

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

**EFEITO FARMACOGENÔMICO *IN VITRO* DO
ASTROCARYUM ACULEATUM EM CÉLULAS
MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO E DE
CÂNCER DE MAMA**

TESE DE DOUTORADO

Olmiro Cezimbra de Souza Filho

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**EFEITO FARMACOGENÔMICO *IN VITRO* DO
ASTROCARYUM ACULEATUM EM CÉLULAS
MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO E DE
CÂNCER DE MAMA**

Olmiro Cezimbra de Souza Filho

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

Orientadora: Prof^a Dr^a 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)

Souza Filho, Olmiro Cezimbra de
EFEITO FARMACOGENÔMICO *IN VITRO* DO ASTROCARYUM
ACULEATUM EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE
PERIFÉRICO E DE CÂNCER DE MAMA / Olmiro Cezimbra de Souza
Filho. – 2014.
90 f.; 30 cm

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. MCF-7 3. Anticarcinogenese 4.
Carotenóides 5. Genotoxicidade I. Cruz, Ivana Beatrice Mânica
da II. Título.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Olmiro Cezimbra de Souza Filho. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua do Acampamento, n. 569, ap. 03, Bairro Centro, Santa Maria, RS. CEP: 97050-003

Fone: (55) 9162.1957; E-mail: ocesfilho@gmail.com

**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 FARMACOGENÔMICO *IN VITRO* DO *ASTROCARYUM
ACULEATUM* EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE
PERIFÉRICO E DE CÂNCER DE MAMA**

elaborada por

Olmiro Cezimbra de Souza Filho

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dr^a
(Presidente/Orientadora)

Patrícia Gomes, Dr^a (UNIFRA)

Roberto Christ Vianna Santos, Dr (UNIFRA)

Katia Padilha Barreto, Dr^a (UFSM)

Rafael Noal Moresco, Dr (UFSM)

Santa Maria, 21 de janeiro de 2014.

*Dedico este estudo a todas as mulheres
que depositam na ciência e na pesquisa
a esperança de que, algum dia,
vençamos, de maneira definitiva,
a luta contra esta terrível doença:
o câncer de mama.*

AGRADECIMENTOS

*A Deus,
por nos permitir a cada dia um novo conhecimento, um novo saber...*

*À minha família, Regina e Olmiro Neto,
por sempre, incondicionalmente, me apoiarem nesta nova empreitada.*

*Aos meus pais, Marietta (in memoriam) e Olmiro,
por me ensinarem, entre tantos princípios, o da persistência ao objetivo.*

*À minha orientadora, amiga, “irmã” e incansável, Prof^a Ivana,
por, muito além de orientar, me introduzir, novamente,
no mundo fascinante da pesquisa.*

*Ao “time” do Laboratório de Biogenômica,
um local onde todos apoiam uns aos outros, em especial aos colegas:
Alencar, Francine, Fernanda, Eduardo, Taís, Michele, Luiz Filipe,
Greice, Thaís, Clarice, Maria Fernanda...*

Aos colegas professores do Departamento de Morfologia da UFSM.

*A UNIFRA, ao LABIMED e ao Prof. Euler e sua equipe,
pelo apoio logístico.*

Aos funcionários do Departamento de Morfologia da UFSM.

*Aos colegas do setor da Saúde da Mulher da Secretária de Saúde,
do município de Santa Maria, RS.*

Ao setor de RH do Ministério da Saúde em especial a Sra. Magda.

*À FAPERGS, à FAPEAM e ao CNPQ,
pelos recursos materiais.*

A todos, enfim, que de uma forma ou de outra contribuíram nesta jornada.

A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.
Nelson Mandela

RESUMO

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

EFEITO FARMACOGENÔMICO *IN VITRO* DO *ASTROCARYUM ACULEATUM* EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO E DE CÂNCER DE MAMA

AUTOR: OLMIRO CEZIMBRA DE SOUZA FILHO

ORIENTADORA: IVANA BEATRICE MÂNICA DA CRUZ

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 21 de janeiro de 2014

O câncer de mama, devido a sua importância epidemiológica em nosso meio e na saúde pública mundial, é uma doença objeto de inúmeros estudos contemporâneos. Alguns destes trabalhos sugerem que determinados genes relacionados ao ciclo celular e à apoptose e que atuam sobre o câncer de mama, podem ser modulados por compostos bioativos presentes na alimentação, como os carotenóides. Frutas são alimentos ricos em carotenóides, entretanto, existe ainda um número extenso de espécies cuja ação anticarcinogênica não foi investigada. Este é o caso do tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) que é muito consumido, habitualmente, pela população amazônica e que estudos recentes indicam ação antioxidante. Trata-se de um fruto rico em carotenóides e outros compostos bioativos que podem atuar como moduladores farmacogenômicos anticarcinogênicos. Estudos sobre este fruto são incipientes, principalmente aqueles voltados a sua potencial ação na gênese e na fisiologia do câncer de mama. Deste modo, esta investigação teve como objetivo avaliar o efeito de extratos etanólicos do tucumã (casca e polpa) na citogenotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico (CMSPs). Adicionalmente, foi avaliado o efeito anticarcinogênico *in vitro* na linhagem comercial MCF-7 de câncer de mama, determinando a ação sobre a viabilidade, proliferação celular, modulação do metabolismo apoptótico e oxidativo. O trabalho foi conduzido a partir de extratos etanólicos de polpa e casca, nos quais foram determinados os níveis de polifenóis totais, flavonóides, taninos, alcalóides por espectrofotometria e os níveis de beta-caroteno, quercetina, rutina, ácidos gálico, clorogênico e cafeico, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para a investigação dos efeitos cito-genotóxicos dos extratos da polpa e da casca do tucumã foram utilizadas CMSPs obtidas de adultos saudáveis. Estas células foram cultivadas em condições controladas e expostas a diferentes concentrações dos extratos durante 24h e 72h. Após estes períodos foi efetuada a análise da viabilidade pelo ensaio espectrofotométrico do MTT (brometo de 3-(4,5)-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-tetrazólio). Os níveis da proteína caspase-1 que está associada a eventos de morte celular programada (apoptose/piroptose) foram determinados por ensaio imunoenzimático de ELISA. Os efeitos genotóxicos foram medidos através da análise de fragmentação do DNA através de ensaio fluorimétrico utilizando o corante DNA Picogreen® que é específico para moléculas de DNA dupla-fita (DNA_{df}). No caso, tratamentos que apresentam maior dano genômico possuem níveis menores de fluorescência quando comparados ao controle. Para avaliar a genotoxicidade também foi realizado o ensaio do DNA Cometa Alcalino e a avaliação da instabilidade cromossômica (citogenética por Banda G). A concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi avaliada via ensaio fluorimétrico da DCFH-DA. Considerando os resultados obtidos no primeiro estudo, somente o efeito anticarcinogênico do extrato da polpa foi avaliado no segundo estudo. Inicialmente, células MCF-7 cultivadas em condições controladas foram expostas a concentrações de 1 a 1000 µg/mL do extrato, a fim de se determinar a faixa de concentração com maior potencial anticarcinogênico. A seguir as células MCF-7 foram expostas a três concentrações do extrato de polpa do

tucumã utilizando como controle positivo o quimioterápico ácido *all-trans* retinóico ATRA (1 μ M). A escolha da concentração do ATRA foi feita com base em estudos prévios publicados na literatura. A ação na viabilidade e proliferação celular foi determinada a partir do ensaio do MTT após 24, 48 e 72h de exposição aos tratamentos. O efeito dos tratamentos na indução da apoptose foi avaliado através da análise dos níveis das caspases (1, 3 e 8) por imunoenensaio ELISA e da expressão dos genes Bcl-2 e BAX via técnica de RT-PCR. Uma vez que o extrato do tucumã é rico em antioxidantes, o efeito no metabolismo oxidativo foi, também, avaliado através da análise da modulação da expressão dos genes das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) 1 e 2, catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX) e da atividade destas enzimas, utilizando os níveis de tióis (proteicos e não proteicos) como medida indireta da GPX. A comparação estatística entre os diferentes tratamentos foi efetuada via análise de variância One-Way e teste *post hoc* de Tukey. Os resultados mostraram que os extratos possuíam níveis elevados de polifenóis e de beta-caroteno. No primeiro estudo, foi observado efeito cito-genotóxico alto nas concentrações > 500 μ g/mL. A polpa apresentou menor cito-genotoxicidade e, por este motivo, foi utilizada para avaliar o efeito anticarcinogênico. No segundo estudo, as concentrações entre 300 a 1000 μ g/mL diminuíram a viabilidade das células MCF-7. Assim, as concentrações de 300, 500 e 900 μ g/mL foram utilizadas nos testes adicionais. Similarmente ao ATRA, o extrato diminuiu a viabilidade e a proliferação das células de câncer de mama ($p \leq 0.01$). A ação na viabilidade, provavelmente, envolveu a via apoptótica já que ocorreu um aumento nos níveis das caspases 1, 3 e 8 e inibição na expressão do gene antiapoptótico Bcl-2. Em geral estes resultados foram similares ao ATRA. O tucumã, assim como o ATRA, causou desbalanço no metabolismo oxidativo. Entretanto, enquanto o ATRA alterou o balanço oxidativo tanto em nível citosólico quanto em nível mitocondrial, o tucumã agiu somente em nível citosólico, principalmente, via diminuição nos níveis da expressão gênica e atividade da SOD1, CAT e aumento nos níveis de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas. O conjunto dos resultados, a despeito das limitações metodológicas associadas aos estudos *in vitro*, indica que o extrato etanólico do tucumã possui efeito anticarcinogênico em células de câncer de mama MCF-7 envolvendo potencial modulação farmacogenômica de genes e moléculas da via apoptótica e do metabolismo oxidativo. Este é o primeiro estudo que relata atividade anticarcinogênica deste fruto, e, tais resultados abrem a perspectiva de estudos adicionais de interesse científico, epidemiológico e clínico.

Palavras-chave: Câncer de mama. Anticarcinogênese. Tucumã. *Astrocaryum aculeatum*. Carotenoides. Polifenóis. Apoptose. Metabolismo oxidativo.

ABSTRACT

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

THE *IN VITRO* PHARMACOGENOMIC EFFECT OF *ASTROCARYUM ACULEATUM* IN MONONUCLEAR CELLS OF PERIPHERAL BLOOD AND BREAST CANCER

AUTHOR: OLMIRO CEZIMBRA DE SOUZA FILHO

ADVISER: IVANA BEATRICE MÂNICA DA CRUZ

Place and Date of Defense: Santa Maria, January 21, 2014

Breast cancer, due to their prevalence in our environment and global public health is a disease subject of numerous contemporary studies. Some of these studies suggest that certain genes related to cell cycle and apoptosis and acting on breast cancer can be modulated by bioactive compounds present in food, such as carotenoids. Fruits are foods rich in carotenoids, however, there is still a large number of species whose anticarcinogenic action was not investigated. This is the case of tucuma (*Astrocaryum aculeatum*) that is widely consumed, usually by Amazonian population and that recent studies shows antioxidant action. It is a fruit that presents high levels of carotenoids and other bioactive compounds that can act as anticarcinogenic pharmacogenomic modulators. Studies of this fruit are incipient, particularly those focused its potential role in the genesis and physiology of breast cancer. Thus, this research aimed to evaluate the effect of ethanol extracts of tucuma (peel and pulp) in the cyto-genotoxicity in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Additionally, the anticarcinogenic effect was evaluated *in vitro* in the commercial line MCF-7 breast cancer, determining the action on the viability, cell proliferation, modulation of apoptosis and oxidative metabolism. The study was conducted from ethanol extracts of peel and pulp, in which were determined the levels of total polyphenols, flavonoids, tannins, alkaloids by spectrophotometry and levels of beta-carotene, quercetin, rutin, gallic, chlorogenic and caffeic acids, by high performance liquid chromatography (HPLC). For investigation of cyto-genotoxic effects of pulp and peel tucuma extracts were used PBMCs obtained from healthy adults. These cells were grown in controlled conditions and exposed to different concentrations of the extracts for 24 and 72 hours. After these periods, viability analysis was conducted by the spectrophotometric assay of MTT (bromide of 3-(4,5)-dimethyl-2-thiazolyl-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium). The levels of caspase-1 protein that is associated with events of programmed cell death (apoptosis/pyroptosis) were determined by enzyme immunoassay ELISA. The genotoxic effects were measured by analysis of DNA fragmentation by fluorometric assay using the DNA Picogreen® dye that is specific for double-stranded DNA molecules (dsDNA). In this case, treatment with higher genomic damage have lower fluorescence levels when compared to control. To evaluate the genotoxicity was also carried out the DNA Alkaline Comet assay and the evaluation of chromosomal instability (G-band cytogenetic). The concentration of reactive oxygen species (ROS) was assessed by fluorimetric assay of DCFH-DA. Considering the results obtained in the first study, only the anticarcinogenic effect of the pulp extract was evaluated in the second study. Initially, MCF-7 cells grown under controlled conditions were exposed to concentrations from 1 to 1000 µg/mL of the extract, in order to determine the concentration range with greater anticarcinogenic potential. Following MCF-7 cells were exposed to three concentrations of the tucuma pulp extract using as positive control chemotherapy all-trans retinoic acid ATRA (1µM). The choice of ATRA concentration was based on previous studies reported in the literature. The action on cell viability and proliferation was determined by MTT assay after 24, 48 and 72h of exposure to treatments. The effect of the treatments in induced

apoptosis was evaluated by analyzing the levels of caspases (1, 3 and 8), by ELISA immunoassay and expression of Bcl-2 and BAX genes via RT-PCR technic. Once the tucuma extract is rich in antioxidants, the effect on oxidative metabolism was also evaluated through the analysis of the modulation of gene expression of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) 1 and 2, catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX) and the activity of these enzymes, using the levels of thiols (protein and non-protein) as an indirect measure of GPX. Statistical comparison between different treatments was performed via ANOVA One-Way and post hoc Tukey test. The results showed that the extracts had high levels of polyphenols and beta-carotene. In the first study, high cyto-genotoxic effect was observed at concentrations > 500 µg/mL. The pulp showed lower cyto-genotoxicity and, therefore, was used to evaluate the anticarcinogenic effect. In the second study, concentrations between 300 to 1,000 µg/mL decreased the viability of MCF-7 cells. Thus, concentrations of 300, 500 and 900 µg/mL were used in further testing. Similarly to ATRA, the extract reduced the viability and proliferation of breast cancer cells ($p \leq 0.01$). The action in the viability probably involved apoptotic pathway since there was an increase in the levels of caspases 1, 3, 8, and inhibiting the expression of anti-apoptotic Bcl-2 gene. In general, these results were similar to ATRA. The tucuma, as well as ATRA, caused an imbalance in the oxidative metabolism. However, while the ATRA altered the oxidative balance in both cytosolic level as for mitochondrial level, tucuma acted only in cytosolic level, mainly, via decreasing levels of gene expression and activity of SOD1, CAT and increased levels of lipid peroxidation and proteins carbonylation. The overall results, despite the methodological limitations associated with *in vitro* studies indicates that the tucuma ethanolic extract has anticarcinogenic effect in breast cancer cells MCF-7 involving potential pharmacogenomics modulation of genes and molecules of the apoptotic pathway and oxidative metabolism. This is the first study reporting anticarcinogenic activity of this fruit, and these results open the prospect of further scientific, epidemiological and clinical interest studies.

Keywords: Breast cancer. Anticarcinogenesis. Tucuma. *Astrocaryum aculeatum*. Carotenoids. Polyphenols. Apoptosis. Oxidative metabolism.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATRA	<i>All-trans retinoic acid</i>
BAX	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
CAT	Catalase
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMSPs	Células mononucleares do sangue periférico
DCFH	Diclorofluoresceína
DCFH-DA	Diclorofluoresceína diacetato
DNA _{df}	Ácido desoxirribonucleico dupla fita
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FEBRASGO	Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia
GPX	Glutathione peroxidase
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5)-dimetil-2-tiazolil-2,5 difenil-2H-tetrazólio
qPCR	<i>Real time PCR</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription - Polymerase chain reaction</i>
SOD	Superóxido dismutase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Câncer de Mama: aspectos epidemiológicos	12
1.2 Biologia e Fisiopatologia do Câncer de Mama	13
1.3 Farmacogenética e farmacogenômica aplicadas em terapias oncológicas	14
1.4 Aspectos gerais da terapêutica do câncer de mama	16
1.5 Potencial uso terapêutico de compostos retinóicos no câncer de mama	17
1.6 Componentes bioativos da dieta na prevenção e tratamento do câncer: o papel dos retinóides	19
1.7 Caracterização do Tucumã (<i>Astrocaryum aculeatum</i>, G.F. Meyer) e seu potencial efeito antitumoral	21
1.8 Justificativa	26
1.9 Objetivos	26
1.9.1 Geral	26
1.9.2 Específicos.....	26
1.10 Delineamento Geral	27
ARTIGO 1	29
ARTIGO 2	39
DISCUSSÃO	74
CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS	81
ANEXOS	86
Anexo A – Autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético	87
Anexo B – Aprovação do Comitê de Ética	89

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma morbidade que, anualmente, ceifa centenas de milhares de vidas no mundo. Igualmente importante é o impacto social, econômico e psicológico que a doença traz para a mulher e sua família envolvendo, desta forma, questões estéticas relacionadas a um órgão que, praticamente, é o símbolo da feminilidade e da maternidade. No contexto familiar traz grandes e profundas transformações e, não raramente, abala, inclusive, a estrutura financeira de forma drástica. Deste modo, investigações relacionadas a aspectos preventivos e terapêuticos desta doença são de grande relevância científica, epidemiológica e clínica.

