém, Ele me deu duas características que estão inseridas em minha alma: persistência e determinação! Contudo, não teria chegado até aqui sem a ajuda de alguns Anjos que Ele me enviou, a saber:

Os meus pais, Moacir e Luizete, que estiveram sempre comigo, ensinando-me, apoiando-me, amando-me incondicionalmente e acreditando em meu potencial.

Os meus familiares, em particular aos meus irmãos Daniele e Rafael, meu cunhado Flávio e aos amores da minha vida, minha sobrinha Marina e meu cachorro Bolota, que entenderam a minha distância quando ao meu lado queriam estar.

À minha orientadora e Professora Ivana Beatrice Mânica da Cruz!!! Palavras e gestos são insuficientes para agradecer por acreditar em mim e aceitar-me como orientanda, incentivar-me, apoiar-me sempre que precisei. Obrigada pelos gestos de ajuda mútua, compreensão, persistência, esperança, humildade e maternidade. Levarei-te para sempre em meu coração e me espelharei sempre nas tuas atitudes.

Ao meu grande amigo Luiz Filipe Machado Garcia, que se dedicou para a realização dessa tese, obrigado pela dedicação, carinho e por ter tomado muito dos ensaios como se fossem seus, ajudando-me nos finais de semana, feriados, dias, noites e madrugadas.

Ao Olmiro Cezimbra Filho, meu novo amigo! Obrigada pelo incentivo que sempre dedicou às minhas empreitadas e pela atenção zelosa comigo e com minha família.

Aos amigos Rodrigo de Almeida Vaucher, Kátia Nascimento e Carolina dos Santos Santini meus grandes tesouros, obrigada por tudo que fizeram por e para mim. Obrigada por sempre me ouvirem, me auxiliarem e me cederem à mão amiga nos dias em que a luz não brilhava tanto. Suas motivações eram grandiosas, somadas às espontâneas generosidades que fizeram possível a transformação de instantâneos momentos de cansaço, angústia e desânimo em uma estrada larga, margeada de flores, frutos e frondosas árvores! Uma estrada toda verde – repleta de cheiros, cores e sons – cujo nome é esperança e cuja base é a busca de conhecimento.

Aos companheiros de trabalho do Centro Universitário Franciscano, pela cobertura, direta ou indireta, que me deram nessa longa travessia, assim como pela confiança e compreensão. Devo dizer-lhes que aprendi com vocês a generosa solidariedade e o carinho desprendido. Por tudo, agradeço-lhes individualmente: ao Roberto Christ Vianna Santos, colega que demonstrou com gestos, atitudes e palavras durante toda esta trajetória ser um grande e eterno amigo, que valorizou meu sonho e me ajudou a seguir no caminho escolhido.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia desta universidade e ao Centro Universitário Franciscano.

Não poderia deixar de mencionar meus alunos de sala de aula e do grupo de pesquisa, que souberam tornar meu cotidiano mais leve graças ao entusiasmo, os sorrisos e aos abraços.

Aos meus colegas do laboratório Biogenômica, obrigada pelo convívio, solidariedade e amizade compartilhadas todo esse tempo.

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos e por suas presenças afetivas, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigada!

Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonho e outras ainda porque nos desafiam a construí-los.

Divido com todos vocês mais uma etapa de minha vida.

Deus abençoe a todos!

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO DO TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*, MEYER) NA CITOPROTEÇÃO CAUSADA PELO ESTRESSE OXIDATIVO E NA MODULAÇÃO DE CÉLULAS DE LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA

AUTORA: Michele Rorato Sagrillo

ORIENTADORA: Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 17 de dezembro 2014, Anf. II

Os carotenoides são pigmentos naturais solúveis inversamente associados com o risco de uma variedade de doenças. Na região da Amazônia há uma grande variedade de frutos nativos ricos em carotenoides, cujas propriedades funcionais precisam ser esclarecidas. Este é o caso dos frutos de palmeira tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Mart.), regionalmente consumido. Portanto, nós investigamos os efeitos protetores do extrato etanólico isolados de casca e polpa de frutas tucumã contra citotoxicidade e dano ao DNA induzido por H₂O₂ em linfócitos humanos e a atividade antiproliferativa dos mesmos frente a linhagem celular de Leucemia Promielocítica Aguda (LPA), NB4-LPA, com e sem exposição concomitante ao ácido *all-trans*-retinóico (ATRA), fármaco utilizado para o tratamento da LPA, constituindo assim os temas do primeiro e segundo artigo da tese. Em primeiro lugar, os compostos químicos principais presentes nos extratos foram determinados através de métodos cromatográficos e espectrofotométrico. O extrato da casca apresentou maior concentração de polifenóis totais, flavonoides, alcaloides, taninos, β-caroteno e quercetina do que extrato de polpa de tucumã. As culturas de linfócitos humanos, com e sem H₂O₂ e as células NB4-LPA foram obtidas após 72h e a viabilidade das células, o ensaio do DNA Picogreen®, assim como a atividade das caspase 1, 3 e 8 relacionadas com acontecimentos de apoptose foi avaliada por meio de testes de imunoensaio. Nas culturas de linfócitos humanos, com e sem H₂O₂ tratados com os extratos obtidos da casca e da polpa do tucumã mostraram que ambos apresentaram efeito cito e genoprotetor principalmente em doses intermediárias (300 a 900 µg/mL) quando comparado com concentrações inferiores e superiores. Os extratos foram capazes de diminuir a grande parte da atividade das caspases 1, 3 e 8 que eram mais elevadas em células expostas a H₂O₂. Estes resultados sugerem efeito positivo do tucumã em células expostas a compostos tóxicos. Quando submetemos à cultura as células NB4-LPA frente ao tratamento com os extratos etanólicos da polpa e casca do tucumã depois de 72h a proliferação celular nas concentrações maiores que 600 µg/mL foram eficazes para inibir a proliferação celular. Quando as células NB4 foram tratadas apenas com ATRA mostrou-se um forte efeito inibitório como esperado (14,5 ± 2,7% do grupo controle). Apesar dos extratos do tucumã também apresentarem efeito antiproliferativo sobre células NB4, este efeito foi mais moderado do que o ATRA. Os níveis das caspases testadas mostraram-se altas na presença de extratos de tucumã e ATRA indicando que o tucumã é capaz de desencadear apoptose em células NB4. Estes resultados sugerem que frutas ricas em retinoides podem apresentar efeito citotóxico contra células de LPA.

Palavras-chaves: *Astrocaryum aculeatum*. Carotenoides. Cultura de linfócitos. Danos de DNA.

ABSTRACT

Doctor Degree Thesis
Program of Post-Graduation on Pharmacology
Federal University of Santa Maria

EFFECT OF ‘TUCUMÃ’ FRUIT (*Astrocaryum aculeatum*, MEYER) IN THE CYTOPROTECTION CAUSED BY THE OXIDATIVE STRESS AND IN THE MODULATION OF CELLS OF ACCUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA

AUTHOR: Michele Rorato Sagrillo

SUPERVISOR: Dr. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Date and Local of Defense: Santa Maria, December 17nd 2014, Anf. II

Carotenoids are natural pigments soluble inversely associated with risk of a variety of diseases. In the Amazon region there is a wide variety of native fruits which are rich in carotenoids, which functional properties need to be clarified. This is the case of the fiber palm fruits (*Astrocaryum aculeatum* Mart.), regionally consumed. Therefore, we investigated the protective effects of ethanol extract isolated from the peel and the pulp of fruits ‘tucumã’ against cytotoxicity and DNA damage induced by H₂O₂ in human lymphocytes and antiproliferative activity against the same cell lineage Acute Promyelocytic Leukemia (APL), NB4- APL, with and without concurrent exposure to all-trans retinoic acid (ATRA), drug used for the treatment of APL, thus constituting the subjects of the first and second article of this thesis. Firstly, the main chemical compounds present in the extracts were determined by chromatographic and spectrophotometric methods. The bark extract showed higher concentration of total polyphenols, flavonoids, alkaloids, tannins, β-carotene and quercetin than extract pulp of ‘tucumã’. Cultures of human lymphocytes with and without H₂O₂ and NB4 cells, APL was obtained after 72h and cell viability assay Picogreen® DNA, as well as the activity of caspase 1, 3 and 8 related to events of apoptosis was assessed by immunoassay tests. In cultures of human lymphocytes with and without H₂O₂ treated with the extracts of the skin and pulp of the present ‘tucumã’ showed that both cytologic and genoprotector effect especially in intermediate doses (300 to 900 ug / ml) when compared to lower and higher concentrations. The extracts were able to largely decrease the activity of caspases 1, 3 and 8 which were higher in cells exposed to H₂O₂. These results suggest a positive effect of ‘tucumã’ in cells exposed to toxic compounds. When submitted to culture the LPA-NB4 cells to the treatment with the ethanolic extract of the pulp and the peel of ‘tucumã’ 72 hours after the cell proliferation in concentrations greater than 600 mg / ml was effective at inhibiting cell proliferation. When NB4 cells were treated with ATRA showed a strong inhibitory effect as expected (14.5 ± 2.7% of control). Despite extracts also present ‘tucumã’ antiproliferative effect on NB4 cells, this effect was more moderate than ATRA. The levels of caspases tested were shown to be higher in extracts of ATRA and ‘tucumã’ indicating that it can trigger apoptosis in NB4 cells. These results suggest that fruits rich in retinoids may have cytotoxic effects against APL cells.

Keywords: *Astrocaryum aculeatum*. Carotenoids. Culture of lymphocytes. DNA damage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O)	16
Figura 2 - Estresse oxidativo e os estágios da carcinogênese	18
Figura 3 - Ilustração da quebra dos cromossomos 15(q22) e 17(q21), gerando a translocação (15;17)	25
Figura 4 - Promielócitos hipergranulares presença de múltiplos bastonetes de <i>Auer</i> no citoplasma, formando feixes que conferem a essas células a denominação de “ <i>Faggot cells</i> ”	26
Figura 5 - (a) Diagrama esquemático da estrutura do éxon/íntron dos genes <i>PML</i> e <i>RARα</i> , envolvidos na t(15;17)(q22;q21). (b) Diagrama esquemático dos três tipos de transcritos <i>PML-RARα</i> , relacionados com os diferentes pontos de quebra no gene <i>PML</i>	30
Figura 6 - Representação esquemática da ação do receptor alfa do ácido retinoico (<i>RARα</i>) na região promotora de seus genes-alvo	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos principais carotenoides no tucumã (<i>Astrocaryum aculeatum</i>)	27
Tabela 2 - Composição de fenólicos e flavonoides de <i>Astrocaryum aculeatum</i>	28

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Bases cito-moleculares da carcinogênese	14
2.1.1 O papel do estresse oxidativo na carcinogênese	14
2.1.2 A carcinogênese e a resistência a apoptose	19
2.2 Papel da dieta na modulação da carcinogênese	21
2.3 Papel dos carotenoides na modulação da carcinogênese	23
2.4 Caracterização do fruto tucumã: <i>Astrocaryum aculeatum</i>	25
2.5 Leucemia Promielocítica Aguda (LPA)	29
2.5.1 Estrutura e Função do Gene <i>PML</i>	31
2.5.2 Estrutura e Função do Gene <i>RARα</i>	33
2.5.3 Manifestações clínicas das LPAs e terapêutica associada	36
2.6 Farmacoterapia e o potencial papel da dieta na Prevenção e Terapêutica da LPA	37
3 OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos Específicos	41
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS	42
4.1 Extratos do fruto tucumã (<i>Astrocaryum aculeatum</i> MEYER) diminuem os efeitos citotóxicos do peróxido de hidrogênio em linfócitos humanos	43
4.2 Efeito citotóxico do extrato de <i>Astrocaryum aculeatum</i> na linhagem celular NB4 de leucemia promielocítica é similar ao ácido all-trans-retinoico droga quimioterápica (ATRA)	52
5 DISCUSSÃO	78
6 CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS	85

APRESENTAÇÃO

Esta tese está subdividida nas seguintes seções: Uma **INTRODUÇÃO** que apresenta de maneira sucinta o contexto e a relevância do estudo proposto seguida de uma revisão bibliográfica sobre os principais temas abordados.

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de dois manuscritos apresentados na seção **RESULTADOS**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos e representam a íntegra deste estudo. A formatação dos artigos está organizada de acordo com a instrução dos autores das revistas nas quais foram submetidos. As instruções são apresentadas nos anexos da tese.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** elencadas no final referem-se somente às citações que aparecem nos item **INTRODUÇÃO e REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** desta tese.

Os itens, **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES** encontradas no final desta tese, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos contidos em **ANEXO** neste trabalho.

1 INTRODUÇÃO

Existe uma diversidade de frutos nativos que contêm substâncias antioxidantes distintas, cujas atividades têm sido determinadas nos últimos anos (ROESLER et al., 2007). Dentre estas substâncias, os carotenoides constituem um dos mais importantes grupos de pigmentos na natureza, apresentando grande diversidade estrutural com inúmeras funções biológicas (BORA et al., 2001). Dos mais de 600 carotenoides conhecidos, aproximadamente 50 são precursores da vitamina A.

Muitos frutos são ricos em carotenoides possuindo diversas moléculas químicas destes compostos. Este é o caso do fruto amazônico tucumã (*Astrocaryum aculeatum*). O tucumã é uma espécie pertencente à família da Arecaceae (Palmeiras), conhecida popularmente pelo nome de tucumanzeiro. É nativo da região Amazônica, onde é muito frequente no Estado do Amazonas, sendo ainda encontrado nos estados brasileiros do Acre, Rondônia, Roraima, Pará e Mato Grosso, além das Guianas, Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia (CAVALCANTE, 1991; KAHN e MILLÁN, 1992). Os frutos servem para a alimentação humana e de animais domésticos, dos quais o mesocarpo (polpa) é considerado uma fonte alimentícia altamente calórica, devido ao elevado conteúdo de lipídios, quantidade expressiva do precursor da vitamina A e teores satisfatórios de fibra e de outras vitaminas como a vitamina E e C (GONÇALVES, 2008).

É sabido que o α e o β -caroteno e a β -criptoxantina podem ser biologicamente transformados em vitamina A em organismos animais, constituindo-se nos principais carotenoides pró-vitâmicos A que estão largamente distribuídos em alimentos (CAMPOS e ROSADO, 2005). No caso, o tucumã apresenta ainda, elevado potencial de pró-vitamina A (caroteno) (YUYAMA et al., 2005). O estudo conduzido por Veridiana et al. (2007) identificou e quantificou 60 tipos diferentes de carotenoides em frutos amazônicos descreveu a presença de 21 tipos diferentes de carotenoides no tucumã sendo o mais concentrado o all-trans- β -caroteno (ATRA).

Os carotenoides e em especial o ATRA possuem diversas propriedades biológicas incluindo ação antioxidante que agem preventivamente nas fases iniciais (iniciação e progressão) da carcinogênese. Por outro lado, na fase de progressão tumoral o ATRA é uma molécula com reconhecida propriedade antitumoral utilizada no tratamento de neoplasias com destaque a Leucemia Promielocítica Aguda (LPA).

Entre as Leucemias Mieloides Agudas (LMAs), a LPA é um subgrupo com achados biológicos e clínicos peculiares. Está associada a uma síndrome hemorrágica que já era conhecida por hematologistas franceses desde 1949. Ocorre em, aproximadamente, 10 a 15% dos adultos com diagnóstico de LMA e idade média de 40 anos, que é considerada mais baixa do que a idade média dos pacientes com outros tipos de LMAs (70 anos) (LÖWENBERG et al., 2003). Afeta 3 a 10% dos casos de crianças com LMA que apresentam, predominantemente, idade mais avançada, sexo feminino, baixa contagem leucocitária e frequentes problemas de coagulação (MARTINEZ-CLIMENT, 1997).

O curso clínico da LPA tem sido modificado, nos últimos anos, de uma leucemia aguda rapidamente fatal para um dos mais curáveis subtipos de leucemia mieloide aguda. Este revolucionário progresso no prognóstico da doença foi atribuído essencialmente aos avanços notáveis em seu tratamento, mais especificamente com a introdução de novos agentes terapêuticos que atuam diretamente na lesão molecular, como o ácido *all-trans* retinoico (ATRA), um derivativo da vitamina A, e o trióxido de arsênico (ATO), passando a ser considerado o primeiro exemplo de sucesso de terapia alvo molecular baseado na indução da diferenciação e apoptose (SANZ et al., 2005).

Apesar da excelente resposta ao ATRA em pacientes com LPA associada ao *PML-RAR α* , os portadores de outras translocações envolvendo o *RAR α* apresentam sensibilidade variável à medicação. Nesses grupos, outras opções devem ser buscadas para o tratamento, como o arsênico e outros agentes diferenciadores (JÁCOMO et al., 2008).

Estudos prévios observaram que o tucumã possui além de carotenoides incluindo o ATRA outros compostos ativos com reconhecidas atividades antioxidante e antitumoral, como é o caso da quercetina, rutina, ácido cafeico e ácido clorogênico (VERIDIANA, 2007; GONÇALVES et al., 2008; GARCIA, 2012).

Com base nessas evidências prévias sobre o tucumã e seus compostos bioativos, uma questão em aberto é se o tucumã possui efeito antitumoral tanto em processos relacionados à prevenção à carcinogênese quanto na terapia de neoplasias sensíveis a ação farmacológica dos retinoides. Assim, a presente tese teve como objetivo inicial avaliar o efeito de extratos do tucumã obtidos da casca e da polpa do fruto, na cito-genoproteção de células mononucleares periféricas do sangue expostas ao peróxido de hidrogênio, bem como avaliar os potenciais mecanismos causais dos efeitos genoprotetores do tucumã via análise da modulação das caspases 1, 3 e 8 que participam da cascata da apoptose.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bases cito-moleculares da carcinogênese

As neoplasias são complexas, de origem multifatorial, estão diretamente relacionadas a alterações genéticas e epigenéticas das células tendo como consequência a proliferação descontrolada, a desdiferenciação e a resistência à morte celular programada (apoptose). Estas consequências ocorrem pelo acúmulo de mutações que interrompem padrões de metilação do DNA, modificam histonas cromossômicas e sua posição no nucleossoma e, principalmente alteram a expressão de genes (YOU & JONES, 2012).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2012) a incidência, a distribuição geográfica e o comportamento de tipos específicos de neoplasias estão relacionados a múltiplos fatores, incluindo sexo, idade, raça, predisposição genética e exposição à carcinógenos ambientais. Destes fatores, os ambientais são, provavelmente, os mais importantes e muitos deles estão relacionados com a exposição das células ao estresse oxidativo.

2.1.1 O papel do estresse oxidativo na carcinogênese

O oxigênio é uma molécula central na evolução e sobrevivência de organismos aeróbios, uma vez que reage através de uma série de reações químicas com a glicose produzindo adenosina trifosfato (ATP), água e CO₂. Entretanto, aproximadamente 5% do oxigênio utilizado por estes organismos, via metabolismo oxidativo, não é utilizado nos ciclos mitocondriais que produzem energia. Esse oxigênio excedente tende a perder dois elétrons na sua última camada, produzindo o radical superóxido (O₂^{•-}) ou, também, por ações enzimáticas e metabólicas adicionais, pode formar outros tipos de moléculas desemparelhadas de oxigênio, que são genericamente conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROs) (HALLIWELL, 1992; BARBOSA et al., 2010).

As EROs, por serem moléculas altamente reativas, o organismo controla a sua degradação através de dois sistemas antioxidantes integrados: um endógeno enzimático e outro exógeno através do ingresso de moléculas antioxidantes não enzimáticas oriundas da dieta ou produzidas pelo organismo. O sistema antioxidante enzimático age a partir do radical superóxido. Esta molécula é dismutada pela ação das enzimas superóxido dismutases (SOD₁,

SOD₂ e SOD₃) em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que, por sua vez é catalizado pelas enzimas catalase (CAT) ou glutathiona peroxidase (GPX) em H₂O (HALLIWELL, 1992). Por outro lado, o organismo também conta com moléculas antioxidantes não enzimáticas definidas como qualquer substância que, em baixas concentrações atrasa ou inibe de maneira eficaz a oxidação de um dado substrato (SIES & STAHL, 1995).

Em excesso, as EROs causam danos celulares importantes, entretanto, estas moléculas também possuem algumas funções biológicas importantes. Assim, o organismo está sempre, ativamente controlando a produção e catalise das EROS. Assim, um processo denominado estresse oxidativo ocorre quando existe um desequilíbrio entre a quantidade de compostos oxidantes e antioxidantes, ou seja, coexiste maior concentração de agentes oxidantes do que antioxidantes (VICENTINO & MENEZES, 2007; BARBOSA et al., 2010).

O estresse oxidativo, em geral favorece a oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático (BARBOSA et al., 2010). Este desequilíbrio ocorre quando a produção de EROs está acelerada ou quando os mecanismos envolvidos na proteção contra as ERO encontram-se deteriorados, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos. A Figura 1 apresenta de modo sintético as reações mitocondriais envolvidas com a produção de EROs.

Nas últimas décadas, foram realizadas inúmeras pesquisas para esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos como envelhecimento, câncer, aterosclerose, inflamação, etc. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é um dos oxidantes mais versáteis que existe, é superior ao cloro, dióxido de cloro e permanganato de potássio; através de catálise, H₂O₂ pode ser convertido em radical hidroxila ([•]OH). Esta conversão ocorre quando o H₂O₂ reage com metais de transição presentes no citoplasma como o ferro e o zinco (reação de Fenton) (HALLIWELL, 1992).

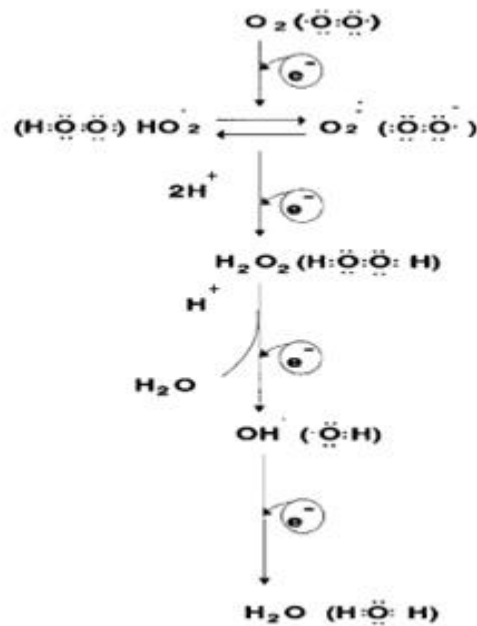


Figura 1- Redução tetraivalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O). Várias espécies reativas do metabolismo do O_2 são produzidas no processo

Fonte: Adaptado de Cohen (1989)

No DNA, as EROs como a $\cdot\text{OH}$ oxidam as bases púricas e pirimídicas. Essas reações podem ocorrer devido à oxidação direta dos ácidos nucleicos ou, muitas vezes, causam a formação de quebras em uma das cadeias do DNA (quebras simples - SSB “*single strand break*”) ou quebras duplas em posições aproximadamente simétricas nas duas cadeias do DNA (quebras duplas - DSB “*double strand break*”). Além disso, quebras simples podem gerar quebras duplas durante a replicação celular. Enquanto que mutações germinativas podem levar a alterações na transmissão dos caracteres hereditários as mutações somáticas são consideradas a como a gênese de processos tumorais (YOU & JONES, 2012).

Assim, as EROs podem estar envolvidas nos processos de carcinogênese ao reagirem com o DNA da célula, alterando sua estrutura genética, o que origina mutações que podem gerar instabilidades genômicas e novas mutações que tem por consequência final a indução da multiplicação celular desordenada e a imortalização celular (resistência a apoptose) (BARBOSA et al., 2010). Além disso, EROs em excesso causam oxidação nas membranas celulares e intracelulares, influenciando na troca de eletrólitos e produzindo novas EROs que podem provocar na célula normal alterações no DNA, o que chamamos de mutação genética (CERUTTI, 1991).

O fenótipo tumoral está associado a alterações nos oncogenes e nos genes de supressão tumoral. Os oncogenes são oriundos dos proto-oncogenes que geralmente estão ativos nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário e que posteriormente são inativados ou mesmo desligados. Após sofrer uma mutação gênica somática, por exemplo, uma translocação, amplificação ou mutação pontual um proto-oncogene torna-se eventualmente um oncogene levando assim a proliferação mitótica exacerbada e a dediferenciação celular (ADAMSON, 1997). Os genes de supressão tumoral incluem aqueles que controlam a qualidade da estrutura e função celular permitindo que a mesma se divida ou induzindo a célula danificada a apoptose (DE VITTA et al., 2005).

As alterações nos proto-oncogenes e genes de supressão tumoral podem levar a carcinogênese. Este processo geralmente é lento até o tumor ser passível de visualização. Portanto, admite-se que a carcinogênese envolva três estágios (Figura 2). O primeiro conhecido como **iniciação** é aquele em que as células sofrem ação de agentes cancerígenos ou carcinógenos incluindo as EROs. Assim o estresse oxidativo causado pelo excesso de EROs induz alterações no DNA e também em mecanismos epigenéticos como modificações no padrão de metilação de genes e/ou modificações de histonas. Estes processos levam ao silenciamento dos genes de supressão tumoral e a ativação dos oncogenes (ZIECH et al., 2012).

A oxidação do DNA ocorre, pois as defesas antioxidantes não são perfeitas. O número de eventos oxidativos ao DNA por dia por célula é estimado em 100.000 em ratos e 10 vezes mais em humanos. As enzimas do sistema de reparo do DNA removem a maioria, mas não todas as mutações que ocorrem no DNA. Assim, lesões oxidativas no DNA nuclear e mitocondrial se acumulam com a idade aumentando a suscetibilidade as neoplasias. Além do sistema de reparo, células danificadas podem ser eliminadas pelo sistema imune do organismo, caso as alterações permitam modificações nas proteínas de reconhecimento celular que tornam esta célula semelhante a um patógeno. As mitocôndrias lesadas também podem ser destruídas e substituídas por outras dentro das células (BARBOSA et al., 2010; AZIZ et al., 2012).

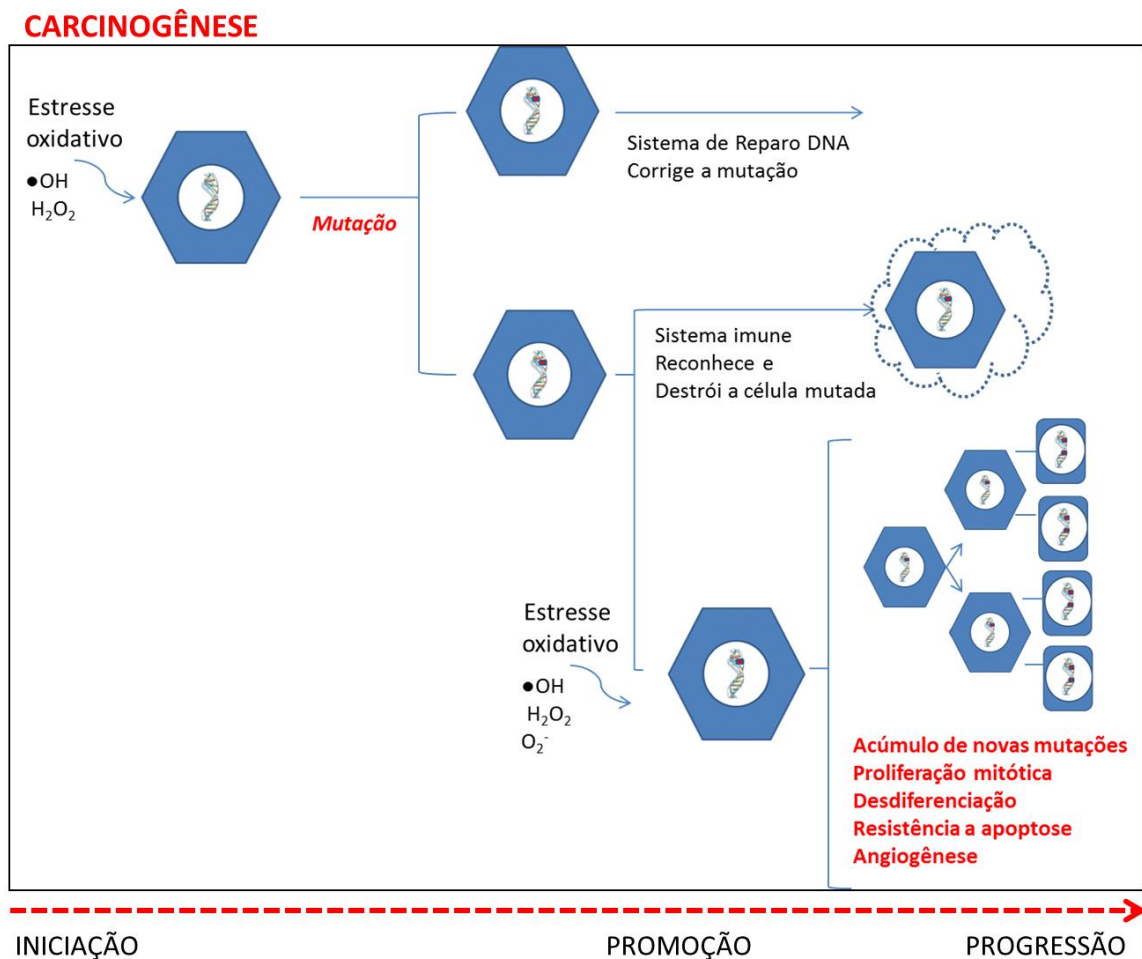


Figura 2 - Estresse oxidativo e os estágios da carcinogênese. O estresse oxidativo pode desencadear a fase de iniciação em que alterações genéticas (no DNA) e epigenéticas podem ocorrer nas células. O estresse oxidativo também pode atuar na promoção da carcinogênese aumentando a instabilidade genômica levando a formação da célula tumoral propriamente dita.