1.1 Câncer de Mama: aspectos epidemiológicos

Estudos epidemiológicos estimam que a incidência do câncer de mama vem aumentando no mundo desde a década de 1940, sendo o tipo de câncer mais prevalente nas mulheres que vivem nos países ocidentais. Em 2007, nos Estados Unidos, o câncer de mama foi diagnosticado em mais de 180 mil mulheres, resultando em cerca de 40 mil óbitos. A partir destes dados epidemiológicos, estima-se que de 10% a 15% de todas as mulheres do mundo serão diagnosticadas com câncer de mama durante a sua vida (JEMAL, 2007).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2011), o risco estimado de câncer de mama tem se mantido próximo a 49 casos a cada 100 mil mulheres, desde 2008, sendo que, a taxa de mortalidade por câncer de mama no Brasil continua alta. Enquanto nos países desenvolvidos a sobrevida média em cinco anos é de 73%, em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, a mesma cai para 57%. Por este motivo, pesquisas que desenvolvam novas abordagens terapêuticas do câncer de mama são consideradas de fundamental importância.

1.2 Biologia e Fisiopatologia do Câncer de Mama

A carcinogênese envolve um processo multifatorial no qual, em relação ao câncer de mama, os aspectos biológicos possuem grande importância, pois o tecido mamário apresenta características próprias. Apesar de variar conforme o sexo e a idade, em geral, a glândula mamária é composta por 15-20 lobos formados por glândulas túbulo-alveolares compostas que são envolvidas tanto por tecido conjuntivo quanto por tecido adiposo. Cada lobo, por sua vez, subdivide-se em lóbulos que contêm alvéolos (acinos) ou túbulos. Estas estruturas são consideradas as porções secretoras do leite. Esta secreção conflui para uma série de ductos que desembocam no seio galactóforo e finalmente no mamilo, localizado no centro da aréola (Figura 1).

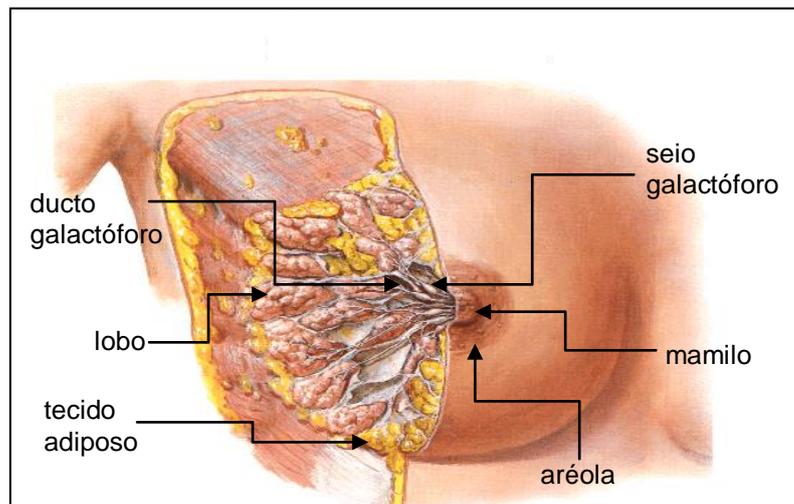


Figura 1 – Esquema anatômico da mama numa vista de dissecação ântero-lateral. Fonte: Adaptado de Netter (1998)

Por ser de origem epitelial, a glândula mamária está continuamente produzindo novas células via linhagem germinal conhecida como “células-tronco adultas”. Estas células-tronco produzem novas células que substituem as células mais velhas. As células velhas se destacam da matriz extracelular e são induzidas a um processo de apoptose próprio chamado de *anoikis* (FRISCH; SCRETON, 2001). Entretanto, conforme o período da vida da mulher, as células-tronco mamárias ficam mais suscetíveis à ação dos fatores carcinogênicos (tabagismo,

terapia hormonal, álcool, excesso de peso, alterações genéticas e outros), pois quanto menos diferenciadas se encontram as células que compõem a estrutura glandular mamária, maior será a suscetibilidade a estes fatores. Por exemplo, logo após a puberdade, a estrutura lobular da mama é do tipo I (muito indiferenciado); já, no outro extremo, durante a lactação, encontra-se o tipo IV (grau máximo de diferenciação celular), por isto a importância da lactação como fator de proteção (EDEN, 2010).

Outra característica da biologia feminina diz respeito à ação hormonal estrogênica que estimula a proliferação celular. Sendo assim, dependendo do sinergismo que possa ocorrer, estas células podem sofrer danos e mutações que levam à perda da capacidade de diferenciação das mesmas, dando início ao processo carcinogênico (CLARK et al., 1997).

1.3 Farmacogenética e farmacogenômica aplicadas em terapias oncológicas

O desenvolvimento de novas tecnologias no contexto da saúde, tanto no aspecto preventivo quanto no aspecto terapêutico, remete a uma gama de possibilidades de intervenções para um patamar mais promissor do que em décadas passadas. Com o sequenciamento do genoma humano em 2001, novas alternativas se descortinaram para a ciência e, tratamentos até então pensados como futuristas tornaram-se reais.

Entre estas alternativas encontra-se a farmacogenética e a farmacogenômica. A farmacogenética é a área que investiga as variações individuais dos genes na eficácia e segurança do uso dos fármacos (METZGER; SOUZA-COSTA; TANUS-SANTOS, 2006). Embora incipiente, a farmacogenética abre um novo horizonte na terapia farmacológica do câncer de mama ao ser alcançada a possibilidade de individualização dos tratamentos. Com o uso de ferramentas genético-moleculares uma maior eficiência terapêutica poderá ser atingida e uma série de eventos indesejáveis, como certos efeitos colaterais e adversos, poderão ser evitados (AL-GHOUL; VALDES, 2008; SHEFFIELD; PHILLIMORE, 2009).

Abordagens terapêuticas nas mais diversas áreas da saúde e não somente na oncologia, vêm utilizando os princípios da farmacogenética como na psiquiatria

(HAILE; KOSTEN; KOSTEN, 2009; XUAN et al., 2008), na reprodução humana (FAUSER; DIEDRICH; DEVROEY, 2008; YU; HANDELSMAN, 2001) e na clínica médica (PETERS, 2009), além de outras.

Em relação ao câncer de mama, torna-se interessante salientar que as respostas individuais a determinados tratamentos explicam, por exemplo, o que ocorre em relação ao uso do tamoxifeno como adjuvante no câncer de mama. Em relação a este medicamento, existem algumas pacientes que não respondem da maneira esperada (efeito farmacogenético), e, portanto, o uso do mesmo é desaconselhado (LAZARUS, 2009).

Uma vez que existe uma enorme complexidade e falta de conhecimento sobre potenciais efeitos farmacogenéticos relacionados ao câncer de mama, investigações usando modelos experimentais são importantes de serem desenvolvidas para dar suporte à área da farmacologia (FRICK et al., 2013). Em alguns casos, a determinação da ocorrência de variações em genes específicos vem conquistando espaço no arsenal terapêutico de muitos tipos de neoplasias. Este é o caso do tratamento de algumas leucemias (STOCCO et al., 2013). Uma série de outros estudos relacionados à farmacogenômica está, ainda, em andamento (MLAKAR; MARC, 2013).

Portanto, é inegável o fato de que a possibilidade da ativação/inativação de alvos específicos e personalizados possa melhorar a terapêutica oncológica. Neste caso, o uso da farmacogenética na clínica médica contemporânea está rompendo o paradigma do uso de protocolos universais para todos os pacientes (“tamanho único”) e consolidando a chamada “medicina personalizada”.

Estudos realizados nestas últimas três décadas sugerem que fármacos e outros fatores ambientais, como os alimentos, podem modular diferencialmente genes associados ao risco, à evolução e ao prognóstico das doenças oncológicas (MLAKAR; MARC, 2013).

Neste contexto, estes fatores podem, por exemplo, modular diferencialmente oncogenes e genes de supressão tumoral, como é o caso dos relacionados com a divisão celular e a morte celular programada (apoptose), que modulam a quantidade e a qualidade das células do organismo humano (EDEN, 2010). No câncer de mama, a expressão de vários destes genes está alterada o que faz com que a célula consiga se dividir indefinidamente, se tornar indiferenciada, em termos cito-funcionais, não respeitando nem os limites do órgão e nem realizando mais suas

funções básicas.

Sendo assim, a identificação de compostos bioativos com efeito farmacológico que inclua a ação sobre a expressão destes genes torna-se importante. Entre estes, estão os genes da família *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2). Nesta família encontra-se o próprio gene Bcl-2 que tem efeito antiapoptótico, bem como o gene *Bcl-2 associated X protein* (BAX) que é um gene pró-apoptótico. Em uma célula saudável as expressões do Bcl-2 e BAX estão equilibradas. Já, nas células tumorais, poderão ser observados níveis aumentados na expressão do gene Bcl-2 implicado diretamente com esta via do metabolismo celular (FATTHAI et al., 2013; NIKHIL et al., 2013; XIONG et al., 2013).

Na prática clínica atual, muitos marcadores tumorais relacionados com genes que sofreram mutações, e que, portanto, modificaram a sua expressão gênica, são utilizados para definir o tipo de terapia a ser aplicada na paciente com câncer de mama.

1.4 Aspectos gerais da terapêutica do câncer de mama

De acordo com os protocolos da Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO) (2013), o tratamento do câncer de mama abarca procedimentos cirúrgicos, radioterápicos, quimioterápicos, imunoterápicos e, de maneira destacada, como adjuvante, cita-se a chamada terapêutica endócrina nos tumores com receptores estrogênio (ER+).

Segundo a FEBRASGO (2013): atualmente, a abordagem cirúrgica procura ser o menos agressiva possível com procedimentos bem delimitados, o que pode ser facilitado por métodos diagnósticos sensíveis e precisos bem como a detecção precoce do câncer de mama; a radioterapia tem como intenção a destruição das células remanescentes após o procedimento cirúrgico ou tem por objetivo diminuir o volume tumoral previamente à cirurgia; a quimioterapia tem papel importante na complementação do tratamento cirúrgico, em situações metastáticas e em tumores refratários a outros tratamentos, sendo a adriamicina a 1ª linha de escolha assim como os taxanos; a imunoterapia, através do uso de anticorpos monoclonais, também é um arsenal terapêutico, através do uso do trastuzumabe e mais

recentemente do pertuzumabe. Estes quimioterápicos induzem as células cancerosas a retomarem o mecanismo da apoptose (indução farmacogenômica); a estratégia da abordagem terapêutica endócrina do câncer de mama hormônio dependente envolve, atualmente, duas possibilidades: (1) bloqueio dos receptores hormonais, sendo que o fármaco mais utilizado é o tamoxifeno para os casos de ER (+), assim como aqueles tumores que apresentam outro biomarcador como o HER 2 (+) podem responder de maneira positiva ao uso do trastuzumabe; (2) supressão da função hormonal ovariana através da utilização de análogos do GnRH (ex: goserelina), de inibidores da aromatase (ex: anastrozol) ou da realização de ooforectomia bi-lateral;

Como pode ser observado, tratamentos indicados pela FEBRASGO (2013) são corroborados por estudos que envolvem a identificação da positividade ou não dos biomarcadores tumorais que vêm ganhando, cada vez mais, terreno na terapêutica do câncer de mama envolvendo, inclusive, os aspectos muito atuais da farmacogenética e da farmagogenômica (CHUNG et al., 2013).

1.5 Potencial uso terapêutico de compostos retinóicos no câncer de mama

Uma vez que determinados genes estão intimamente ligados à gênese do câncer foi desenvolvida a “terapia da diferenciação celular”, considerada como uma nova esperança no tratamento desta doença. Esta terapia está subsidiada na possibilidade de que os genes alterados no câncer de mama possam ser novamente modulados, similarmente ao que ocorre no estado diferenciado permitindo, assim, a indução de apoptose destas células e não a sua simples destruição por agentes farmacológicos (JAIN; ALAHARI, 2011).

Entre os genes relacionados à apoptose encontram-se os genes Bcl-2 e BAX que já foram referidos anteriormente. Entretanto, evidências sugerem que moléculas químicas podem modular tais genes interrompendo seu efeito tumoral. Assim, um conjunto grande de pesquisas se volta, hodiernamente, para a análise dos efeitos de compostos na modulação da diferenciação do câncer, como os retinóicos (ALTUCCI; GRONEMEYER, 2001; KOAY et al., 2010; SUN; LOTAN, 2002; TANG; GUDAS, 2011).

Um conjunto consistente de evidências sugere que a molécula do ácido retinóico (vitamina A) atua diretamente na sinalização que regula a diferenciação celular no câncer de mama. A vitamina A e seus derivados retinóicos exercem uma ampla variedade de efeitos no desenvolvimento embrionário, no crescimento e diferenciação celulares e, também, na apoptose. A vitamina A não pode ser sintetizada por qualquer tipo de animal. Então, sua obtenção, obrigatoriamente, deve ser feita pela dieta na forma de retinol, retinil, retinal e ácido retinóico (de origem animal) ou beta-criptoxantina, alfa e beta-carotenos (de origem vegetal) sendo este último o mais ativo dos carotenóides pró-vitamina A (CAMPOS; ROSADO, 2005) e, conforme Bushue e Wan (2010) existem mais de 400 moléculas naturais e sintéticas que são estrutural ou funcionalmente relacionadas à vitamina A.

O ácido retinóico regula vários processos biológicos através da sua ligação com uma série de proteínas produzidas pelo organismo. Entre estas proteínas se destaca a proteína celular ligante ao retinol (*cellular retinol-binding protein*, CRBP), proteínas ligantes ao retinol (*retinol-binding proteins*), proteína celular ligante ao ácido retinóico (*cellular retinoic acid binding protein*, CRABP) e receptores nucleares como o receptor do ácido retinóico (*retinoic acid receptor*, RAR) e o receptor retinóide X (*retinoid x receptor*, RXR) (BUSHUE; WAN, 2010).

Conforme Clarke et al. (2004) e Brtko (2007) a ação biológica dos retinóides é mediada pela formação de heterodímeros entre essas duas famílias de receptores conhecidas como RAR α , RAR β e RAR γ , que pertencem aos receptores do ácido retinóico, e RXR α , RXR β e RXR γ , que pertencem aos receptores retinóides X como já foi referido.

O papel do ácido retinóico na prevenção e tratamento do câncer tem recebido grande atenção devido aos seus efeitos terapêuticos ou, como agente quimiopreventivo devido a suas propriedades de diferenciação celular, antiproliferativas e pró-apoptóticas. Estudos epidemiológicos têm sugerido que a baixa ingestão de vitamina A aumenta o risco de desenvolvimento de câncer o que é corroborado por estudos em modelos animais em condições controladas de laboratório (SUN; LOTAN, 2002).

Investigações têm observado que os retinóides têm a capacidade de suprimir a carcinogênese em modelos experimentais de câncer de pele, câncer da cavidade oral, pulmão, bexiga, próstata, ovário e de mama. Em seres humanos, lesões epiteliais pré-malignas de câncer podem ser revertidas por compostos retinóides

induzindo a diferenciação de células mielóides e a prevenção do câncer de pulmão, fígado e de mama (BUSHUE; WAN, 2010).

No caso, a sinalização dos receptores retinóides pode modular a expressão dos genes relacionados ao ciclo celular e à apoptose. Esta modulação faz com que a célula retome a sua capacidade de diferenciação, interrompendo o processo de multiplicação anárquica e descontrolada que ocorre nas neoplasias (FLODROVA et al., 2013; GINESTIER et al., 2009; ZENG et al., 2013).

No câncer de mama, especificamente o *trans*-ácido retinóico também conhecido como ATRA, sigla em inglês para *all-trans retinoic acid*, tem sido utilizado em protocolos clínicos internacionais. Seu uso é indicado em alguns países porque o câncer de mama está associado ao alto risco de trombose, principalmente durante a quimioterapia e a hormonioterapia. Este efeito colateral tem que ser combatido, e estudos sugerem que o ATRA, além dos efeitos anticarcinogênicos, tem efeito antitrombótico (BRTKO, 2007; MARCHETTI et al., 2011). Entretanto, no Brasil, seu uso ainda não consta no protocolo da FEBRASGO (2013).

Investigações *in vitro* têm mostrado que células de câncer de mama tratadas com retinóides apresentam efeitos antiproliferativos, principalmente naquelas com receptor de estrogênio positivo como é o caso da MCF-7 (CZECZUGA-SEMENIUK; LEMANCEWIKS; WOLCZYNSKI, 2009). Entretanto, outra questão que precisa ser explorada é o quanto retinóides presentes em alimentos da dieta humana, principalmente frutos, podem influenciar na prevenção e no tratamento das neoplasias. Isto porque, muitos frutos possuem, inclusive, grandes concentrações do ATRA (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007; RIBEIRO; CRUZ, 2012).

1.6 Componentes bioativos da dieta na prevenção e tratamento do câncer: o papel dos retinóides

Investigações conduzidas, principalmente, nestes últimos vinte anos sugerem que, além das propriedades nutricionais, os alimentos possuem compostos bioativos que têm efeitos preventivos e terapêuticos em doenças crônico-degenerativas como é o caso do câncer. Estudos, como o realizado por Pérez-Lopez et al. (2009), envolvendo tipos de dieta como a do Mediterrâneo, por exemplo, já são bastante

conhecidos e demonstram a importância dos componentes bioativos presentes nos alimentos que compõem a dieta humana nos indicadores de saúde. Entre estes estudos, se destaca o *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study*, desenvolvido em 23 centros de pesquisa e dez países europeus, que demonstrou associação entre dieta e câncer (GONZALES; RIBOLI, 2010).

No Brasil, a incidência e a prevalência do câncer de mama variam conforme a região do país. Chama a atenção o fato de que na Região Norte estes números são menores do que nas demais. Dados epidemiológicos oriundos do Sistema Único de Saúde do Ministério da Saúde-DATASUS (BRASIL, 2011) permitem análises que mostram que Manaus-AM é uma das capitais com menor índice relativo de óbitos por câncer de mama assim como outros tipos de câncer.

Apesar de não se poder descartar a potencial ação de outros fatores ambientais na baixa prevalência de câncer de mama observada em Manaus e na Região Norte, fatores alimentares relacionados à dieta amazônica que ainda mantêm uma forte influência pré-colombiana podem contribuir com este quadro epidemiológico (RIBEIRO; CRUZ, 2012).

Esta afirmativa é corroborada por pesquisas populacionais, como a conduzida por Krewer et al. (2011) na qual os autores compararam a saúde de idosos ribeirinhos que vivem no município amazônico de Maués-AM e que habitualmente ingerem guaraná com os que não ingerem. Os resultados mostraram que os idosos que consomem guaraná apresentavam menor prevalência de doenças cardiovasculares, obesidade, hipertensão, diabetes mellito e também de neoplasias. Tais investigações sugeriram fortemente a existência de uma interação entre aspectos étnicos da população e fatores ambientais onde o *modus vivendi*¹, que inclui a dieta, assume papel de grande importância.

Entre as morbidades que estão fortemente relacionadas com a dieta, as neoplasias têm um papel destacado. Entretanto, esta relação parece ultrapassar os limites da prevenção e avançar em direção às estratégias terapêuticas (RIBEIRO; CRUZ, 2012). Por este motivo, pesquisas complementares em outros frutos amazônicos, além do guaraná, são de grande relevância, em especial, naqueles que são ricos em carotenóides contendo, inclusive, o composto ATRA. De Rosso e Mercadante (2007) realizaram um estudo para identificar e quantificar compostos

¹ estilo de vida

retinóides em seis frutos amazônicos: buriti, mari-mari, pupunha, mamey, camapu (físalis) e o tucumã que é um fruto regional habitualmente consumido tanto pela população residente na zona urbana de Manaus como pelos ribeirinhos (MIRANDA et al., 2001).

1.7 Caracterização do Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*, G.F. Meyer) e seu potencial efeito antitumoral

Entre os alimentos que possuem uma concentração e diversidade de carotenóides na sua constituição, encontra-se um fruto que faz parte da dieta amazônica: o tucumã, cujo nome científico é *Astrocaryum aculeatum* (CAVALCANTE, 1991).

Conforme Henderson (1995) o tucumã é uma palmeira comumente encontrada em pequenas densidades no interior da floresta e, em maior número, nas áreas abertas, seguindo, principalmente, a ocupação humana. Trata-se de uma espécie solitária, monóica que, com o estirpe ereto, mede de 8 a 20 m de altura (Figura 2).



Figura 2 – *Astrocaryum aculeatum*, um fruto Amazônico rico em moléculas retinóides (nomes comuns: tucumã, tucum no Brasil; wara, awara ou awarra nas Guianas; chontilla no Equador). (A) A palmeira do tucumã é nativa da região da floresta tropical da Amazônia; (B) Aspecto externo do tucumã; (C) A semente preta do tucumã é recoberta externamente por uma polpa comestível alaranjada e oleosa a qual foi utilizada para produzir os extratos etanólicos testados neste estudo assim como a casca verde-amarelada. Fonte: Adaptado de Henderson (1995).

Esta palmeira, conhecida como tucumanzeiro, se distribui geograficamente pela Amazônia central e ocidental. No Brasil, é frequentemente encontrada nos estados do Amazonas, Pará, Roraima, Rondônia e Acre, distribuindo-se, também, pelas Guianas, Peru e Colômbia. Assim, este fruto possui outros nomes comuns dependendo do local onde é encontrado: na Guiana Francesa, por exemplo, é conhecido como *wara* ou *awara*, enquanto que, no Suriname, é chamado de *awarra* e no Equador de *chontilla* (HENDERSON, 1995).

A família *Arecaceae*, que inclui o tucumã, é constituída por plantas muito características da flora tropical, entre cerca de 2500 a 3500 espécies de palmeiras identificadas de acordo com Uhl e Dransfield (1987). Tais plantas se constituem num dos grupos ecologicamente mais importantes para as populações do interior da Amazônia conforme Mendonça e Araújo (1999) já que, praticamente, todas as suas partes são aproveitadas: na alimentação, uso medicinal ou, até mesmo, na construção de casas (cobertura, assoalho e parede feitas das folhas) como relata Miranda et al. (2001).

A polpa do tucumã é apreciada e consumida pela população na forma *in natura* ou como recheio de sanduíches, tapiquinha, cremes e sorvetes (YUYAMA et al., 2008). O fruto é uma drupa globosa ou ovóide, cujo mesocarpo é fibroso e de coloração amarelo-alaranjada, contendo alto teor de pró-vitamina A, como citam Aguiar et al. (1980) e Marinho e Castro (2002). Já, a presença de lipídios e o alto valor energético são referidos por Aguiar et al. (1996) e Yuyama et al. (2005).

Apesar de ser um fruto rico em carotenóides, um número muito reduzido de estudos foi conduzido, até o presente, sobre o mesmo. Na revisão da literatura feita no *Medline* utilizando como palavra-chave o “gênero *Astrocaryum*” foram identificadas pouco mais que uma dezena de publicações. No *Scielo*, menos de cinquenta estudos foram identificados. Já, no banco de tese da CAPES, não chega a uma centena a quantidade de estudos em nível de mestrado e doutorado relacionados ao gênero *Astrocaryum*. Embora, a maior parte dos estudos visou questões agrobiológicas relacionadas ao tucumã e não seus potenciais efeitos biológicos, algumas informações relevantes foram obtidas.

O estudo realizado por Picanço (1997) analisou a composição centesimal, mineral, o conteúdo de vitamina A e a caracterização dos ácidos graxos da polpa do tucumã. Os resultados mostraram quantidades significativas de vitamina A. A polpa também é rica em minerais como: cálcio, ferro, fósforo, magnésio, sódio e zinco.

Outra investigação, feita por Moreira (2000), que avaliou a composição nutricional de frutos de algumas palmeiras, descreveu que o tucumã possui 58,6% de lipídios na polpa e 37,6% na amêndoa. Na polpa, 46,96% das gorduras eram saturadas, 27,06% eram monoinsaturadas e 4,2% eram poliinsaturadas. Os teores protéicos foram estimados em 8,44% para a polpa e 12,06% na amêndoa.

A investigação realizada por Bora et al. (2001) sobre a qualidade das gorduras e proteínas do tucumã descreveu um total de 22 a 25 ácidos graxos. Entre os ácidos graxos insaturados os principais foram o ácido palmítico, o ácido aríco, o oléico e o linoléico. As proteínas da polpa apresentaram aminoácidos essenciais em concentração relativamente alta, com exceção da metionina e da lisina que estavam em baixas concentrações.

Estudos sobre a caracterização nutricional e química do tucumã mostraram que além do alto valor energético, o tucumã é reconhecidamente fonte de pró-vitamina A. O teor de β -caroteno no fruto *in natura* é, em média, $10,28 \text{ mg} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$ e na polpa desidratada pulverizada (farinha), $12,06 \text{ mg} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$. Assim, 100 g de parte comestível do tucumã fresco fornecem 0,85 mg de retinol, e a polpa desidratada pulverizada (farinha), 1 mg. Em se tratando de recomendações, isto significa que 100 g de polpa fresca de tucumã suprem 95,2% das necessidades diárias de um homem adulto, ou que 46,67 g de polpa (aproximadamente três frutos) suprem 100% da necessidade diária de uma criança de 4 a 6 anos (YUYAMA et al., 2008).

Em comparação a certas hortaliças como, por exemplo, a cenoura (*Dalcus carota*) e a abóbora (*Cucurbita sp.*), Godoy e Rodriguez-Amaya (1998) observaram que o tucumã apresentou uma concentração 339,5% maior de pró-vitamina A do que a cenoura cozida, 311,7% maior do que a cenoura fresca e 478,0% maior do que a abóbora cozida.

Adicionalmente, ao contrário de outros frutos também ricos em compostos carotenóides, segundo autores como De Rosso e Mercadante (2007), o tucumã seria pobre em compostos polifenólicos como os flavonóides. Entretanto, esta afirmativa não foi confirmada pelo trabalho conduzido por Gonçalves (2008). Talvez, estas diferenças de resultados se devam à avaliação dos frutos em diferentes momentos ontogenéticos ou provenientes de regiões também diferenciadas.

Na sua composição são observados os seguintes tipos de moléculas de retinóides apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais retinóides encontrados na polpa do tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) determinados por De Rosso e Mercadante (2007)

Tipos de moléculas	Concentração µg/g
Vitamina A	62,65
All-trans-β-caroteno (ATRA)	47,36
All-trans-α-caroteno	1,68
All-trans-β-criptoxantina	1,64
13-cis-β-caroteno	1,60
All-trans-α-criptoxantina	1,30
Zeinoxantina	1,02
All-trans-luteína	0,79
Cis-γ-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-δ-caroteno	0,52
All-trans-β-zeacaroteno	0,44
All-trans-γ-caroteno	0,35
All-trans-neoxantina	0,26
Cis-violaxantinas	0,24
Cis-neoxantinas	0,18
All-trans-zeaxantina	0,16
All-trans-ζ-caroteno	0,14
Cis-luteína	0,04

Fonte: De Rosso e Mercadante (2007)

Com base nestas evidências, Garcia (2012) avaliou e quantificou a presença de outros compostos bioativos presentes em extratos etanólicos da polpa e casca do tucumã no qual foram identificados alcalóides, taninos e flavonóides como a quercetina, rutina, ácido gálico, ácido clorogênico e ácido cafeíco. Adicionalmente, este autor observou grande capacidade antioxidante destes extratos e propriedade de reversão de efeitos causados por moléculas pró-oxidantes como é o caso do peróxido de hidrogênio. Estes resultados fortaleceram a hipótese de que o tucumã teria potencial efeito antitumoral. Entretanto, não pode ser descartada a hipótese de que, dependendo da concentração, este fruto também poderia apresentar efeitos cito-genotóxicos em células saudáveis.

Com a emergência na utilização de produtos naturais, tanto na suplementação alimentar quanto na terapêutica farmacológica, discussões sobre a segurança do uso destes produtos têm sido intensificadas. Internacionalmente já

existem orientações sobre a necessidade de testes que avaliem a segurança no uso destes produtos, como é o caso do *Guideline on Non-Clinical Documentation for Herbal Medicinal Products in Applications for Marketing Authorisation* (KELBER; STEINHOFF; KRAFT, 2012). Entretanto, a quantidade de estudos sobre o potencial efeito citotóxico e genotóxico de produtos naturais ainda é considerada insuficiente. Neste sentido, investigações sobre ervas e frutos devem se orientar, não só para o seu potencial uso farmacológico, mas, também estimar as concentrações que estariam dentro de limites de segurança considerando aspectos cito-genotóxicos.

A ocorrência de resposta biológica a determinadas moléculas, compostos químicos ou extratos pode acontecer através de um efeito não linear. Este fenômeno produz uma curva em formato de U (*U-shaped*) ou de U invertido. Considerando a influência de um determinado fármaco na sobrevivência de células cancerosas, o início da curva indica a amplitude das concentrações mais baixas que não causam nenhum ou pouco efeito; as concentrações intermediárias são as que possuem o efeito biológico desejável (diminuem a sobrevivência, indicando efeito anticarcinogênico); e, nas concentrações mais elevadas, ocorre a perda do efeito ou mesmo o aparecimento de efeitos indesejáveis (aumentam a sobrevivência das células tumorais indicando efeito pró-carcinogênico). Este fenômeno é também conhecido como hormese (KELBER; STEINHOFF; KRAFT, 2012).

A hormese foi, inicialmente, identificada através de estudos de dois pesquisadores alemães em épocas diferentes. Um, farmacologista, no final do século XIX, e o outro, médico, na década de 1940. Há ainda algumas restrições para a aceitação universal de tal conceito. Nos últimos anos, vários estudos sobre o tema foram publicados em periódicos científicos, sendo 80% deles após o ano 2000 (CALABRESE; BALDWIN, 2001).

Acredita-se que a identificação do efeito hormético pode auxiliar na determinação da faixa terapêutica mais eficaz e segura de uma dada molécula. Sendo assim, é aconselhável que investigações sobre a potencial ação terapêutica de produtos naturais também incluam estudos indicativos de hormese, utilizando para tanto modelos *in vitro* com células saudáveis (CALABRESE; BALDWIN, 2001).

Por este motivo, a análise do efeito do tucumã em células como as células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) é relevante, a fim de se determinar se a faixa de concentração que apresenta efeito antitumoral não é tóxica o suficiente para causar morte ou mesmo danos genotóxicos nas células saudáveis.

1.8 Justificativa

Apesar dos avanços terapêuticos no tratamento do câncer de mama, existem algumas situações nas quais ocorre resistência aos quimioterápicos e/ou efeitos adversos tromboembólicos associados à terapia convencional. Investigações sugerem que o uso do ATRA seria uma estratégia para minimizar estas condições. Entretanto, são poucos os estudos que avaliam o papel de frutos ricos em retinóides na ação antitumoral contra o câncer de mama. Tais estudos são importantes de serem realizados considerando o papel destes frutos na prevenção ao câncer. Levando-se em conta que existe uma grande concentração de ATRA no tucumã, a análise do seu potencial efeito antitumoral na linhagem celular de câncer de mama MCF-7, que é sensível a este retinóide, é justificada, principalmente, utilizando concentrações da polpa que não possuam efeitos cito-genotóxicos ou que estes estejam atenuados. Por tratar-se de uma doença de alta prevalência e mortalidade torna-se importante o desenvolvimento de novas abordagens de prevenção e tratamento, principalmente, se resultarem em custos menores.

1.9 Objetivos

1.9.1 Geral

Avaliar, o efeito *in vitro* do tucumã (*A. aculeatum*) na cito-genotoxicidade em CMSPs e sua ação anticarcinogênica na linhagem MCF-7 de câncer de mama, investigando o potencial efeito farmacogenômico na via apoptótica e no metabolismo oxidativo.

1.9.2 Específicos

- Determinar as principais moléculas bioativas presentes nos extratos de

polpa e casca do tucumã;

- Analisar o efeito cito-genotóxico dos extratos de tucumã (polpa e casca) em células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) avaliando a modulação dos níveis da caspase 1 como indicador de morte celular programada (apoptose/piroptose);
- A partir do extrato que apresentou menor potencial cito-genotóxico avaliar na linhagem comercial de câncer de mama MCF-7 o efeito anticarcinogênico e farmacogenômico via análise da: viabilidade e proliferação celular; indução da via apoptótica através da análise dos níveis das caspases 8, 3 e 1 e da expressão dos genes Bcl-2 e BAX; alteração do metabolismo oxidativo celular através da análise de marcadores do estresse oxidativo (lipoperoxidação e carbonilação de proteínas), e do sistema antioxidante endógeno (SOD1, SOD2, CATALASE, GPX) via quantificação enzimática e modulação da expressão gênica.

1.10 Delineamento Geral

O estudo foi desenvolvido em duas etapas, a seguir descritas.

Na primeira etapa foi avaliado o potencial efeito cito-genotóxico dos extratos da polpa e da casca do tucumã a partir da realização de três conjuntos de experimentos, *in vitro*, utilizando como modelo experimental CMSPs. Os resultados obtidos foram publicados no periódico *Journal of Medicinal Food* (v.16, n.11, p. 1013-1021) sob o título: *The in vitro genotoxic effect of tucuma (Astrocaryum aculeatum), an Amazonian fruit rich in carotenoids.*

Na segunda etapa do estudo foi avaliado, primeiramente, o efeito anticarcinogênico do extrato de polpa do tucumã na linhagem celular de câncer de mama MCF-7, utilizando como controle positivo o ATRA (1 μ M). Neste estudo também foi investigado o potencial efeito do tucumã na indução das caspases 8, 3 e 1 que são proteínas apoptóticas e na modulação da expressão dos genes Bcl-2 e BAX. Uma vez que o tucumã apresenta outras moléculas antioxidantes que têm

ação antitumoral previamente descrita na literatura, um protocolo adicional avaliou o efeito tanto do tucumã quanto do ATRA na modulação de marcadores oxidativos e na atividade e expressão gênica das enzimas antioxidantes. Os resultados obtidos originaram um manuscrito submetido ao periódico *Molecular Nutrition & Food Research* intitulado: *Astrocaryum aculeatum, an Amazonian fruit and ATRA its main retinoid molecule, exert an antitumoral effect against MCF-7 breast cancer cells by modulating apoptosis and antioxidant genes.*

ARTIGO 1²**The in vitro genotoxic effect of tucuma (*Astrocaryum aculeatum*), an
Amazonian fruit rich in carotenoids**

Olmiro Cezimbra de Souza Filho
Michele Rorato Sagrillo
Luiz Filipe Machado Garcia
Alencar Kolinski Machado
Francine Cadona
Euler Esteves Ribeiro
Marta Maria Medeiros Frescura Duarte
Ademir Farias Morel
Ivana Beatrice Mânica da Cruz

² Artigo publicado em: J Med Food, v.16, n.11, p. 1013-1021, 2013.

The *In Vitro* Genotoxic Effect of Tucuma (*Astrocaryum aculeatum*), an Amazonian Fruit Rich in Carotenoids

Olmiro Cezimbra de Souza Filho,^{1,2} Michele Rorato Sagrillo,¹ Luiz Filipe Machado Garcia,²
Alencar Kolinski Machado,^{1,2} Francine Cadoná,^{2,3} Euler Esteves Ribeiro,⁴
Marta Maria Medeiros Frescura Duarte,² Ademir Farias Morel,⁵ and Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1–3}

¹Post-Graduate Program in Pharmacology, and ²Laboratory of Biogenomics, Department of Morphology, Center of Health Sciences; ³Post-Graduate Program in Biochemical Toxicology, and ⁵Department of Chemistry, Center of Natural and Exact Sciences; Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.
⁴University for the Third Age, University of Amazonas State, Manaus, Amazonas, Brazil.