Eventualmente alguma célula alterada escapa da ação do sistema de reparo e do sistema imune corporal e continua se dividindo. As alterações criam instabilidade genômica propiciando o aparecimento e fixação de novas mutações. Estas alterações podem ser causadas por agentes conhecidos como “oncopromotores” que levam a transformação da célula em uma célula maligna. Este estágio é conhecido como **promoção**. O estresse oxidativo também age como um oncopromotor na fase da progressão tumoral (AZIZ et al., 2012).

O terceiro estágio conhecido como **progressão** da carcinogênese é caracterizado pela proliferação celular descontrolada e irreversível, desdiferenciação celular, uma vez que a célula cancerosa perde grande parte da sua morfologia e função original, indução a

angiogênese e resistência acentuada à apoptose. Adicionalmente, podem alterar proteínas celulares adesivas levando a liberação do tecido e a migração para outras regiões corporais onde são formados tumores secundários (metástases) (ZIECH et al., 2012).

Portanto, os sistemas antioxidantes são importantes na fase de iniciação e promoção tumoral por servirem como agentes preventivos. Por outro lado, na fase da progressão tumoral, quando as células tumorais já estão formadas o seu papel envolve diminuição da proliferação celular e indução da apoptose (ZIECH et al., 2012).

Esta ação diferenciada dos compostos antioxidantes nas células tumorais ocorre por que muitos destes compostos funcionam bioquimicamente como se fosse enzimas antioxidantes, em especial como se fossem a superóxido dismutase (SOD). Como a SOD catalisa o superóxido em H_2O_2 , muitos estudos têm observado que o aumento na atividade da SOD leva a um aumento nos níveis de H_2O_2 (revisão em BUETTNER, 2011). Estudos têm mostrado que a SOD, em especial a SOD2 (superóxido dismutase dependente de manganês) que atua na mitocôndria está reduzida em muitas neoplasias. Entretanto, quando as células tumorais são tratadas com análogos químicos desta enzima aumentando a quantidade desta enzima ocorre inibição do crescimento tumoral. Este efeito parece estar diretamente relacionado com o aumento dos níveis de H_2O_2 nas células tumorais. As células cancerosas como têm uma taxa de crescimento muito acentuada estão continuamente sobre estresse oxidativo e um aumento nos níveis de compostos pro-oxidantes age negativamente sobre a viabilidade das mesmas. Por isto é que o gene da SOD2 é considerado um gene de supressão tumoral (BATINIĆ-HABERLE et al., 2010).

2.1.2 A carcinogênese e a resistência a apoptose

O organismo ao longo do seu desenvolvimento precisa muitas vezes eliminar células. O processo fisiológico pelo qual este fenômeno acontece é denominado de morte celular programada ou apoptose. A apoptose possui características morfofisiológicas muito marcantes e coordenadas, sendo um processo que, de modo geral ocorre rapidamente. A célula em apoptose apresenta uma retração causada pela perda da sua aderência na matriz extracelular e com as células vizinhas. A cromatina sofre, inicialmente condensação e posteriormente sofre cortes (o DNA é segmentado). O material citoplasmático é envolto por membranas e digerido formando porções celulares denominadas corpos apoptóticos. Posteriormente quando toda a célula está empacotada em corpos apoptóticos estes são fagocitados por macrófagos e removidos sem causar processo inflamatório (revisão em GRIVICICH et al., 2007).

A apoptose pode ser ativada por vários fatores como a remoção de sinais químicos da célula (fatores de crescimento ou de sobrevivência), ignorar mensagens químicas por alguns receptores internos e externos, ou pela presença de sinais com informação contraditória (THOMAS et al., 1996). Pode ocorrer como sinal apoptótico externo, a ativação de receptores da superfície celular, como FAS-receptor. O FAS-ligante se liga ao FAS-receptor da membrana - chamados "*death receptors*", clivam o fator de ativação de proteases apoptóticas (APAF), iniciado a cascata de caspases (MEIER et al., 2000).

Muitos genes pró-apoptóticos e antiapoptóticos têm sido identificados nestes últimos anos. Distúrbios no processo de apoptose podem levar ao crescimento descontrolado das células e a formação de tumores. Entretanto, o papel preciso dos mesmos ainda não está totalmente claro (revisão em ZHIVOTOVSKY e ORRENIUS, 2006). Neste contexto a família Bcl-2 é uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose que participam ativamente da regulação da apoptose. Os membros da família *Bcl-2* como *Bcl-2* e *Bcl-XL* inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo c e são chamados de reguladores antiapoptóticos (revisão em ZHIVOTOVSKY e ORRENIUS, 2006).

O processo de apoptose está intimamente relacionado com a ação de moléculas denominadas caspases. A família das caspases é representada por um conjunto de proteínas com função de proteases que estão vinculadas tanto a sinalização da apoptose quanto a sua execução. Encontram-se no citoplasma celular sob a forma inativa. Existem dois tipos de caspases: caspases iniciadoras e caspases efetoras. Caspases iniciadoras (por exemplo, caspase-8, caspase-9) clivam proformas inativas de caspases efetoras, ativando-as. Caspases efetoras (por exemplo, caspase-3, caspase-7) por sua vez clivam outras proteínas da célula resultando no processo apoptótico (OKADA e MAK, 2004).

A caspase efetora, já ativada, cliva uma proteína (ICAD, de *inhibitor of caspase-activated DNase*) normalmente ligada a uma DNAase (CAD) no citoplasma. CAD se torna ativo, entra no núcleo e começa a cortar pontos específicos de DNA (clivagem entre nucleossomos), desencadeando o processo de morte celular programada (DIMRI, 2005).

Uma vez que as caspases são moléculas chaves na apoptose a desregulação da função destas proteínas tem sido associada a carcinogênese. Quando comparada com as células saudáveis a expressão da caspase-3 está desregulada podendo ser menor ou maior conforme o tipo de tumor (ZHIVOTOVSKY e ORRENIUS, 2006).

Dada a relevância da apoptose no processo da carcinogênese, este fenômeno é foco de pesquisas tanto na prática clínica como potencial alvo terapêutico ou da compreensão dos mecanismos de resistência à radioterapia e à quimioterapia (ZHIVOTOVSKY e ORRENIUS,

2006; GRIVICICH et al., 2007). Além disto, investigações com a intenção de identificar compostos farmacológicos ou dietéticos que tenham propriedades de ativar processos apoptóticos em células tumorais também são consideradas de grande importância clínico-epidemiológicas.

2.2 Papel da dieta na modulação da carcinogênese

Em 1978, o termo antimutagênico ou genoprotetor foi proposto, designando todos os compostos que agem diretamente sobre agentes mutagênicos ou em seus precursores, de modo a neutralizá-los. Muitos destes compostos têm sido encontrados em alimentos que fazem parte da nossa dieta. Assim, nos últimos anos, uma atenção crescente tem sido dedicada ao papel da dieta na saúde humana. Vários estudos epidemiológicos indicaram que a alta ingestão de produtos vegetais está associada com uma redução no risco de uma variedade de doenças crônicas como aterosclerose e câncer. Estes efeitos têm sido particularmente atribuídos aos compostos que possuem atividade antioxidante ou também na modulação da apoptose o que significam que os mesmos possuem efeitos anticarcinogênico (CAPECKA et al., 2005; GRIVICICH et al., 2007).

Os principais antioxidantes nos vegetais são as vitaminas C e E, os carotenoides e os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides. Esses antioxidantes absorvem radicais livres e inibem a cadeia de iniciação ou interrompem a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas pelos radicais livres. Além da ingestão de frutas e vegetais, que são recomendados como fontes de compostos antioxidantes, acredita-se que a suplementação da dieta com ervas, contendo altas concentrações de compostos capazes de desativar EROs, tenha também efeitos benéficos (CAPECKA et al., 2005).

Dentre os agentes antimutagênicos, Kada e Shimoi (1987) propuseram duas categorias desses agentes: os desmutagênicos que promovem a alteração química ou bioquímica dos agentes mutagênicos antes que danifiquem o DNA; e os bioantimutagênicos que suprimem o processo de fixação da mutação, após o DNA ser lesado pelo agente mutagênico. Para a prevenção de doenças como o câncer, existe a alternativa da quimioproteção que é baseada na modulação do mecanismo de defesa, através da ingestão de alimentos e medicamentos que possuem mecanismos potenciais de prevenção ao câncer e são efetivos em modelos de estudos pré-clínicos (DE FLORA et al., 1998).

Os mecanismos pelos quais essas patologias se desenvolvem, geralmente envolvem alterações oxidativas de moléculas consideradas críticas, o que inclui proteínas, carboidratos,

ácidos nucleicos além das substâncias envolvidas na modulação da expressão gênica e em respostas inflamatórias (LAGUERRE et al., 2007). Por outro lado, trabalhos têm relacionado o consumo de frutas e verduras a uma redução de várias doenças degenerativas como as doenças cardiovasculares e envelhecimento (SCALBERT, 2005).

Esta ação protetora dos alimentos deve-se a presença de compostos bioativos que possuem atividade antioxidante e anticarcinogênica como é o caso dos flavonoides. Os flavonoides formam uma classe de compostos naturais polifenólicos e muitos deles conferem cores atraentes para flores, frutas e folhas. Os flavonoides podem ser subdivididos em algumas das seguintes classes: flavanols, flavanonas, flavonois, flavonas e antocianidinas (RICE-EVANS et al., 1996). Dentro de uma classe, as diferenças são com base na variação em número e disposição dos grupos hidroxila e alquilação ou glicosilação destes grupos. A ampla variedade de flavonóides e as grandes diferenças no teor de flavonóides de determinados itens alimentares, torna difícil estimar a ingestão diária destes. Kuhnau em 1976 determinou que uma dieta diária média no mundo ocidental, contém aproximadamente 1 grama de uma variedade de flavonoides. No entanto, de acordo com Hollman e Katan em 1999, este número é provável que seja superestimado, pois eles consideram a ingestão diária de flavonoides a ser de apenas algumas centenas miligramas.

Entre os flavonoides com ação anticarcinogênica reconhecida está a quercetina (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavona) presente em níveis elevados em muitas frutas, (HOLLMAN et al., 1997; MENDOZA & BURD, 2011). Em alguns casos, a presença de um açúcar ligado a quercetina leva a outra denominação da estrutura, por exemplo, com um açúcar rutinose como um 3-O- glicosídeo o composto é chamado rutina, enquanto que quercetina com um ramnose na mesma posição é referida como quercetrina.

A ação da quercetina não é só antioxidante uma vez que têm a capacidade de regular moléculas importantes no controle da apoptose como é o caso da proteína p53 (MENDOZA & BURD, 2011). Geralmente células tumorais apresentam baixa ou nenhuma expressão da proteína p53, a elevação dos níveis desta molécula nestas células pode contribuir na indução da apoptose das mesmas (RUSSO et al., 2012). Entretanto, a biodisponibilidade da quercetina é relativamente baixa e níveis de ingestão muito altos desta molécula podem desencadear efeito contrário, com ação prooxidante (METODIEWA et al., 1999). Com relação ao seu efeito anti-ou pró-oxidante, a dose de quercetina é fundamental, bem como seu ambiente. Além dessas circunstâncias variáveis, as diferenças inter-individual podem desempenhar um

papel, como por exemplo sexo e idade, mas também constituição genética (MATEUCA et al., 2006).

2.3 Papel dos carotenoides na modulação da carcinogênese

O sistema antioxidante não enzimático também inclui moléculas importantes como os carotenoides (McLEAN et al., 2005). Carotenoides são pigmentos lipossolúveis, amarelos, laranjas e vermelhos, presentes em muitas frutas e vegetais. Em plantas superiores, estão localizados em organelas subcelulares (cloroplastos e cromoplastos). Nos cloroplastos encontram-se associados principalmente às proteínas e são, normalmente, mascarados pela presença de outros pigmentos clorofílicos dominantes. Atuam como pigmentos fotoprotetores na fotossíntese e como estabilizadores de membranas. Nos cromoplastos, eles são depositados na forma cristalina (ex. tomates e cenouras) ou como gotículas de óleo (ex. manga e páprica) (SIKORA et al., 2008).

As funções biológicas do β -caroteno, consideradas como propriedades essenciais para o bem estar dos organismos, incluem transferência de energia na fotossíntese; transferência de energia para fotoproteção, e conversão metabólica a retinoides, em animais com ingestão inadequada de vitamina A pré-formada (KRINSKY, 1994). Esta última constitui até o momento a única função biológica comprovada do carotenoide em humanos (OLSON, 1996).

A conversão metabólica do β -caroteno à vitamina A é quimicamente possível devido a sua estrutura molecular que contém anéis ionona não substituídos, ligados à cadeia lateral poliênica (rica em ligações duplas conjugadas). Sendo assim, o carotenoide pode, teoricamente, gerar duas moléculas de vitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997). A maior parte do β -caroteno absorvido pela mucosa duodenal é convertida a retinol (60 a 70%) que em seguida é metabolizado a ésteres de retinila no enterócito. Estes, juntamente com a molécula intacta do carotenoide, atingem o fígado através da linfa, veiculados por remanescentes de quilomicrons (PARKER, 1996).

O β -caroteno é transportado no plasma por lipoproteínas e estocado principalmente no tecido adiposo e fígado. A conversão metabólica do carotenoide a retinoides pode ocorrer também em tecidos de diferentes órgãos, tais como o fígado, pulmão e rins (OLSON, 1996; WANG, 1994; VAN VLIET, 1996). Estima-se que cerca de 70% do aporte de vitamina A da dieta humana advém dos carotenoides presentes nas frutas e vegetais, especialmente do β -caroteno (FOOD, 1988). O fator preconizado para conversão do carotenoide a retinol é de 6:1,

considerando-se a absorção de cerca de um terço e que, da quantidade absorvida, a metade seria convertida a retinol (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1989).

Os retinoides são compostos derivados da vitamina A, capazes de regular o crescimento e diferenciação celular. Por este motivo sua ação biológica e farmacológica tem sido bastante estudada bem como é de interesse a identificação e análise dos frutos ricos nestas moléculas. O mecanismo pelo qual os carotenoides protegem os sistemas biológicos está diretamente relacionado com o controle das EROs (ESTEUBAUER et al., 1989). No caso, carotenoides levam a um decréscimo da formação do oxigênio *singlet in vivo*, e pode também reagir diretamente com radicais peróxido e alcóxidos, desta forma, interfere na reação em cadeia da peroxidação lipídica. Adicionalmente, alguns carotenoides como o β -caroteno conhecido como *all-trans-retinoic acid* (ATRA) têm a capacidade de indução da diferenciação celular que, por sua vez leva a apoptose (revisão em SIDDIKUZZAMAN et al., 2011).

Portanto, o β -caroteno possui atividade protetora antitumoral via suas propriedades antioxidantes. Estudos epidemiológicos em que o β -caroteno mostram que o seu efeito antioxidante pode existir independente do seu papel como precursor da vitamina A. O β -caroteno agiria inibindo a transformação neoplásica (HALLIWEL & GUTTERDGE, 1989; ESTEUBAUER et al., 1989; SIDDIKUZZAMAN et al., 2011).

A ação anticarcinogênica dos retinoides deve-se também pelo fato de que estas moléculas têm a capacidade de regular diferencialmente a expressão de diversos genes celulares via diferentes isoformas de receptores. Estes diferentes receptores são essenciais na indução do efeito sobre a proliferação diferenciação celular que levam a restrição mitótica e também a indução de morte celular por apoptose das células tumorais (CHEN et al., 1991).

No caso, a transcrição dos genes sensíveis ao ácido retinoico depende da velocidade de transporte desta molécula para o interior das células bem como do seu período de exposição. Os receptores nucleares específicos dos retinoides são: os receptores do ácido retinoico (RAR-*retinoid acid receptors*) e os receptores de retinoides x (RXR *retinoid x receptors*). Além disto, os retinoides conseguem se ligar diretamente a genes estruturais, oncogenes, genes de fatores de transcrição e de citocinas (CLIFFORD et al., 1996).

Os RAR são codificados por três genes que dão origem as suas três isoformas: *alpha*, *beta* e *gamma*. No caso, estas isoformas são geradas pela presença de promotores alternativos que levam a processamento diferencial dos seus mRNAs (*splicing* alternativo). Como todos os receptores nucleares, os RARs também têm uma estrutura conservada consistindo de um domínio AF-1 ou A / B (*Activating Factor-1 transcriptional*); DBD um dedo de zinco ou C

(DNA-Binding Domain), um domínio CR ou D (*Hinge / Corepressor Binding*), um LBD ou AF-2 ou E (*Domain Activation Ligand-Binding/Transcriptional*), e um domínio variável de F (carboxi-terminal) (CHAMBON, 1996).

Entretanto, a concentração de β -carotenos também influencia sua ação antioxidante, de modo que concentrações que superam os 4-5 μM prejudicam sua habilidade protetora e/ou a reverterem em pró-oxidativa, neste último caso podendo, inclusive, promover danos no material genético. A demonstração desse efeito reverso por diversos estudos indica que suplementações com altas doses de micronutrientes devem ser atentamente acompanhadas pelos estudos, como em qualquer intervenção farmacológica (WOODS et al., 1999).

2.4 Caracterização do fruto tucumã: *Astrocaryum aculeatum*

Muitos frutos são ricos em carotenoides e outros compostos antioxidantes e anticarcinogênico. Este é o caso do tucumã oriundo de uma palmeira amazônica (CAVALCANTE, 1991; KAHN e MILLÁN, 1992). Ocorre em floresta de terra firme, vegetação secundária (capoeiras), savanas, pastagens e roçados, sendo excepcionalmente tolerante a solos pobres e degradados (FAO, 1987). Invade áreas desmatadas, onde possui ocorrência espontânea formando grandes e densas áreas com diversos tucumanzeiros em roças, pastagens e capoeiras. A disseminação do tucumã é feita principalmente pelos animais (cotias) que se alimentam da polpa e enterram as sementes no solo (KAHN e MILLÁN, 1992).



Figura 3 - População de Tucumã-do-amazonas (*Astrocaryum aculeatum*).
Fonte: Adaptado do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Os frutos servem para a alimentação humana e animais domésticos, dos quais o mesocarpo (polpa) é considerado uma fonte alimentícia altamente calórica, devido ao elevado conteúdo de lipídios, apresenta ainda quantidade expressiva do precursor da vitamina A, teores satisfatórios de fibra e vitamina E. O óleo considerado comestível, de cor amarela extraído do mesocarpo possui características organolépticas e nutritivas de alto valor para a indústria de alimentos e cosmética (YUYAMA et al., 2005).



Figura 4 - Tucumãs (inteiros e parcialmente descascados)
Fonte: Adaptado do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Trabalhos anteriores já demonstraram que na composição química do fruto do tucumã encontra-se, em média, 46% de umidade, 5% de proteínas, 30% de lipídios, 9% de fibras e 3% em minerais. O valor nutricional estimado é de 247 kcal/100g de tucumã. Apresenta em média 58 ± 4 mg/100 g de ácido ascórbico e grande capacidade antioxidante (GONÇALVES, 2008). Já a concentração de polifenóis é contraditória e, portanto talvez seja dependente do momento ontogênico do fruto ou das condições ambientais do seu cultivo. Gonçalves (2008) descreveu ainda presença de catequina (79 ± 5 mg/100g), quercetina $2,96 \pm 0,05$ mg/100g). Entretanto, a autora não observou presença outros polifenóis como a epicatequina, o campferol e a cianidina.

Recentemente um estudo identificou outros importantes compostos bioativos na polpa e casca do tucumã como a rutina, o ácido cafeico e o ácido clorogênico além de confirmar concentrações consideráveis de β -caroteno e de quercetina. O estudo também mostrou grande atividade antioxidante no tucumã (GARCIA et al., 2012).

O elevado potencial de pró-vitamina A (caroteno) foi detectado por muitos autores (YUYAMA et al., 2005; DE ROSSO e MERCADANTE, 2007). O estudo conduzido por

De Rosso & Mercadante (2007) identificou e quantificou 60 tipos diferentes de carotenoides em frutos amazônicos observou 21 destes compostos no tucumã.

A composição de carotenoides e de vitamina A observada no tucumã e descrita por De Rosso & Mercadante (2007) é sintetizada na Tabela 1. Cabe ressaltar que a unidade da atividade da vitamina A universalmente aceita é o equivalente de retinol (RE), baseado na atividade de 1 micrograma do *all-trans* retinol. A unidade internacional (UI), usada ainda em alguns contextos, é igual a 0,300 microgramas de *all trans* retinol. No caso, os diferentes tipos de carotenoides têm níveis diferentes da atividade da vitamina A dependendo da eficiência de sua absorção e da taxa de sua conversão à vitamina A (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

No tucumã o *trans*- β -caroteno foi o carotenoide encontrado em maior concentração representando 75% de todos os carotenoides identificados e quantificados.

A partir da concentração de carotenoides avaliada a quantidade estimada de pró-vitamina A no tucumã foi de 850 RE/100g. Considerando a presença de pró-vitamina A em outras frutas como a manga (104 a 127 RE/100g), papaia (19 a 74 RE/100g), acerola (148 a 283 RE/100g), brócolis (131 a 194 RE/100g), verduras folhosas (429 a 640 RE/100g), cenoura crua (308 a 625 RE/100g) e acerola (67 a 87 RE/mg) o tucumã apresenta níveis mais altos deste composto (DE ROSSO & MERCADANTE, 2007; GARCIA et al., 2012).

Tabela 1- Composição dos principais carotenoides encontrados na polpa do tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) descrita por De Rosso & Mercadante (2007)

Composição	Concentração ($\mu\text{g/g}$)
Total de carotenoides	62,65
All-trans β -caroteno	47,36
All-trans-R caroteno	1,68
All-trans- β -criptoxantinas	1,64
13-cis- β -caroteno	1,60
All-trans-R criptoxantinas	1,30
Zeinoxantina	1,02
Todas as trans-luteína	0,79
Cis-c-caroteno 3	0,89
15-cis- β -caroteno	0,80
5,8-epoxi- β -caroteno	0,76
Cis- β -zeacaroteno 2	0,65
Cis- β -zeacaroteno 1	0,60
All-trans- β -caroteno	0,52
All-trans- α -zeacaroteno	0,44
All-trans- ζ -caroteno	0,35
All-trans-neoxantina	0,26
Cis-violaxantina	0,24
Tall-trans-zeaxantina	0,16
All-trans u-caroteno	0,14
Cis-luteína	0,04

Um estudo recente feito por Garcia et al. (2012) identificou além de carotenoides outros compostos bioativos importantes tanto na polpa quanto na casca do tucumã que possuem ação antioxidante e anticarcinogênica reconhecida (Tabela 2).

Tabela 2 - Composição de fenólicos e flavonoides de *Astrocaryum aculeatum* (Fonte: Garcia et al., 2012)

Compostos	<i>Astrocaryum aculeatum</i>			
	Extrato da casca		Extrato da polpa	
	mg/g	%	mg/g	%
Ácido gálico	3.79 ± 0.01 a	0.38	14.25 ± 0.03 a	1.42
Ácido clorogênico	3.04 ± 0.03 a	0.30	1.19 ± 0.02 b	0.11
Ácido cafeico	8.33 ± 0.11 b	0.83	0.87 ± 0.01 b	0.09
Rutina	30.54 ± 0.04 c	3.05	19.06 ± 0.04 a	1.91
Quercetina	12.72 ± 0.01 d	1.27	6.53 ± 0.07 c	0.65
β-caroteno	62.91 ± 0.05 e	6.29	27.55 ± 0.10 d	2.75

Os resultados são expressos em média ± desvio padrão (DP) de três determinações. Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a p <0,005.

Considerando os carotenos presentes no tucumã, Chaves e Pechnik já no ano de 1947 descreveram que o consumo de 30g de polpa do fruto de tucumã, supriria três vezes a necessidade diária de vitamina A de uma criança e representa aproximadamente a dose diária recomendada para um homem adulto que é de 800 RE/100g. Assim, 100 gramas de polpa equivalem a 52.000 unidades de vitamina A. Em Manaus (AM), a exploração da polpa de tucumã e de seus derivados representa uma atividade econômica significativa e crescente no âmbito regional. A polpa é apreciada e consumida pela população na forma *in natura* ou como recheio de sanduíches, tapioquinha, cremes e sorvetes (FAO, 1987).

Estes resultados indicam que o tucumã pode apresentar tanto propriedades de prevenção a carcinogênese quanto propriedades quimioterapêuticas principalmente naquelas neoplasias sensíveis a ação dos retinoides como é o caso da leucemia promielocítica aguda (LPA).

2.5 Leucemia Promielocítica Aguda (LPA)

As LPAs fazem parte das Leucemias Mielocíticas Agudas (LMAs) representando um tipo altamente maligno de leucemia com tendência à hemorragia e a um alto risco de óbito em poucas semanas caso não for rapidamente tratada (revisão em SAEED et al., 2011; to CHOUDHRY & DELOUGHERY, 2012).

As LPAs constituem um grupo heterogêneo de doenças caracterizado pela expansão clonal de progenitores hematopoiéticos imaturos na medula óssea levando ao bloqueio da hematopoese normal. Alterações genéticas foram identificadas na maioria dos casos de LMA e a análise da genômica funcional levou à elaboração de modelos fisiopatológicos distintos para os subtipos de LMA, os quais, por sua vez, foram base para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (JÁCOMO et al., 2008).

Em termos epidemiológicos, a prevalência das LPAs é de aproximadamente, 10 a 15% dos adultos com diagnóstico de LMA com idade média de 40 anos, que é considerada mais baixa do que a idade média dos pacientes com outros tipos de LMAs (70 anos) (LÖWENBERG et al., 2003). Afeta 3 a 10% dos casos de crianças com LMA que apresentam, predominantemente, idade mais avançada, sexo feminino, baixa contagem leucocitária e frequentes problemas de coagulação sanguínea (MARTINEZ-CLIMENT, 1997).

Entre as LMAs, a LPA é um subgrupo que apresenta achados biológicos e clínicos peculiares. Isto porque está associada a uma síndrome hemorrágica que já era conhecida por hematologistas franceses desde 1949. Em 1957, Hillestad a descreveu como um subtipo distinto de LMA sendo fenotipicamente caracterizado por um acúmulo de promielócitos anormais na medula óssea e/ou sangue periférico, riscos de complicações trombóticas e hemorrágicas. Portanto, a LPA é uma neoplasia maligna caracterizada por uma diferenciação anormal das células mielocíticas. A descrição morfológica inicial da LPA enfatizava a sua presença, na medula óssea, de células blásticas hipergranulares semelhantes aos promielócitos. Embora o termo “leucemia promielocítica” tenha sido amplamente aceito desde 1957, alguns autores acham que não é o mais apropriado, uma vez que as células das LPA são morfológicamente diferentes dos promielócitos normais (SAINTY et al., 2000).

Assim, as LPAs correspondem aos subtipos M3 e M3 variante (M3v) da LMA, segundo a classificação Franco Américo Britânica (FAB), e ao subtipo de LMA associada à translocação entre os cromossomos 15 e 17, t(15;17) (Figura 5) segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde das Neoplasias Mieloides (SANTOS et al., 2004).