ABSTRACT Tucuma (*Astrocaryum aculeatum*) is an Amazonian fruit that presents high levels of carotenoids and other bioactive compounds such as quercetin. The extracts of tucuma peel and pulp present strong antioxidant activity which illustrate an elevated concentration that causes cytotoxic effects in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). This study performed additional investigations to analyze the potential genotoxic effects of the tucuma extracts on PBMCs. The genotoxicity was evaluated by DNA fragmentation, Comet assay, and chromosomal instability G-band assays. The acute tucuma extract treatment showed genoprotective effects against DNA denaturation when compared with untreated PBMC cells. However, in the experiments with 24 and 72 h treatments to tucuma treatments, we observed low genotoxicity through a concentration of 100 µg/mL, some genotoxic effects related to intermediary concentrations (100–500 µg/mL), and more pronounced genotoxic effects on higher tucuma extract concentrations. After 24 h of treatment, the reactive oxygen species were similar among treatments and PBMC control groups. However, the caspase-1 activity related to the apoptosis and pyroptosis process increased significantly in higher tucuma concentrations. In summary, tucuma extracts, despite their higher antioxidant content and antioxidant activity, would present PBMCs genotoxic effects that are dependent on concentration and time exposition. These results need to be considered in future *in vitro* and *in vivo* studies of tucuma effects.

KEY WORDS: • *Astrocaryum aculeatum* • DNA damage • genotoxicity • PBMCs • tucuma

INTRODUCTION

THE NUTRACEUTICALS present in fruits and vegetables have received considerable attention because of their low cost and wide safety margin.^{1–3} However, when extracts are produced from these foods, the increase in the compounds that present biological properties can be harmful and present toxic effects, including damage to genetic material.⁴ Cellular toxicity can include genotoxic effects. Genotoxic effects have been reported in vegetable extracts, and the evaluation of cytotoxic, genotoxic, or mutagenic effects of plant compounds can minimize the possible risk of these agents to human health.¹

Among the compounds present in vegetables, the carotenoids have attracted significant attention due to their

characteristic biological activities, including anti-allergic, anti-cancer, and anti-obesity effects.⁵ Some Amazonian fruits can be considered ideal natural carotenoid sources for consumption or supplementation because of the concomitant presence of high amounts of oil and carotenoids in these fruits that improve the oral bioavailability of these compounds.⁶

Tucuma (*Astrocaryum aculeatum*), an Amazonian palm fruit, is one of the traditional components of the regional breakfast. Due to its high popularity, the tucuma can be sold in the Manaus local markets as well as on downtown streets.⁷ In Brazil, the common names of this fruit are tucuma or tucum, whereas in other Latin American regions, these species are named wara awara, awarra, and chontilla.⁷

Fruit centesimal composition analysis showed that the mesocarp contains 412.73 ± 2.12 kcal, 44.9 ± 0.30 wet content, 10.9 fibers ± 0.1, 3.5 ± 0.07 g proteins, 8.5 ± 0.6 carbohydrates, and 40.5 ± 0.5 fats per 100 g pulp. The oil extract from the tucuma pulp presents 74.4% unsaturated and 25.6% saturated fatty acids that are rich in Omega 3, 6, and 9 fatty acids. Micronutrient analysis showed that tucuma

Manuscript received 19 November 2012. Revision accepted 18 August 2013.

Address correspondence to: Olmiro Cezimbra de Souza Filho, MD, PhD, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av Roraima 1000, Predio 19, Santa Maria-RS97105-900, Brazil, E-mail: ocesfilho@gmail.com

presents one of the highest concentrations of provitamin A "beta-carotene" with 52 mg per 100 g of pulp. This concentration is approximately eight times higher than that which is found in carrots (6.6 mg/100 g pulp).⁸

The tucuma carotenoid's evaluation described 24 carotenoids, of which 21 were chemically identified. The all-trans- β -carotene was found to be the main carotenoid, representing 75% of the total carotenoid content in tucuma followed by 13-cis- β -carotene, all-trans- α -carotene, and all-trans- β -cryptoxanthin, with each representing from 2.0% to 2.8% of the total carotenoid content. The other 19 carotenoids represent 15% of the total content.⁸

Previous studies defined other bioactive compounds in tucuma pulp as catechins (79 ± 5 mg/100 g sample dry weight), quercetin (2.96 ± 0.05 mg/100 g sample dry weight) a general antioxidant capacity as well as antiinflammatory activity.^{9,10}

Within this context, the tucuma extracts from peel and pulp could represent a potential effect on human health. However, it will be important to determine the range of concentrations that do not present toxic effects on cells. For this reason, we performed a complementary investigation to evaluate whether tucuma extracts present some genotoxic effect using human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), such as an *in vitro* experimental model.

MATERIALS AND METHODS

Tucuma extract production and chemical characterization

Tucuma 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). The pulp and peel were manually removed and kept frozen at -18°C until extraction procedures were performed 1 week later, producing 800 g peel and 400 g pulp. The ethanolic tucuma extract was prepared from tucuma 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. The extraction was performed over 4 days.

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 2 g. After this procedure, the pulp and peel extracts were lyophilized and stored at -20°C until they were to be used. We obtained 3359 g of peel and 6091 g of dried tucuma pulp extract.

Chemical characterization of tucuma extracts was performed in triplicate. The total phenolic content (TPC) was evaluated using Folin-Ciocalteu's method.¹¹ The TPC samples were calculated as a gallic acid equivalent from the calibration curve of gallic acid standard solutions (5, 10, 15, 20, 25, and 30 $\mu\text{g/mL}$) of 0.2% aqueous gallic acid that followed the same method. The equation obtained for the calibration curve of gallic acid was $y = 18.185x - 0.0266$ ($R^2 = 0.9783$). The results were expressed as mg gallic acid equivalent (mg GAE)/g dry plant extract materials.

The tannin content was measured using the method described by Morrison *et al.*¹² with some modifications. Samples in concentrations of 0.25 mg/mL, 5 mL of solution A (1 g vanillin in 100 mL of methanol), and solution B (8 mL HCl in 100 mL of methanol) were used for the experiment. The samples were read at 500 nm in a spectrophotometer. The total tannin content was expressed in milligram equivalents of catechin per gram of each fraction. The equation obtained for the calibration curve of catechin in the range of 0.001–0.025 mg/mL was $y = 0.00015x + 0.005$ ($r = 0.9989$).

The alkaloid content was determined using the method described by Sreevidya and Mehrotra,¹³ where Dragendorff's reagent precipitates alkaloids in plant materials. The samples were read at 435 nm in the spectrophotometer. The equation obtained for the calibration curve of bismuth nitrate pentahydrate solution in the range of 0.01–0.09 mg/mL was $y = 2.2783x + 0.0361$ ($r = 0.9997$).

The quantification of β -carotene and quercetin investigation was performed using reverse-phase chromatographic analyses (HPLC). The HPLC analyses were carried out under gradient conditions using the C18 column (4.6 mm \times 250 mm) packed with 5 μm diameter particles; the mobile phase was water containing 2% acetic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was 5% of B for 2 min, then changed to obtain 25%, 40%, 50%, 60%, 70%, and 100% B at 10, 20, 30, 40, 50, and 80 min, respectively, following the method described by Laghari *et al.*,¹⁴ with slight modifications. The lyophilized tucuma peel and pulp extracts were analyzed and dissolved in ethanol at a concentration of 3 mg/mL. Identification of the compounds was performed by comparing their retention time and UV absorption spectrum with commercial standards. The flow rate was 0.8 mL/min, injection volume was 40 μL , and the wavelength was 365 nm for quercetin and 450 nm for β -carotene. All the samples and the mobile phase were filtered through a 0.45 μm membrane filter (Millipore, Billerica, MA, USA) and then degassed by an ultrasonic bath before use. Stock solutions of standard references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.020–0.200 mg/mL for β -carotene and quercetin. The chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 600 nm). The calibration curve for quercetin is $y = 13,495x - 1092.6$ ($r = 0.9999$) and β -carotene: $y = 13,681x - 1518.7$ ($r = 0.9999$).

Tucuma extract treatments

To perform the experimental assays, the extracts were first diluted in 40% ethanol in order to improve their solubilization. The solution was then diluted in a cellular medium culture to obtain <0.5% ethanol concentration in all tucuma concentrations tested here. The ethanol was also added in all control treatments to eliminate the potential influence of this molecule in the results obtained. The concentration of tucuma extracts tested in this study was 5, 10, 100, 500, and 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Human PBMC culture conditions

We used PBMC cells from three healthy human donors to test the potential *in vitro* genotoxicity of tucuma extracts as previously described in Montagner *et al.*¹⁵ Briefly, peripheral blood samples were collected after a 12h overnight fasting period by venipuncture using top Vacutainer (BD Diagnostics, Plymouth, United Kingdom) tubes with heparin. One aliquot of each sample was used for cell culture; the other aliquots were used for biochemical and DNA damage analysis. Blood specimens (5 mL) were routinely centrifuged within 1 h of collection for 15 min at 2500 g; leucocyte samples were used to obtain PBMCs through a gradient centrifugation. The PBMCs were immediately transferred to culture media containing RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin/streptomycin. The cells were maintained in a suspension culture at 37°C in a 5% humidified CO₂ atmosphere.

Genotoxicity assays

We performed five general protocols to test whether the tucuma extracts present *in vitro* genotoxic effects on human PBMCs.

DNA picogreen denaturation assay

The DNA denaturation assay was applied by a protocol previously described by Batel *et al.*¹⁶ 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 is used to follow DNA denaturation with decreasing fluorimetric signal intensity proportionate to increasing ssDNA and mononucleotide content. Initially, we evaluated the potential acute effect of tucuma extracts on DNA denaturation.

Two tests were performed: acute effect of tucuma extracts on DNA damage and after 24h of PBMC treatment to tucuma 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 recorded at room temperature (SpectraMax M2/M2e Multi-mode Plate Reader; Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Expressions of results to DNA strand-break calculations were made in relation to control values at each time in denaturation after correction for blank readings. Blank values were measured in wells containing only the samples. Results were expressed as a percentage of dsDNA calculated for each treatment in relation to the untreated control samples.

Alkaline DNA comet and chromosomal instability by cytogenetic G-band assays

In the second protocol, we tested the potential genotoxicity of tucuma extracts. In this experiment, we evaluated the effect of tucuma extracts at different concentrations on DNA damage using alkaline DNA Comet and chromosomal instability by cytogenetic G-band assays.

The Comet assay was used to test the effect of tucuma extracts on PBMCs cellular DNA damage. The assay was performed as described by Singh *et al.*¹⁷ in accordance with general guidelines. Overall, 100 cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analyzed. Cells were visually scored according to tail length and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration). Therefore, the damage index for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). The slides were analyzed under blind conditions by at least two different researchers.

Karyotype analysis can provide clues to significant genes involved in the genesis and growth of several cancers. Therefore, we tested whether the tucuma extracts induced changes in mitotic index (MI) and chromosomal instability evaluated by the G-band cytogenetic carried out by optical microscopy analysis, that is, the most commonly used standardized method to detect chromosomal abnormalities.¹⁸ The nuclei found at the centerline of the slide glass were observed, counted, and classified by considering the occurrence of intact nuclei (in interphase or prophase), intact metaphases, and three indicators of chromosomal instability: broken chromosomes, karyopyknosis, and karyorrhexis/karyolysis. The karyopyknosis is characterized by a cytological condition caused by shrinkage of the nucleus of a cell with the condensation of the chromatin into structure-less masses. The karyorrhexis and karyolysis are the destructive fragmentation of the nucleus of a dying cell by which its chromatin is distributed irregularly throughout the cytoplasm that occurs as a result of either programmed cell death or necrosis. The MI that indicates the cell proliferation level was also evaluated to each of the treated and untreated PBMC samples. The MI observed was represented by the percentage of metaphases divided by the total nuclei observed in each treatment. Two replicates of each treatment were performed and analyzed.

Reactive oxygen species assay

We evaluated whether the tucuma extracts in different concentrations present effects on cellular oxidative metabolism, altering the intracellular reactive oxygen species (ROS) production that could be related to genotoxic effects. Therefore, ROS production was determined in all PBMC treatments with 24h of tucuma extract treatments using the non-fluorescent cell permeating compound 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay. In this technique, the DCFDA is hydrolyzed by intracellular esterases to DCFH, which is trapped within the cell. This non-fluorescent molecule is then oxidized to fluorescent DCF by cellular oxidants. After the designated treatment time, the cells were treated with DCFDA (10 μ M) for 60 min at 37°C. In the assay, 1×10^5 a cell to each sample was used to measure ROS levels.

The fluorescence was measured at an excitation of 488 nm and an emission of 525 nm (SpectraMax M2/M2e Multi-mode Plate Reader; Molecular Devices). All tests were performed in triplicate for each of the samples tested. The results were expressed as % of non-treated control cells

where the absorbance observed in the treatments was divided by the average absorbance of control group. This value was multiplied by 100 to give the percentage of ROS in relation to the control group. Values above 100% indicate increased levels of ROS, while those below 100% denote lower levels of ROS.¹⁹

Caspase-1 activity assay

The potential programmed cell death induction was analyzed from the evaluation of caspase-1 activity²⁰ that is involved in pyroptosis and also apoptosis processes of PBMCs treatment to tucuma extracts at different concentrations. The PBMCs were incubated under the conditions described earlier for 24 h. The analyses were performed using the Quantikine Human Caspase-1 Immunoassay to measure caspase-1 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 μ L) to each well. Furthermore, 100 μ L of the standard control for our sample was added per well, 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, 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 incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated, and 200 μ L of substrate solution was added to each well and 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.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard error of the mean. Statistical differences between pulp and peel bioactive compound concentrations were compared by Student's *t*-test. The comparison among genotoxic effects of tucuma extracts at different concentrations was performed by analyzing the one-way variance followed by a Tukey *post hoc* test. Chromosomal instability frequency among treatments was compared by chi-square test. All statistical analyses were performed where all *P*-values were two tailed, and *P* < .05 was considered statistically significant.

RESULTS

The TPC value was 941.8 ± 0.07 mg/GAEg in peel and 872.1 ± 0.06 mg/GAEg in pulp extracts. The chemical characterization of other bioactive compounds also showed higher concentrations in peel when compared with pulp extracts (Fig. 1).

The first experiment evaluated the acute effect of tucuma extracts on PBMC DNA fragmentation, and the results are presented in Figure 2. The PBMCs treated with tucuma peel

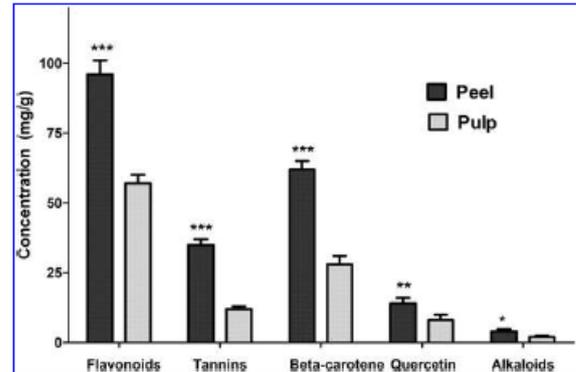


FIG. 1. Bioactive compounds detected by spectrophotometry (total flavonoids, tannins, and alkaloids) and HPLC (β -carotene and quercetin) present in tucuma peel and pulp extracts compared by Student's *t*-test (**P* < .05; ***P* < .01; ****P* < .001). Graphic bars represent mean \pm standard error.

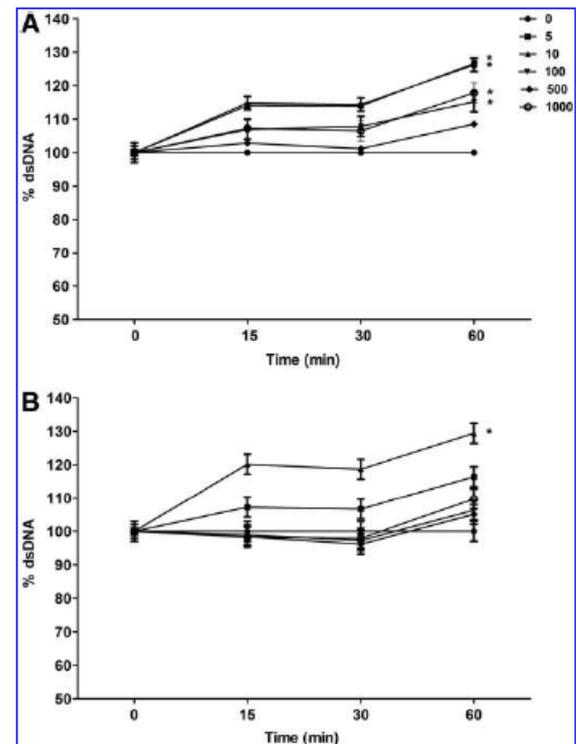


FIG. 2. DNA denaturation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after treatments with tucuma peel (A) and pulp (B) extracts at concentrations correspondent to 5 (\blacksquare), 10 (\blacktriangle), 100 (\blacksquare), 500 (\bullet), and 1000 (\circ), and expressed as μ g/mL. Percentages of dsDNA were calculated in relation to the untreated control, and each of the symbols represents means \pm standard error of the mean (SEM) (*n* = 8 wells) obtained in experiments. (*) Significant differences (*P* < .05) versus control (\blacklozenge) evaluated by Measure Repeated analysis of variance followed by *post hoc* Tukey test.

TABLE 1. DNA MIGRATION IN THE COMET ASSAY FOR ASSESSMENT OF GENOTOXICITY OF TUCUMA EXTRACTS EXPOSITION IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL CULTURE

Treatments ($\mu\text{g/mL}$)	Comet frequency (per 100 nuclei analyzed)					Index damage
	0	1	2	3	4	
Control	87	10	3	0	0	0.13
Peel						
5	67	23	9	1	0	0.33
10	67	20	10	3	0	0.33
100	44	30	14	8	4	0.56
500	42	25	11	8	14	0.58
1000	28	21	10	17	24	0.72
Pulp						
5	63	22	7	2	6	0.37
10	51	34	10	3	2	0.49
100	45	28	21	4	2	0.55
500	38	20	15	12	15	0.62
1000	18	28	19	14	21	0.82

Index damage: Σ (1,2,3,4 comet class)/100.
0, nucleus without DNA damage.

extracts presented a significant increase in DNA fluorescence when compared with an untreated group in 15, 30, and 60 min of treatment, indicating a genoprotective effect. However, the PBMC treated with tucuma pulp extract presented similar DNA denaturation observed in the control group except at a concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$. In this concentration, the PBMCs fluorescence level was higher than the control group, indicating a genoprotective effect.

The second experiment evaluated the potential genotoxic effect on PBMC exposed during 24 h to different concentrations of tucuma extracts. All PBMCs exposed to tucuma

peel extracts presented higher DNA degradation than the control group ($P = .0001$). However, in PBMC exposed to tucuma pulp extracts, 51.4% of dsDNA degradation occurred in only 1000 $\mu\text{g/mL}$ of pulp extract when compared with the control group, indicating some genotoxicity effect ($P = .0001$).

The results of genotoxicity induced by tucuma extracts using comet assay under alkaline conditions are described in Table 1. The damage index was higher in all concentrations of both extracts when compared with the PBMC control group ($P = .0001$).

The potential effect of tucuma extract on chromosome instability was also evaluated, and the results are presented in Table 2 and Figure 3. The MI was influenced by the presence of tucuma extracts. In the lowest concentrations of both extracts, the MI was similar to the control group. However, from the 100 $\mu\text{g/mL}$ concentration, the mitosis decreased dramatically ($\leq 1\%$) in the peel ($P = .001$) and in the pulp ($P = .001$).

The chromosome instability was not detected until 100 $\mu\text{g/mL}$ of both extract's broken chromosomes could no longer be observed. The karyiopyknosis frequency was also lower until it reached a 10 $\mu\text{g/mL}$ concentration in both extracts ($< 1.1\%$). However, karyiopyknosis increased in a concentration-dependent way from a 100 $\mu\text{g/mL}$ concentration in both extracts. The Karyorrhexis/karyolysis was observed only in the higher concentrations (500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$) of tucuma extracts.

We found significant differences in the MI among the cells treated with different tucuma extract concentrations.

The ROS production for PBMCs culture exposed during 24 h to different concentrations of tucuma peel and pulp extracts were also examined. Despite the 500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$ concentrations, in both extracts, the trend to decrease 23–25% the ROS production was found. When compared

TABLE 2. KARYOTYPES ALTERATION IN HUMAN HEALTH PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS EXPOSED TO DIFFERENT TUCUMA PEEL AND PULP EXTRACTS CONCENTRATIONS

Extracts/concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Total nuclei (n)	Mitotic index (%) ^a	Intact metaphases (%)	Instability chromosomal markers (%)		
				Broken chromosomes ^b	Karyopyknosis	Karyorrhexis and karyolysis
Control	958	52.7	5.5	0	0.5	0
Peel						
5	933	46.6	5.0	0	1.0	0
10	888	41.7	4.7	0	1.1	0
100	513	16.9	3.3	0	4.9	0
500	593	17.7	0.3	0.2	10.1	2.8
1000	892	35.6	0.4	0.3	11.2	3.4
Pulp						
5	955	49.7	5.2	0	0.5	0
10	852	41.7	4.9	0	1.1	0
100	610	22.0	4.1	0	2.5	0
500	718	24.3	0.1	0.9	5.6	1.8
1000	893	26.8	0.3	0.6	7.3	3.4

n, number of nuclei counted in each treatment present in central region of glass slide.

^aPercentage of cells in the metaphase phase divided by total nuclei.

^bMetaphases with chromosomal damage.

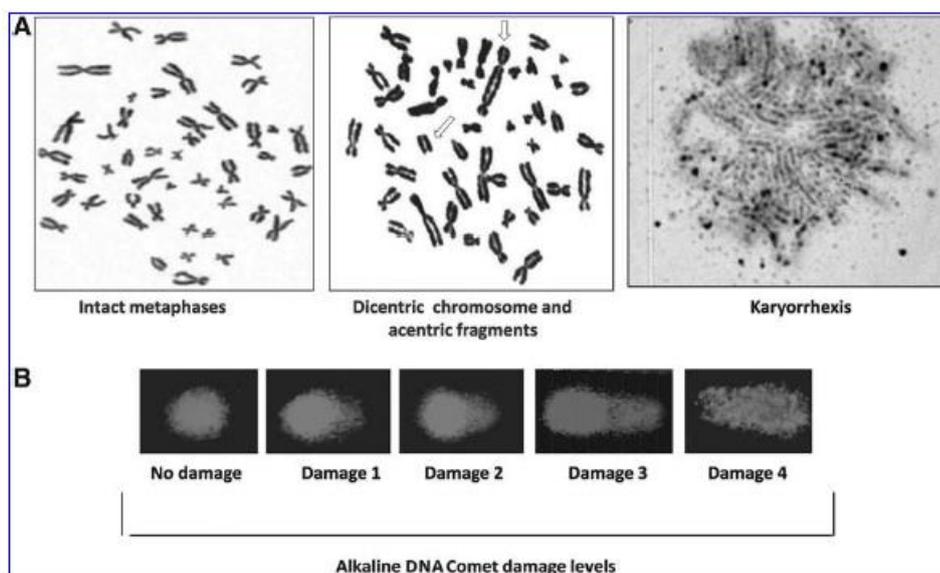


FIG. 3. Microphotographs of genotoxicity assays: (A) chromosomal instability analysis using G-banded cytogenetic technique showing karyotypes with intact metaphases, broken and in karyorrhexis; (B) alkaline DNA comet assay showing nucleus without damage, and the nucleus with different damage levels.

with the control group (Fig. 4A), these differences were not statistically significant (peel extract $P = .167$; pulp extract $P = .232$).

The caspase-1 activity was also evaluated among the different tucuma extract concentrations to observe the potential triggering of an apoptosis event, mainly pyroptosis in PBMC cells exposed to $>100 \mu\text{g/mL}$ tucuma extract. As viewed in Figure 4B, the caspase-1 activity presented an increase in activity concentration dependence in both ex-

tracts ($P = .0001$). However, the peel extracts presented higher caspase-1 activation in 500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$ concentrations than the pulp extracts ($P = .0001$).

DISCUSSION

The study described the potential genotoxicity effect of pulp and peel obtained from the tucuma Amazonian fruit that is very rich in carotenoids and other bioactive

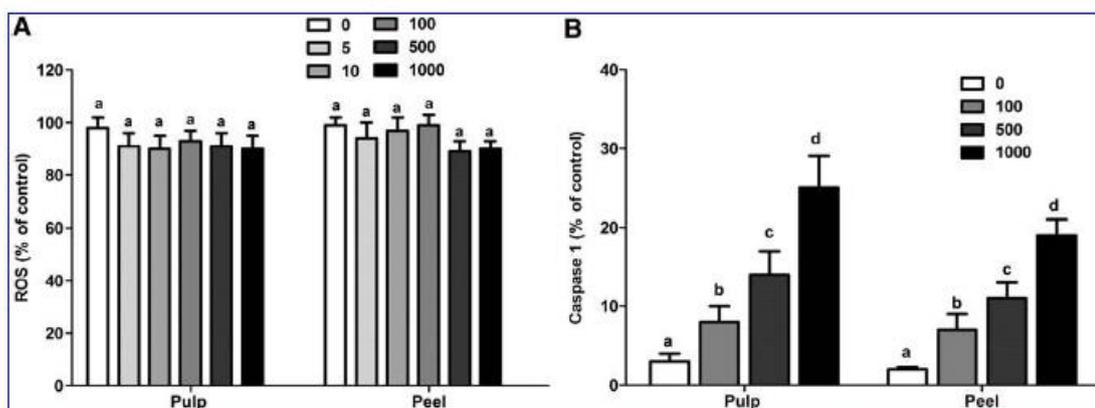


FIG. 4. Reactive oxygen species (ROS) levels evaluated by fluorimetric DCFH-DA assay (A) and caspase activity (pg/mL) of human PBMCs evaluated by immunoassay (B) after 24 h exposition to tucuma peel (A) and pulp (B) extracts at concentrations expressed as $\mu\text{g/mL}$. No statistical differences were observed in the ROS levels. Caspase activity of each treatment represented by means \pm SEM ($n = 8$ wells). ^{abcd}Different letters represent significant differences ($P < .05$) among treatments evaluated by analysis of two-way variance followed by *post hoc* Tukey test.

compounds. In the first experiment that evaluated the potential effect of tucuma extracts on DNA denaturation, a genoprotective action was observed mainly in tucuma peel extract. These results are most likely related to the high concentration of antioxidant compounds, mainly β -carotene, which is found in tucuma fruit.^{8,9}

However, with the other results obtained from PBMC treatments in which DNA fragmentation was analyzed, DNA cell damage evaluated by Comet assay and analysis of chromosomal instability suggested some genotoxic effect of tucuma extract in $>500 \mu\text{g}/\text{mg}$ concentrations. Since we did not find differences in the ROS production among the control group and PBMC treated with tucuma extracts, we can hypothesize that the antioxidant compounds present in the extracts were metabolized by the cells in the first hours. In these terms, since the tucuma presented other molecules (tannins and alkaloids) for which we did not know their specificity, we could not discard the possibility that some could present toxic effects on PBMC cells. In addition, several investigations have shown the antioxidant, pro-oxidant, or both effects.²¹

Why do such ambiguous results exist with regard to carotenoids? Authors such as Krinsky and Johnson²² consider that the reason for this discrepancy may be attributed to the use of different methodologies (1) in dissolving the carotenoid to be evaluated, (2) in initiating oxidant stress, (3) in the presence of other antioxidants, (4) in the type of animal used for *in vivo* studies, and (5) in the evaluation technique used to determine the efficacy of the various carotenoids. Our results corroborate this suggestion, as we found different effects considering PBMC acute or chronic treatment of tucuma extracts.

Other important results are related to differences in the genotoxic response depending on tucuma concentrations. From our results, we observed that the lower tucuma extract concentrations (from 5 to $100 \mu\text{g}/\text{mL}$) presented more positive effects than higher concentrations. The occurrence of U-shaped dose-response relationships (often termed hormesis) of several herbal products has been documented in numerous biological, toxicological, and pharmacological investigations. Many of the endpoints studied are of considerable significance to public health.²³

The potential differential effect of tucuma extract dose dependence is reinforced by results related to caspase-1 activity that increased in PBMC cultures treated with higher tucuma extract concentrations ($\geq 500 \mu\text{g}/\text{mL}$).

Cell death can occur via apoptosis, necrosis, and pyroptosis, distinct processes that present morphologic changes, the presence of DNA fragmentation, chromatin condensation, cellular lysis, and the release of cytosolic contents to the extracellular space.^{24,25} The process is distinct from apoptosis and necrosis, although the pyroptosis is an inflammatory and a more rapid event than apoptosis.²⁴

The caspase-1 activation results in apoptosis via caspase-7 and is also a key molecule in the pyroptosis process. The higher caspase-1 activity in PBMC extracts treated with higher tucuma extracts indicated that these extracts are able to trigger cellular programmed death, specifically apoptosis and pyroptosis.

These results suggest that tucuma extracts could have some effect on cancer biology due to the properties which induce caspase-1 activation. This suggestion is corroborated in studies about the effect of retinoids as all-trans-retinoic acid (ATRA) that are present in tucuma extracts in cancer cells. Caspase activation is fundamental for retinoid-induced apoptosis, including caspase-1.²⁴ In promyelocytic leukemia cells, the growth inhibition, differentiation, and apoptosis are directly influenced by retinoids via activation of caspase, in particular, caspase-1. A previous study showed that bioactive compounds present in tucuma extracts in high doses suppress the growth of some cell lines such as cervical carcinoma by activation of caspase-1.²⁶

Therefore, caspase-1 can operate at the cell-autonomous level to eliminate malignant precursors through programmed cell death. On the other hand, in healthy cells, the activation of inflamed pathways may stimulate the production of trophic factors for cancer cells and their stroma.²⁷ Our results described here indicate that higher tucuma extract concentrations could not present beneficial effects on PBMCs, including routes related to inflammation and cell-programmed pathways.

Conversely, lower tucuma extract concentrations are safe and potentially present beneficial effects on human physiology that could contribute in the prevention of diseases.

Phytochemicals have great potential in disease prevention, mainly cancer, because of their safety, low cost, and oral bioavailability. There are numerous reports of cancer chemopreventive activity of dietary botanicals, including cruciferous vegetables such as cabbage and broccoli, as well as Allium vegetables such as garlic and onions, green tea, citrus fruits, soybeans, tomatoes, berries, and ginger, as well as medicinal plants. Several lead compounds, such as genistein (from soybeans), lycopene (from tomatoes), brassinin (from cruciferous vegetables), sulforaphane (from asparagus), indole-3-carbinol (from broccoli), and resveratrol (from grapes and peanuts), are in preclinical or clinical trials for cancer chemoprevention.²⁷

When compared with traditional vegetables such as carrots, tucuma extracts present higher carotenoids concentrations, including RAs that are a class of compounds structurally related to vitamin A.² These compounds presented antioxidant activity as well as other biological effects that regulate a wide range of biological processes, including embryonic development, differentiation, proliferation, and apoptosis. The RAs also participate in important physiological functions, primarily in the brain and the reproductive system.²⁸ Investigations have also observed that RAs can interfere with these events on several levels related to carcinogenesis. This is the case of ATRA molecules that provide essential support to diverse biological systems and physiological processes.²⁹

Differentiation therapy with ATRA has marked a major advance and become the first drug of choice in the treatment of cancers, such as acute promyelocytic leukemia. ATRA is being increasingly included in anti-tumor therapeutical schemes for the treatment of various tumoral diseases such as Kaposi's sarcoma, head and neck squamous cell carcinoma,

ovarian carcinoma, bladder cancer, and neuroblastoma. The ATRA also presents antiangiogenic effects in several systems, inhibiting proliferation in vascular smooth muscle cells (VSMCs) and anti-inflammatory in rheumatoid arthritis.³⁰

Tucuma extracts also present other important polyphenols such as quercetin. Quercetin is the main flavonoid present in the human diet. Flavonoids are compounds occurring in plants that present important antioxidative properties.

Several therapeutic proprieties of flavonoids, mainly of quercetin, have been studied in the last decade, such as the antioxidant and anticarcinogenic potential and their protective effect to the renal, cardiovascular, and hepatic systems. Most flavonoids have some potentially positive effects on the cardiovascular system, although the final pharmacological targets differ markedly among various flavonoids.³¹ Biochemical and genetic studies on cellular and animal models showed that quercetin presents a broad range of biological properties. Multiple lines of experimental evidence suggest a positive association between quercetin intake and improved outcomes of inflammatory cardiovascular risk. Quercetin can be considered the prototype of a naturally occurring chemopreventive agent because of its key roles in triggering the ‘‘hallmarks of cancer.’’³² In this context, tucuma extracts could affect the modulation of biological process related to cancer prevention and therapy.

However, our results also support the fact that the beneficial tucuma effects are dependent on the concentration and time of treatment, as these variables were related to an increase in the genotoxic effects observed in PBMCs. The genotoxic concentration-dependent effects have been previously described for other plants used by humans. For example, Wnuk *et al.*³³ described that yerbamate (*Ilex paraguayensis*) extracts increased in the level of apoptotic and necrotic of lymphocytes in a dose-depending manner.

Finally, we need to consider some methodological limitations related to the study presented here. We only used *in vitro* protocols to analyze the potential genotoxic effect of tucuma extracts. Therefore, these results cannot be directly transferred to *in vivo* models, as with these models, we need to consider other intervenient variables such as bioactive compounds and bioavailability as well as the absorption and biological metabolism. For example, despite β -carotene being one of the major carotenoids present in our diet and in human blood and tissues, its bioavailability is dependent on a vegetable source. Other factors can be important in its bioavailability, such as cooking, chopping, and the presence of dietary fat.³⁴ Since the tucuma fruit is very rich in oil, this condition potentially increases the bioavailability of compounds such as carotenoids.³³ Therefore, complementary investigations using experimental models need to be performed to confirm the results described here.

CONCLUSION

In summary, tucuma extracts, despite their higher antioxidant content and antioxidant activity, would be present in the

genotoxic effects of PBMCs that are dependent on concentration and time exposition. These results need to be considered in future *in vitro* and *in vivo* studies of tucuma effects.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was performed with financial support (grants and fellowships) from Brazilian research agencies: FAPEAM, FAPERGS, and CNPq. The authors thank Aline Augusti Boligon, Margareth Linde Athayde, and the Biogenomic Lab research team for technical support.

AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

No competing financial interests exist.