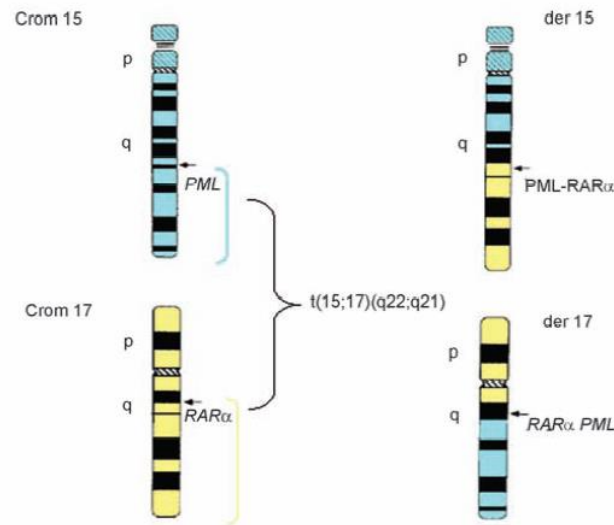


Figura 5 - Ilustração da quebra dos cromossomos 15(q22) e 17(q21), gerando a translocação (15;17), segundo Jácomo et al. (2008) que são diagnósticas as Leucemias Promielocíticas Agudas (LPAs).

Portanto, a principal característica diagnóstica da LPA é uma translocação cromossômica aberrante que justapõe o gene *PML* localizado no cromossomo 15 com o gene do receptor do ácido retinoico (*RARα*) localizado no cromossomo 17 (ROWLEY et al., 1977; KAKIZUKA et al., 1991). Esta translocação ocorre em 90% dos casos de LPA. Deste modo, o LPA geneticamente, está associado com alterações cromossômicas estruturais (translocação), envolvendo sempre o locus gênico para o receptor *alfa* do ácido retinoico (*RARα*), localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21).

Assim, o diagnóstico que confirma a LPA exige a demonstração das alterações cromossômicas específicas, quer por métodos de citogenética tradicional, quer por técnicas de biologia molecular. Entretanto, a citomorfologia e a imunofenotipagem contribuem significativamente para o mesmo (SANTOS et al., 2004).

Em células saudáveis a proteína sintetizada pelo gene *PML* é uma das principais proteínas constituintes dos corpos nucleares estando envolvida em diversas funções biológicas como a resposta ao dano do DNA, resistência a microrganismos através da regulação de uma ampla variedade de proteínas (JEANNE et al., 2010).

A alteração cromossômica induzida pela translocação leva a fusão dos genes *PML* que também é um fator de transcrição da linhagem mieloide, e do gene do receptor de ácido retinoico (*RARα*) resulta em um gene modificado relacionado à síntese de uma oncoproteína quimérica denominada *PML/RARα*. Essa proteína atua bloqueando a diferenciação

mielocítica, ainda que permita a maturação de mielócitos na presença de níveis farmacológicos do ácido retinoico (VILLA et al., 2004; ZHOU et al., 2005; GARCÍA et al., 2006, VITOUX et al., 2007).

Em termos citológicos a LPA apresenta morfologia celular característica com promielócitos anormais, núcleo excêntrico, abundantes granulações no citoplasma. Caracteriza-se, também, pela presença de múltiplos bastonetes de *Auer* no citoplasma, formando feixes que conferem a essas células a denominação de “*Faggot cells*” (células com maços ou feixes), como demonstrada na Figura 6 (revisão em SAGRILLO et al., 2005).

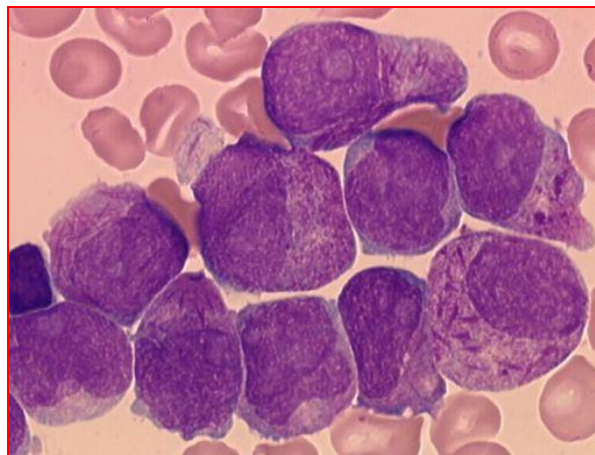


Figura 6 - Promielócitos hipergranulares presença de múltiplos bastonetes de *Auer* no citoplasma, formando feixes que conferem a essas células a denominação de “*Faggot cells*”
Fonte: Revisão em Sagrillo et al. (2005).

Estudos de marcadores de superfície celular mostram que as células da LPA têm um padrão distinto quando comparado a outras LMAs. Ocorre alta expressão de antígenos mielomonocíticos (CD13, CD15 e CD33) e ausência de expressão de antígenos monocíticos (CD14, incluindo My4, Leu M3 e Mo2 e HLA-DR (revisão em SAGRILLO et al., 2005).

2.5.1 Estrutura e Função do Gene *PML*

O gene *PML* é considerado um gene de supressão tumoral estando implicado no controle da estabilidade genômica a sua modificação funcional tem profundo impacto sobre a célula (Figura 5). Estudos em cultura de células sugerem que o gene *PML* controla a indução de apoptose dependente de p53. Controla também a supressão de crescimento e a indução a senescência celular em resposta à radiação ionizante e transformação oncogênica (GURRIERI et al., 2004; SALOMONI et al., 2012).

A proteína *PML* encontra-se organizada em dímeros é caracterizada pela presença de um elemento estrutural conhecido como "motivo tripartido" formado por um anel com um dedo de zinco, duas regiões B boxes, ricas em cisteína e uma região enrolada (*coiled-coil*). No núcleo, a proteína *PML* faz parte de um complexo de multiproteínas, estruturais nucleares conhecidas como corpos nucleares (*nuclear bodies*, NBs), juntamente com outras proteínas, tais como p53, pRB, Daxx, CBPs, etc (GURRIERI et al., 2004).

Na translocação cromossômica t(15;17), o ponto de quebra no gene *PML* pode ser variável, sendo capaz de gerar produtos de tamanhos diferentes, isoformas do transcrito *PML-RAR α* , entre os pacientes. No entanto, no mesmo paciente, o transcrito é invariável, o que demonstra a natureza clonal do fenômeno. A quebra do cromossomo 15 pode ocorrer em três locais diferentes do gene *PML* denominados *breakpoint cluster region (Bcr)* *Bcr1*, *Bcr2* e *Bcr3* (Figura 7a). Aproximadamente em 55% dos casos, a ruptura ocorre no *Bcr1* localizado no íntron 6 do gene, apenas 5%, aproximadamente, ocorre no *Bcr2*, localizado dentro do éxon 5, e os 40% restantes ocorrem no *Bcr3*, localizado no íntron 3 (VAN DONGEN et al., 1999; RAMÍREZ, 1995). Estudos indicam que a variabilidade genética está correlacionada à distribuição etno-geográfica. Por exemplo, pacientes latinoamericanos apresentam uma alta incidência de transcritos *bcr1/2*, contudo, a correlação entre esses subtipos de transcritos e parâmetros clínicos ainda é controversa (CHAUFFAILLE et al., 2001; DOUER, 2003; RUIZ-ARGÜELLES et al., 2004; MELO et al., 2006).

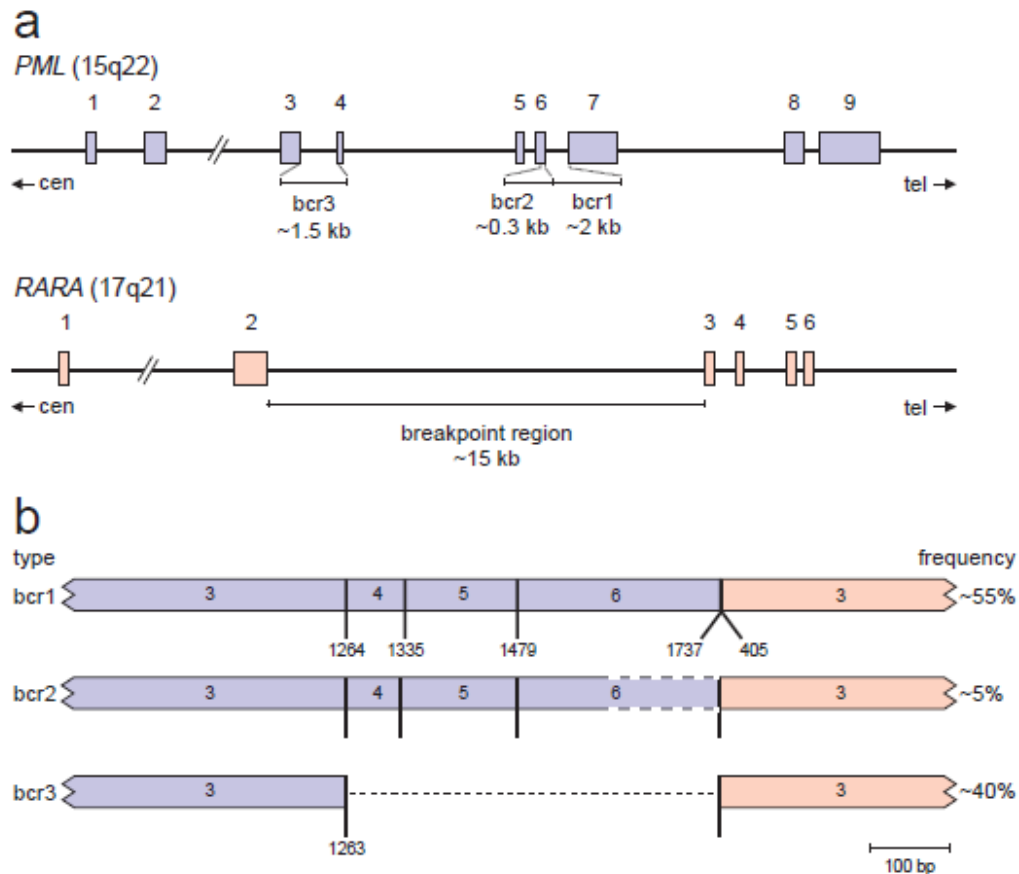


Figura 7 - (a) Diagrama esquemático da estrutura do éxon/íntron do dos genes *PML* e *RARα*, envolvidos na $t(15;17)(q22;q21)$. A orientação do centrômero e (cen) e dos telômeros (tel), a numeração dos éxons e as regiões de ponto de quebras relevantes são indicadas. As regiões dos pontos de quebras *bcr1* e *bcr2* são justapostos no íntron 6 e éxon 6 respectivamente. (b) Diagrama esquemático dos três tipos de transcritos *PML-RARα*, relacionados com os diferentes pontos de quebra no gene *PML* (VAN DONGEN et al., 1999).

2.5.2 Estrutura e Função do Gene *RARα*

O gene *RARα* codifica o receptor alfa do ácido retinoico, o qual faz parte da superfamília de receptores nucleares de hormônios que atuam como reguladores da transcrição dependentes do tipo de composto ligante. Estes receptores são capazes de se ligarem a segmentos específicos do DNA, denominados elementos responsivos ao hormônio que têm um papel fundamental na diferenciação da linhagem mielóide (ASOU, 2007). Estruturalmente, o receptor *RARα* possui seis domínios funcionais, a saber: região aminoterminal (A/B- que contém o domínio de transativação AF-1); o domínio de ligação ao DNA (DBD); o domínio D (região *hinge* – dobradiça); domínio de ligação ao ligante (LBD –

que possui na sua região C-terminal o domínio de transativação dependente do ligante AF-2); e região F, que não tem função conhecida (MELNICK e LICHT, 1999).

O receptor *alfa* do ácido retinoico (*RAR α*) se liga a elementos responsivos ao ácido retinoico (*RAREs*) presentes nas regiões promotoras de seus genes-alvo, os quais estão envolvidos com o processo de diferenciação da linhagem mieloide. Para isso, é necessária sua heterodimerização com o RXR (receptor nuclear do ácido 9- cis - retinoico) formando o complexo *RAR α /RXR*, o qual pode atuar como um complexo de repressão ou como um complexo de ativação da transcrição desses genes-alvo (Figura 8) (KASTNER e CHAN, 2001).

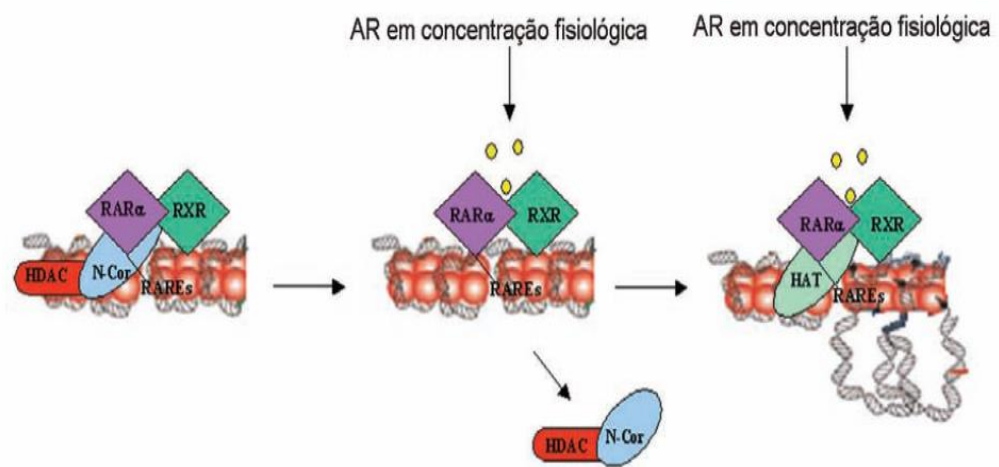


Figura 8 - Representação esquemática da ação do receptor alfa do ácido retinoico (*RAR α*) na região promotora de seus genes-alvo. (RXR receptor nuclear do ácido 9-cis-retinóico; RAREs - elementos responsivos ao ácido retinoico; N-Cor - correpresor transcricional; HDAC - histonas desacetilases; AR- ácido retinoico; HAT- histonas acetiltransferases)

Fonte: Leal et al. (2009)

Na translocação do cromossomo 17 associada à LPA, o ponto de quebra no gene *RAR α* é invariável na região t(15;17) ocorrendo sempre no segundo íntron (GRIMWADE et al., 1998).

Em aproximadamente 2% dos casos, o gene *RAR α* pode está fusionado com outros genes que não o *PML*, levando à formação de proteínas de fusão conhecidas genericamente como X-*RAR α* . Estas proteínas resultam em alterações estruturais, em sua grande maioria relacionada à translocações alternativas. Na nova classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) dos tumores dos tecidos hematopoéticos e linfoides, a presença dessas translocações alternativas envolvendo o receptor alfa do ácido retinoico é citada como

fazendo parte de leucemia aguda com translocação variante do *RARα*. (ZHOU et al., 2005; SWERDLOW et al., 2008; GRIMWADE et al., 2000; BROCKMAN et al., 2003; SAINTY et al., 2000).

Em raros casos, 0,8%, o *RARα* está fusionado ao gene *PLZF* (do inglês, *Promyelocytic Leukemia Zinc Finger*) (CHEN et al., 1991) levando à formação de dois genes híbridos: *PLZF-RARα* e o *RARα-PLZF* (REDNER, 2002). Esta LPA caracterizada geneticamente pela presença da $t(11;17)(q23;q21)$ apresenta algumas características morfológicas e imunofenotípicas que permitem diferenciá-la da LPA com a clássica $t(15;17)$. Estas características incluem: núcleo mais regular, aumento do número de células com projeções citoplasmáticas, expressão frequente de CD56 e morfologia intermediária entre LMA-M2 /LMA-M3. Assim, pacientes com LPA resistente ao tratamento com ATRA podem ser portadores da $t(11;17) - PLZF/RARα$ (JÁCOMO et al., 2008).

Outra alteração envolve o gene *NPM* (do inglês, *Nucleophosmin*), localizado no braço longo do cromossomo 5 (5q35) e o locus gênico *RARα* levando à formação de dois genes híbridos: *NPM-RARα* e *RARα-NPM* (REDNER, 2002). O fenótipo da LPA associado com essa translocação é morfológicamente conhecido como LMA-M3 (MELNICK e LICHT, 1999; REDNER, 2002). Existe também a translocação envolvendo o gene *NuMA* (do inglês, *Nuclear Matrix-Mitotic Apparatus* e o gene *RARα* levando à formação do gene híbrido *NuMA-RARα*. Como a proteína *NuMA* parece ter um papel no núcleo interfásico, por ser um importante componente da matriz nuclear, a mesma é importante no processo da mitose. Isto porque, auxilia na função do fuso celular, na reorganização nuclear durante a telófase. Também desempenha papel no processo de apoptose. Esta translocação é considerada o primeiro rearranjo genético descrito em que ocorre o envolvimento de um gene relacionado com o aparato mitótico em neoplasia humana (MELNICK e LICHT, 1999; REDNER, 2002; GRIMWADE e LO COCO, 2002). Dados da literatura mostram, também, que o gene *RARα* pode estar fusionado com o gene *Stat5b* (do inglês, *Signal Transducer and Activator of Transcription*) (ARNOULD et al., 1999).

Alterações adicionais à $t(15;17)$ são detectadas em 25-40% dos pacientes com LPA com grande predominância da trissomia do cromossomo 8 seguida por alterações envolvendo o cromossomo 17, o cromossomo 9 e o cromossomo 7. Já, casos de tetraploidia são extremamente raras na LPA (AU et al., 1999; KOJIMA et al., 2003).

A significância prognóstica das anomalias cromossômicas adicionais a $t(15;17)$ permanece incerta. Enquanto alguns relatos mostram associação com prognóstico desfavorável (HIORNS et al., 1997), outros sugerem um melhor prognóstico (SLACK et al.,

1997) e outros, ainda, não encontram associação entre alterações cromossômicas secundárias e prognóstico (SCHOCH et al., 1996; GRIMWADE et al., 1998; BOTTON et al., 2000).

Em geral as translocações envolvendo o gene *RAR α* levam a uma repressão gênica deste receptor que contribui para o bloqueio da diferenciação mieloide, ocorrência de desregulação do ciclo celular e vantagem proliferativa. Estas alterações culminam com a transformação leucêmica (WANG e CHEN, 2008; MELNICK e LICHT, 1999, SAEED et al., 2011).

2.5.3 Manifestações clínicas das LPAs e terapêutica associada

Na maioria dos casos, os pacientes portadores de LPAs apresentam sintomas relacionados à anemia, trombocitopenia, organomegalia e distúrbios da coagulação. Assim, a primeira manifestação clínica em LPA é a leucopenia e, na variante da LPA, é a leucocitose. Outras características menos frequentes são observadas em 15% a 20% dos pacientes e infiltração no sistema nervoso central e na pele são achados raros (revisão em SAGRILLO et al., 2005).

A morbidade e a mortalidade estão fortemente relacionadas à coagulopatia (revisão em CHOUDHRY e DELOUGHERY, 2012). Muitos pacientes morrem devido à hemorragia, especialmente intracraniana ou intrapulmonar. A incidência dessa hemorragia varia de 8% a 47% (WARREL et al., 1993) e a mortalidade é de 10% entre aqueles pacientes tratados (LO COCO et al., 1999). Promielócitos malignos revelam substâncias pró-coagulantes que ativam a cascata de coagulação, geralmente trombinas, liberam fibrinogênio, fatores de coagulação e plaquetas. Em razão dessa reação, os pacientes com LPA mostram coagulação intravascular disseminada (CIVD), fibrinólise e proteólise (WARREL et al., 1993; TALLMAN, 1999).

Clinicamente, difere das outras LMAs por estar associada à coagulopatia em cerca de 60% a 90% dos pacientes, a principal responsável pelas altas taxas de mortalidade (JÁCOMO et al., 2008).

Entretanto, a LPA tem o melhor prognóstico quando comparado a outras as leucemias agudas que ocorrem nos adultos. Isto porque, os esquemas quimioterápicos bem como as orientações de seguimento já são bem estabelecidos na literatura e acessíveis para o médico habituado ao tratamento antineoplásico (JÁCOMO et al., 2008).

O hemograma geralmente evidencia pancitopenia e, quando há leucocitose, ela costuma ser discreta. Blastos com morfologia de promielócitos, assim como evidências de anemia microangiopática (esquizócitos), podem ser vistos na lâmina de sangue periférico. O

mielograma apresenta infiltração maciça por promielócitos neoplásicos, que se coram fortemente à reação da mieloperoxidase e ao *Sudan Black*. Dois subtipos morfológicos podem ocorrer: o padrão hipergranular (ou subtipo FAB M3 clássico) e o microgranular (ou subtipo FAB M3 variante ou hipogranular), este último corresponde a 25% dos casos. A forma clássica se caracteriza pela presença de promielócitos anormais com granulação azurofílica abundante, núcleo irregular e bastonetes de *Auer*, que frequentemente se organizam em feixes, caracterizando as chamadas células de *Faggot* ou *Faggot cells* (Figura 6).

Na variante hipogranular, geralmente associada à leucocitose, observa-se grande número de blastos com núcleos bilobulados ou reniformes e granulação citoplasmática discreta. Pode haver a coexistência de blastos hipergranulares típicos em menor número. Há, ainda, uma forma hiperbasofílica rara, na qual as células leucêmicas têm alta relação núcleo-citoplasmática e citoplasma fortemente basofílico com granulação esparsa ou ausente (JÁCOMO et al., 2008).

2.6 Farmacoterapia e o potencial papel da dieta na Prevenção e Terapêutica da LPA

O uso dos retinoides para o tratamento do câncer tem progredido, particularmente para os casos de leucemia, neuroblastoma, cânceres de próstata e pulmão. Considerando a evolução histórica de cada composto retinoide, Allen e Bloxham sugeriram em 1989 a classificação dos retinoides em três grupos ou gerações. A primeira geração de compostos compreende o retinol (vitamina A) e os compostos derivados de seu metabolismo, como a tretinoína (ácido *todo-trans*-retinoico) e a isotretinoína (ácido *13-cis*-retinóico). A segunda geração compreende os análogos sintéticos da vitamina A com uma parte da molécula modificada para produzir compostos que apresentam somente parte do perfil farmacológico da vitamina A. Os principais representantes desta geração são o etretinato e a acitretina. Na terceira geração de compostos a molécula base da vitamina A é extensamente modificada com a perspectiva de selecionar uma atividade biológica específica da vitamina A, produzindo um fármaco com atividade biológica seletiva e com efeitos adversos mínimos. Os retinoides da terceira geração são altamente potentes e possuem dois anéis aromáticos que restringem a flexibilidade da cadeia lateral. Esta classe de retinoides tem sido denominada de carotenoides (ALLEN e BLOXHAM, 1989).

Em relação a LPA, uma vez que podem ocorrer múltiplas alterações cromossômicas relacionadas ao receptor do ácido retinoico, a eficácia do tratamento baseado no ATRA parece ser estritamente dependente do tipo de rearranjo genético presente nas células

leucêmicas. Deste modo, a confirmação do tipo de rearranjo é obrigatória durante o diagnóstico da LPA que deve ser rápido e preciso (SANZ et al., 2010; LOCK et al., 2004; SANZ et al., 2005).

Como foi anteriormente comentado, o curso clínico da leucemia promielocítica aguda tem sido modificado, nos últimos anos, de uma leucemia aguda rapidamente fatal para um dos subtipos de leucemia mieloide aguda mais curável. Este revolucionário progresso no prognóstico da doença está associado essencialmente aos avanços notáveis em seu tratamento, mais especificamente com a introdução de novos agentes terapêuticos que atuam diretamente na alteração molecular, como é o caso do ácido retinoico derivado da vitamina A (ATRA) e o trióxido de arsênico (ATO). Estas terapêuticas são consideradas como o primeiro exemplo de sucesso de terapia alvo molecular relacionada com a indução da diferenciação celular e da apoptose (AVVISATI et al., 2001; REITER et al., 2004; WANG e CHEN, 2008; SANZ et al., 2010).

Isto porque o ATRA, em doses farmacológicas, induz a diferenciação celular das células neoplásicas. Dessa forma, o clone leucêmico progride na maturação mieloide, tornando-se suscetível aos mecanismos de morte celular programada (JÁCOMO et al., 2008).

Estudos têm demonstrado que a oncoproteína de fusão *PML-RAR α* é o alvo direto do ATRA uma vez que o medicamento leva a sua degradação. As concentrações farmacológicas desse medicamento (10^{-6} - 10^{-7} M) induzem diferenciação do promielócito leucêmico, e a seguir a apoptose. Esta oncoproteína também é alvo do trióxido de arsênico (ATO), e pesquisas indicam que a região rica em cisteína do motivo *PML* da oncoproteína é a principal candidata para interagir com o ATO. A ação desse composto nas células leucêmicas é dose dependente, onde, em baixas concentrações, ocorre a indução da diferenciação parcial dessas células e, em altas concentrações, ocorre a indução de apoptose.

Pesquisas têm demonstrado que o ATRA, em combinação com o ATO, atua de forma sinérgica, aumentando a degradação da oncoproteína de fusão e a indução da apoptose celular, o que representa uma explicação plausível para os bons resultados observados na clínica (AVVISATI et al., 2001; REITER et al., 2004; WANG e CHEN, 2008; SANZ et al., 2010).

Dado o sucesso desta terapia, o tratamento com ATRA deve ser iniciado imediatamente diante da suspeita morfológica, mesmo antes da confirmação genética do diagnóstico, pois leva à melhora da coagulopatia e a diminuição do risco de sangramento grave. Entretanto, apesar de seu uso como monoterapia levar à remissão hematológica, todos os pacientes apresentam recaída. Assim, exceto para os pacientes com alguma contra

indicação clínica o ATRA deve ser administrado junto medicamentos antracíclicos (JÁCOMO et al., 2008).

Com o esquema combinado (ATRA e antracíclico), alcança-se remissão molecular em até 99% dos pacientes, com sobrevida livre de doença de 90% aos cinco anos do diagnóstico.

O tratamento é usualmente dividido em três fases: indução de remissão, consolidação e manutenção. As duas primeiras fases são fundamentadas no uso de ATRA e algum antracíclico, enquanto que a última fase é composta pela administração de ciclos de ATRA associado à metotrexate e mercaptopurina em baixas doses (JÁCOMO et al., 2008).

O mecanismo de ação terapêutica proposto é a indução à diferenciação dos precursores leucêmicos em células maduras. O ATRA exerce um efeito negativo no complexo *PML/RAR α* , quebrando a proteína quimérica além do complexo nuclear diacetil-histona (PINHEIRO et al., 2003).

Apesar da excelente resposta ao ATRA em pacientes com LPA associada ao *PML-RAR α* , os portadores de outras translocações envolvendo o *RAR α* apresentam sensibilidade variável à medicação. Nesses grupos, outras opções devem ser buscadas para o tratamento, como o arsênico e outros agentes diferenciadores (JÁCOMO et al., 2008).

Ainda que o ATRA é bem tolerado pela maioria dos pacientes, alguns podem desenvolver uma síndrome denominada Síndrome do ATRA. Esta síndrome apresenta os seguintes sintomas clínicos: febre, insuficiência respiratória e infiltrado pulmonar. A Síndrome do ATRA é, hoje, o principal efeito adverso do uso do ATRA no tratamento da LPA acometendo aproximadamente 14%-16% dos pacientes tratados. A sua letalidade é estimada entre 2%-10% (PINHEIRO et al., 2003).

Sendo assim, atualmente o tratamento molecular da LPA envolve a utilização do ATRA associada antraciclina combinada com trióxido de arsênico. O uso destes medicamentos apresenta alta eficiência no controle e remissão da LPA, apesar de existirem ainda alguns casos de recidivas da doença.

Apesar dos avanços nos tratamentos para diferentes tipos de neoplasias, a diversidade dos mecanismos que levam ao desenvolvimento do câncer, torna importante o estudo de substâncias que possam agir na prevenção, no atraso ou na reversão do fenótipo maligno das células cancerígenas. Além de atuar com eficiência nos casos de cânceres secundários ou recorrentes. Uma estratégia para a identificação de compostos anticarcinogênicos candidatos a serem usados na terapia das LPAs é a avaliação sob uma perspectiva farmacológica de fitoterápicos ou mesmo alimentos que possuem diferentes compostos bioativos, em especial os ricos em carotenoides e pró-vitamina A.