REFERENCES

1. Surh YJ: Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 2003;3:768–780.
2. Martinez ME, Marshall JR, Giovannucci E: Diet and cancer prevention: the roles of observation and experimentation. *Nat Rev Cancer* 2008;8:694–703.
3. Shukla Y, George J: Combinatorial strategies employing nutraceuticals for cancer development. *Ann NY Acad Sci* 2011;1229:162–175.
4. Kelber O, Steinhoff B, Kraft K: Assessment of genotoxicity of herbal medicinal products: a coordinated approach. *Phytomedicine* 2012;19:472–476.
5. Nagao A: Absorption and metabolism of dietary carotenoids. *Biofactors* 2011;37:83–87.
6. Cavalcante PB: Edible palm fruits of the Brazilian Amazon. *Principes* 1991;21:91–103.
7. Godoy HT, Rodriguez-Amaya DB: Occurrence of cis isomers of provitamins A in Brazilian vegetables. *J Agric Food Chem* 1998;46:3081–3086.
8. De Rosso VV, Mercadante AZ: Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from amazonian fruits. *J Agric Food Chem* 2007;55:5062–5072.
9. Gonçalves AESS, Lajolo FM, Genovese MI: Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. *J Agric Food Chem* 2010;58:4666–4674.
10. Bony E, Boudard F, Brat P: Awara (*Astrocaryum vulgare* M.) pulp oil: chemical characterization, and anti-inflammatory properties in a mice model of endotoxic shock and a rat model of pulmonary inflammation. *Fitoterapia* 2012;81:33–42.
11. Chandra S, Mejia EG: Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguayensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *J Agric Food Chem* 2004;52:3583–3589.
12. Morrison M, Asiedu EA, Stuchbury T, Powell AA: Determination of lignin and tannin contents of cowpea seeds coats. *Ann Bot* 1995;76:287–290.
13. Sreevidya N, Mehrotra S: Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. *JAQAC Int* 2003;86:1124–1127.
14. Laghari AH, Ali Memon A, Memon S, Nelofar A, Khan KM, Yasmin A: Determination of free phenolic acids and antioxidant

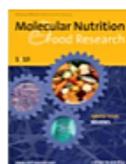
- capacity of methanolic extracts obtained from leaves and flowers of camel thorn (*Alhagi maurorum*). *Nat Prod Res* 2012;26:173–176.
15. Montagner GGS, Sagrillo MR, Machado MM, Almeida RC, Mostardeiro CP, Duarte MMF, Da Cruz IBM: Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicol In Vitro* 2010;24:1410–1416.
 16. Batel R, Jaksic Z, Bihari N, Hamer B, Fafandel M, Chauvin C, Schröder HC, Müller WE, Zahn RK: A microplate assay for DNA damage determination (fast micromethod). *Anal Biochem* 1999;270:195–200.
 17. Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184–191.
 18. Yunis JJ: High resolution of human chromosomes. *Science* 1976;191:1268–1270.
 19. LeBel CP, Ali SF, Bondy SC: Deferoxamine inhibits methyl mercury-induced increases in reactive oxygen species formation in rat brain. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992;112:161–165.
 20. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, Roose-Girma M, Erickson S, Dixit VM: Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 2004;430:213–218.
 21. Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ: Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 1992;358:167–169.
 22. Krinsky NI, Johnson EJ: Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med* 2005;6:459–516.
 23. Calabrese EJ, Baldwin LA: U-shaped dose-responses in biology, toxicology and public health. *Ann Rev Publ Health* 2001;12:15–33.
 24. Miao EA, Rajan JV, Aderem A: Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev* 2011;243:206–214.
 25. Gianni M, Ponzanelli I, Mologni L, Reichert U, Rambaldi A, Terao M, Garattini E: Retinoid-dependent growth inhibition, differentiation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. Expression and activation of caspases. *Cell Death Differ* 2000;7:447–460.
 26. Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G: Inflammasomes in carcinogenesis immune responses. *Nat Immunol* 2012;13:343–351.
 27. Gullett NP, Ruhul Amin AR, Bayraktar S, Pezzuto JM, Shin DM, Khuri FR, Aggarwal BB, Surh YJ, Kucuk O: Cancer prevention with natural compounds. *Semin Oncol* 2010;37:258–281.
 28. Bushue N, Wan YJ: Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:1285–1298.
 29. Napoli JL: Physiological insights into all-trans-retinoic acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821:152–167.
 30. Siddikuzzaman C, Guruvayoomappan VM, Berlin G: All trans retinoic acid and cancer. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2011;33:241–249.
 31. Mladenka P, Zatloukalová L, Filipický T, Hrdina R: Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 2010;49:963–975.
 32. Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Russo GL: The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochem Pharmacol* 2012;83:6–15.
 33. Wnuk M, Lewinska A, Oklejewicz B, Bugno M, Slota E, Bartosz G: Evaluation of the cyto- and genotoxic activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in human lymphocytes in vitro. *Mutat Res* 2009;679:18–23.
 34. Castenmiller JJ, Van de Poll CJ, West CE, Brouwer IA, Thomas CM, Van Dusseldorp M: Bioavailability of folate from processed spinach in humans. Effect of food matrix and interaction with carotenoids. *Ann Nutr Metab* 2000;44:163–169.

ARTIGO 2³

***Astrocaryum aculeatum*, an Amazonian fruit, and ATRA, its main retinoid molecule, exert an antitumoral effect against MCF-7 breast cancer cells by modulating apoptosis and antioxidant genes**

Olmiro Cezimbra de Souza Filho
Alencar Kolinski Machado
Francine Carla Cadoná
Verônica Azzolin
Eduardo Bortoluzzi Dornelles
Fernanda Barbisan
Marta Maria Medeiros Frescura Duarte
Taís Cristina Unfer
Margareth Linde Athayde
Aline Bolignon
Euler Ribeiro
Ivana Beatrice Mânica da Cruz

³ Artigo submetido ao periódico *Molecular Nutrition & Food Research*



Astrocaryum aculeatum, an Amazonian fruit, and ATRA, its main retinoid molecule, exert an antitumoral effect against MCF-7 breast cancer cells by modulating apoptosis and antioxidant genes

Journal:	<i>Molecular Nutrition and Food Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	de Souza Filho, Olmiro; Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Machado, Alencar; Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Cadoná, Francine; Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica Azzolin, Veronica; Universidade Federal de Santa Maria, Laboratório de Biogenômica Domelles, Eduardo; Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica Barbisan, Fernanda; Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Duarte, Marta; Universidade Federal de Santa Maria, Laboratório de Biogenômica Unfer, Taís; Universidade Federal de Santa Maria, Laboratório de Biogenômica Athayde, Marqareth; Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Boliqon, Aline; Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Ribeiro, Euler; Universidade do Estado do Amazonas, Universidade Aberta da Terceira Idade da Cruz, Ivana Beatrice; Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde
Keywords:	retinoids, breast cancer, oxidative stress, tucumã, apoptosis

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

SCHOLARONE™
Manuscripts

For Peer Review

***Astrocaryum aculeatum*, an Amazonian fruit, and ATRA, its main retinoid molecule, exert an antitumoral effect against MCF-7 breast cancer cells by modulating apoptosis and antioxidant genes**

Olmiro Cezimbra de Souza Filho^{1,2}, Alencar Kolinski Machado^{1,2}, Francine Carla Cadoná^{2,3}, Verônica Azzolin², Eduardo Bortoluzzi Dornelles^{2,3}, Fernanda Barbisan^{1,2}, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte², Tais Cristina Unfer², Margareth Linde Athayde⁴, Aline Bolignon⁴, Euler Esteves Ribeiro,⁵ Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,2,3*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil. -

² Laboratório de Biogenômica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil;

³ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

⁵ Universidade Aberta da Terceira Idade, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus-AM, Brazil

* Corresponding author: Ivana BM da Cruz, Av Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria-RS, Brazil. Zip Code 97105-900. Phone: 55-55-32208163; Fax: 55-55-32208239, email: ibmcruz@hotmail.com

List of Abbreviations: From standard abbreviations: bp, BSA, RPMI, DMSO, dsDNA, EDTA, ELISA, HPLC, IFN, IL, PBS, PCR, RNA, RT-PCR, SDS, Tris, UV. Others: all-trans retinoic acid (ATRA), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (BAX), catalase (CAT), Cu/Zn superoxide dismutase (SO1), dichlorofluorescein (DCF), 2' -7' -dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay, glutathione peroxidase (GPX), methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT), reactive oxygen species (ROS), retinoic acid (RA), Mn superoxide dismutase (SOD2), Tris-borate EDTA (TBE), total phenolic content (TPC)

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

Abstract

Scope: Several plants are rich in retinoids, such as all-trans-retinoic acid (ATRA), which are used in cancers as chemotherapeutic agents; an example plant is *Astrocaryum aculeatum*, an Amazonian fruit which the activity against the MCF-7 breast cancer cell line was analysed in this study.

Methods and Results: *A. aculeatum* ethanolic extract was produced, and the main bioactive molecules were quantified. MCF-7 cells were exposed to different *A. aculeatum* concentrations, with ATRA (1 μ M) as a positive control, and we determined the effect on the viability; cell proliferation; levels of caspases 8, 3 and 1; Bcl-2 and BAX gene expression and cell oxidative stress. *A. aculeatum* decreased the MCF-7 viability and cellular proliferation and increased the caspases levels, although its effect was not as strong as that of ATRA. Similar to ATRA, 300 μ g/mL of *A. aculeatum* was able to decrease the expression of Bcl-2 and to induce oxidative stress by lowering SOD1, catalase gene expression and enzyme activities, as well as increasing the lipoperoxidation and protein carbonylation. Most of the results were also observed in cells exposed to ATRA.

Conclusions: *A. aculeatum* possesses antitumoral effects against MCF-7 breast cancer cells involving oxidative stress as potential causal mechanism.

Keywords: breast cancer/retinoids/ apoptosis/oxidative stress/ tucumã

1 Introduction

The Vitamin A derivative ATRA is considered a potent chemotherapeutic drug for its role in regulating cell growth and differentiation. In breast cancer, ATRA is involved in growth modulation, differentiation and apoptosis induction [1]. Complementary studies reported that pre-malignant cancer cells can be transformed by retinoids that induce cell differentiation. These effects were observed mainly in human breast oestrogen receptor-positive cells such as the MCF-7 cell line [2]. Hong et al [3] investigated the effects of RA isomers (all trans-RA, 13-cis RA and 9-cis RA) on cell signal transduction and reported that increased caspase activity induces apoptosis in MCF-7 cells. In addition, RA treatment significantly decreases the activity of the antioxidant enzymes catalase and glutathione peroxidase.

RA isomers are naturally found in a wide variety of Amazonian fruits [4]. Most of these fruits also have high oil and carotenoid concentrations, which improves the oral bioavailability of these compounds [5]. This true for the regionally consumed fruits known as buriti (*Mauritia vinifera*), mamey (*Mammea americana*), marimari (*Geoffirola striata*), peach palm (*Bactrys gasipaes*), physalis (*Physalis angulata*) and tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) [6].

Unfortunately, the anticancer effects of Amazon fruits have not been the subject of much study. *Astrocaryum aculeatum*, popularly named “tucumã”, is a tropical palm fruit widely consumed in Amazonian breakfasts [7]. *A. aculeatum* (Figure 1) belongs to the Arecaceae family, the members of which are commonly found in deforested or degraded areas of found in Western and central Brazilian Amazonia and other Central American countries [8, 9].

Figure 1 here

1
2
3 The estimated total carotenoid content in tucumã fruit is 62.65 µg/g and there are
4
5 850 RE/100 g of vitamin A. Based on current nutritional recommendations, 100 g of
6
7 fresh *A. aculeatum* pulp can supply 95.2 % of the daily recommended Vitamin A [10].
8
9 Tucumã contains 21 chemically identified carotenoid molecules. All-trans-β-carotene is
10
11 found in the highest concentration (75 %), followed by 13-cis-carotene, all-trans-α-
12
13 carotene, all-trans-β-cryptoxanthin and others [6]. In addition to being rich in beta-
14
15 carotene, *A. aculeatum* contains other bioactive molecules that reportedly show
16
17 antitumoral activity; these include quercetin, rutin and gallic, and caffeic and
18
19 chlorogenic acids [11,12]. In some Latin American regions, *Astrocaryum vulgare*, a
20
21 species that is closely to tucumã and is popularly named awara, is also used
22
23 therapeutically [13] for its anti-inflammatory effects [14]. Recently, one study reported
24
25 that *A. aculeatum* displays antimicrobial activity effects against three gram-positive
26
27 microorganisms (*Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*)
28
29 and *Candida albicans*. The study showed that the antimicrobial activity was related to
30
31 an oxidative imbalance caused by *A. aculeatum* [12]. However, due the presence of
32
33 important bioactive molecules, higher concentrations of pulp and peel tucumã ethanolic
34
35 extracts (≥ 500 µg/mL) can cause cytotoxicity and genotoxicity in human peripheral
36
37 blood mononuclear cells (PBMCs), inducing caspase 1 activity that is related to
38
39 apoptosis and pyroptosis [13].
40
41
42
43
44

45 Considering *A. aculeatum* is rich in RA isomers that can act on cancer cells [2],
46
47 an additional complementary investigation was performed to evaluate the action of
48
49 ethanolic extract from the edible part of tucumã (pulp) against MCF-7 breast cancer
50
51 cells. The study also compared the cytotoxic and antiproliferative effects of *A.*
52
53 *aculeatum* with those of ATRA, which is the main RA molecule present in tucumã.
54
55

56 The levels of caspases 8, 3 and 1 were analysed to determine whether if the
57
58
59
60

1
2
3 effect of *A. aculeatum* on MCF-7 cells is related to apoptosis modulation. The
4
5 association between *A. aculeatum* and the expression of two genes involved in apoptosis
6
7 (Bcl-2 and BAX) was analysed. RA isomers are known to modulate MCF-7 antioxidant
8
9 enzymes; therefore, the effects of *A. aculeatum* pulp extract on oxidative metabolism
10
11 were also investigated [2].
12
13
14
15

16 2. Materials and Methods

17 2.1 Plant extract

18
19
20
21 The ethanolic *A. aculeatum* extract used in the present study is the same extract
22
23 that was prepared and chemically characterised by Souza-Filho et al [Error! Bookmark
24
25 not defined.]. Briefly, pulp extract was obtained from a composite sample representing a
26
27 mixture of progenies from a native forest near Manaus City (Amazonas State, Brazil),
28
29 located in the Amazonian region (3.08°S, 60.01°W). The pulp and peel were manually
30
31 removed and the pulp was kept frozen at -18°C until extraction procedures were
32
33 performed one week later, producing 400 g pulp. The pulp samples were titrated and
34
35 placed into sealed amber glass jars containing an absolute ethanol solution. Extraction
36
37 was performed over the course of four days. The homogenate was filtered through
38
39 Whatman No. 1 paper and then collected. Ethanol was removed using a rotary
40
41 evaporator at reduced pressure, 25° at 2 g. Following this procedure, the pulp extract
42
43 was lyophilised and stored at -20°C until it was used. A total of 6,091 g of dried tucuma
44
45 pulp extract was obtained.
46
47
48
49
50
51
52
53

54 2.2 Bioactive molecule quantification

1
2
3
4
5 The lyophilised tucuma pulp extract was analysed and dissolved in ethanol at a
6 concentration of 3 mg/mL. Chemical characterisation of tucuma pulp extract was
7 performed in triplicate. The total polyphenols content (TPC) was evaluated using Folin-
8 Ciocalteu's method as described by Chandra et al [15]. The TPC samples were
9 calculated as gallic acid equivalents from the calibration curve of gallic acid standard
10 solutions (5, 10, 15, 20, 25 and 30 µg/mL) of 0.2 % aqueous gallic acid, which followed
11 the same method. The equation obtained for the calibration curve of gallic acid was $y =$
12 $18.185x - 0.0266$ ($R^2 = 0.9783$). The results were expressed as mg gallic acid
13 equivalents (mg GAE)/g dry plant extract materials. The tannin content was measured
14 using the method described by Morrison et al. [16] with some modifications. Samples at
15 concentrations of 0.25 mg/mL, 5 mL of solution A (1 g vanillin in 100 mL of methanol)
16 and solution B (8 mL HCl in 100 mL of methanol) were used in the experiments. The
17 samples were read at 500 nm using a spectrophotometer. The total tannin content was
18 expressed in milligram equivalents of catechin per gram of each fraction. The equation
19 obtained for the calibration curve of catechin in the range of 0.001 - 0.025 mg/mL was
20 $Y = 0.00015x + 0.005$ ($r = 0.9989$). The alkaloid content was determined using the
21 method described by Sreevidja & Mehrotra [17], where Dragendorff's reagent
22 precipitates alkaloids in plant materials. The samples were read at 435 nm in the
23 spectrophotometer. The equation obtained for the calibration curve of bismuth nitrate
24 pentahydrate solution in the range of 0.01 - 0.09 mg/mL was $Y = 2.2783x + 0.0361$ ($r =$
25 0.9997). The quantification of β -carotene and quercetin investigation was performed
26 using HPLC analyses carried out under gradient conditions using the C18 column (4.6
27 mm x 250 mm) packed with 5 µm diameter particles; the mobile phase was water
28 containing 2 % acetic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was 5%

1
2
3 % of B for 2 minutes and then changed to obtain 25 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % and
4
5 100 % B at 10, 20, 30, 40, 50 and 80 minutes, respectively, following the method
6
7 described by Laghari et al. [18] with slight modifications. The compounds were
8
9 identified by comparing their retention times and UV absorption spectra with
10
11 commercial standards. The flow rate was 0.8 ml/minute, injection volume 40 μ L, and
12
13 the wavelength was 365 nm for quercetin and 450 nm for β -carotene. All the samples
14
15 and the mobile phase were filtered through a 0.45 μ m membrane filter (Millipore) and
16
17 then degassed using an ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standard
18
19 references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.020 –
20
21 0.200 mg/ml for β -carotene and quercetin. The chromatography peaks were confirmed
22
23 by comparing the retention times with those of reference standards and by DAD spectra
24
25 (200 to 600 nm). The calibration curve for quercetin is: $Y = 13495x - 1092.6$ (r
26
27 =0.9999) and β -carotene: $Y = 13681x - 1518.7$ ($r = 0.9999$).