Apesar de possuir diversos efeitos farmacológicos da vitamina A, a aplicação terapêutica do ácido todo transretinoico via oral é bastante limitada também devido aos intensos efeitos colaterais de hipervitaminose, os quais ocorrem mesmo em concentrações terapêuticas. Entretanto, este tratamento requer acompanhamento e suporte médico intensivo, já que, além dos efeitos adversos comuns aos retinoides, cerca de 25% dos pacientes em uso de tretinoína desenvolvem a chamada síndrome do ácido retinoico-APL (RA-APL), caracterizada por febre, dispnéia, aumento de peso e presença de infiltrado pulmonar. Esta síndrome ocorre geralmente no primeiro mês de tratamento, sendo fatal em vários casos (WARREL et al., 1991). Em razão de sua atividade sobre a proliferação e diferenciação celular, os retinoides têm demonstrado eficácia na terapia antineoplásica de lesões pré-malígnas da mucosa oral, e a isotretinoína é eficaz na prevenção da ocorrência de tumores secundários no trato digestivo e respiratório superior em pacientes com carcinoma de células escamosas na cabeça e pescoço.

Além disso, a isotretinoína também apresenta efeito inibidor da carcinogênese em modelos experimentais com animais de laboratório e em culturas de células, inibindo também a proliferação de várias linhagens de células neoplásicas, como por exemplo, células de leucemia mieloide, melanoma, adenocarcinoma mamário e leucemia linfocítica (BREITMAN et al., 1981).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações do extrato etanólico do tucumã e do quimioterápico ATRA na reversão das propriedades carcinogênicas da linhagem de leucemia promielocítica aguda, NB4-LPA investigando adicionalmente se tais efeitos envolvem o metabolismo oxidativo.

3.2 Objetivos Específicos

- Obtenção do extrato etanólico e caracterização dos compostos bioativos;
- Caracterizar e quantificar os compostos bioativos presentes nos extratos etanólicos obtidos da casca e polpa do tucumã;
- Determinar o potencial antioxidante dos extratos da polpa e da casca do tucumã através das técnicas de sequestro de radicais 2,2- difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e de Potencial Antioxidante Reativo Total (TRAP);
- Determinar a presença de polifenóis, taninos, flavonoides e alcaloides totais presentes nos extratos da polpa e da casca do fruto;
- Realizar a identificação de compostos bioativos nos extratos através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos etanólicos obtidos da casca e polpa do tucumã;
- Investigar os efeitos citoprotetores dos extratos etanólicos isolados da casca e polpa do tucumã frente à cultura de linfócitos humanos submetidos ao tratamento com H₂O₂;
- Avaliar o efeito anticarcinogênico *in vitro* de células NB4 através da análise das taxas de proliferação, viabilidade celular e níveis de apoptose.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos científicos, os quais se encontram aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos. O primeiro manuscrito está disposto na forma que foi aceito na edição da revista científica *Food Chemistry*. O segundo manuscrito está disposto na forma em que normalmente se submete para publicação, obedecendo as normas da revista *Plant Foods for Human Nutrition*.

4.1 Extratos do fruto tucumã (*Astrocaryum aculeatum* meyer) diminuem os efeitos citotóxicos do peróxido de hidrogênio em linfócitos humanos

Artigo 1

Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes

Michele Rorato Sagrillo; Luiz Filipe Machado Garcia; Olmiro Cezimbra de Souza Filho; Marta Maria Medeiros Frescura Duarte; Euler Esteves Ribeiro; Francine Carla Cadoná; Ivana Beatrice Mânica da Cruz



Analytical Methods

Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes

Michele Rorato Sagrillo^{a,b,c,*}, Luiz Filipe Machado Garcia^{a,c,1}, Olmiro Cezimbra de Souza Filho^{a,c}, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte^c, Euler Esteves Ribeiro^d, Francine Carla Cadoná^{a,c,e}, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{a,c,e}

^a Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 21, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^b Centro Universitário Franciscano, Rua dos Andradas, 1614, 97010-032 Santa Maria, RS, Brazil

^c Laboratório de Biogenômica, Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000 Prédio 19, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^d Universidade Aberta da Terceira Idade, Universidade do Estado do Amazonas, Amazonas, Brazil

^e Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 April 2013

Received in revised form 27 September 2014

Accepted 10 October 2014

Available online 25 October 2014

Keywords:

Astrocaryum aculeatum

Carotenoids

DNA damage

Lymphocyte culture

ABSTRACT

This study quantifies the bioactive molecules in and determines the *in vitro* protective effect of ethanolic extracts isolated from the peel and pulp of tucumã (*Astrocaryum aculeatum*, Mart.), an Amazonian fruit rich in carotenoids. The cytoprotective effect of tucumã was evaluated in lymphocyte cultures exposed to H₂O₂ using spectrophotometric, fluorimetric, and immunoassay assays. The results confirmed that tucumã pulp extract is rich in β-carotene and quercetin, as previously described in the literature. However, high levels of these compounds were also found in tucumã peel extract. The extracts also contained significant amounts rutin, gallic acid, caffeic acid, and chlorogenic acid. Despite quantitative differences in the concentration of these bioactive molecules, both extracts increased the viability of cells exposed to H₂O₂ in concentrations ranging from 300 to 900 μg/mL. Caspases 1, 3, and 8 decreased significantly in cells concomitantly exposed to H₂O₂ and these extracts, indicating that tucumã cryoprotection involves apoptosis modulation.

© 2014 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Carotenoids are one of nature's major antioxidant pigments, found in several fruits. The reactive oxygen species (ROS) are highly reactive molecules and the body controls their degradation through two integrated antioxidant systems: an endogenous enzymatic system and exogenous control through the entry of non-enzymatic antioxidant molecules derived from the diet or produced by the body (Böhm, Edge, & Truscott, 2012). However, the biological properties of several fruits rich in carotenoids are not well characterised. This is the case of tucumã (*Astrocaryum aculeatum*, Mar, 1824), which belongs to the Arecaceae family and is distributed in the central region of the Amazon basin from south to north, tucumã grows in Bolivia (Beni, Pando, Santa Cruz), Brazil (Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima), Guyana, Suriname,

Trinidad, and, Venezuela. This fruit has several popular names chonta, tucumo, and panima in Bolivia; tucumã, tucumã-arara, tucumã-piranga, tucumã-piririca, tucumã-uassu-rana, tucum-assu, tucum-bravo, tucum-da-serra, tucum-do-matto, and tucum-purupuru in Brazil; akuyuro palm, cuyuru-palm, and tucumou in Guyana; amana, toekoemau, and warau in Suriname; and cumare and yavaide in Venezuela (Kahn, 2008).

Tucumã is a type of palm. Average in height, it comes from the Amazon rainforest. The trunk is heavily spined, and even the inflorescences are covered by a thorny spathe. Centesimal composition analysis of the tucumã using methods described by the Association of Official Analytical Chemists showed that the mesocarp contains 412.73 ± 2.12 kcal, 44.9 ± 0.30 g wet content, 10.9 ± 0.1 g fibres, 3.5 ± 0.07 g proteins, 8.5 ± 0.6 g carbohydrates, and 40.5 ± 0.5 g fats per 100 g of pulp. Previous studies have shown that the oil extracted from tucumã consists of 74.4% unsaturated and 25.6% saturated fatty acids and is rich in omega-3, -6, and -9 fatty acids (Aguiar, 1996).

The orange-yellow fruit (about the size of a chicken egg) is an excellent source of carotenoids. This fruit contains 21 different

* Corresponding author at: Av. Roraima 1000, Predio 19, Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 32208163; fax: +55 55 32208239.

E-mail address: sagrillomr@yahoo.com.br (M.R. Sagrillo).

¹ The two authors contributed equally in this study.

types of carotenoids in which all-trans- β -carotene (47.36 μ g), the precursor of vitamin A and which represents 75% of all carotenoids, is identified and quantified in this fruit (De Rosso & Mercadante, 2007). The vitamin A value found in tucumã is 850 RE/100 g, which is higher than other fruits such as papaya (19–74 RE/100 g), acerola (148–283 RE/100 g), and vegetables like carrots (308–625 RE/100 g) and broccoli (131–194 RE/100 g) (De Rosso & Mercadante, 2007). It is also an important source of vitamin B2 (riboflavin) and presents bioactive compounds like catechin and quercetin (Gonçalves, Lajolo, & Genovese, 2010). Additionally, the edible tucumã fruit is used for the production of biodiesel (Bora, Narain, Rocha, De Oliveira Monteiro, & De Azevedo Moreira, 2001).

Since DNA damage is generally regarded as an indicator of disease risk, we performed an *in vitro* study to investigate the potential cytoprotective effect of tucumã peel and pulp extracts in human lymphocytes exposed to hydrogen peroxide (H_2O_2), a prooxidant and genotoxic molecule.

2. Material and methods

2.1. Experimental design

To test the protective effects of *A. aculeatum* on cell viability and the protective effect on chromosome damage in human lymphocytes, we performed a protocol similar to the one described by Boligon et al. (2012). Briefly, we exposed the lymphocyte cell cultures to H_2O_2 (2×10^5 cells, 1 h, 37 °C). After one hour, the cells were treated with pulp and peel extracts from *A. aculeatum*. Six concentrations (100, 300, 600, 900, 1200, and 1500 μ g/mL) of these extracts were tested. A cultured medium containing cells without treatment was used as a negative control. The study of the Amazonian fruit was registered and approved by the Board of Management of Genetic Patrimony (CGEN) number 530.

2.2. Chemical characterisation of tucumã extracts

This study of tucumã was part of a project that has a Brazilian Access and Benefit Sharing Permit and was registered and approved by the Board of Management of Genetic Patrimony (CGEN) (ABSP n° 010547/2013-4) Tucumã peel and pulp extracts were obtained from a composite sample representing a mixture of progenies from a native forest near Manaus City (Amazonas State, Brazil), located in the Amazonian region (3.08°S, 60.01°W). Therefore, we used tucumã fruit collected directly from native palm trees found in primary and secondary forests, pastures, and home gardens. Tucumã usually flowers from June to January and produces fruit from February to August. We obtained the fruits from Manaus city in February, 2010.

The pulp and peel were manually removed, producing 400 g of peel and 800 g of pulp, which was kept frozen at -18 °C until extraction procedures were performed one week later. The ethanolic tucumã extract was prepared from tucumã pulp and peel samples that were titrated and placed separately into sealed amber glass jars containing an absolute ethanol solution at a ratio of 1:5 (w/v). The extraction was performed over four days at room temperature.

The homogenate was filtered through Whatman No. 1 paper and then collected; the ethanol was removed using a rotary evaporator at reduced pressure, 25 °C at 115 rpm. Following this procedure, the pulp and peel extracts were lyophilized and stored at -20 °C until they were to be used. We obtained 3.3 g of peel and 6.0 g of dried tucumã pulp extract.

To perform the experimental assays, the extracts were first diluted in 40% ethanol in order to improve the extract's solubilisation. This solution was then diluted in distilled water to obtain

<0.5% ethanol concentration in all tucumã concentrations tested. The ethanol was added in all control treatments to eliminate the potential influence of the ethanol in the results obtained.

Chemical characterisation of tucumã extracts was performed in triplicate, and all reagents were obtained from Sigma–Aldrich Co. (St Louis, USA). Total phenolic content (TPC) was determined using Folin–Ciocalteu's method (Chandra & Mejia, 2004). Briefly, 10 μ g samples of lyophilized powdered tucumã peel and pulp extracts were dissolved in 1 mL deionized water. These solutions (1.0 mL) were mixed with 2 mL of 20% sodium carbonate (Na_2CO_3) in deionized water and 0.5 mL 1 N Folin–Ciocalteu's phenol reagent. After incubation at room temperature for 10 min, the absorbance of the reaction mixtures was measured at 730 nm against a deionized water blank plus <0.5% ethanol.

The total phenolic content of samples was calculated as gallic acid equivalents, using a calibration curve of gallic acid standard solutions (5, 10, 15, 20, 25, and 30 μ g/mL of 0.2% aqueous gallic acid) and was analysed following the same method as the samples. The equation obtained for the gallic acid calibration curve was $y = 18.185x - 0.0266$ ($R^2 = 0.9783$). The results were expressed as mg gallic acid equivalents (mg GAE)/g dry plant extract material. The experiments were performed in triplicate.

The determination of the total tannin content was performed using the method described by Morrison, Asiedu, Stuchbury, and Powell (1995) with some modifications. Samples were prepared at a concentration of 0.25 mg/mL; 5 mL of solution A (1 g vanillin in 100 mL of methanol) and 5 mL solution B (8 mL HCl in 100 mL of methanol) were used in the experiment. The samples were read at 500 nm. The total tannin content was expressed as milligram equivalents of catechin per gram of sample. The equation obtained for the catechin calibration curve, ranging from 0.001 to 0.025 mg/mL, was $y = 0.00015x + 0.005$ ($r = 0.9989$). The experiments were performed in triplicate.

The alkaloid content was determined using the method described by Sreevidja and Mehrotra (2003), where Dragendorff's reagent (Bismuth sub-nitrate, 1.7 g; Glacial Acetic Acid, 20 mL; water, 80 mL; and 50% solution of Potassium iodide in water, 100 mL) precipitates alkaloids in plant materials. The samples were read at 435 nm in the spectrophotometer (UV-1100 Model, Pro-Analise CO, São Paulo, Brazil). The equation obtained for the calibration curve of bismuth nitrate pentahydrate solution in the range of 0.01–0.09 mg/mL was $y = 2.2783x + 0.0361$ ($r = 0.9997$).

Chromatographic analyses were carried out following the method described by Laghari et al. (2012), with slight modifications. The analyses were performed using a C18 column (4.6 mm \times 250 mm) packed with 5 μ m diameter particles. The mobile phases were water containing 2% acetic acid (A) and methanol (B). The gradient used started at 5% B and increased to 25%, 40%, 50%, 60%, 70%, and 100% B at 10, 20, 30, 40, 50, and 80 min, respectively. The flow rate was 0.8 mL/min, and the injection volume was 40 μ L. The lyophilized extracts of tucumã peel and pulp were dissolved in ethanol at a concentration of 3 mg/mL. All samples and mobile phases were filtered through a 0.45 μ m membrane filter (Millipore) and then degassed in an ultrasonic bath prior to use. Six different antioxidant compounds were investigated: gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, quercetin, rutin, and β -carotene. Identification of these compounds was performed by comparing the retention time and UV absorption spectrum with those of the commercial standards. The wavelengths used were 254 nm for gallic acid, 325 nm for caffeic and chlorogenic acids, 365 nm for quercetin and rutin, and 450 nm for β -carotene. Stock solutions of reference standards were prepared in mobile phase at concentrations ranging from 0.020 to 0.200 mg/mL for β -carotene, quercetin, and rutin and 0.050 to 0.250 mg/mL for gallic, caffeic, and chlorogenic acids. Chromatographic peaks were confirmed by comparing the retention time of samples with those of the referenced

standards and by comparing the DAD spectra (200–600 nm). The following calibration curves were obtained: gallic acid, $y = 10523x + 1478.8$ ($r = 0.9999$); caffeic acid, $y = 12765x + 1381.7$ ($r = 0.9995$); rutin, $y = 12,691 - 1165.0$ ($r = 0.9998$); quercetin, $y = 13495x - 1092.6$ ($r = 0.9999$); and β -carotene, $y = 13681x - 1518.7$ ($r = 0.9999$). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and were performed in triplicate.

2.3. Antioxidant capacity assays

The antioxidant capacity of tucumã pulp and peel extracts was evaluated by monitoring the ability of the extracts to scavenge the stable free radical DPPH according to a slightly modified method previously described by Choi et al. (2002). Spectrophotometric analysis was used to determine the inhibition concentration of tucumã extracts. DPPH scavenging ability was also calculated as IC₅₀ (the concentration that yields 50% inhibition). Eleven different ethanol dilutions of each extract (1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 140, 200, and 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were mixed with 1.0 mL of a 0.3 mol/L⁻¹ DPPH ethanol solution. The absorbance was measured at 518 nm against a blank after a 30 minute reaction at room temperature in a dark place. The DPPH solution (1.0 mL, 0.3 mol/L⁻¹) plus ethanol (2.5 mL) was used as a negative control. The natural antioxidants, rutin and ascorbic acid, were used as positive controls. The percentage inhibition of free radicals by DPPH (IP%) was calculated in the following way: $\text{IP}\% = 100 - [(\text{ABS}_{\text{sample}} - \text{ABS}_{\text{blank}}) / (\text{ABS}_{\text{control}} - \text{ABS}_{\text{blank}})] \times 100$, where ABS_{sample} is the absorbance of the test compound, ABS_{blank} is the absorbance of the blank (containing 1.0 mL of ethanol plus 2.5 mL of the plant extract solution), and ABS_{control} is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test compound). IP% was plotted against the sample concentration, and a linear regression curve was established to calculate the IC₅₀. Tests were performed in triplicate.

A second protocol to evaluate the antioxidant capacity of tucumã extracts was also performed. A total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) assay was adapted and used to determine the capacity of tucumã extracts to trap a flow of water-soluble peroxy radicals produced at a constant rate through the thermal decomposition of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) (Silva et al., 2007). The assay was performed in a 96-well plate. The reaction mixture contained 300 μL of the free-radical source (10 mol/L⁻¹ AAPH) in a 0.1 mol/L glycine buffer (pH 8.6), 10 μL of the test samples at different concentrations, and 10 μL of luminol (1 mol/L⁻¹) as the external probe to monitor radical production. The reactions were incubated at 20 °C. The chemiluminescence produced is directly proportional to radical generation and was recorded as counts per minute. The TRAP capacity of tucumã extracts was evaluated for instantaneous inhibition of chemiluminescence as area under the curve (AUC). The total antioxidant reactivity (TAR) was calculated as the ratio of light intensity in the absence of samples (I₀) to the light intensity after *A. aculeatum* addition (I) and was expressed as a percentage inhibition.

2.4. Blood collection and lymphocyte culture

In this study, human blood was used to perform the *in vitro* experiments. The protocol was approved by the Federal University of Santa Maria Ethics Committee Board (23081.015838/2011-10) and donors signed a consent term. Peripheral blood samples were obtained from three apparently healthy volunteers (22–25 years of age), who did not smoke, drink alcoholic beverages more than two times a week, or take prescription drugs. The samples were collected after 12 h of overnight fasting by venipuncture using a top Vacutainer® (BD Diagnostics, Plymouth, UK) and heparin tubes. The Histopaque-1077® (Sigma–Aldrich Co. (St Louis, USA)) density

gradient was used to separate lymphocyte cells using 4 mL blood samples. After further centrifugation for 15 min at 2500g, the cells were transferred to culture media containing 5 mL RPMI 1640 with 10% foetal bovine serum, 1% penicillin and streptomycin, phytohemagglutinin, and tucumã extracts at different concentrations. After one hour, H₂O₂ was added in the cultures. The cells were cultured in a 96-well microplate at an initial density of 2×10^5 cells for 72 h at 37 °C in a 5% humidified CO₂ atmosphere (Laghari et al., 2012). In addition, the cells were counted, centrifuged for 10 min at 2000g, and transferred to a new culture media containing H₂O₂ treatments with and without tucumã extracts for one hour. Cell viability and DNA damage analysis were evaluated; a DNA fragmentation assay and a caspases activity analysis were also performed.

2.5. Cell viability

Cell viability was evaluated before and after treatment exposition using the MTT assay, a colorimetric assay that measures the reduction of yellow 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) by mitochondrial succinate dehydrogenase (Choi et al., 2002). Cell viability was expressed as a percentage of the control value. To perform the MTT assay, this reagent (Sigma–Aldrich Co. (St Louis, USA)) was dissolved in a 5 mg/mL phosphate buffer (PBS, 0.01 mol/L; pH 7.4), added into a 96-well microplate containing the sample treatments, and incubated for four hours. In addition, the supernatant was removed from the wells and the cells were resuspended in dimethyl sulfoxide (DMSO). The absorbance at 560 nm was read in a TP-Reader (Thermoplate, China). This assay was performed in octuplicate for each treatment.

2.6. DNA denaturation assay

The DNA denaturation assay was applied by a protocol previously described by Batel et al. (1999). The method is based on the ability of the specific fluorochrome dye (PicoGreen®) to make a very stable complex with dsDNA in alkaline conditions instead of ssDNA, proteins, SDS, and urea. This selectivity characteristic used to follow DNA denaturation with decreasing fluorimetric signal intensity proportionate to increasing ssDNA and mononucleotide content. Initially we evaluated the potential acute effect tucumã extracts on DNA denaturation.

Two tests were performed: one testing the acute effect of tucumã extracts on DNA damage and the other after 24 h of lymphocyte treatment with tucumã extracts. In the acute effect experiment, a kinetic of DNA denaturation (15, 30, and 60 min) was evaluated. The fluorescence was measured at an excitation of 485 nm, and an emission of 520 nm was recorded at room temperature (SpectraMax M2/M2e Multi-mode Plate Reader, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Expression of results to DNA strand break calculations were made in relation to control values at the time of each denaturation after correction for blank readings. Blank values were measured in wells containing only the samples. Results were expressed as a percentage of dsDNA and were calculated for each treatment in relation to the untreated control samples.

2.7. Caspases activity assays

The lymphocyte were incubated under the conditions described above for 24 h. The analyses were performed using the Quantikine Human Caspases Immunoassays to measure Caspase-1, 3, and 8 in cell culture supernates using a microplate with 96 wells, according to the manufacturer. Briefly, all reagents and working standards were prepared, and the excess microplate strips were removed. The assay diluent RD1W was added (50 μL) to each well. Further-

more, 100 μ L of the standard control for our sample was added per well. The sample was then covered with an adhesive strip and incubated for 1.5 h at room temperature. Each well was aspirated and washed twice, for a total of three washes. Caspase-1 antiserum was added to each well and covered, and the sample was given a new adhesive strip and incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated and the Caspase-1 conjugate (100 μ L) was added to each well and the sample was incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated again, and 200 μ L of substrate solution was added to each well, and the sample was incubated for 20 min at room temperature. Finally, the 50 μ L stop solution was added to each well and the optical density was determined within 30 min using a microplate reader set to 450 nm. Experiments were performed in triplicate.

2.8. Statistical analysis

Data are presented as mean and standard deviation of the mean (\pm SD). Statistical differences between groups were evaluated by analysis of variance One-Way followed by the Tukey *post hoc* test. All statistical analyses were performed where all *p* values were two-tailed, and *p* < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Chemical composition of tucumã extracts

The TPC, flavonoid, tannin, and alkaloid concentrations were determined in tucumã extracts (Table 1). The results showed a higher concentration of these bioactive compounds in the peel extracts than in the pulp extracts. Flavonoid and tannin content were also determined in tucumã extracts, as observed in Table 1, with the highest values occurring in the peel extract. HPLC fingerprinting of lyophilized tucumã extracts revealed the presence of gallic acid (tR = 17.83 min, peak 1), chlorogenic acid (tR = 28.14 min, peak 2), caffeic acid (tR = 34.09 min, peak 3), rutin (tR = 41.53 min, peak 4), and quercetin (tR = 48.28 min, peak 5). The last peak in Fig. 1 represents the β -carotene peak (tR = 57.64 min, peak 6).

Of the six bioactive compounds analysed here, four were found in tucumã extracts for the first time: rutin, gallic acid, caffeic acid, and chlorogenic acid. Other than gallic acid, which showed a higher concentration in tucumã pulp extract, the molecules were more concentrated in tucumã peel extract.

3.2. Antioxidant capacity assays

Tucumã peel and pulp extracts scavenging activity against DPPH radicals were determined at concentrations of 1, 5, 10, 20,

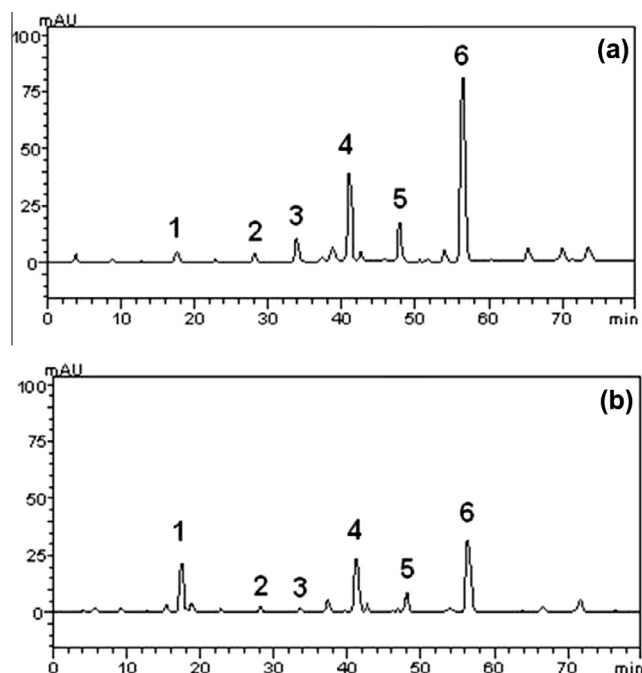


Fig. 1. Representative high performance liquid chromatography profile of *Astro-caryum aculeatum*. Lyophilized extract of bark (a) and lyophilized extract of pulp (b), detection UV was at 325 nm. Gallic acid (peak 1), chlorogenic acid (peak 2), caffeic acid (peak 3), rutin (peak 4), quercetin (peak 5) and β -carotene (peak 6). Chromatographic conditions are described in Section 2.

40, 60, 80, 100, 140, and 240 μ g/mL. For a positive control, rutin and ascorbic acid were used at the same concentrations as the extracts. We observed that both extracts had a strong antioxidant capacity. At a concentration of 20 μ g/mL, the tucumã extracts inhibited >80% of DPPH radicals. The 50% concentration to inhibit DPPH radicals (IC₅₀) was also calculated. The IC₅₀ was estimated to be 11.24 μ g/mL for tucumã pulp extract, 8.98 μ g/mL for tucumã peel extract, 5.92 μ g/mL for rutin, and 4.89 μ g/mL for ascorbic acid.

We also analysed tucumã antioxidant activity using a TRAP assay. Initially, this test was performed at five concentrations (1, 5, 10, 30, and 100 μ g/mL), similar to the concentrations tested in the DPPH assay. However, we found higher antioxidant activity (>80% of inhibition) at all concentrations. For this reason, we changed the range of concentrations of the tucumã extracts to include several lower concentrations (1, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000, 5000, and 10,000 ng/mL).

As observed in Fig. 2 and 25 ng/mL of peel extract and 50 ng/mL of pulp extract started to inhibit the pro-oxidant pulse generated

Table 1
Contents of total phenol contents, flavonoids tannins and alkaloids of tucumã extracts (*A. aculeatum*).

Compounds	Peel extract		Pulp extract	
	Total value	*mg/100 g	Total value	*mg/100 g
TPC (mg/GAE g)	941.8	790.95	872.1	426.35
Flavonoids (quercetin mg/g)	92.8	77.52	53.3	26.06
Tannin	31.4	26.37	8.24	4.03
Alkaloids	1.5	1.26	0.93	0.45
β -Carotene (%)	6.29	52.83	2.75	20.97
Rutin (%)	3.05	25.64	1.91	14.51
Quercetin (%)	1.27	10.68	0.65	4.97
Gallic acid (%)	0.38	3.18	1.42	10.85
Caffeic acid (%)	0.83	6.99	0.09	0.66
Chlorogenic acid (%)	0.30	2.55	0.11	0.91

GAE = gallic acid equivalent; TPC = total phenolic content expressed as extract; the total value were determined from three replicate measure performed to each compound analysis.

* mg/100 g fresh fruit.

by the free-radical-producing system of the TRAP assay. At 500 $\mu\text{g/mL}$, the inhibition levels were similar in both extracts (94.6% and 95.5%). The IC₅₀ of the tucumã peel and pulp extracts were estimated to be $102.38 \pm 4.8 \mu\text{g/mL}$ and $224.57 \pm 3.9 \text{ ng/mL}$.

3.3. Cell viability

As expected, the H_2O_2 significantly decreased lymphocyte viability when compared to control samples and the tucumã treatments partially reverted the cytotoxicity caused by H_2O_2 in the MTT ($F = 86.727$, $p = 0.0001$) blue exclusion assay. As seen in Fig. 3, the 600 and 900 $\mu\text{g/mL}$ concentrations of both extracts presented the better protective effect against H_2O_2 toxicity.

3.4. DNA denaturation assay

Quantification of plasma DNA was done using fluorescent Pico-Green dye, which is highly specific for dsDNA (Fig. 4). The H_2O_2 significantly increased the dsDNA level in supernatant medium culture when compared with an untreated control group indicating cell damage. In the presence of all concentrations of tucumã peel extract, occurred partial reversion of this damage ($F = 27.731$, $p = 0.0001$). In spite of this, the tucumã pulp extract at 100 $\mu\text{g/mL}$ concentration did not revert the cell damage triggered by H_2O_2 ; the other high concentrations totally reverted this damage

since the dsDNA values were similar to the untreated control group, and at 900 $\mu\text{g/mL}$, these values were lower than the control group ($F = 49.638$, $p = 0.0001$).

3.5. Caspases activity

The activity status of the proapoptotic proteins caspase-1, 3 and 8 was measured in lymphocytes treated with tucumã peel and pulp extracts at different concentrations exposed or not exposed to an H_2O_2 prooxidant molecule. The results are presented in Fig. 5. All caspases levels were increased in cells exposed to H_2O_2 indicating cell death induction. However, the medium supplementation with peel and pulp tucumã extracts reversed this effect. At 100 and 300 $\mu\text{g/mL}$ of tucumã extracts occurred the caspase 1 levels were similar to untreated control cells. Tucumã extract also affected the caspases 3 and 8 levels of cells exposed to H_2O_2 molecule. However, this effect was partial because the caspases levels were intermediary between untreated cells and cells exposed just to H_2O_2 molecule.

4. Discussion

The present study investigated the effect of extracts of tucumã, an Amazonian fruit rich in carotenes and bioactive compounds such as quercetin, on lymphocyte cells exposed to the toxic effect

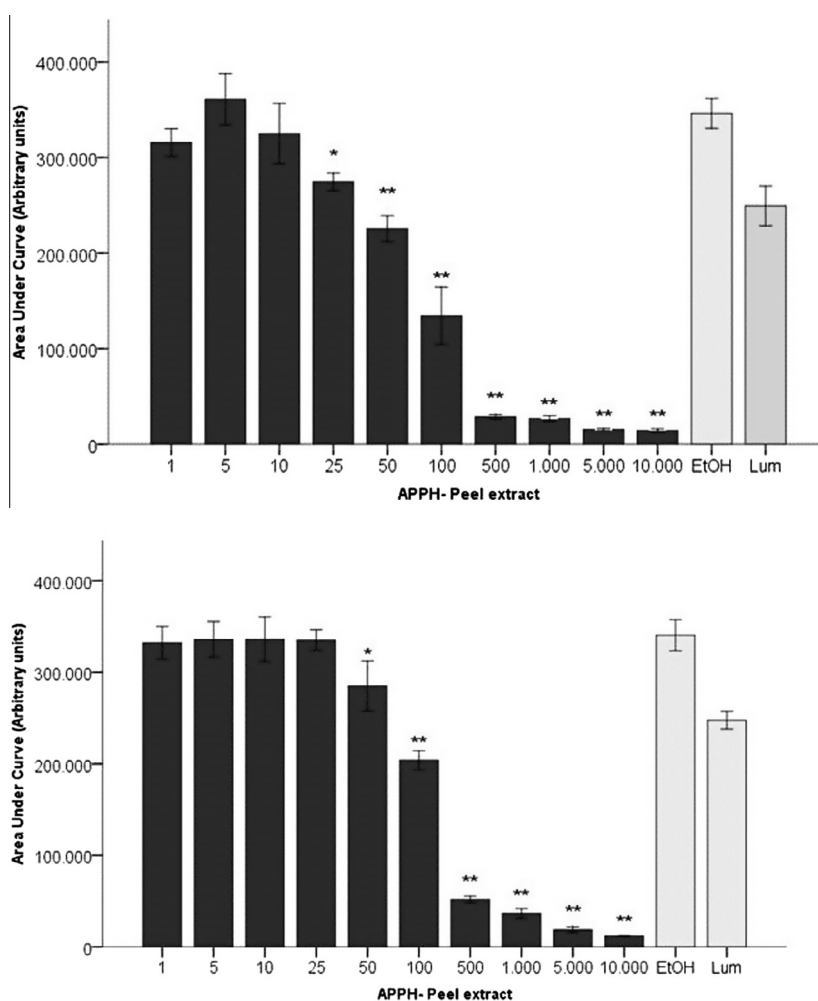


Fig. 2. Antioxidant activity determination expressed as the net area under the curve (AUC) from TRAP assay. (A) Antioxidant activity of tucumã pulp extract at different concentrations (1, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10,000 $\mu\text{g/mL}$). (B) Antioxidant activity of tucumã peel extract at different concentrations (1, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10,000 $\mu\text{g/mL}$); EtOH and Lumino control groups.

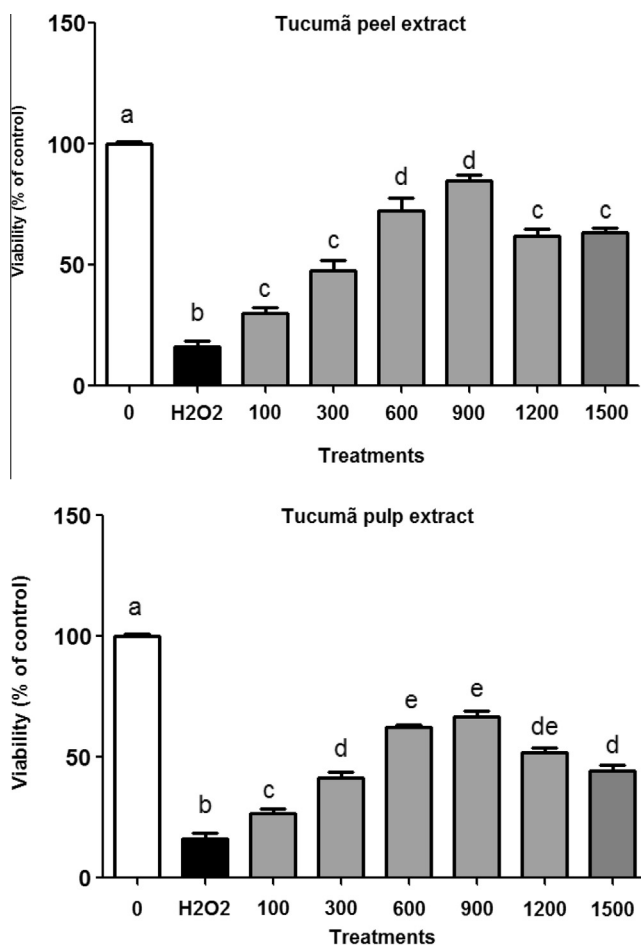


Fig. 3. Comparison of cytotoxicity. Comparison of cytotoxicity evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolic bromide (MTT) reduction among human lymphocyte cells exposed to H₂O₂ and treated to peel (A) and pulp (B) ethanolic extracts at different concentrations. Values are mean ± SE. Different letters within extract treatment indicate statistical differences compared by one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* tests.

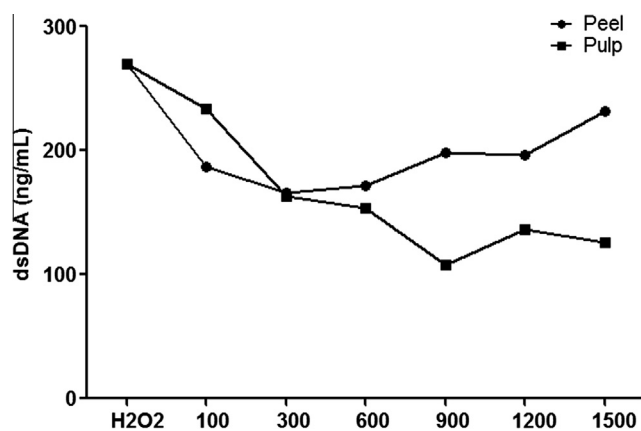


Fig. 4. DNA double-strand denaturation of human lymphocyte cells. DNA double-strand denaturation (dsDNA, ng/mL) of human lymphocyte cells after exposure to H₂O₂ and treated to tucumã peel (A) and pulp (B) ethanolic extracts at different concentrations. Values are mean ± SE. Different letters within extract treatment indicate statistical differences compared by one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* tests.

of H₂O₂. In general, the results showed a beneficial effect of tucumã extracts on the cyto and genotoxicity lymphocytes exposed to H₂O₂.

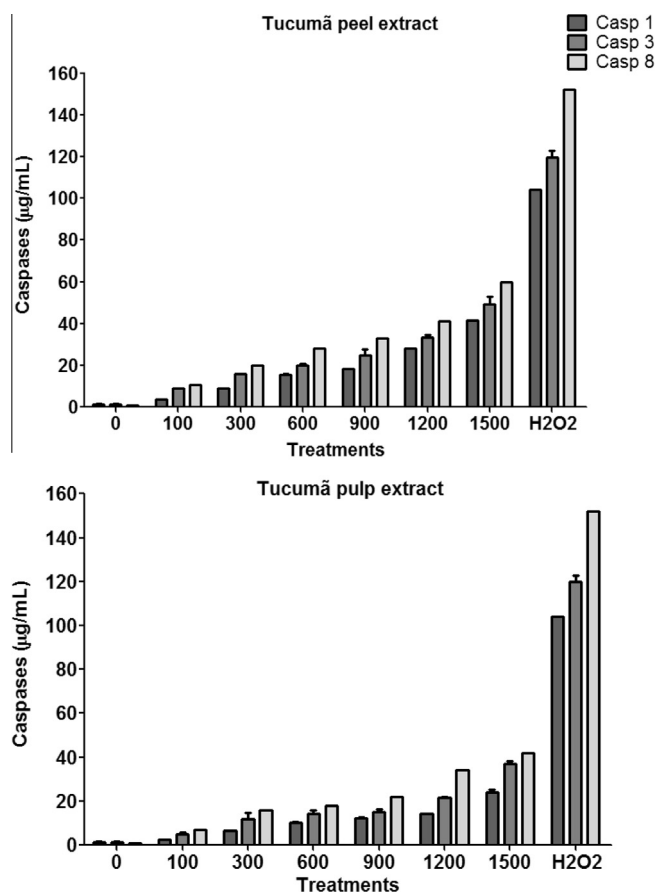


Fig. 5. Activation of caspases 1, 3, and 8. Activation of caspases 1, 3, and 8, analysed by immunoassay tests of human lymphocyte cells after exposure to H₂O₂ and treated with ethanolic tucumã extracts at different concentrations. Peel extracts (3A = caspase 1, 3B = caspase 3, 3C = caspase 8); Pulp extracts (3D = caspase 1, 3E = caspase 3, 3F = caspase 8) (Values are mean ± SE). Different letters within extract treatment indicate statistical differences compared by one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* tests.

The results observed here are probably related to antioxidant molecules found in the peel and pulp extracts. The tannin and alkaloid contents found in tucumã peel and pulp extracts are lower when compared to extracts of other fruits, such as red grapefruit and pomegranate. A lower tannin concentration found in the extracts analysed here confers some safety in tucumã consumption, because an excess of tannins can lower protein digestibility and cause gastric enzymatic inhibition. β-Carotene and quercetin were previously measured in tucumã fruit (De Rosso & Mercadante, 2007; Gonçalves et al., 2010). Therefore, data from these two important compounds in our extracts served to validate our protocol that described new chemical elements in the tucumã fruit. Quercetin and rutin have been reported to carry out numerous biochemical and pharmacological activities, including free-radical scavenging and ultraviolet-light protection. These molecules also have effects on immune and inflammatory cell functions (Mosmann, 1983).

Tucumã pulp extract contained a higher gallic acid concentration than the peel extract. We estimate that the ingestion of 100 g of fresh tucumã gives a similar amount of gallic acid as the ingestion of approximately 130 mL of red grape juice. This juice is considered one of the predominant sources of gallic acid in the human diet. Although caffeic and chlorogenic acids were found at low concentrations in tucumã, the levels of these compounds were higher in peel than in pulp extracts.

The bioactive molecules present in the tucumã extracts probably contributed to their antioxidant capacity, and this was confirmed by DPPH and TRAP assays. The DPPH assay of tucumã pulp extract had been previously reported by Gonçalves et al. (2010). However, to the best of our knowledge, the antioxidant effect of tucumã peel extract has not been reported before. However, the important concentration of antioxidant molecules in tucumã extracts is not a guarantee that these extracts would be able to revert oxidative stress in biological systems exposed to prooxidant molecules, such as the H_2O_2 molecule.

We chose H_2O_2 as the prooxidant molecule since, along with the superoxide radical and hydroxyl radical, H_2O_2 is one of the three major reactive oxygen species (ROS): metabolic by-products continuously generated by the mitochondria in growing cells as a consequence of aerobic metabolism (Halliwell, 1992). Nevertheless, at low levels, H_2O_2 should be considered a signalling molecule in several cell processes because at high levels, H_2O_2 causes damage to organelles, particularly the mitochondria. Potentially damaging oxidative stress can be generated by excess ROS, and dysfunction may result in energy depletion, accumulation of cytotoxic mediators, and cell death (Lima et al., 2008). This cell injury process occurs since, in a high concentration, ROSs like H_2O_2 cause damage to cellular proteins and lipids or form DNA adducts that can promote carcinogenic activity (Choquet, Couteau, Papis, & Coiffard, 2008) 18. In these terms, the consequence of cell oxidative stress reversion indicates the potential preventive role of the cell oxidative stress by the tucumã extracts. It is important, however, to point out that we did not find a linear response related to different tucumã extract concentrations on lymphocyte cell cyto- and geno-toxicity caused by H_2O_2 . This fact needs to be discussed in greater depth.

Two potential explanations should be considered for the interpretation of these results. Firstly, in respect to an occurrence of chemical compounds in tucumã, higher concentrations can decrease the positive effect of other compounds, such as antioxidant molecules also present in the extracts. This is the case with alkaloid compounds. Some alkaloid compounds are toxic to several organisms and others are used as pharmacological drugs (Castro & Freeman, 2001). In the extracts tested here, we found a higher total alkaloid concentration in the peel when compared to tucumã pulp extracts.

Another possible explanation is related to the increase of antioxidant concentrations present in the extracts that were tested. This is the case with carotenoids that are present in high concentrations in tucumã fruit as described in previous studies and in our results (Morrison et al., 1995; Sreevidya and Mehrotra (2003); Laghari et al., 2012). De Rosso and Mercadante (2007) described 24 carotenoids of which 21 were chemically identified in tucumã fruit. The all-trans- β -carotene was found to be the principal carotenoid, representing 75% of the total carotenoid content in tucumã, followed by 13-cis- β -carotene, all-trans- α -carotene, and all-trans- β -cryptoxanthin, each representing between 2.0% and 2.8% of the total carotenoid content. The other 19 carotenoids represent 15% of the total content. The analysis showed that tucumã offers one of the highest concentrations of pro-vitamin A (β -carotene), with 52 mg/100 g pulp. This concentration is approximately eight times higher than that which is found in carrots (6.6 milligrams/100 g pulp). The mean consumption of 30 g of tucumã pulp can supply three times the daily vitamin A requirement for an adult (Morrison et al., 1995).

Carotenoids are naturally occurring organic pigments and are precursors to vitamin A, which is indispensable for cell differentiation, embryonic development, and vision, as well as having many other roles, including potential therapeutic benefits in the treatment of several morbidities due to their antioxidant properties (Lee, Giordano, & Zhang, 2012). There is little to no doubt that

carotenoids and their oxidation products exhibit important bioactivities in cell lines and that the use of cell cultures to interrogate the mechanisms of action may well help in designing sensible clinical trials. However, prospective randomized trials have failed to demonstrate a consistent benefit for the carotenoid β -carotene in patients at risk for CVD. The basis for this apparent paradox is not well understood, but may be attributed to the distinct antioxidant properties of various carotenoids resulting from their structure-dependent physicochemical interactions with biologic membranes (Böhm et al., 2012). Therefore, we cannot discard the idea that high tucumã extract concentrations that present higher carotenoids levels could interrupt the cytoprotective effects observed in lower concentrations.

Similar results were observed when the potential protector effect of tucumã peel extract on DNA damage of lymphocytes exposed to H_2O_2 was analysed. The treatments with 300 and 600 μ g/mL presented a better protective action than treatments with tucumã peel extracts in both lower and higher concentrations. However, all pulp extract treatment at concentrations >100 μ g/mL reverted the DNA damage caused by H_2O_2 to a similar level observed in untreated control cells. These results are in concordance with some previous studies, which observed that some carotenoids, such as β -carotene, increased DNA resistance to oxidative damage at relatively low concentrations. However, this protection was rapidly lost with an increasing carotenoid concentration (Astley, Hughes, Wright, Elliott, & Southon, 2004; Lowe, Booth, Young, & Bilton, 1999).

On the other hand, compared with the peel, the pulp extract had approximately 50% lower concentration of β -carotene. Perhaps the differences in the concentration of this and the other compounds like alkaloids can explain the different results on DNA damage of lymphocytes exposed to H_2O_2 since tucumã concentration >100 μ g/mL presented a genoprotective effect (Fig. 4). Independent of the causes leading to any differences between tucumã peel and pulp extracts, the results suggest that the edible pulp presents genoprotective properties.

H_2O_2 has the capacity to destroy cells, such as neurons, by inducing apoptosis (Chandra, Samali, & Orrenius, 2000). Apoptotic signalling mainly converges in the activation of intracellular caspases, also known as cysteine aspartate specific proteases, which is a family of intracellular proteins involved in the initiation and execution of apoptosis. Therefore, activation of a caspase cascade is a central effector mechanism promoting apoptosis in response to death-inducing signals from cell surface receptors or from mitochondria (Toshiyuki et al., 2000). Initiator caspases, like caspase 8, are able to activate effector caspases like caspase 1 and 3 (Budihardjo, Oliver, Lutter, Luo, & Wang, 1999). Investigations as performed by Jiang et al. show that H_2O_2 induces apoptosis, triggering a caspases pathway. The authors have shown that H_2O_2 treatment caused a time-dependent increase in caspase-1 and -3 proteolytic activities. Based on this previous evidence, we performed an analysis to determine if tucumã extracts could act on caspase pathways involved in the apoptosis process of lymphocytes caused by H_2O_2 exposition. Our results confirm the activation of caspases activity in the presence of H_2O_2 previously described, and tucumã extracts were able to totally or partially revert the caspases activation (Fig. 5).

To the best of our knowledge, this is the first study to describe the cytoprotective effects of tucumã fruit. The results obtained from tucumã peel extracts open the option of using the parts of this fruit that are less edible (for example, only riverine people eat the peel of the tucumã fruit) as a food supplement. However, *in vivo* investigations need to be performed to evaluate the tucumã extract's effects on biochemical and physiological markers related to the prevention of morbidities like cancer and cardiovascular diseases.

References

- Aguiar, J. P. L. G. (1996). Table of nutrients composition of Amazonian foods. *Acta Amazonica*, 26, 121–126.
- Astley, S. B., Hughes, D. A., Wright, A. J., Elliott, R. M., & Southon, S. (2004). DNA damage and susceptibility to oxidative damage in lymphocytes: Effects of carotenoids *in vitro* and *in vivo*. *British Journal of Nutrition*, 91, 53–61.
- Batel, R., Jaksic, Z., Bihari, N., Hamer, B., Fafandel, M., Chauvin, C., et al. (1999). A microplate assay for DNA damage determination (fast micromethod). *Analytical Biochemistry*, 270, 195–200.
- Böhm, F., Edge, R., & Truscott, G. (2012). Interactions of dietary carotenoids with activated (singlet) oxygen and free radicals: Potential effects for human health. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56, 205–216.
- Boligon, A. A., Sagrillo, M. R., Machado, L. F., de Souza Filho, O., Machado, M. M., da Cruz, I. B. M., et al. (2012). Protective effects of extracts and flavonoids isolated from *Scutia buxifolia* Reissek against chromosome damage in human lymphocytes exposed to hydrogen peroxide. *Molecules*, 17, 5757–5769.
- Bora, P. S., Narain, N., Rocha, R. V. M., De Oliveira Monteiro, A. C., & De Azevedo Moreira, R. (2001). Characterisation of the oil and protein fractions of Tucuma (*Astrocarym vulgare* Mart.) fruit pulp and seed kernel. *Ciência Tecnologia dos Alimentos*, 3, 111–116.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., & Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Review Cell Developmental Biology*, 15, 269–290.
- Castro, L., & Freeman, B. A. (2001). Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition*, 17, 163–165.
- Chandra, S., & Mejia, E. G. (2004). Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3583–3589.
- Chandra, J., Samali, A., & Orrenius, S. (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 29, 323–333.
- Choi, C. W., Kim, S. C., Hwang, S. S., Choi, B. K., Ahn, H. J., Lee, M. Y., et al. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, 163, 1161–1168.
- Choquet, B., Couteau, C., Papis, E., & Coiffard, L. J. (2008). Development of an *in vitro* test to determine the water-resistance of sunscreens. *Pharmazie*, 63, 525–527.
- De Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2007). Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5062–5072.
- Gonçalves, A. E. S. S., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2010). Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4666–4674.
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal Neurochemical*, 59, 1609–1623.
- Kahn, F. (2008). The genus *Astrocaryum* (Arecaceae). *Revista Peruana de Biología*, 15, 31–48.
- Laghari, A. H., Ali Memon, A., Memon, S., Nelofar, A., Khan, K. M., et al. (2012). Determination of free phenolic acids and antioxidant capacity of methanolic extracts obtained from leaves and flowers of camel thorn (*Alhagi maurorum*). *Natural Product Research*, 26, 173–176.
- Lee, J., Giordano, S., & Zhang, J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: Cross-talk and redox signaling. *Biochemical Journal*, 441, 523–540.
- Lima, E. C., Paiva, R., Nogueira, R. C., Soares, F. P., Emrich, E. B., & Silva, A. A. N. (2008). Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill. *Ciência e Agrotecnologia*, 32, 17–22.
- Lowe, G. M., Booth, L. A., Young, A. J., & Bilton, R. F. (1999). Lycopene and β -carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses. *Free Radical Research*, 30, 141–151.
- Morrison, M., Asiedu, E. A., Stuchbury, T., & Powell, A. A. (1995). Determination of lignin and tannin contents of cowpea seeds coats. *Annals of Botany*, 76, 287–290.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunology Methods*, 65, 55–63.
- Silva, E. G., Behr, G. A., Zanotto-Filho, A., Lorenzi, R., Pasquali, M. A. B., Ravazolo, L. G., et al. (2007). Antioxidant activities and free radical scavenging potential of *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Caesalpinaceae) extracts linked to their polyphenol content. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30, 1488–1496.
- Sreevidya, N., & Mehrotra, S. (2003). Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, 86, 1124–1127.
- Toshiyuki, N., Hong, Z., Nobuhiro, M., En, L., Xu, J., Yankner, B. A., et al. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature*, 403, 98–103.

4.2 Efeito citotóxico do extrato de *Astrocaryum aculeatum* na linhagem celular NB4 de leucemia promielocítica é similar ao ácido all-trans-retinoico droga quimioterápica (ATRA)

Artigo 2

Cytotoxic effect of *Astrocaryum aculeatum* extracts on NB4 promyelocytic leukemia cell line is similar to all-trans-retinoic acid chemotherapeutic drug (ATRA)

Sagrillo, M.R.; Garcia, L.F. M., Aline Augusti Boligon, Margareth Linde Athayde Ribeiro, E.E.; Duarte M.M.F, Cruz, I.B.M.

Plant Foods for Human Nutrition

Cytotoxic in vitro effect of *Astrocaryum aculeatum* extracts on NB4 promyelocytic leukemia cell line is similar to all-trans-retinoic acid chemotherapeutic drug (ATRA)

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Cytotoxic in vitro effect of <i>Astrocaryum aculeatum</i> extracts on NB4 promyelocytic leukemia cell line is similar to all-trans-retinoic acid chemotherapeutic drug (ATRA)
Article Type:	Manuscript (should not exceed 16 pages)
Keywords:	acute promyelocytic leukemia; tucumã, antitumoral; all-trans-retinoic acid; apoptosis; carotenoids
Corresponding Author:	Ivana Beatrice Mânica da cruz, PhD Universidade Federal de Santa Maria Santa Maria, RS BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Santa Maria
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Michele Rorato Sagrillo, PhD
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Michele Rorato Sagrillo, PhD Luiz Filpe Machado Garcia, MSc Aline Augusti Bolignon, PhD Margareth Linde Athayde, MSc, PhD Euler Esteves Ribeiro, MD, PhD Ivana Beatrice Mânica da cruz, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	Acute promyelocytic leukemia (APL) is a cancer pharmacologically treated with All-trans-retinoic acid (ATRA). The β -carotene molecule is a constituent of many varieties of vegetables. The Amazon basin is a home to several fruits and oleaginous plants rich in micronutrients, particularly carotenoids, including tucumã fruit (<i>Astrocaryum aculeatum</i>) that contains several carotenoid molecules. In this study, we analyzed the potential cytotoxic effect of tucumã extracts NB4-LPA on an APL cell line with and without concomitant ATRA exposure. Cultured cells were exposed to ethanolic tucumã extracts, which were obtained and chromatographically characterized, and the viability was determined after 72 hours of cell proliferation. In addition, the caspases 1, 3 and 8 that indicate apoptosis pathway were also determined. Tucumã extracts (> 600 $\mu\text{g/mL}$) were effective in inhibiting NB4 cell proliferation. As expected, NB4 treated with ATRA only presented a strong inhibitory effect ($14.5 \pm 2.7\%$ control group). Even though tucumã extracts also exhibited inhibitory effect on NB4 cell proliferation, it was more moderate than that of ATRA. Caspase levels were high in the presence of tucumã extracts and ATRA, indicating that tucumã is able to trigger apoptosis events on NB4 cells. These results suggest that fruits rich in retinoid molecules can exhibit cytotoxic effect against APL cells.
Suggested Reviewers:	Wei-Li Zhao, PhD Shanghai Jiao Tong University School of Medicine zhao.weili@yahoo.com The author has previous studies involving bioactive molecules present in foods against APL

	<p>T Fujiwara, PhD Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan fujiwaratu@otsuka.jp The author has previous studies involving plant extracts against APL</p>
	<p>S Jo, PhD Hanyang University joejo0517@hotmail.com The author has previous studies involving plant extracts against APL</p>
	<p>Paola Bontempo, PhD Seconda Università degli Studi di Napoli, Napoli, Italy paola.bontempo@unina2.it The author has previous studies involving fruit extracts against anti-cancer effect</p>
	<p>Ratana Banjerdpongchai, PhD Chiang Mai University ratana@chiangmai.ac.th The author has a previous studies involving plant extracts against APL cells</p>

1
2
3 **Cytotoxic *in vitro* effect of *Astrocaryum aculeatum* extracts on**
4 **NB4 promyelocytic leukemia cell line is similar to all-trans-**
5 **retinoic acid chemotherapeutic drug (ATRA)**
6
7
8
9

10
11 Sagrillo, M.R.^{1,2}; Garcia, L.F.M.¹, Aline Augusti Boligon³, Margareth Linde
12 Athayde,³ Ribeiro, E.E.⁴; Duarte M.M.F.¹, Cruz, I.B.M.^{1,3*}
13
14
15

16
17 ¹ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de
18 Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 21, 97105900 Santa Maria, RS, Brasil.
19
20

21
22 ² Centro Universitário Franciscano – UNIFRA, Rua dos Andradas, 1614, 97010-
23 032 Santa Maria, RS, Brasil.
24
25

26
27 ³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade
28 Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, 97105900 Santa Maria, RS, Brasil
29
30
31

32
33 ⁴ Universidade Aberta da Terceira Idade, Universidade do Estado do
34 Amazonas,
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 **Keywords:** *Astrocaryum aculeatum*, carotenoids, DNA damage, leukemia
46
47
48
49
50
51
52

53 *Corresponding author: Ivana Beatrice Mânica da Cruz. Av Roraima 1000,
54 Predio 19, Santa Maria-RS, Brazil. Zip Code 97105-900, Phone: 55-55-
55 32208163, Fax: 55-55- 32208239, Email: ibmcruz@hotmail.com
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 **ABSTRACT**
2
3

4 Acute promyelocytic leukemia (APL) is a cancer pharmacologically treated with
5 All-*trans*-retinoic acid (ATRA). The β -carotene molecule is a constituent of many
6 varieties of vegetables. The Amazon basin is a home to several fruits and
7 oleaginous plants rich in micronutrients, particularly carotenoids, including
8 tucumã fruit (*Astrocaryum aculeatum*) that contains several carotenoid
9 molecules. In this study, we analyzed the potential cytotoxic effect of tucumã
10 extracts NB4-LPA on an APL cell line with and without concomitant ATRA
11 exposure. Cultured cells were exposed to ethanolic tucumã extracts, which
12 were obtained and chromatographically characterized, and the viability was
13 determined after 72 hours of cell proliferation. In addition, the caspases 1, 3 and
14 8 that indicate apoptosis pathway were also determined. Tucumã extracts (\geq
15 600 μ g/mL) were effective in inhibiting NB4 cell proliferation. As expected, NB4
16 treated with ATRA only presented a strong inhibitory effect ($14.5 \pm 2.7\%$ control
17 group). Even though tucumã extracts also exhibited inhibitory effect on NB4 cell
18 proliferation, it was more moderate than that of ATRA. Caspase levels were
19 high in the presence of tucumã extracts and ATRA, indicating that tucumã is
20 able to trigger apoptosis events on NB4 cells. These results suggest that fruits
21 rich in retinoid molecules can exhibit cytotoxic effect against APL cells.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 **KEY-WORDS:** acute promyelocytic leukemia, tucumã, antitumoral, all-*trans*-
34 retinoic acid, apoptosis, carotenoids
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Introduction

Acute promyelocytic leukemia (APL) is a cancer type with distinct subset of acute myeloid leukemia (AML), characterized by a unique chromosome translocation t(15;17) involving the retinoic acid receptor alpha (*RARα* or *RARA*) gene). The translocation causes a *PML–RARα* gene fusion and formation of a chimeric protein [1,2]. For this reason, APL patients are pharmacologically treated with All-*trans*-retinoic acid (ATRA) resulting in the degradation of *PML–RARα* [3,4]. There is a robust body of evidence indicating that ATRA is able to induce disease remission in APL patients by triggering terminal differentiation of leukemic promyelocytes [4]. The β-carotene molecule, considered the major dietary source of provitamin A, is a constituent of many varieties of fruit and vegetables, including carrots, tomatoes, and spinach, among others [5]. The β-carotene central enzymatic cleavage and subsequent oxidation produces ATRA, which functions as a ligand for a family of nuclear transcription factors, the retinoic acid receptors (RARs) [6].