2.3 MCF-7 Cell line culture

32
33
34
35
36
37
38 The MCF-7 human breast cancer cell line was obtained from American Type
39
40 Culture Collection (ATCC) and grown in RPMI 1640 with 10 % FBS, 2 mM glutamine,
41
42 and 100 U/mL of penicillin and streptomycin. The cells were maintained in culture at
43
44 37° C in a 5 % humidified CO₂ atmosphere.

2.4 MCF-7 treatments with *A. aculeatum* extract and ATRA

45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
The MCF-7 cell suspension was prepared by placing 0.5×10^5 cells/mL in a 96-
well plate and incubating for 24 hours. Further, the cells were treated with several

1
2
3 concentrations of *A. aculeatum* extract as well as 1 μ M ATRA. No treated cells were
4
5 used as negative controls. The *A. aculeatum* and ATRA effect on MCF-7 was evaluated
6
7 after 24, 48 and 72 h of exposure. All experiments were performed in triplicate.
8
9

10 11 12 2.5 *A. aculeatum* and ATRA cytotoxic and antiproliferative effects 13 14 15

16
17 An MTT assay was used to determine the effects of *A. aculeatum* and ATRA on
18
19 the MCF-7 viability and proliferation as described by Mosmann [19]; briefly cells
20
21 treated were incubated for 4 h with MTT reagent. After formazan salt was dissolved, the
22
23 absorbance was measured at 570 nm. The cells were photographed before DMSO
24
25 addition to observe the formazan crystals. To confirm the *A. aculeatum* cytotoxicity, a
26
27 second assay was performed to evaluate the dsDNA release from the cells to the culture
28
29 medium, which indicates cell death. The MTT assay was read using a SpectraMax
30
31 M2/M2e Multi-mode Plate Reader (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA,
32
33 USA) and the results were expressed as a percentage of the untreated control values
34
35 relative to the values for each treatment.
36
37
38
39
40
41

42 2.6 The effects of *A. aculeatum* and ATRA on the apoptosis pathway 43 44 45

46
47 The potential effects of *A. aculeatum* and ATRA on apoptosis modulation were
48
49 evaluated based on the quantification of caspases 8, 3 and 1 [20] as well as the analysis
50
51 of Bcl-2 and BAX gene expression after 24 h of MCF-7 exposure to pulp extract and
52
53 ATRA.
54
55

56 2.6.1 Caspase quantification 57 58 59 60

1
2
3
4
5 The caspases were identified using Fluorimetric kit assays (BioVision, Mountain
6 View, CA) following the manufacturer's instructions. The fluorescence intensity of
7 caspase-1, caspase-3 and caspase-8 were recorded at a wavelength of 400 nm for
8 excitation and 505 nm for emission. Caspase activity was calculated by testing the
9 fluorescence intensity (FI)/min/ml= $\Delta FI/t(t \times v)$, where ΔFI =the difference in the
10 fluorescence intensity between time zero and time t minutes, t=the reaction time in min,
11 and v=the sample volume in ml. The analyses were performed using a microplate with
12 96 wells, in accordance with the manufacturer's instructions. All reagents and working
13 standards were prepared and excess microplate strips were removed. The assay diluent
14 RD1 W was added (50 μ L) to each well. Furthermore, 100 μ L of the standard control
15 for our sample was added per well, covered with an adhesive strip and incubated for 1.5
16 hours at room temperature. Each well was aspirated and washed twice, for a total of
17 three washes. Caspase antiserum was added to each well and covered, given a new
18 adhesive strip and incubated for 30 minutes at room temperature. The aspiration/wash
19 step was repeated and Caspase conjugate (100 μ L) was added to each well, which was
20 then incubated for 30 minutes at room temperature. The aspiration/wash step was
21 repeated and 200 μ L of the substrate solution was added to each well, which was then
22 incubated for 20 minutes at room temperature. Finally, 50 μ L of stop solution was
23 added to each well.
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 2.6.2 RT-PCR of Bcl-2 and BAX genes

52
53
54 The Bcl-2 and BAX gene expression was determined using quantitative real time
55 RT-PCR of the total RNA obtained from each sample. The cells were washed gently at
56
57
58
59
60

1
2
3 ambient temperature with PBS (pH 7.4), and cellular lysis was performed with 2.5 ml of
4
5 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). The next step was to extract RNA following
6
7 the manufacturer's instructions. The total mRNA obtained was solubilised in 20 μ l of
8
9 water free of nucleases and used to synthesise cDNA from 500 ng. The cDNA
10
11 amplification was performed using Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent
12
13 Technologies, Inc. Santa Clara, CA, USA) and the following thermal cycling profile:
14
15 95°C for 5 min., followed by 40 steps of 95°C for 1 min., 60°C for 30 sec. 72°C for 1
16
17 min and then 72° C for 4 min for final extension. After 40 cycles, samples were run
18
19 through the dissociation protocol. Finally, the amplification reaction of the study genes
20
21 (Table 1) was conducted in 3 μ l of cDNA using the REDEExtract-N-Amp PCR Reaction
22
23 Mix Kit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) in an Eppendorf Mastercycler
24
25 gradient thermocycler (Maxygene II, Axygen, Foster City, CA, USA). Amplification
26
27 study gene fragments were separated in acrylamide gels at 10 % in 1 \times TBE buffer
28
29 through electrophoresis at 220 V for 30 min. Finally, bands were revealed with ethidium
30
31 bromide at 0.2 %. The primers used in the study are listed in Table 1. The housekeeping
32
33 gene β -actin was amplified as an internal control. Samples were analysed in triplicate.
34
35 Because the bands produce semi-quantitative results, the fragments amplified for each
36
37 treatment were measured using a DNA Picogreen assay. This method is based on the
38
39 ability of a specific fluorochrome dye (PicoGreen®) to make a very stable complex
40
41 with dsDNA in alkaline conditions instead of ssDNA, proteins, SDS, and urea. The
42
43 dsDNA in medium was identified using Quant-iT™ DNA PicoGreen® kit according
44
45 to the manufacturer's instructions. PicoGreen dye was diluted 1:200 with TE buffer (10
46
47 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) and incubated with cell samples added in a 96-
48
49 well fluorescence microplate in the dark at room temperature for 5 min. The
50
51 fluorescence emission was recorded at 528 nm with an excitation wavelength of 488
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 nm. The dsDNA quantification was read using a SpectraMax M2/M2e Multi-mode
4
5 Plate Reader (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA), and the results
6
7 were expressed as a percentage of the β -actin gene expression calculated for each
8
9 treatment.
10

11
12
13
14 Table 1 here
15
16
17

18 2.7 *A. aculeatum* and ATRA effect on the MCF-7 cellular redox state

19

20
21
22
23 A previous investigation performed by Oh et al [21] reported that retinoic acid
24
25 induces oxidative stress in MCF-7 by activating protein kinase C-delta on insulin-like
26
27 growth factor-I secretion. However, the ATRA effect on MCF-7 cell oxidative
28
29 metabolism is not well studied. Therefore, an additional analysis investigating the
30
31 potential effects of *A. aculeatum* and ATRA treatment on MCF-7 oxidative metabolism
32
33 was performed.
34
35
36
37

38 2.7.1 ROS quantified by DCFH-DA fluorometric assay

39

40
41 ROS quantification after cells were exposed to 24 h of increasing concentrations
42
43 of *A. aculeatum* extract concentration as well as ATRA was determined using the DCFH-
44
45 DA assay. In this technique, the DCFH-DA is hydrolysed by intracellular esterases to
46
47 DCFH-DA, which is trapped within the cell. This non-fluorescent molecule is then
48
49 oxidised to fluorescent DCF by cellular oxidants. After the designated treatment time,
50
51 the cells were treated with DCFH-DA (10 μ M) for 60 minutes at 37°C. The
52
53 fluorescence was measured at an excitation of 488 nm and an emission of 525nm using
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 a SpectraMax M2/M2e Multi-mode Plate Reader, Molecular Devices Corporation
4
5 (Sunnyvale, CA, USA). All tests were performed in triplicate [22].
6
7

8 9 10 2.7.2 Oxidant and enzymatic antioxidant biomarkers quantified by 11 spectrophotometric assays 12

13
14
15 Lipid peroxidation was quantified by measuring the formation of thiobarbituric
16 acid reactive substances (TBARS) as described by Ohkawa et al [23]. Protein carbonyls
17 were measured according the protocol described by dos Santos Montagner et al [24]
18
19 SOD1, SOD2, catalase and total thiols (proteic/no proteic), which is an indirect measure
20 of GPX. The SOD activity was identified by measuring the competitive reaction
21 between SOD and nitroblue tetrazolium chloride in an indirect assay [25]. The rate of
22 increase in the absorbance at 560 nm indicates the reduction of nitroblue tetrazolium
23 chloride to blue formazan by superoxide, which is generated by the xanthine/xanthine
24 oxidase system. The enzymatic reaction was initiated by adding xanthine oxidase.
25 SOD2 activity was quantified in the same assay medium in the presence of 5 mM KCN,
26 which inhibits SOD1 activity. SOD1 activity was measured as the difference between
27 the total SOD activity and SOD2 activity. One unit of activity was defined as the
28 amount of protein necessary to achieve half-maximal inhibition of the nitroblue
29 tetrazolium chloride reaction, and the activity was expressed as units per milligram of
30 haemoglobin. Catalase (CAT) activity was measured spectrophotometrically [26] using
31 hydrogen peroxide as a substrate and expressed as K per gram of haemoglobin. Thiol
32 groups were determined as described by Ellman [27].
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

2.7.3 RT-PCR of enzymatic antioxidant genes

The expression of the SOD1, SOD2, CAT and GPX genes was determined using quantitative real time RT-PCR of the total RNA obtained from each sample as described in section 2.4.2 of the present study. The primers used in the study are also listed in Table 1.

2.8 Statistical analysis

All data were expressed as the mean \pm standard deviation (SD). The results were analysed using one-way ANOVA followed by Tukey or Dunnet *post hoc* tests. A *p* value of ≤ 0.05 was taken to be significant.

3 Results

3.1 Chemical characterisation of *A. aculeatum* ethanolic extract

The *in vitro* antitumoral effect of *A. aculeatum* fruit pulp against MCF-7 cancer cells was tested using an ethanolic extract with the following characteristics: TPC = 941.8 mg/GAE g; flavonoids = 92.8 quercetin mg/g; total tannins = 31.4 mg/g and alkaloids = 1.5 mg/g. The extract also the following bioactive molecules: 63 mg/g of β -carotene, rutin 30.54 mg/g; quercetin = 12.72 mg/g; gallic acid = 3.79 mg/g; caffeic acid = 8.33 mg/g; and chlorogenic acid = 3.04 mg/g.

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

3.2 Cytotoxicity and antiproliferative effects of *A. aculeatum* extract and ATRA

Initially, the effect of *A. aculeatum* on the MCF7 cell viability at different concentrations was determined as shown in Figure 2 (A and B). *A. aculeatum* against the breast cancer cell cytotoxicity was detected at 300 µg/mL concentrations. After the results of the first analysis, the following three concentrations of *A. aculeatum* extract were used in the subsequent experiments: 300, 500 and 900 µg/mL, and each was compared to ATRA and untreated control cells (Figure 2C).

An important reduction of MCF7 cell proliferation was observed mainly after 48 h of *A. aculeatum* exposition. Cells exposed to 300 and 500 µg/mL of *A. aculeatum* extracts presented with a pattern similar to that observed in cells treated with ATRA. However, the antiproliferative effect of *A. aculeatum* extract at the highest concentration (900 µg/mL) was less pronounced than at lower concentrations (300 and 500 µg/mL) and for ATRA exposure. Therefore, *A. aculeatum* did not show a clear dose-dependent effect on MCF-7 cells at the tested concentrations.

Figure 2 here

3.3 The effects of *A. aculeatum* and ATRA on apoptosis markers

To determine whether the effects of *A. aculeatum* on the MCF-7 cell viability were related to apoptosis, the levels of caspases 8, 3 and 1 were determined after 24 h of exposition exposure (Figure 3). Cells treated with *A. aculeatum* showed significantly higher, dose-dependent caspase levels when compared to the untreated control group. However, this effect was lower than observed in cells exposed to ATRA. These results

1
2
3 indicate that *A. aculeatum* triggered apoptosis events activity in the MCF7 cells even at
4
5 the lowest concentration (300 µg/mL). To confirm the potential effects of *A. aculeatum*
6
7 on the apoptosis cascade, the Bcl-2 and BAX gene expression levels were also analysed.
8
9 The levels of the anti-apoptotic Bcl-2 gene decreased significantly in MCF7 cells
10
11 treated with ATRA and cells treated with 300 µg/mL of *A. aculeatum* extract. However,
12
13 the *A. aculeatum* effect on the Bcl-2 gene was less pronounced than the observed effect
14
15 of ATRA (Figure 4A). The BAX expression levels were higher in cells receiving ATRA
16
17 and cells receiving *A. aculeatum* when compared to untreated control cells, but this
18
19 effect was not statistically significant. Despite the lack of significance, the results
20
21 indicate an imbalance between BAX and Bcl-2 that occurs when triggered in MCF7
22
23 cells.
24
25
26
27

28
29 Figure 3 here

30
31 Figure 4 here

32 33 34 35 36 3.4 *A. aculeatum* and ATRA effect on the cellular redox state of MCF-7

37
38
39 The effect of *A. aculeatum* and ATRA treatment on the oxidative metabolism of
40
41 MCF-7 cells was evaluated using only the 300 µg/mL *A. aculeatum* concentration. This
42
43 concentration was chosen because it presented higher cytotoxicity and antiproliferative
44
45 effects than the other concentrations tested here. After 24 h of exposure, MCF-7 cells
46
47 treated with ATRA showed lower ROS levels than the control group, whereas cells
48
49 treated with *A. aculeatum* at 300 µg/mL showed ROS levels similar to those observed in
50
51 control cells ($p \leq 0.001$). In the presence of ATRA, MCF-7 cells showed increased
52
53 lipoperoxidation (8.78 ± 0.4 nmol MDA/mg protein) when compared to untreated
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 control cells (6.042 ± 0.3 nmol MDA/mg protein). On the other hand, *A. aculeatum*
4
5 extract significantly increased the TBARS levels (0.710 ± 0.04 nmol MDA/mg protein)
6
7 when compared to the control group (0.653 ± 0.03 MDA/mg protein) and to cells
8
9 treated with ATRA (0.558 ± 0.05 MDA/mg protein) Both, cells exposed to ATRA and
10
11 cells exposed to *A. aculeatum* showed significantly higher the protein carbonylation
12
13 compared to MCF-7 control cells (Control = 2.53; ATRA= 3.43 and *A. aculeatum* =
14
15 3.36 nmol/mg protein, $p \leq 0.01$).

16
17
18 The effects of ATRA and *A. aculeatum* on antioxidant enzymes were also
19
20 investigated by analysing SOD activity. Both ATRA and *A. aculeatum* treatments
21
22 SOD1 and SOD2 enzyme levels. SOD1 activity was 4.93 ± 0.8 mg/protein in untreated
23
24 MCF-7 cells. This level was significantly lower in cells treated with ATRA (3.83 ± 0.8
25
26 mg/protein) and *A. aculeatum* (3.48 ± 0.6 mg/protein) ($p \leq 0.05$). Additionally,
27
28 significantly higher SOD2 activity ($p \leq 0.01$) was observed in cells treated with ATRA
29
30 (2.71 ± 0.4 mg/protein) when compared to cells in the control group (1.85 ± 0.8
31
32 mg/protein) and those treated with *A. aculeatum* (1.97 ± 0.6 mg/protein). The catalase
33
34 levels of untreated MCF-7 cells were 0.27 ± 0.2 K/mg/protein. Exposure to ATRA
35
36 significantly decreased catalase activity (0.17 ± 0.2 K/mg/protein) whereas the
37
38 *A. aculeatum* extract significantly increased activity (0.34 ± 0.3 K/mg/protein) ($p \leq 0.01$).
39
40 The thiols levels were similar in the control group (0.161 ± 0.06 nmol/mL) and in cells
41
42 exposed to ATRA (0.149 ± 0.01 nmol/mL) and *A. aculeatum* (0.159 ± 0.01 nmol/mL).

43
44
45 The effects of *A. aculeatum* and ATRA on the antioxidant gene expression in
46
47 MCF 7 cells were also analysed; the resulting data are shown in Figure 5. The
48
49 treatments had effects of both SODs and CAT gene expression, but no detectable effect
50
51 was observed for the GPX expression. Both *A. aculeatum* and ATRA treatments
52
53 significantly decreased the SOD1 and CAT genes expression in MCF-7 cells when
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 compared to the control group. Increased SOD2 expression was observed only in cells
4
5 exposed to ATRA; cells exposed to *A. aculeatum* showed SOD2 expression that was
6
7 similar to untreated cells. Therefore, the results of gene expression analysis
8
9 corroborated the enzyme activity data.

10
11
12 Figure 5 here
13
14
15

16 4 Discussion

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
Breast cancer incidence, morbidity and mortality are a large problem, and more
effective strategies for breast cancer prevention are urgently needed [28].
Chemoprevention, which is the administration of pharmacologic or natural agents that
potentially could help to suppress or reverse carcinogenesis, has been explored as a
treatment for breast cancer for the last decade [2]. Retinoids have been identified as
important preventive and therapeutic agents for many types of cancers, including human
breast cancer. A large number of investigations showed have shown that natural or
synthetic vitamin A analogues can effectively regulate the differentiation, growth and
apoptosis of several types of cells [29].