The Amazon basin is home to several fruits and oleaginous plants rich in micronutrients, particularly carotenoids. This is the case of tucumã fruit (*Astrocaryum aculeatum*), characterized by several carotenoid molecules, including an important concentration of all-*trans*-β-carotene [7]. Tucumã is a fruit produced by a palm tree native to tropical South America and has a range extending northwards towards Central America, Trinidad and the West Indies [8]. This fruit is a popular traditional component of regional breakfasts [9] and is well known for its beneficial biological properties, such as antioxidant [10], anti-

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

inflammatory [11,12] and antimicrobial effect [13]. However, in high concentrations (> 100 mg/mL), pulp and peel extract can also exhibit genotoxic action [14].

However, thus far, the potential cytotoxic tucumã effect against tumoral cells, acute promyelocytic leukemia cells in particular, has not been evaluated. Tucumã composition also comprises other bioactive molecules, such as quercetin and caffeic acid, which have some effect against leukemic cells [15,16,17].

Therefore, in this work, we evaluated the potential cytotoxic effect of tucumã extracts against NB4-LPA, an acute promyelocytic leukemia cell line cytogenetically characterized by a t(15;17)(q22;q11-12) translocation isolated by Lanotte et al. [18]. In addition, the effect of tucumã extracts on NB4-LPA cell line was compared to that of the ATRA chemotherapeutic drug presently used in LPA cancer treatment.

Materials and Methods

Chemicals and equipment

Cell culture products, as well as media, used in this study were obtained from Gibco (BRL, Gaithersburg, MD, USA). Double-strand DNA quantification was evaluated using quantitTM-Picogreen® ds DNA Kit Assay obtained from Invitrogen, while caspase quantification was performed using Quantikine Human Caspases Immunoassays R&D systems (Minneapolis, MN). Chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Spain), RA (purity ≥ 99%). The

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

analysis was performed using SpectraMax M2/M2e Multi-mode Plate Reader, Molecular Devices Corporation equipment (Sunnyvale, CA, USA).

Tucumã extract preparation and bioactive molecule content

Tucumã extract was produced from fresh matured fruit obtained from a native forest near Manus City, Amazonas States, Brazil (3.08°S, 60.01°W). The extracts were obtained and the main bioactive molecules were quantified, based on previous studies performed by Souza Filho et al. [14], Jobim et al. [13] and Sagrillo et al. [10]. Briefly, the tucumã pulp and peel extracts were manually removed, producing 800 g of peel and 400 g of pulp, and were kept frozen at – 18 °C until needed for performing the extraction procedure. This material was used to obtain an ethanolic tucumã extract with absolute ethanol solution at a ratio of 1: (w/v). After four days, the extraction process was complete and the obtained pulp and peel extracts were lyophilized and stored at – 20 °C until needed for chemical characterization. This procedure yielded 3359 g and 6091 g of tucumã peel and pulp extract, respectively. The chemical composition determined by spectrophotometric assays and HPLC chromatography identified total polyphenol content (peel = 941.8; pulp = 872.1 mg/GAE g); flavonoids (peel = 92.8; pulp = 53.3 quercetin mg/g); tannin (peel = 31.4; pulp = 0.24 mg/g); alkaloids (peel = 1.5, pulp = 0.93 mg/g); β -carotene (peel = 62.91, pulp = 27.55 mg/g); rutin (peel = 30.54, pulp = 19.06 mg/g); quercetin (peel = 12.72, pulp = 6.53 mg/g); gallic acid (peel = 3.79, pulp = 14.25 mg/g); caffeic acid (peel = 8.33; pulp = 0.87 mg/g) and chlorogenic acid (peel = 3.04, pulp = 1.119 mg/g).

NB4-LPA cell cultures and tucumã extract treatments

1 Human acute promyelocytic leukemia (APL)-derived NB4 cells were
2 cultured in RPMI-1640 medium and supplemented with 10% FCS, 100 units/ml
3 penicillin and 100 µg/mL streptomycin at 37 °C in a 5% CO₂ humidified
4 environment, as previously described by Falanga et al. [19].
5
6
7
8
9

10 To perform the experimental assays, the extracts were firstly diluted in
11 40% ethanol in order to improve their solubility. The solution was then diluted in
12 cellular medium culture to obtain < 0.5% ethanol concentration in all tucumã
13 concentrations tested in this work. Ethanol was also added in all control
14 treatments to eliminate the potential influence of this molecule on the results
15 obtained. The concentrations of tucumã extracts tested in this study were 100,
16 300, 600, 900, 1200 and 1500 µg/mL. ATRA, at 1 µmol concentration dissolved
17 in 0.04% of dimethylsulfoxide (DMSO), was also used to treat NB4-LPA cells, as
18 it has been shown that this ATRA concentration induces NB4 cell maturation to
19 granulocytes [20].
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 Cytotoxic assays

39 The effect of tucumã extracts on NB4 cell viability was evaluated using
40 the MTT assay, a colorimetric assay that measures the reduction of yellow 3-
41 (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) by
42 mitochondrial succinate dehydrogenase [21]. To perform the MTT assay, this
43 reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was dissolved in a 5 mg/mL phosphate
44 buffer (PBS, 0,01M; pH 7.4), added into a 96-well microplate containing the
45 sample treatments and incubated for 4 hours. In addition, the supernatant was
46 removed from the wells and the cells were resuspended in DMSO. The
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

absorbance at 560 nm was read in a plate reader TP-Reader (Thermoplate, China). This assay was performed in octuplicate for each treatment and cell viability was expressed as a percentage of the control value.

An additional assay was performed from quantification of double-strand DNA concentration present in supernatant culture using Picogreen® dye, according to the manufacturer's instructions. The fluorescence was measured at an excitation wavelength of 485 nm and an emission of 520 nm was recorded at room temperature. The results were expressed as fluorescence values that indicate the DNA integrity, as well as its percentage in relation to that pertaining to the negative control group treatment. Fluorescence values lower than those obtained for the untreated NB4 control group indicated cytotoxic effect of tucumã and ATRA treatments. Therefore, the results were expressed as a percentage of dsDNA calculated for each treatment in relation to the untreated control samples.

Apoptosis biomarkers analysis

ATRA is a morphogenetic signaling molecule inducing differentiation of immature blood cells, resulting in a massive cell death characterized by apoptosis [22]. Considering that caspases are molecules that are essential in the apoptosis pathway, the quantification of caspases 1, 3 and 8 was performed in NB4 cells exposed to tucumã extracts and ATRA. To perform this analysis, the cells were incubated under the conditions described above for 24 hours. The analyses were performed using the Quantikine Human Caspases Immunoassays to measure Caspase-1, 3 and 8 in cell culture supernates using a microplate with 96 wells, according to the manufacturer's instructions. Briefly,

1 all reagents and working standards were prepared and the excess microplate
2 strips were removed. The assay diluent RD1W was added (50 μ L) to each well.
3
4 Furthermore, 100 μ L of the standard control for our sample was added per well,
5
6 before being covered with an adhesive strip and incubated for 1.5 hours at room
7
8 temperature. Each well was aspirated and subjected to three washes. Caspase-
9
10 1 antiserum was added to each well and covered, given a new adhesive strip
11
12 and incubated for 30 minutes at room temperature. The aspiration/wash step
13
14 was repeated and the Caspase-1 conjugate (100 μ L) was added to each well
15
16 and incubated for 30 minutes at room temperature. The aspiration/wash step
17
18 was repeated once again, whereby 200 μ L of substrate solution was added to
19
20 each well and incubated for 20 minutes at room temperature. Finally, the 50 μ L
21
22 stop solution was added to each well and the optical density was determined
23
24 within 30 minutes using a microplate reader set to 450 nm. These experiments
25
26 were performed in triplicate.
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 Statistical analysis

37
38 The results were expressed as mean \pm standard deviation (SD), while
39
40 viability and antiproliferative effect of tucumã and ATRA findings were
41
42 expressed as percent (%) of those pertaining to the control group. This allowed
43
44 subjecting the data to one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the
45
46 Dunnett Test. The statistical tests were performed using GraphPad Prism
47
48 Software, whereby the comparisons with $p \leq 0.05$ were considered statistically
49
50 significant.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Results

Cellular proliferation

Figure 1 presents the NB4 cell proliferation (% of control) when exposed to pulp and peel tucumã extract at different concentrations for 72 hours. The ATRA effects on these cells, with and without exposure to tucumã extracts, are also presented. Our findings reveal that cells exposed to peel extracts at concentrations above 600 µg/mL exhibited a significant decrease in cellular proliferation after 72 h culture ($p = 0.001$).

NB4 treated with ATRA only presented a strong inhibitory effect, as expected ($14.5 \pm 2.7\%$, in relation to the untreated control group, $p = 0.001$). Even though tucumã extracts also exhibited inhibitory proliferative effect on NB4 cells, it was more moderate than that of ATRA.

In the presence of ATRA, all peel extract concentrations decreased cellular proliferation when compared to untreated cells. However, this effect was more pronounced than that noted for NB4 cells treated with ATRA only. These findings indicate that tucumã extract could influence the chemotherapeutic response negatively ($p = 0.001$).

Figure 1 here

Quantification of culture medium free dsDNA was also performed to determine if tucumã extracts presented some cytotoxic effect on NB4 cells after 72 h culture. Both tucumã extracts significantly increased the levels of dsDNA medium in culture in a dose-dependent way, as can be seen in Figure 2A. A

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

second analysis that evaluated the effects of tucumã extract in association with ATRA drug showed that the interaction between the two treatment protocols caused a significant increase in cell mortality.

For this reason, the levels of caspases 1, 3 and 8 were measured, in order to establish whether tucumã cytotoxic effect could involve triggering of apoptosis pathway.

Figure 2 here

Caspases activity

In general, as can be seen in Figure 3, 4 and 5, caspase levels presented a significant increase when compared to the untreated control cells. However, this effect was dependent on the quantity of tucumã extract used ($p = 0.0001$). In the presence of ATRA, the caspase levels increased further than in cells that were exposed to tucumã extracts only. These results also indicate that tucumã extracts are able to induce apoptosis of NB4 cells. Moreover, they appeared to present synergic effect when these cells were exposed concomitantly to ATRA and tucumã extracts.

Figure 3 here

Figure 4 here

Figure 5 here

Discussion

The present study showed that peel and pulp extract of tucumã, an Amazonian fruit that contains high levels of retinoid molecules, has an important cytotoxic effect against APL cell line (NB4). To our knowledge, this is the first study of its kind to demonstrate that exposure to tucumã can cause an increase in leukemic cell mortality.

The results reported here also reveal synergic effect between tucumã extracts and ATRA, as indicated by the analysis of cell viability, evaluated by dsDNA free-culture medium levels (Figure 2). In this case, NB4 cultures exposed concomitantly to ATRA and tucumã presented high mortality. Taking into account these results, it is plausible to suggest that tucumã extracts present similar response to that of ATRA—as a first line of chemotherapeutic drug in the APL treatment.

The potent effect of ATRA against APL cells is important to note and explore further, because this leukemia type is unique among myeloid leukemias presenting high sensitivity to ATRA. In APL, ATRA induces both cell cycle arrest and maturation, triggering caspase-dependent apoptosis [23]. As expected, when NB4 cells were exposed to ATRA, a significant increase in the caspase 8, 3 and 1 levels was observed. Even though this effect was more moderate than that reported for ATRA, tucumã extracts also induced the increase of these proteins, indicating its capacity to apoptosis induction.

On the other hand, the effect of tucumã extracts on NB4 cell proliferation was not as intense as observed for ATRA treatment. In addition, when cells

1 were concomitantly exposed to tucumã and ATRA, a negative synergic effect
2 on cell proliferation was noted. These results are not surprising, considering that
3
4 ATRA action is primarily focused on triggering APL cell differentiation, followed
5
6 by apoptosis processes. Thus, its effects on direct cell cycle inhibition are less
7
8 pronounced.
9

10
11 The results reported here highlight the importance of the habitual intake
12
13 of fruits rich in retinoids as a preventive strategy against APL development. This
14
15 is particularly important for leukemic patients undergoing ATRA chemotherapy.
16
17 A robust body of evidence indicates that, owing to their cancer-preventive
18
19 constituents, diet rich in fruit and vegetables may inhibit carcinogen activation,
20
21 enhance carcinogen detoxification, prevent carcinogens from interacting with
22
23 critical target sites, or impede tumor progression. Unfortunately, in APL disease,
24
25 these two important epidemiological points are insufficiently investigated.
26
27
28
29
30

31 The studies conducted thus far identified and described more than 4000
32
33 molecules that are chemically related to vitamin A, including retinoids present in
34
35 some types of vegetables. These molecules have a large number of biological
36
37 functions, as retinoic acid is the active metabolite of retinol [24]. Retinoic acid is
38
39 able to suppress skin, lung, oral, bladder, ovarian and prostate cancer in
40
41 tumorigenic animal models [24]. However, the potential preventive role of
42
43 vitamin A in pediatric cancer should be exploited via moderate and habitual
44
45 intake of foods rich in these compounds. This recommendation is based on
46
47 recent dietary guidelines, as no empirical evidence that supports the use of
48
49 antioxidant supplements, such as beta-carotene, vitamin A and vitamin E, in the
50
51 primary prevention of cancer, especially in well-nourished populations, presently
52
53 exists [25,26].
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Despite the lack of epidemiological data pertaining to the potential preventive effect of retinoids on APL carcinogenesis, the habitual consumption of foods rich in vitamin A can be considered the best way to help cancer prevention in general, and thus also leukemia. This presupposition is based on the findings of some studies that analyzed the effects of other fruits and bioactive molecules obtained from the diet on APL, such as resveratrol from red grape fruit and wine [27], lycopene from tomato and other vegetables [28], pomegranate [29], curcumin and tea [30], hibiscus [31], and anthocyanidins present in several dark-red fruits [32].

The aforementioned *in vitro* studies contribute to the exploratory investigation of the potential effect of molecules and extracts against cancer. Thus, our results contribute to this effort further, suggesting that fruits rich in retinoid molecules can exhibit cytotoxic effect against APL cells.

Acknowledgments

This work was performed with financial support (grants and fellowships) from Brazilian research agencies: FAPEAM, FAPERGS and CNPq. The authors would like to thank and the Biogenomic Lab research team for technical support.

References

[1] Rowley JD, Golomb HM, Dougherty C (1977) 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet* 1: 549–550.

[2] Kakizuka A, Miller Jr WH, Umesono K, Frankel SR, Murty VV, Dmitrovsky E, Evans RM (1991) Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 66: 663–674.

[3] Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, Fuks F, Lo Coco F, Kouzarides T, Nervi C, Minucci S, Pelicci PG (2002) Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* 295: 1079–1082.

[4] Lo-Coco F, Hasan SK (2014) Understanding the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 27(1): 3–9.

[5] Bora PS, Narain N, Rocha RVM, De Oliveira Monteiro AC, De Azevedo Moreira R (2001) Characterisation of the oil and protein fractions of Tucuma (*Astrocarym vulgare* Mart.) 452 fruit pulp and seed kernel. *Ciência Tecnologia dos Alimentos* 3: 111–116.

[6] Álvarez R, Vaz B, Gronemeyer H, de Lera ÁR (2014) Functions, therapeutic applications, and synthesis of retinoids and carotenoids. *Chem Ver*: 114(1): 1–125.

[7] de Rosso VV, Mercadante AZ (2007) Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *J Agric Food Chem* 55(13): 5062–5072.

[8] Shanley P, Cymerys M, Serra M, Medina G (2011) Fruit trees and useful plants in Amazonian life. Rome: FAO-CIFOR-PPI, <http://www.fao.org/docrep/015/i2360e/i2360e.pdf>

[9] Cavalcante PB (1991) Edible palm fruits of the Brazilian Amazon. *Principes* 21: 91–103.

1 [10] Sagrillo MR, Garcia LFM, Souza Filho OC, Duarte MMMF, Ribeiro EE,
2 Cadoná FC, da Cruz IBM (2014) Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum*
3 Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes.
4 Food Chemistry – pré-aceito.
5
6
7
8
9

10 [11] Bony E, Boudard F, Dussossoy E, Portet K, Brat P, Giaimis J, Michel A
11 (2012) Chemical composition and anti-inflammatory properties of the
12 unsaponifiable fraction from awara (*Astrocaryum vulgare* M.) pulp oil in
13 activated J774 macrophages and in a mice model of endotoxic shock.
14 Plant Foods for Human Nutrition 67(4): 384–392.
15
16
17

18 [12] Bony E, Boudard F, Brat P, Dussossoy E, Portet K, Poucheret P, Giaimis J,
19 Michel A (2012) Awara (*Astrocaryum vulgare* M.) pulp oil: chemical
20 characterization, and anti-inflammatory properties in a mice model of endotoxic
21 shock and a rat model of pulmonary inflammation. Fitoterapia 83(1): 33–43.
22
23
24

25 [13] Jobim ML, Santos RC, dos Santos Alves CF, Oliveira RM, Mostardeiro CP,
26 Sagrillo MR, de Souza Filho OC, Garcia LF, Manica-Cattani MF, Ribeiro EE, da
27 Cruz IB (2014) Antimicrobial activity of Amazon *Astrocaryum aculeatum*
28 extracts and its association to oxidative metabolism. Microbiological Reserch
29 169(4): 314–323.
30
31
32
33

34 [14] Souza Filho OC, Sagrillo MR, Garcia LF, Machado AK, Cadoná F, Ribeiro
35 EE, Duarte MM, Morel AF, da Cruz IB (2013) The in vitro genotoxic effect of
36 Tucuma (*Astrocaryum aculeatum*), an Amazonian fruit rich in carotenoids.
37 Journal of Medicine Food 16(11): 1013–1021.
38
39
40

41 [15] Avci CB, Yilmaz S, Dogan ZO, Saydam G, Dodurga Y, Ekiz HA, Kartal M,
42 Sahin F, Baran Y, Gunduz C (2011) Quercetin-induced apoptosis involves
43 increased hTERT enzyme activity of leukemic cells. Hematology 16(5): 303–
44 307.
45
46
47

48 [16] Ramos AM, Aller P (2008) Quercetin decreases intracellular GSH content
49 and potentiates the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide in
50 human leukemia cell lines. Biochemical Pharmacology 75(10): 1912–1923.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 [17] Veselská R, Zitterbart K, Auer J, Neradil J (2004) Differentiation of HL-60
2 myeloid leukemia cells induced by all-trans retinoic acid is enhanced in
3 combination with caffeic acid. *International Journal of Molecular Medicine* 14(2):
4 305–310.
5

6
7
8 [18] Lanotte M, Martin-Thouvenin V, Najman S, Balerini P, Valensi F, Berger R
9 (1991) NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a
10 human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood* 77(5): 1080–1086.
11
12

13
14 [19] Falanga A, Marchetti M, Giovanelli S, Barbui T (1996) All-trans-retinoic acid
15 counteracts endothelial cell procoagulant activity induced by a human
16 promyelocytic leukemia-derived cell line (NB4). *Blood* 87(2): 613–617.
17
18
19

20
21 [20] Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey
22 EH, Naoe T, Lengfelder E, Büchner T, Döhner H, Burnett AK, Lo-Coco F (2010)
23 Guidelines on the management of acute promyelocytic leukemia:
24 recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemia
25 Net. *Blood* 13(9): 1875–1891.
26
27

28
29 [21] Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and
30 survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunology*
31 *Methods* 65: 55–63.
32
33

34
35 [22] Luo P, Lin M, Lin M, Chen Y, Yang B, He Q (2009) Function of retinoid acid
36 receptor alpha and p21 in all-trans-retinoic acid-induced acute T-lymphoblastic
37 leukemia apoptosis. *Leukemia Lymphoma* 50(7): 1183–1189.
38
39

40
41 [23] Gianni M, Ponzanelli I, Mologni L, Reichert U, Rambaldi A, Terao M,
42 Garattini E (2000) Retinoid-dependent growth inhibition, differentiation and
43 apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. Expression and activation of
44 caspases. *Cell Death Differentiation* 7: 447–460.
45
46
47

48 [24] Alizadeh F, Bolhassani A, Khavari A, Bathaie SZ, Naji T, Bidgoli SA (2014)
49 Retinoids and their biological effects against cancer. *International*
50 *Immunopharmacology* 18(1): 43–49.
51
52

53
54 [25] Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud C (2014) Antioxidant supplements and
55 mortality. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 17(1): 40–44.
56
57
58

1 [26] Fortmann SP, Burda BU, Senger CA, Lin JS, Beil TL, O'Connor
2 E, Whitlock EP (2013) Vitamin and mineral supplements in the primary
3 prevention of cardiovascular disease and cancer: An updated systematic
4 evidence review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of Internal
5 Medicine* 159: 824–834.
6
7

8
9
10 [27] Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong
11 HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM (1997)
12 Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from
13 grapes. *Science* 10(5297): 218–220.
14
15

16
17
18 [28] Amir H, Karas M, Giat J, Danilenko M, Levy R, Yermiahu T, Levy J, Sharoni
19 Y (1999) Lycopene and 1,25-dihydroxyvitamin D3 cooperate in the inhibition of
20 cell cycle progression and induction of differentiation in HL-60 leukemic cells.
21 *Nutrition Cancer* 33(1): 105–112.
22
23

24
25 [29] Kawaii S, Lansky EP (2004) Differentiation-promoting activity of
26 pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic
27 leukemia cells. *Journal of Medicine Food* 7(1): 13–18.
28
29

30
31 [30] Conney AH, Lou YR, Xie JG, Osawa T, Newmark HL, Liu Y, Chang RL,
32 Huang MT (1997) Some perspectives on dietary inhibition of carcinogenesis:
33 studies with curcumin and tea. *Proceedings of the Society for
34 Experimental Biology and Medicine* 216(2): 234–245.
35
36

37
38 [31] Tsai TC, Huang HP, Chang YC, Wang CJ (2014) An anthocyanin-rich
39 extract from *Hibiscus sabdariffa* linnaeus inhibits N-nitrosomethylurea-induced
40 leukemia in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(7): 1572–1580.
41
42

43
44 [32] Hou DX, Ose T, Lin S, Harazoro K, Imamura I, Kubo M, Uto T, Terahara N,
45 Yoshimoto M, Fujii M (2003) Anthocyanidins induce apoptosis in
46 human promyelocytic leukemia cells: structure-activity relationship and
47 mechanisms involved. *International Journal of Oncology* 23(3): 705–712.
48
49

1
2
3
4
5
6 **Figure Legends**
7
8
9

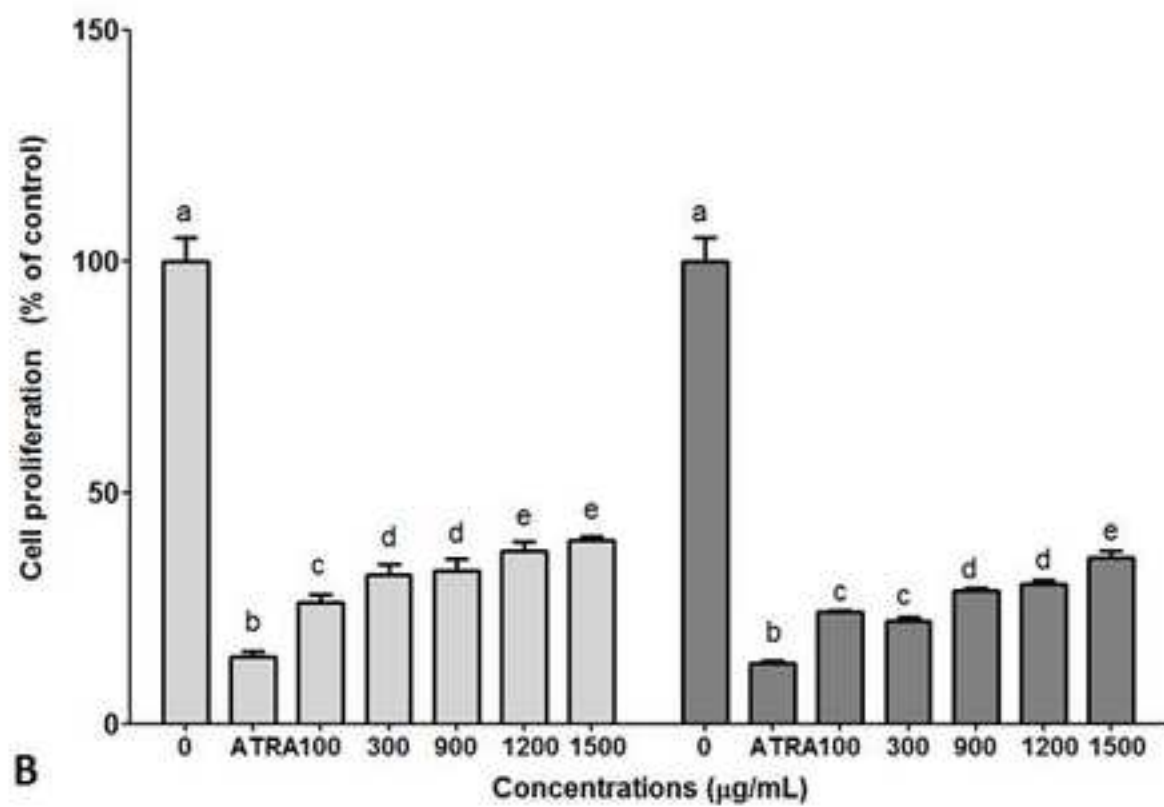
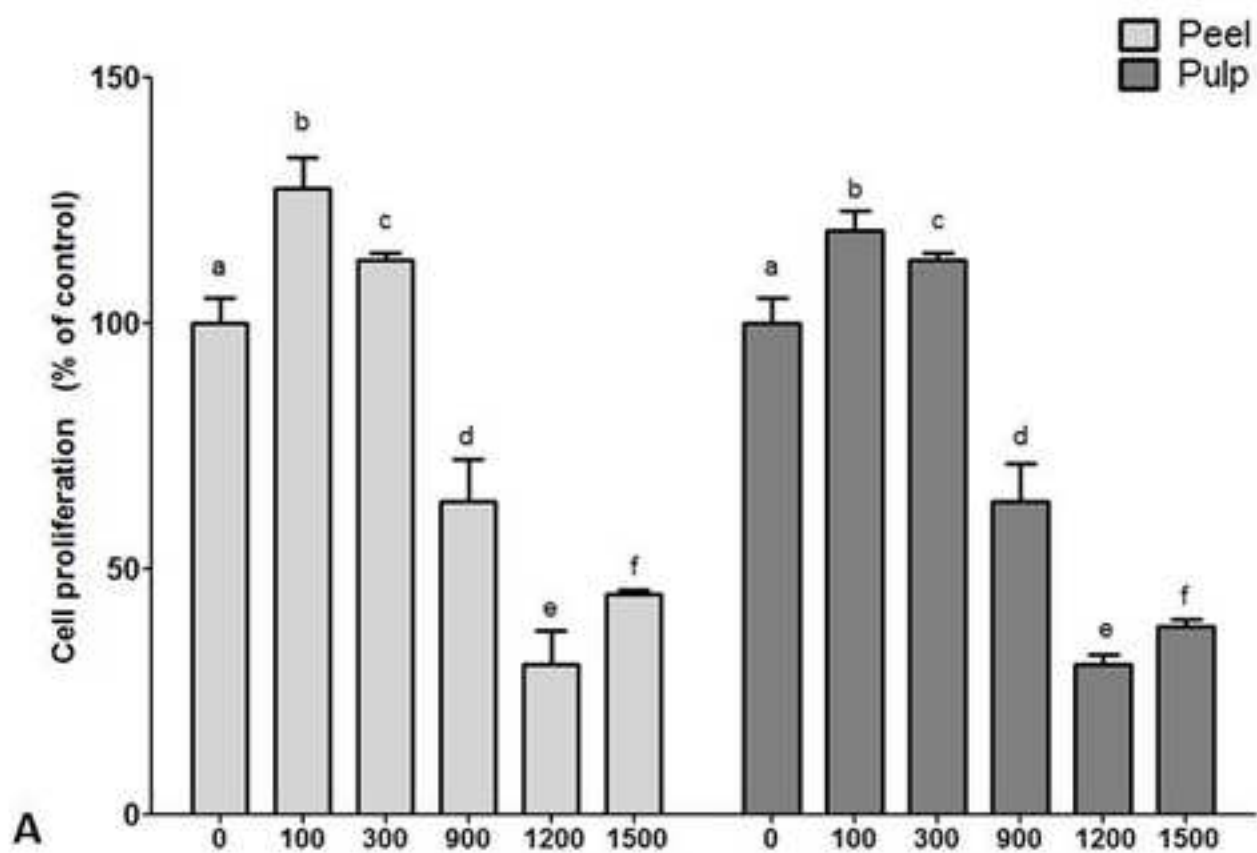
10
11 **Figure 1** Effects of peel and pulp tucumã extracts on the proliferation of NB4
12 cells. (A) Different tucumã extract concentrations; (B) Effect of tucumã extracts
13 on ATRA antitumoral action. Data are shown as % of the untreated control
14 group. Different letters indicate statistical differences among treatments
15 determined by analysis of variance followed by Tukey post-hoc test ($p < 0.05$).
16
17
18

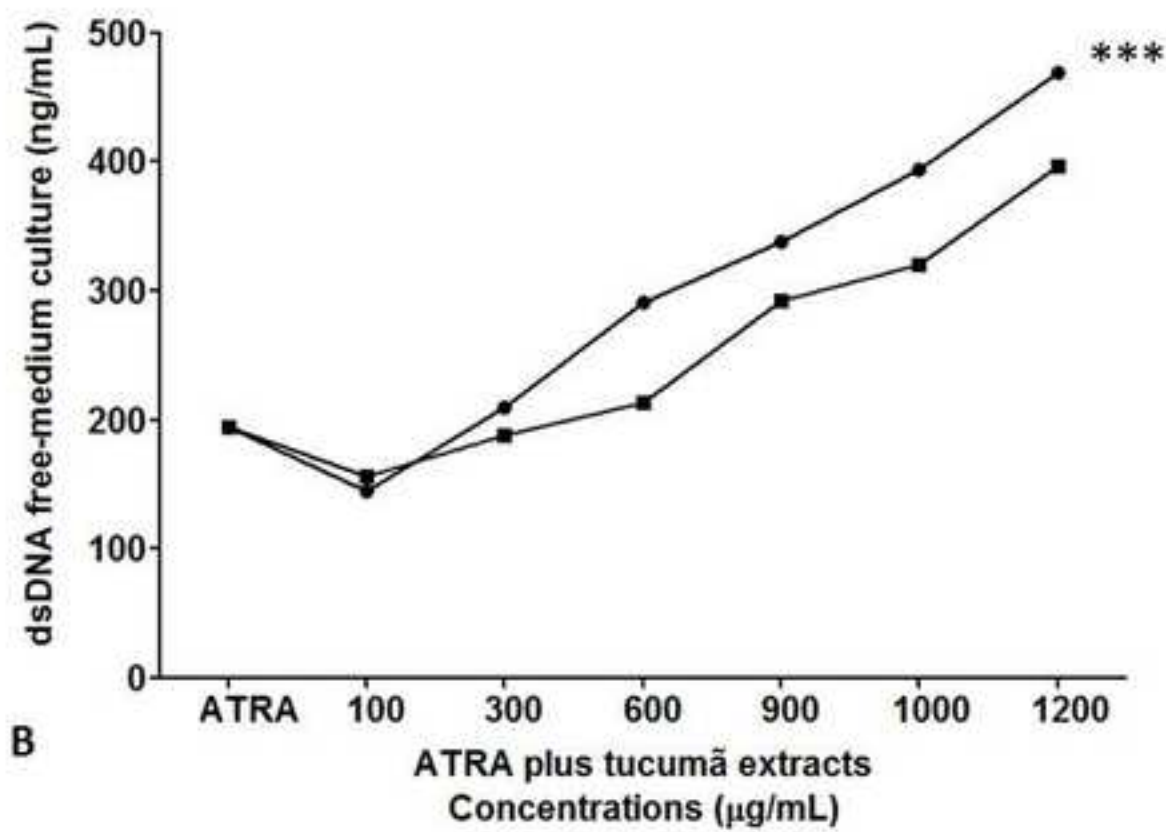
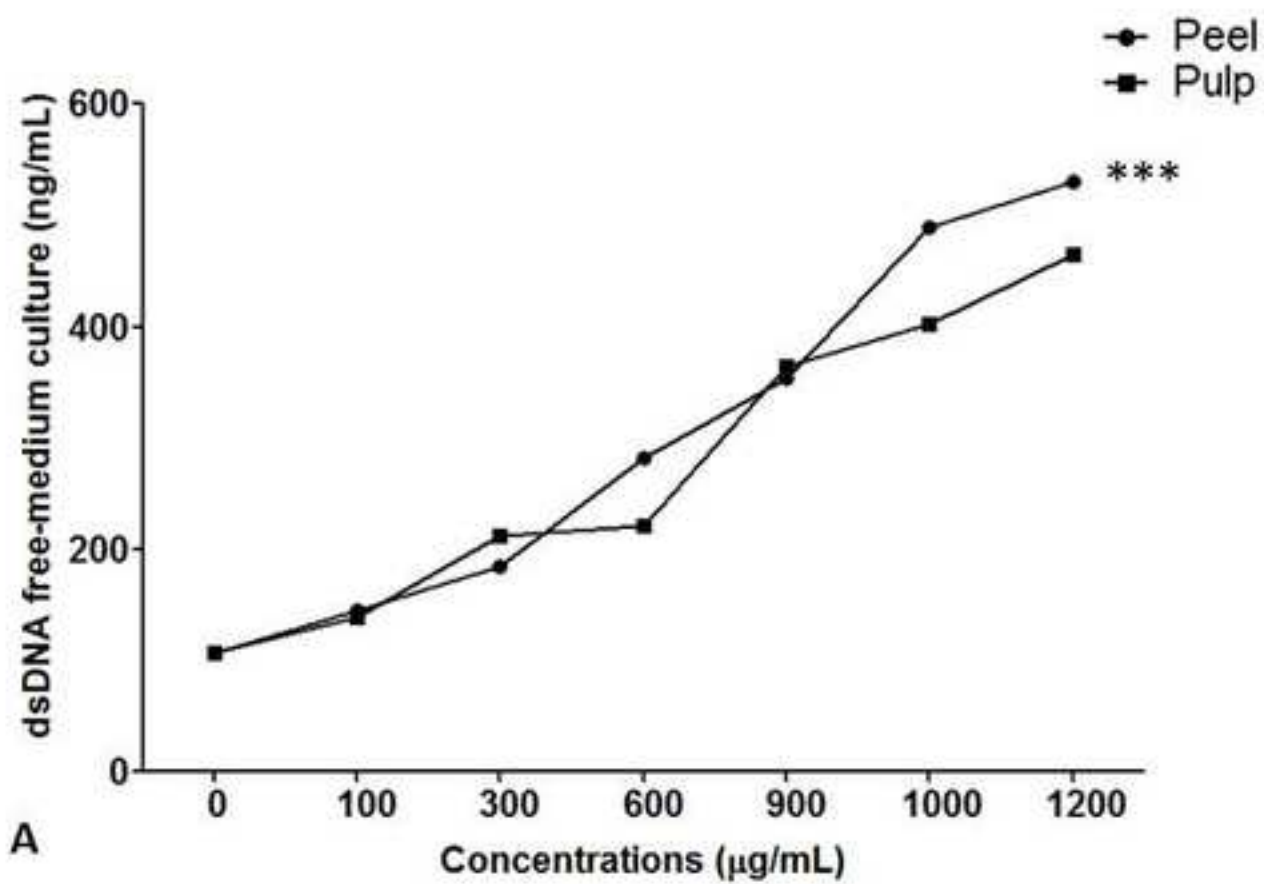
19
20
21 **Figure 2** Effects of peel and pulp tucumã extracts on the viability of NB4 cells
22 determined by dsDNA levels in the culture medium. Elevate dsDNA levels
23 indicate high cell mortality; (A) Different tucumã extract concentrations; (B)
24 Effect of tucumã extracts on ATRA antitumoral action. Data are shown as % of
25 the untreated control group. Different letters indicate statistical differences
26 among treatments determined by analysis of variance followed by Tukey post-
27 hoc test ($p < 0.05$).
28
29
30

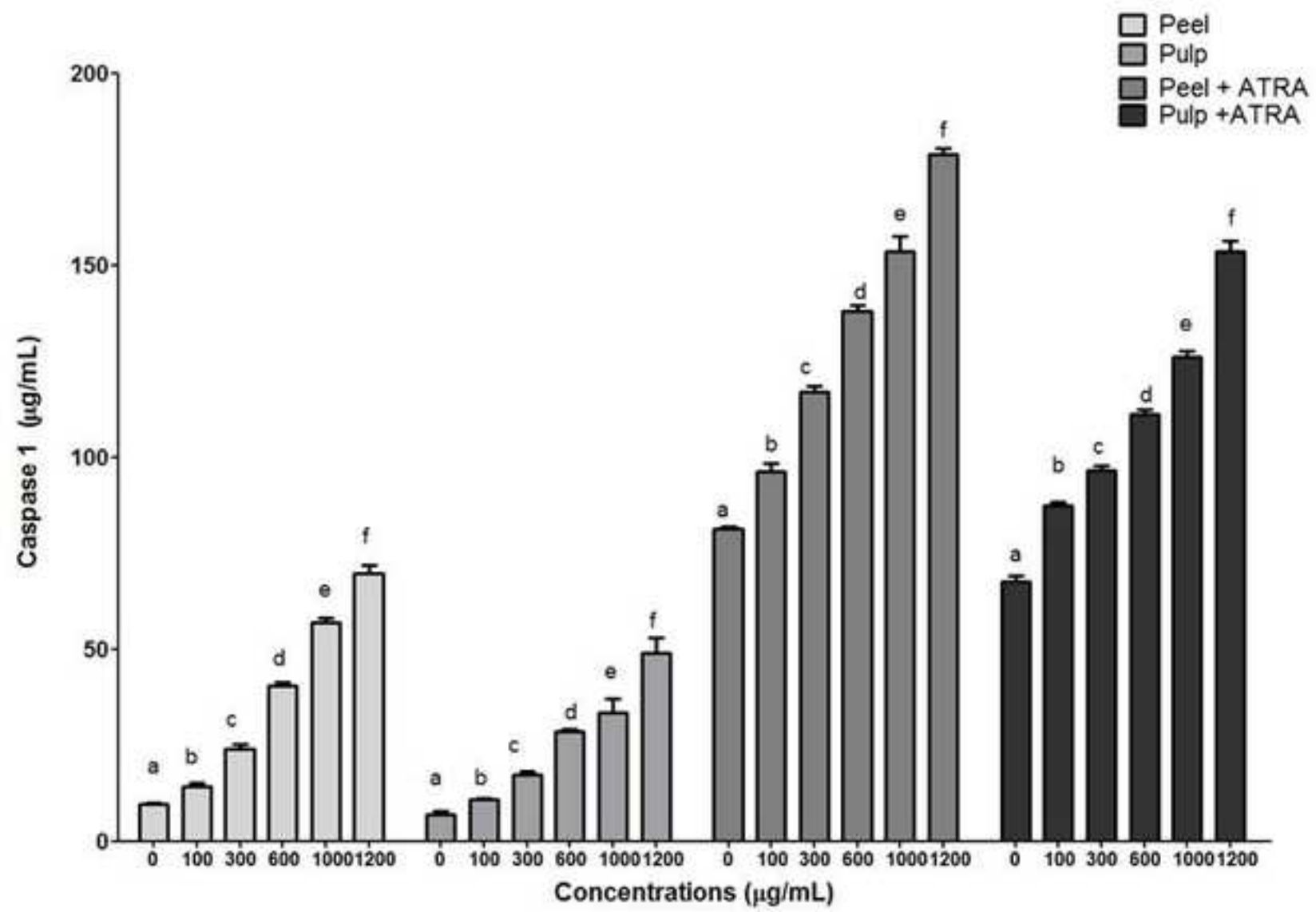
31
32
33
34 **Figure 3** Effects of peel and pulp tucumã extracts on caspase 1 levels ($\mu\text{g/mL}$)
35 of NB4 cells with and without ATRA concomitant treatment. Different letters
36 indicate statistical differences among treatments determined by analysis of
37 variance followed by Tukey post-hoc test ($p < 0.05$).
38
39
40

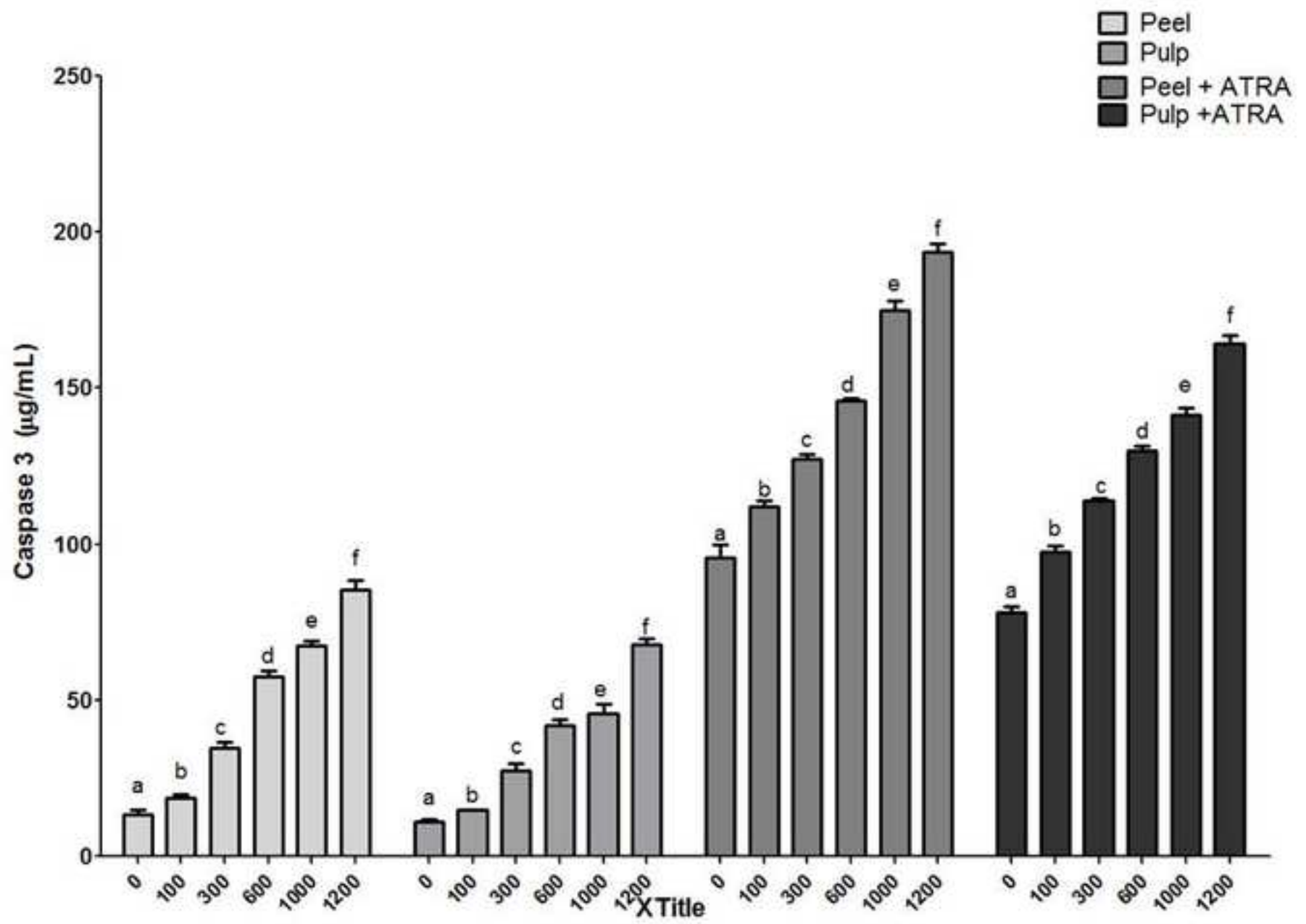
41
42
43 **Figure 4** Effects of peel and pulp tucumã extracts on caspase 3 levels ($\mu\text{g/mL}$)
44 of NB4 cells with and without ATRA concomitant treatment. Different letters
45 indicate statistical differences among treatments determined by analysis of
46 variance followed by Tukey post-hoc test ($p < 0.05$).
47
48
49

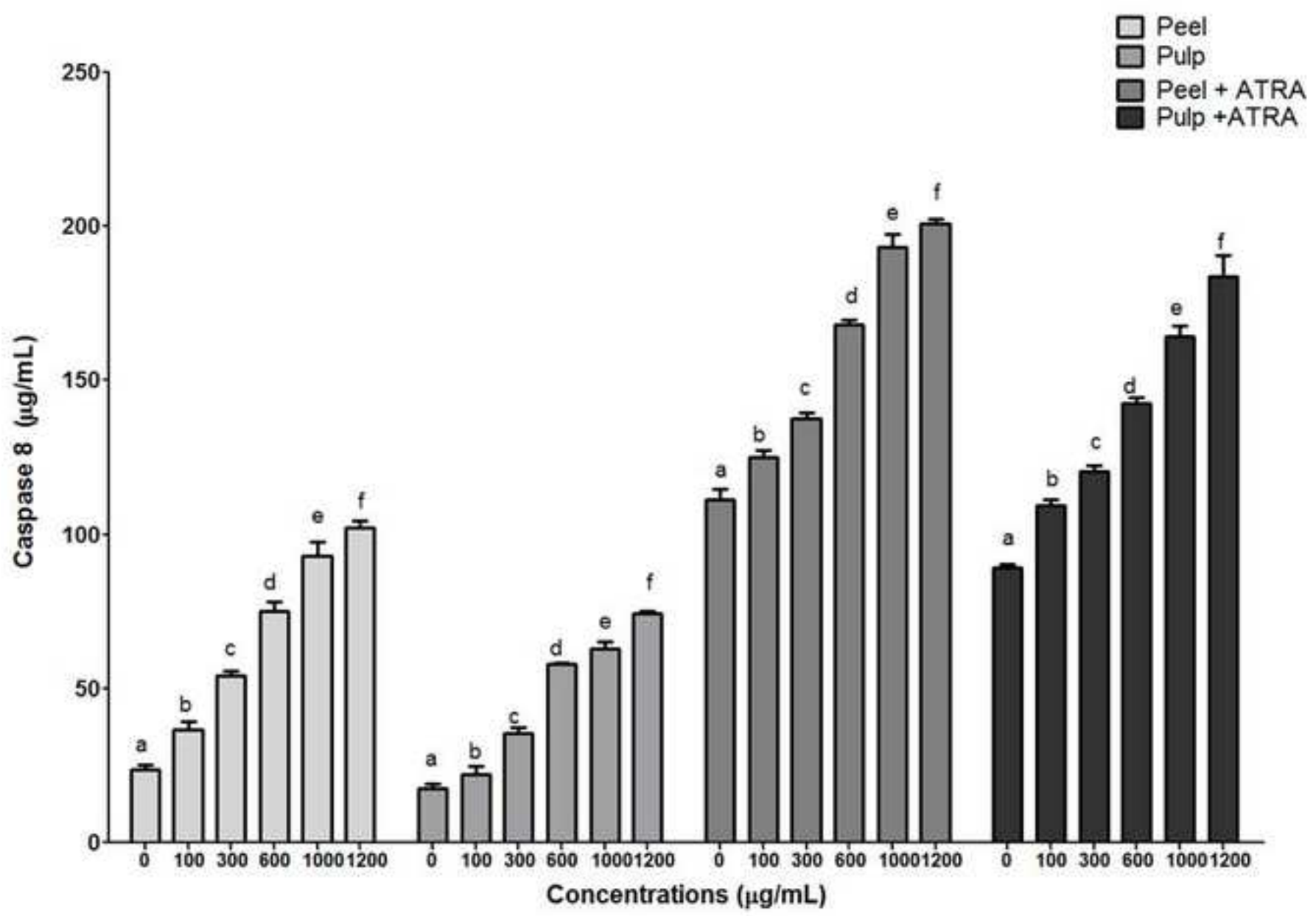
50
51
52 **Figure 5** Effects of peel and pulp tucumã extracts on caspase 8 levels ($\mu\text{g/mL}$)
53 of NB4 cells with and without ATRA concomitant treatment. Different letters
54 indicate statistical differences among treatments determined by analysis of
55 variance followed by Tukey post-hoc test ($p < 0.05$).
56
57
58











Conflict of Interest Statment

This article does not contain any studies with human or animal subjects

5 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o efeito de extratos do fruto tucumã, fruta amazônica rica em carotenoides e compostos bioativos, como a quercetina, sobre células linfocitárias expostas ao efeito tóxico do H₂O₂. De um modo geral, os resultados mostraram um efeito benéfico dos extratos do tucumã sobre a cito-genotoxicidade nestas células.

Os resultados observados neste trabalho e que compõem o primeiro manuscrito desta tese, estão provavelmente relacionados com moléculas antioxidantes encontradas nos extratos da casca e da polpa. A quantidade de taninos e alcaloides encontrados nos extratos oriundos da polpa do tucumã são inferiores quando comparados aos extratos de outras frutas, como uva vermelha e romã. Os menores teores de taninos encontrados nos extratos analisados aqui conferem uma segurança do consumo do tucumã, pois o excesso de taninos pode reduzir a digestibilidade gástrica e causar inibição enzimática. O β-caroteno e a quercetina foram previamente quantificados no tucumã por De Rosso et al. (2007) e Gonçalves et al. (2010), portanto, os dados provenientes destes dois importantes compostos em nossos extratos serviu para validar o nosso protocolo, pois novos compostos químicos no tucumã foram identificados. A quercetina e a rutina têm sido relatadas por participarem de numerosas atividades bioquímicas e farmacológicas, incluindo a capacidade sequestradora de radicais livres e em relação a proteção contra a luz ultravioleta. Essas moléculas também têm efeitos sobre células imunes e inflamatórias (MOSMANN, 1983).

O extrato da polpa do tucumã contém uma concentração de ácido gálico maior do que o extrato da casca. Nós estimamos que a ingestão de 100 g de tucumã fresco contém uma quantidade de ácido gálico equivalente a ingestão de aproximadamente 130 mL de suco de uva vermelha. Este suco é considerado uma das principais fontes de ácido gálico na dieta humana. Embora os ácidos cafeico e clorogênicos fossem encontrados em baixas concentrações no tucumã, os níveis desses compostos foram maiores no extrato da casca do que da polpa.

As moléculas bioativas presentes nos extratos do tucumã, provavelmente, contribuíram para a sua capacidade antioxidante, o que foi confirmado por ensaios do DDPH e TRAP. O ensaio DPPH do extrato da polpa do tucumã havia sido relatado por Gonçalves et al. (2010). No entanto, o efeito antioxidante do extrato da casca do tucumã não havia sido relatado antes. A concentração de moléculas antioxidantes importantes encontradas nos extratos do tucumã não é uma garantia de que estes extratos sejam capazes de reverter o

estresse oxidativo em sistemas biológicos expostos a moléculas pró-oxidantes, tais como a molécula de H_2O_2 .

Nós escolhemos H_2O_2 como a molécula pró-oxidante, já que, juntamente com o radical superóxido e o radical hidroxila, o H_2O_2 é uma das três principais espécies reativas de oxigênio (ROS): subprodutos metabólicos continuamente gerados pelas mitocôndrias nas células em crescimento, como consequência do metabolismo aeróbico (HALLIWELL, 1992). No entanto, a níveis baixos, o H_2O_2 deve ser considerado uma molécula de sinalização em vários processos celulares, e a níveis elevados, o H_2O_2 causa danos às organelas, particularmente as mitocôndrias. Potencialmente, o estresse oxidativo pode ser prejudicial, gerado por um excesso de ROS, e a disfunção pode resultar em depleção da energia, acumulação de mediadores citotóxicos e morte celular (LIMA et al., 2008). Esse processo de lesão celular ocorre uma vez que, em alta concentração de ROS, como H_2O_2 , danos a proteínas celulares e lipídios ou adutos de DNA se formam e podem promover a atividade carcinogênica (CHOQUENET et al., 2008). Nestes termos, a consequência da reversão do estresse oxidativo celular indica o potencial papel preventivo dos extratos do tucumã. É importante, no entanto salientar, que não encontramos uma resposta linear relacionada com as diferentes concentrações dos extratos do tucumã em linfócitos em relação à atividade cito e genotóxica causada pelo H_2O_2 . Este fato precisa ser discutido com maior profundidade.

Duas explicações potenciais devem ser consideradas para a interpretação destes resultados. Em primeiro lugar, no que diz respeito à ocorrência de compostos químicos no tucumã, concentrações mais elevadas podem reduzir o efeito positivo de outros compostos, como moléculas antioxidantes também presentes nos extratos. Este é o caso dos compostos alcaloides. Alguns compostos alcaloides são tóxicos a vários organismos e outros são usados como fármacos (CASTRO & FREEMAN, 2001). Nos extratos testados aqui, encontramos uma concentração de alcaloides totais maior na casca quando comparado com o extrato da polpa do tucumã.

Outra explicação possível é relacionada com o aumento das concentrações de antioxidantes presentes nos extratos que foram testados. Este é o caso dos carotenoides que estão presentes em concentrações elevadas no fruto tucumã como descrito em nossos resultados e em estudos anteriores (MORRISON et al., 1995; SREEVIDJA et al., 2003; LAGHARI et al., 2012). De Rosso e Mercadante (2007) descreveram 24 carotenoides, dos quais 21 foram quimicamente identificados no fruto tucumã. O- β -caroteno todo-trans foi encontrado como sendo o carotenoide principal, representando 75% do teor total de carotenoides no tucumã, seguido por 13-cis- β -caroteno, ácido all-trans- α -caroteno, e todo-

trans β -criptoxantina, cada um representando entre 2,0-2,8% do conteúdo total de carotenoides. Os outros 19 carotenoides representam 15% do conteúdo total. A análise mostrou que o tucumã oferece uma das maiores concentrações de pró-vitamina A (β -caroteno), com 52 mg/100g de polpa. Esta concentração é cerca de oito vezes mais elevada do que a encontrada na cenoura (6,6 mg/100g de polpa). O consumo médio de 30 g de polpa de tucumã pode fornecer três vezes mais vitamina do que a necessidade diária requerida para um adulto (MORRISON, 1995).

Os carotenoides são pigmentos orgânicos que ocorrem naturalmente e são precursores da vitamina A, que é indispensável para a diferenciação celular, o desenvolvimento embrionário, para a visão, bem como tendo muitas outras funções, incluindo potenciais benefícios terapêuticos no tratamento de várias morbidades devido às suas propriedades antioxidantes (LEE, GIORDANO & ZHANG, 2012). Há pouca ou nenhuma dúvida de que os carotenoides e seus produtos de oxidação apresentam atividades biológicas importantes em linhagens de células e que seu mecanismo de ação em culturas celulares pode muito bem ajudar na concepção de ensaios clínicos. No entanto, estudos randomizados prospectivos não conseguiram demonstrar um benefício consistente para o carotenoide β -caroteno em pacientes com risco de doenças cardiovasculares. A base para este paradoxo aparente não é bem compreendido, mas pode ser atribuído às propriedades antioxidantes distintas de vários carotenoides resultantes das suas interações dependentes da estrutura físico-química com as membranas biológicas (BÖHM et al., 2012). Portanto, não podemos descartar a ideia de que as concentrações altas do extrato do tucumã que apresentam níveis mais altos de carotenoides poderiam interromper os efeitos citoprotetores observados em concentrações mais baixas.

Resultados similares foram observados quando o potencial efeito protetor do extrato da casca do tucumã em danos no DNA de linfócitos expostos a H_2O_2 foi analisado. Os tratamentos com 300 e 600 $\mu\text{g} / \text{mL}$ apresentaram uma ação protetora melhor do que os tratamentos com extratos da casca do tucumã em ambas as concentrações inferiores e superiores. No entanto, todos os tratamentos do extrato da polpa, em concentrações $> 100 \mu\text{g} / \text{mL}$ reverteram os danos do DNA causados pelo H_2O_2 a um nível semelhante ao observado nas células do controle não tratadas. Estes resultados estão em concordância com alguns estudos anteriores, os quais verificaram que alguns carotenoides, tais como β -caroteno, aumentaram a resistência a danos oxidativos do DNA em concentrações relativamente baixas. No entanto, essa proteção foi rapidamente perdida com uma crescente concentração de carotenoides (LOWE et al., 2004). Por outro lado, em comparação com a casca, o extrato da polpa possui concentração cerca de 50% mais baixa de β -caroteno. Talvez as diferenças nas

concentrações deste e outros compostos, tais como alcaloides, podem explicar os resultados diferentes em relação aos danos no DNA de linfócitos expostos a H_2O_2 na concentração tucumã $> 100 \mu\text{g} / \text{mL}$, demonstrando efeito genoprotetor. Independente das causas que levam a quaisquer diferenças entre os extratos da casca e da polpa do tucumã, os resultados sugerem que a polpa é a parte do fruto que apresenta maiores propriedades genoprotetoras.

O H_2O_2 tem a capacidade de destruir as células, tais como os neurônios, através da indução de apoptose (CHANDRA, SAMALI, & ORRENIUS, 2000). A sinalização apoptótica converge principalmente na ativação de caspases intracelulares, também conhecidas como proteases ou cisteínas dependentes de aspartato, que é uma família de proteínas intracelulares envolvidas na iniciação e execução de apoptose. Por isso, a ativação de uma cascata de caspases é um mecanismo efetor central que promove a apoptose em resposta a sinais de indução de morte a partir de receptores de superfície celular ou de mitocôndrias (TOSHIYUKI et al., 2000). As caspases iniciadoras, como a caspase 8, é capaz de ativar caspases efetoras como caspase 1 e 3 (BUDIARDJO et al., 1999). Estudos realizados por Jiang et al. (1990) mostraram que H_2O_2 induz a apoptose, desencadeando a via das caspases. Os autores demonstraram que o tratamento com H_2O_2 causou um aumento dependente do tempo da atividade proteolítica das caspases 1 e 3. Com base nessas evidências anteriores, foi realizada uma análise para determinar se os extratos do tucumã poderiam atuar na via das caspases promovendo a apoptose pela exposição dos linfócitos ao H_2O_2 . Os resultados confirmam a ativação da via das caspases, na presença de H_2O_2 anteriormente descrito, e os extratos do tucumã foram capazes de reverter totalmente ou parcialmente a ativação das mesmas.

Para melhor conhecimento, este é o primeiro estudo que descreve os efeitos citoprotetores do tucumã. Os resultados obtidos a partir dos extratos da casca do tucumã abrem a opção de usar esta parte do fruto que é menos consumida (por exemplo, somente pessoas ribeirinhas comem a casca do fruto tucumã) como um suplemento alimentar. No entanto, investigações *in vivo* precisam ser realizadas para avaliar os efeitos dos extratos do tucumã em marcadores bioquímicos e fisiológicos relacionados com a prevenção de morbidades como câncer e doenças cardiovasculares.

No segundo manuscrito elaborado para esta tese, utilizamos a linhagem celular comercial NB4-LPA, com intuito de verificarmos a capacidade anti-proliferativa dos extratos da casca e polpa do tucumã isoladamente e em sinergismo ao quimioterápico ATRA.

Neste estudo tanto o extrato da casca quanto o da polpa do tucumã, fruto com altos níveis de moléculas de retinoides, apresentaram importante efeito citotóxico contra linha

celular NB4-LPA. Para o nosso melhor conhecimento este também é o primeiro estudo que mostra aumento da mortalidade células leucêmicas pelo tucumã.

Os resultados aqui descritos também demonstraram efeito sinérgico entre extratos do tucumã e o ATRA, através da análise sobre a viabilidade celular avaliadas pelos níveis de dsDNA (Figura 2). Neste caso, as culturas NB4 expostas concomitantemente ao ATRA e tucumã apresentaram alta mortalidade, sugerindo que os extratos do tucumã apresentam alguma resposta semelhante com o ATRA, que é o fármaco quimioterápico utilizado no tratamento da LPA.

O efeito potente do ATRA contra células de LPA é porque este tipo de leucemia é a única entre as leucemias mieloides que apresentam alta sensibilidade para ATRA. Em LPA o ATRA induz tanto a parada do ciclo celular quanto a maturação das células que desencadeiam a apoptose dependente das caspases (GIANNI et al., 2000). Como esperado, quando as células NB4 foram expostas ao ATRA foi observado um aumento significativo nos níveis das caspases 1, 3 e 8, embora o efeito sobre os níveis de caspases foi mais moderado do que o ATRA, quando as células foram tratadas com os extratos do tucumã, que também induziram ao aumento destas proteínas, indicando a sua capacidade para a indução de apoptose.

Por outro lado, o efeito dos extratos do tucumã sobre a proliferação celular NB4 não foi tão intenso do que o tratamento com o ATRA. Além disso, quando as células foram expostas aos extratos concomitantemente ao ATRA, ocorre um efeito sinérgico negativo sobre a proliferação celular. Estes resultados não são tão surpreendentemente, considerando que a ação do ATRA é mais concentrada em acionar a diferenciação das células LPA e, em seguida, os processos de apoptose e a inibição do ciclo celular.

A partir dos resultados descritos aqui, dois aspectos importantes podem ser discutidos: o papel da ingestão habitual de frutas ricas em retinoides como estratégia de prevenção contra o desenvolvimento da LPA ou por pacientes com leucemia submetidos a quimioterapia com ATRA. Várias evidências mostraram a ocorrência de constituintes de frutas e vegetais com ação preventiva ao câncer que podem inibir a ativação carcinogênica, prevenir a carcinogênese através da interação com sítios alvos, ou impedir a progressão do tumor. Infelizmente, na LPA estes dois pontos de importância epidemiológica são pouco investigados.

Estudos identificaram e descreveram mais que 4000 moléculas que são quimicamente relacionadas com a vitamina A, incluindo retinoides presentes em alguns tipos de vegetais. Estas moléculas possuem um grande número de funções biológicas, sendo o ácido retinoico o metabolito ativo do retinol (ALIZADEH et al., 2014). O ácido retinoico é capaz de suprimir o

câncer de pele, pulmão, boca, bexiga, ovário e próstata em modelos animais. No entanto, o potencial papel preventivo da vitamina A no câncer pediátrico deve ser realizado pela ingestão moderada e habitual de alimentos ricos nestes compostos. Esta afirmação baseia-se em orientações dietéticas recentes, onde não há evidências do uso de suplementos antioxidantes, como o β -caroteno, vitamina A e vitamina E, na prevenção do câncer especialmente em populações bem nutridas (BJELAKOVIC, NIKOLOVA & GLUUD, 2014; FORTMANN, 2013)

Apesar da falta de dados epidemiológicos que analisam os potenciais efeitos preventivos dos retinoides sobre a carcinogênese da LPA, o consumo habitual de alimentos ricos em vitamina A pode ser considerada a melhor maneira de ajudar na prevenção do câncer em geral, incluindo leucemia. Este pressuposto está baseado em alguns estudos que analisaram o papel de outras frutas e moléculas bioativas obtidas a partir da dieta em LPA, como o resveratrol da uva vermelha e do vinho (JANG et al., 1997), o licopeno do tomate e outros vegetais (AMIR et al., 1999), romã (KAWAII e LANSKY, 2004), a curcumina e chá (CONNEY et al., 1997), hibiscos (TSAI et al. 2014) e as antocianidinas presentes em diversas frutas vermelhas (HOU et al., 2003).

Apesar de estudos *in vitro* de investigação exploratória sobre o efeito potencial de moléculas e extratos contra o câncer, os resultados descritos aqui sugerem que frutas ricas em moléculas retinoides podem apresentar efeito citotóxico contra células de LPA.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, podem ser feitas as seguintes conclusões:

- O tucumã é rico em polifenóis totais, flavonoides e β -caroteno, podendo ser indicado no suprimento das necessidades diárias dessas substâncias;

- A casca do tucumã, até então nunca antes explorada, mostrou-se como componente importantíssimo do fruto, uma vez que apresentou resultados significativamente superiores à polpa para a grande maioria dos compostos bioativos identificados;

- A alta atividade antioxidante apresentada pelo tucumã acaba destacando o fruto dentre os demais que são consumidos na dieta amazônica;

- A relevância dos compostos bioativos isolados da polpa e da casca do tucumã confere ao fruto um potencial terapêutico promissor, sobretudo, na prevenção/tratamento de neoplasias;

- Houve relação positiva entre a concentração de β -caroteno e a captura de radicais peróxilas, confirmando a afinidade do composto por tais espécies reativas;

- No entanto, ambos os extratos apresentaram efeito cito e genoprotetor principalmente em doses intermediárias (300 a 900 $\mu\text{g/mL}$) quando comparado concentrações inferiores e superiores.

- No presente trabalho verificamos que os extratos de tucumã podem agir na via das caspases envolvidas no processo de apoptose de linfócitos causados pela exposição ao H_2O_2 , revertendo totalmente ou parcialmente a ativação das caspases.

- Os extratos do tucumã apresentam potencial efeito quimioterapêutico em células tumorais de LPA (linhagem comercial NB4) similar ao observado no ATRA e esse efeito está relacionado com a indução na queda das taxas de proliferação celular e aumento da apoptose.

REFERÊNCIAS

- ADAMSON, E. D. Oncogenes in development. **Development**, v. 99, 449–471, 1997.
- ALLEN, J. G.; BLOXHAM, D. P. The pharmacology and pharmacokinetics of the retinoids. **Pharmac. Ther.**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 1-27, 1989.
- ARNOULD, C. et al. The signal transducer and activator of transcription STAT5b gene is a new partner of retinoic acid receptor alpha in acute promyelocytic-like leukaemia. **Hum Mol Genet.**, v. 8, n. 9, p.1741-9, 1999.
- ASOU N. 2. All-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. **Intern Med.**, v. 46, n. 2, p.91-3, 2007.
- AU, W. Y. et al. Tetraploid acute promyelocytic leukemia with large bizarre blast cell morphology. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 115, p. 52-55, 1999.
- AVVISATI, G.; LO COCO, F.; MANDELLI, F. Acute promyelocytic leukemia: clinical and morphologic features and prognostic factors. **Semin Hematol.**, v. 38, n.1, p.4-12, 2001.
- AZIZ, K.; NOWSHEEN, S.; PANTELIS, G.; ILIAKIS, G.; GORGOLIS, V.G.; GEORGAKILAS, A.G. Targeting DNA damage and repair: embracing the pharmacological era for successful cancer therapy. **Pharmacol Ther.**, v. 133, n. 3: p. 334-50, 2012.
- BARBOSA, K.B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 23, n. 4, jul./aug. 2010.
- BATINIĆ-HABERLE, I.; REBOUÇAS, J.S.; SPASOJEVIĆ, I. Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Antioxid Redox Signal**, v. 15;13, n. 6: p. 877-918, 2010.
- BORA, P. S. et al. Characterisation of the oil and protein fractions os Tucuma (*Astrocarym vulgare* Mart.) fruit pulp and seed kernel. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v. 3, n. 2, p. 111-116, 2001.
- BOTTON, S. et al. Additonal chromosomal abnormalities in patients with acute promyelocit leukaemia (APL) do not confer poor prognosis: results pf APL 93 trial. **Br. J. Haematol.**, v. 111, p. 801-806, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira**. Brasília, 2005.
- BREITMAN, T. R.; COLLINS, S. J.; KEENE, B. R. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells in primary culture in response to retinoic acid. **Blood**, New York, v. 57, n. 6, p. 1000-1004, 1981.
- BROCKMAN, S.R. et al. New highly sensitive fluorescence in situ hybridization method to detect PML/RAR α fusion in acute promyelocytic leukemia. **Cancer Genet Cytogenet.** v. 145, n. 2, p.144-51, 2003.

BUETTNER, G.R. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. **Anticancer Agents Med Chem.**, v. 11, p. 341-346, 2011.

CAMPOS, F.M.; ROSADO, G.P. Novos fatores de conversão de carotenoides provitamínicos A. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.3, p.571-578, jun./set. 2005.

CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. **Food Chemistry**, London, v. 93, p. 223-226, 2005.

CAVALCANTE, P.B. Frutas comestíveis da Amazônia. 5. ed. Belém: Edições CEJUP/Museu Paraense Emílio Goeldi, 1991. 279pp. (Coleção Adolfo Ducke).

CERUTTI, P.A. Oxidant stress and carcinogenesis. **European Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v.21, n.1, p.1-5, 1991.

CHAMBON, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. **FASEB J.**, v.10, p.940-954, 1996.

CHAUFFAILLE, M.L. et al. Acute promyelocytic leukemia: the study of t(15;17) translocation by fluorescent in situ hybridization, reverse transcriptase-polymerase chain reaction and cytogenetic techniques. **Braz J Med Biol Res.** v. 34, n. 6, p. 735-43, 2001.

CHAVES, J. M.; PECHNIK, E. Tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.). **Rev. Quím. Ind.**, v.16, n. 5, p. 184-191, 1947.

CHEN, Z.X. et al. A clinical and experimental study of all-trans retinoic acid-treated acute promyelocytic leukemia patients. **Blood**, v.78, p.1413-1419, 1991.

CHOUDHRY, A.; DELOUGHERY, T. G. Bleeding and thrombosis in acute promyelocytic leukemia. **American Journal of Hematology.** v. 87, n. 6, p. 596–603, 2012.

CLIFFORD, J. et al. RXRa-null F9 embryonal carcinoma cells are resistant to the differentiation, anti-proliferative and apoptotic effects of retinoids. **EMBO J.**, v.15, p.4142-4155, 1996.

COHEN M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann Internacional Medicine**, n. 111, p. 918-31, 1989.

DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 402, p. 151-158, 1998.

DE VITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, A.S. **Cancer: principles and practice of oncology.** 7th. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2005.

DE ROSSO, V., MERCADANTE, A. Identification and Quantification of Carotenoids, By HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 5062-5072, 2007.

DIMRI, G.P. What has senescence got to do with cancer? **Cancer Cell.**v.7, p.505-12, 2005.

DOUER, D. The epidemiology of acute promyelocytic leukaemia. **Best Pract Res Clin Haematol.** v. 16, n.3, p. 357-67, 2003.

FAO. Especies forestales productoras de frutas y otros alimentos. 3. Ejemplos de America Latina. **FAO**, Rome, v. 44, n. 3. 241pp., 1987.

GARCÍA, R. R. et al. Evaluación de la citotoxicidad del trióxido de arsênico em líneas celulares tumorales humanas com la técnica colorimétrica de la sulforhodamina B. **Rev. Cubana Med.**, v. 45, n. 1, 2006.

GARCIA, L.F.M., et al. The in vitro antioxidant activity and citotoxicity of tucumã (*Astrocaryum aculeatum*, m.) peel and pulp extracts. **J. Food Comp. Anal.** (2012) – pré-aceito.

GONÇALVES, A. E. de S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C.** 88 fl., 2008. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GRIMWADE, D. et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. **Blood**, v. 92, p. 2322- 2333, 1998.

GRIMWADE, D. et al. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. Groupe Français de Cytogénétique Hématologique, Groupe de Français d'Hematologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies". **Blood**. v. 96, n. 4, p.1297-308, 2000.

GRIMWADE, D.; LO COCO, F. Acute promyelocytic leukemia: a model for the role of molecular diagnosis and residual disease monitoring in directing treatment approach in acute myeloid leukemia. **Leukemia**. v. 16, n.10, p.1959-73, 2002.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Rev. Bras. de Cancerologia**. v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GURRIERI, C. et al. Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 96, n. 4, p. 269-79, 2004.

HALLIWEL, B.; GUTTERDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 2th ed. Oxford, Clarenton Press, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymology**, n. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal Neurochemical**, n. 59, p. 1.609-23, 1992.

HILLESTAD, L. K. Acute Promyelocytic Leukemia. **Acta Medica Scandinavica**. v. 159, n. 3, p. 189–194, 1957.

HIORNS, L. R. et al. Additional chromosome abnormalities confer worse prognosis in acute promyelocytic leukaemia. **Br. J. Haematol.**, v. 96, p. 314-321, 1997.

HOLLMAN, P.C., et al., Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. **FEBS Lett**, v, 418, n. 1-2: p. 152-6, 1997.

HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food Chem Toxicol**, v, 37, n. 9-10: p. 937-42, 1999.

JÁCOMO, R. H.; FIGUEIREDO-PONTES, L. L.; REGO, E. M. Do paradigma molecular ao impacto no prognóstico: uma visão da leucemia promielocítica aguda. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 54, n. 1, 2008.

JEANNE, M. et al. *PML/RARA* oxidation and arsenic binding initiate the antileukemia response of As₂O₃. **Cancer Cell.**, v.18, n. 1, p. 88-98, 2010.

KADA, T.; SHIMOI, K. Desmutagens and bio-antimutagens: their modes of action. **Bioessays**, v. 7, p. 113-115, 1987.

KAKIZUKA, A. et al. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RARα with a novel putative transcription factor, PML. **Cell**, v. 66, p. 653–674, 1991.

KAHN, F.; MILLÁN, B. *Astrocaryum* (Palmae) in Amazonia: a preliminary treatment. **Bulletin Institute Français d'Étude Andines**, v. 21, n. 2, p. 459-531, 1992.

KASTNER, P.; CHAN, S. Function of RARα during the maturation of neutrophils. **Oncogene**, v. 20, n. 49, p.7178-85, 2001.

KOJIMA, K. et al. Hapocellular acute promyelocytic leukemia with a tetraploid clone characterized by two 9(15;17). **Cancer Genetic Cytogenet**, v. 145, p. 169-171, 2003.

KRINSKY, N.I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, London, v.66, n.5, p.1003-1010, 1994.

KUHNAU, J., The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. **World Rev Nutr Diet**, 24: p. 117-91, 1976.

INCA, Instituto Nacional do Câncer, Brasil, 2012.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Review. Progress in Lipid Research**, v. 46, p. 244-282, 2007.

LOCK, R.J. et al. Rapid diagnosis and characterization of acute promyelocytic leukaemia in routine laboratory practice. **Clin Lab Haematol.**, v. 26, n. 2, p. 101-6, 2004.

LÖWENBERG, B.; GRIFFIN, J. D.; TALLMAN, M. S. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. **Hematology.**, v. 2003, p. 82-101, 2003.

MARTINEZ-CLIMENT, J.A. Molecular cytogenetics of childhood hematological malignancies. **Leukemia**, v. 11, p. 1999-2001, 1997.

MATEUCA, R. et al. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie.** Nov, v, 88, n. 11, p. 1515-31. Epub 2006 Aug 4, 2006.

McLEAN, J. A. et al. Lipid-soluble and water-soluble antioxidant activities of the avian intestinal mucosa at different sites along the intestinal tract. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 141, n. 8, p. 366- 372, 2005.

MEIER, P., FINCH, A., EVAN, G. Apoptosis in development. **Nature.** v. 407, p.796-801. 2000.

MELNICK, A., LICHT, J.D. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. **Blood.**, v. 93, n. 10, p. 3167-215, 1999.

MELO, R.A. et al. PML-RARalpha fusion gene transcripts and biological features in acute promyelocytic leukemia patients. **Clin Lab Haematol.**, v. 28, n. 2, p. 126-9, 2006.

MENDOZA, E.E., BURD, R. Quercetin as a systemic chemopreventative agent: structural and functional mechanisms. **Mini Rev Med Chem.**, v. 11, n. 14: p. 1216-1221, 2011.

METODIEWA, D. et al. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. **Free Radic Biol Med**, v. 26, n. 1-2: p. 107-16, 1999.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (USA). Recommended Dietary Allowances. 10. ed. Washington DC: **National Academy Press.**, p.78-92, 1989.

NUSSBAUM, R.L.; MCINNES, R.R.; WILLARD, H.F. **Thompson & Thompson genética médica.** 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

OLSON, J.A. Benefits and liabilities of vitamin A and carotenoids. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.126, n. 4, p.1208-1212, 1996.

OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer.** v.4, p.592-603, 2004.

PARKER, R.S. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. **FASEB Journal**, Bethesda, v.10, n.5, p.542-551, 1996.

PINHEIRO, R. F. et al. Síndrome ATRA: experiência de 10 anos. **Rev. Brás. Cancerol.**, v. 49, n. 1, p. 27-31, 2003.

RAMÍREZ, P. H. Alteraciones moleculares em las leucemias agudas. **Rev. Cubana Hematol., Immunología y Hemoterapia**, 1995.

REDNER, R.L. Variations on a theme: the alternate translocations in APL. **Leukemia**, v. 16, n. 10, p. 1927-32, 2002.

REITER, A.; LENGFELDER, E.; GRIMWADE, D. Pathogenesis, diagnosis and monitoring of residual disease in acute promyelocytic leukaemia. **Acta Haematol.**, v. 112, n.1-2, p. 55-67, 2004.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J. ; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic Biol Med.** v. 20, n. 7: p. 933-56, 1996.

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** v. 27, p. 53-60, 2007.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **Carotenoids and food preparation:** the retention of provitamin a carotenoids in prepared, processed, and stored foods. Arlington: John Snow, 1997.

ROWLEY, J. D. et al. Further evidence for a non-random chromosomal a acute promyelocytic leukemia. **Int. J. Cancer**, v. 20, p. 869-872, 1977.

RUIZ-ARGÜELLES, G.J. et al. More on geographic hematology: the breakpoint cluster regions of the PML/RARalpha fusion gene in Mexican Mestizo patients with promyelocytic leukemia are different from those in Caucasians. **Leuk Lymphoma.** v. 45, n. 7, p. 1365-8, 2004.

RUSSO, M. et al. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. **Biochem Pharmacol.**, v. 1, n. 83, p. 6-15, 2012.

SAEED, S. et al. Genome-wide functions of PML–RARA in acute promyelocytic Leukaemia. **British Journal of Cancer.** v. 104, p. 554 – 558, 2011.

SAGRILLO, M. R. et al. Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 27, n. 2, 2005.

SAINTY, D. et al. A new morphologic classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying PLZF/RARA gene rearrangements. Group Francais de Cytogenetique Hematologique, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies. **Blood**, v. 96, p. 1287-1296, 2000.

SALOMONI, P.; DVORKINA, M.; MICHOD, D. Role of the promyelocytic leukaemia protein in cell death regulation. **Cell Death Dis.** v. 3, n. 1, p. 1-6, 2012.

SANTOS, F. L. S. et al. Características hematológicas e perfil de expressão de antígenos mielóides de pacientes com leucemia promielocítica aguda. Análise de fatores prognósticos para o desenvolvimento da síndrome do ácido retinóico. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 50, n. 3, 2004.

- SANZ, M.A., TALLMAN, M.S., LO-COCO, F. Tricks of the trade for the appropriate management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. **Blood.**, v. 105, n. 8, p. 3019-25, 2005.
- SANZ, M.A. et al. Guidelines on the management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood.** (Prepublished online dez 21, 2010).
- SCALBERT, A. et al. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** v. 45, n. 4, p. 287-306, 2005.
- SCHOCH, C. et al. Incidence and implication of additional chromosome aberrations in acute promyelocytic leukaemia with translocation t(15;17) (q22;q21): a report on 50 patients. **Br. J. Haematol.**, v. 94, p. 493-500, 1996.
- SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.
- SIDDIKUZZAMAN, Guruvayoorappan, C.; BERLIN GRACE, V.M. All trans retinoic acid and cancer. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 33, n. 2, p. 241-249, 2011.
- SIKORA, E. et al. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. **Food Chemistry**, London, v. 107, p. 50-55, 2008.
- SLACK, J. L. et al. Secondary cytogenetic changes in acute promyelocytic leukemia – prognostic importance in patients treated with chemotherapy alone and association with the intron 3 breakpoint of the PML gene: a Cancer and Leukemia Group B study. **J. Cl. Oncol.**, v. 15, p. 1786-1795, 1997.
- SWERDLOW, S.H. et al. **Who Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.** Lyon, IARC Press, 2008.
- TALLMAN, M. S. Therapy of acute promyelocytic leukemia: all-trans retinoic acid and beyond. **Leukemia**, v. 12, p. 37-40, 1999.
- THOMAS, A. et al. Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance. **Oncogene**, v.12, p.1055-1062, 1996.
- VAN DONGEN, J.J.M. et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. **Leukemia**, v. 13, p.1901–1928, 1999.
- VAN VLIET, T. Absorption of β -carotene and other carotenoids in humans and animal models. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v.50, n. 3, p.32-37, 1996.
- VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v.17, n. 3, 2007.

VILLA, R. et al. Epigenetic gene silencing in acute promyelocytic leukemia. **Biochem Pharmacol.**, v. 68, n. 6, p. 1247-54, 2004.

VITOUX, D., NASR, R., DE THE, H. Acute promyelocytic leukemia: new issues on pathogenesis and treatment response. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 39, n. 6, p. 1063-70, 2007.

WALKER, P.R. et al. Relationship between apoptosis and the cell cycle in lymphocytes: roles of protein kinase C, tyrosine phosphorylation and AP-1. **Exp. Cell Res.**, v.207, p.142-151, 1993.

WANG, X.D. Review: absorption and metabolism of β - carotene. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v.13, n.4, p.314-325, 1994.

WANG, Z.Y., CHEN, Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. **Blood**, v. 111, n. 5, p. 2505-15, 2008.

WARREL, R. P. et al. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-*trans*-retinoic acid). **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v.324, n. 20, p. 1385-1393, 1991.

WARREL, R. P. JR.; WANG, Z., DEGOS, L. Acute promyelocytic leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v.329, p.177-189, 1993.

WOODS, J.A., BILTON, R.F., YOUNG, A.J. Beta-carotene enhances hydrogen peroxide-induced DNA damage in human hepatocellular HepG2 cells. **FEBS Letters**, v. 449, n. 2-3), p. 255-8, 1999.

ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. Carcinogenesis and apoptosis: paradigms and paradoxes. **Carcinogenesis**. v. 27, n. 10, p.1939-1945, 2006.

ZHOU, G.B.; CHEN, S.J.; CHEN, Z. Acute promyelocytic leukemia: a model of molecular target based therapy. **Hematology**, v. 10, n. 1, p. 270-80, 2005.

ZIECH, D. et al. Pleiotrophic effects of natural products in ROS-induced carcinogenesis: The role of plant-derived natural products in oral cancer chemoprevention. **Cancer Lett.** 2012.

YOU, J.S.; JONES, P.A. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? **Cancer Cell**. v. 22, n. 1, p. 9-20, 2012.

YUYAMA, L. K. O. et al. Polpa e casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer): quais os constituintes nutricionais? In: Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 8. Nutrire: **Revista Sociedade Brasileira Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v. 30, Suplemento, p. 225, 2005.