In general, sources of vitamin A include carrots, mangos, sweet potatoes, and
spinach [30]. However, there are several less common fruits that are the richest in
carotenoids and, therefore, may have antitumoral properties. This is the case for most
Amazonian fruits, including *A. aculeatum*. To the best of our knowledge, this is the
first study to analyse the cytotoxic and antiproliferative of *A. aculeatum* ethanolic
extract on MCF-7 cancer cells. These effects are likely mediated by bioactive
molecules, especially ATRA, since which is the main retinoid found in *A. aculeatum*
[31].

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

Published studies have reported that ATRA can inhibit breast cancer cell proliferation by arresting the G1 cell cycle [30]. Studies of MCF-7 cells indicate that this effect is related to alterations in the expression and activity of cell cycle regulators [31] and to the induction of apoptosis after G1 arrestment [32,33]. Indeed, in the present study, both ATRA and *A. aculeatum* extract increased the caspase levels and affected Bcl-2 and BAX gene expression, which play roles in the apoptosis pathway.

These Bcl-2 and BAX belong to the Bcl-2 family of gene proteins, which are directly involved in the apoptosis pathway. While Bcl-2 is essentially an anti-apoptotic protein, Bax is considered a critical pro-apoptotic that regulates the balance between cellular life and death [34]. In healthy mammalian cells, Bax is a cytosolic inactive protein. However, a death signal alerts this protein to translocate into outer mitochondrial membrane, where it promotes permeability that favours the release of several apoptogenic factors, including cytochrome c. It is well established that Bcl-2 inhibits Bax activation [35, 35]. In this study, after 24 h of exposure to ATRA, MCF-7 cells showed significantly lower Bcl-2 gene expression and showed an increasing trend in Bax gene expression, which was not enough to be statistically significant. However, this imbalance between the Bcl-2 and Bax genes indicates that apoptosis is being triggered in MCF-7 cells. MCF-7 cells exposed to *A. aculeatum* showed effects similar to those observed in MCF-7 cells that were treated with ATRA. Although the decrease in the Bcl-2 levels was less intense in cells exposed to *A. aculeatum* (Fig. 4), the results suggest that this Amazonian fruit potentially affects breast cancer tumour cells.

A previous study, authored by Hong and Lee-Kim [3], investigating the effects of RA isomers on apoptosis and the enzymatic antioxidant system in human breast cancer cells, suggested that manipulation of the cellular redox state could be used to

1
2
3 modulate caspase-mediated death. This study showed that ATRA was the most effective
4
5 RA isomer in both cell growth inhibition and the induction of apoptosis in MCF-7 cells.
6

7
8 Because *A. aculeatum* contains antioxidants with antitumoral effects, such as
9
10 quercetin, rutin, gallic and caffeic acid, the potential effects of these molecules on the
11
12 cellular redox state of MCF-7 cells was postulated. Analysis of oxidative metabolism
13
14 biomarkers (oxidant and antioxidant) showed that both ATRA and *A. aculeatum* had
15
16 effects on MCF-7 cells. Both compounds caused cellular oxidative stress resulting from
17
18 increased lipoperoxidation and protein carbonylation levels in MCF-7 cells.
19

20
21 However, the results summarised in Figure 6 suggest that ATRA and
22
23 *A. aculeatum* extract different effects on the enzymatic antioxidant system.
24

25
26 Figure 6 here

27
28 The oxidative effects of ATRA occur at the mitochondrial and cytoplasmic
29
30 levels, whereas the of *A. aculeatum* extract were limited to the cytoplasmic level. Hong
31
32 and Lee-Kim [3] reported that also described lowering effect of RA isomers decreased
33
34 the expression of the MCF-7 antioxidant genes CAT and GPX, whereas no effect was
35
36 observed in the SOD expression levels. In our study, ATRA significantly decreased
37
38 CAT gene expression and activity. On the other hand, the effect of ATRA on GPX was
39
40 not as clear. Perhaps the differences between our results and those of previous authors
41
42 are due to the timing at which the enzymatic biomarkers were analysed. In our protocol,
43
44 we evaluated oxidative metabolism after 24 hours of exposure; however, Hong and Lee-
45
46 Kim [3] performed their evaluation after 4 days of RA isomer exposure. The different
47
48 exposure times may also explain the differences ATRA on SOD1 and SOD2 gene
49
50 expression and enzymatic activity. Despite these differences, we believe our results
51
52 confirm the effects of ATRA action on oxidative balance, which probably most likely
53
54 contributess to apoptosis induction.
55
56
57
58
59
60

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

The effect of ATRA on SOD2 is relevant because the enzyme is very important to controlling the level of superoxide in the mitochondria. Previous studies suggested that SOD2 is an antitumoral gene [36] therefore, the increase in SOD2 gene expression and enzymatic activity could explain the antitumoral effects of ATRA. A previous study has described SOD2 induction by ATRA in human neuroblastoma [37].

A. aculeatum extract did not have the same effects on SOD2 gene expression and enzymatic activity. The differences between exposure to ATRA and *A. aculeatum* may be due to the interaction of other chemical molecules in the *A. aculeatum* extract, which may minimise the retinoid's effect on SOD2. However, considering that both ATRA and *A. aculeatum* increased oxidative stress, increased caspase activity and decreased MCF-7 cell viability, effects of exposure to the compounds are very similar despite their different effects on oxidative metabolism.

In conclusion, in spite of the methodological limitations related to *in vitro* studies, we determined that *A. aculeatum*, a lesser-known fruit that is rich in retinoid molecules, has antitumoral effects against breast cancer cells. *A. aculeatum* trigger an increase in caspase proteins and oxidative stress similar to ATRA, though the compounds have different effects on apoptotic and oxidative metabolism genes.

Acknowledgments

This work was performed with financial support (grants and fellowships) from the following Brazilian research agencies: FAPERGS, FAPEAM and CNPq. The authors thank Luiz Filipe Machado Garcia and Michele Rorato Sagrillo for help in the initial experiments performed with MCF-7 cells and the Biogenomic Lab research team for technical support.

References

- [1] Czeczuga-Semeniuk, E., Lemancewicz, D., Wolczynsky, S., Estradiol and tamoxifen differently affects the inhibitory effects of vitamin A and their metabolites on the proliferation and expression of alpha2beta1 integrins in MCF-7 breast cancer cells. *Adv. in Med. Scienc.* 2009, 54, 91-98.
- [2] Bushue, N., Wan, Y.J.Y., Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010, 62, 1285-1298.
- [3] Hong, T.K., Lee-Kim, Y.C., Effects of retinoic acid isomers on apoptosis and enzymatic antioxidant system in human breast cancer cells. *Nutr. Res. Pract.* 2009, 3, 77-83.
- [4] Rodriguez-Amaya, D.B., Latin American food sources of carotenoids. *Arch. Latinoam. Nutr.* 1999, 49, 74S-84S.
- [5] Olson, J.A., Absorption, transport, and metabolism of carotenoids in humans. *Pure Appl. Chem.* 1994, 66, 1011-1016.
- [6] De Rosso, V.V., Mercadante, A.Z., Identification and Quantification of Carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 5062-5072.
- [7] Shanley, P., Cymerys, M., Serra, M. et al. *Fruit Trees and Useful Plants in Amazonian Life*, FAO-CIFOR-PPI, Rome 2011.
- [8] Kahn, F., The genus *Astrocaryum* (Arecaceae). *Rev. Peru Biol.* 2008, 15, 031-048.
- [9] Ramos, S.L., de Macêdo, J.L., Lopes, M.T. et al., Microsatellite loci for tucumã of Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) and amplification in other Arecaceae. *Am. J. Bot.* 2012, 99, 508-510.
- [10] Yuyama, L.K.O., Maeda, R.N., Pantoja, L. et al., Processing and shelf-life evaluation of dehydrated and pulverized tucuman (*Astrocaryum aculeatum* Meyer). *Ciênc. Tecnol. Alim.* 2008, 28, 408-412.

- 1
2
3
4 [11] Jobim, M.L., Santos, R.C., Dos Santos Alves, C.F. et al., Antimicrobial activity of
5 Amazon *Astrocaryum aculeatum* extracts and its association to oxidative metabolism.
6 *Microbiol. Res.* 2013, doi:pii: S0944-5013(13)00092-X. 10.1016/j.micres.2013.06.006.
7
- 8 [12] Souza Filho, O.C., Sagrillo, M.R., Garcia, L.F.M. et al., The in vitro genotoxic
9 effect of tucuma (*Astrocaryum aculeatum*), an Amazonian fruit rich in carotenoids. *J.*
10 *Med. Food* 2013, 16, 1013-1021.
11
- 12 [13] Bony, E., Boudard, F., Dussossoy, E. et al., Chemical composition and anti-
13 inflammatory properties of the unsaponifiable fraction from awara *Astrocaryum vulgare*
14 M.) pulp oil in activated J774 macrophages and in a mice model of endotoxic shock.
15 *Plant Foods Hum. Nutr.* 2012, 67, 384-392.
16
- 17 [14] Bony, E., Boudard, F., Brat, P. et al. A. Awara (*Astrocaryum vulgare* M.) pulp oil:
18 chemical characterization, and anti-inflammatory properties in a mice model of
19 endotoxic shock and a rat model of pulmonary inflammation. *Fitoterapia* 2012, 83, 33-
20 43.
21
- 22 [15] Chandra, S., Mejia, E.G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and
23 quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to
24 mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *J. Agric. Food Chem.*
25 2004, 52, 3583-3589.
26
- 27 [16] Morrison, M., Asiedu, E. A., Stuchbury, T., Powell, A. A. Determination of lignin
28 and tannin contents of cowpea seeds coats. *Ann. Bot.* 1995, 76, 287-290.
29
- 30 [17] Sreevidja, N., Mehrotra, S. Spectrophotometric method for estimation of alkaloids
31 precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*
32 2003, 86, 1124-1127.
33
- 34 [18] Laghari, A. H., Ali Memon, A., Memon, S. et al. Determination of free phenolic
35 acids and antioxidant capacity of methanolic extracts obtained from leaves and flowers
36 of camel thorn (*Alhagi maurorum*). *Nat. Prod. Res.* 2012, 26, 173-176.
37
- 38 [19] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application
39 to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Met.* 1983, 65, 55-63.
40
- 41 [20] Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D.M. et al. Differential activation of the
42 inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature.* 2004, 430, 213-218.
43
- 44 [21] Oh, Y.I., Kim, J.H., Kang, C.W. Oxidative stress in MCF-7 cells is involved in the
45 effects of retinoic acid-induced activation of protein kinase C-delta on insulin-like
46 growth factor-I secretion and synthesis. *Growth Horm. IGF Res.* 2010, 20, 101-109.
47
- 48 [22] LeBel, C.P., Ali, S.F., Bondy, S.C. Deferoxamine inhibits methyl mercury-
49 induced increases in reactive oxygen species formation in rat brain. *Toxicol. Appl.*
50 *Pharmacol.* 1992, 112, 161-165.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4 [23] Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by
5 thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979, *95*, 351-358.
6
7
8 [24] Dos Santos Montagner, G.F.F., Sagrillo, M., Machado, M.M. et al. Toxicological
9 effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide
10 dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicol. In Vitro.* 2010, *24*, 1410-1416.
11
12 [25] Spitz, D.R., Oberley, L.W. An assay for superoxide dismutase activity in
13 mammalian tissue homogenates. *Anal. Biochem.* 1989, *179*, 8-18.
14
15 [26] Aebi, H. Catalase in vitro. *Met. Enzymol.* 1984, *105*, 121-126.
16
17 [27] Ellman, G.L. Tissue sulphhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959, *589*, 70-77.
18
19 [28] Jemal, A., Siegel, R., Ward, E. et al. Cancer Statistics, 2007. *Cancer J. Clin.* 2007,
20 *57*, 43-66.
21
22 [29] Koay, D.C., Zerillo, C., Narayan, M. et al. Anti-tumor effects of retinoids
23 combined with trastuzumab or tamoxifen in breast cancer cells: induction of apoptosis
24 by retinoid/trastuzumab combinations. *Breast Cancer Res.* 2010, *12*, 1-19.
25
26
27
28 [30] Godoy, H.T., Rodriguez-Amaya, D.B. Occurrence of Cis Isomers of Provitamins A
29 in Brazilian Vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 1998, *46*, 3081-3086.
30
31
32
33 [31] Mangiarotti, R., Danova, M., Aberici, R. et al. All-trans retinoic acid (ATRA)-
34 induced apoptosis is preceded by G1 arrest in human MCF-7 breast cancer cells. *Br. J.*
35 *Cancer.* 1998, *77*, 186-191.
36
37 [32] Patel, J.B., Mehta, J., Belosay, A. et al. Novel retinoic acid metabolism blocking
38 agents have potent inhibitory activities on human breast cancer cells and tumour
39 growth. *Br. J. Cancer.* 2007, *96*, 1204-1215.
40
41 [33] Yang, F., Miao, L., Mei, Y. et al. Retinoic acid-induced HOXA5 expression is co-
42 regulated by HuR and miR-130a. *Cell Signal.* 2013, *25*, 1476-1485.
43
44 [34] Basanez, G., Soane, L., Hardwick, J.M., A new view of the lethal apoptotic pore.
45 *PLoS Biology.* 2012, *10*, 1-4.
46
47 [35] Walensky, L.D., Gavathiotis, E. BAX unleashed: the biochemical transformation
48 of an inactive cytosolic monomer into a toxic mitochondrial pore. *Trends Biochem. Sci.*
49 2011, *36*, 642-652.
50
51 [36] Dhar, S.K., St Clair, D.K. Manganese superoxide dismutase regulation and cancer.
52 *Free Radic. Biol. Med.* 2012, *52*, 2209-2222.
53
54
55
56
57
58
59
60

[37] Kiningham, K.K., Cardozo, Z.A., Cook, C. et al. All-trans-retinoic acid induces manganese superoxide dismutase in human neuroblastoma through NF-kappaB. *Free Radic. Biol. Med.* 2008, 44, 1610-1616.

Figure Legends

Figure 1 – *Astrocaryum aculeatum*, an Amazonian palm fruit popularly named “tucumã”. (A) a mature tree, at least seven years old, produces approximately 50 kg of fruit per year; (B) the fruit is a drupe, with ovoid to globular shape when mature presents a green-yellow color; (C) the mesocarp, the edible part, presents a yellowish-orange color and it is rich in starch, oil rich in omega 3, 6 and 9 acids and beta-carotene.

Figure 2 – Cytotoxic effect of *Astrocaryum aculeatum* pulp ethanolic extract against MCF-7, a breast cancer cell line determined by MTT assay. (A) Viability curve of MCF-7 after 24 h of different *A.aculeatum* concentrations exposition; (B) microphotography (X 400 magnification) of MCF-7 died (D) and living cells (L). Living cells are identified by presence of insoluble purple formazan crystals produced by reduction of mitochondrial dehydrogenase in the presence of MTT compound; (C) *A. aculeatum* effect of three main concentrations on viability and proliferation evaluated in three different periods of exposition: 24, 48 and 72 h. Statistical comparison in each period was performed by one-way analysis of variance followed by *post hoc* Tukey test. Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$.

Figure 3 - Caspases levels of MCF-7 breast cancer cells exposed to different concentrations of pulp ethanolic *Astrocaryum aculeatum* extract. (A) Caspase 8; (B) Caspase 3, (C) Caspase 1. Different letters indicated significant differences ($p < 0.05$) by one-way analysis of variance followed by Tukey *post hoc* test.

Figure 4 – Effect of pulp ethanolic *Astrocaryum aculeatum* extract on Bcl-2 antiapoptotic and BAX proapoptotic gene expression by RT-PCR assay. (A) Bands representing A= ATRA treatment; T= *A.aculeatum* treatment at 300 µg/mL concentration; C = untreated control cells. A1,T1,C1 = Beta-actin expression; A2,T2,C2= Bcl-2 expression; A3,T3,C3= BAX expression; (B) Bcl-2 gene expression; (C) BAX gene expression. Bcl-2 and BAX gene expression are presented as relative percent of β-actin gene quantified by DNA@Picogreen assay. * = $p < 0.05$; ***= $p < 0.001$ determined by one-way analysis of variance followed by Dunnet *post hoc* test.

Figure 5 – Effect of pulp ethanolic *Astrocaryum aculeatum* extract on antioxidant enzyme gene expression of MCF-7 breast cancer cells determined by RT-PCR assay. C= untreated control treatment; A= ATRA treatment; T= *A.aculeatum* treatment at 300 µg/mL concentration; (A) SOD1 (cytoplasmic superoxide dismutase Cu/ZN dependent) gene; (B) SOD2 (mitochondrial superoxide dismutase Mn dependent) gene; (C) CAT (catalase) gene; (D) GPX (glutathione peroxidase) gene. Gene expression data are presented as relative percent of β-actin gene quantified by DNA@Picogreen assay. * = $p < 0.05$; ***= $p < 0.001$ determined by one-way analysis of variance followed by Dunnet *post hoc* test.

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

Figure 6 – General model of (A) *A. aculeatum* pulp ethanolic extract and (B) ATRA effect causing imbalance on oxidative metabolism MCF-7 breast cancer cell line. *A. aculeatum* effect on MCF-7 cells is mainly concentrate in changes of cytoplasmic oxidative metabolism, since 24 hours of exposition the extract down-regulated SOD1, CAT and GPX genes. Probably this effect was positively influenced by the ingress into cells of antioxidant molecules present in the extract causing a negative feedback in these genes. In consequence, a decreasing in CAT and SOD1 activity is observed, probably leading to oxidative stress state due increase of H₂O₂ and O⁻² levels. Data support the hypothesis that high levels of H₂O₂ produced by *A. aculeatum* trigger the reaction of this molecule with metal molecules as Fe and Zn (Fenton reaction) producing ROS as hydroxyl (OH). The OH radical has high DNA affinity causing genotoxicity, and possible subsequent cell apoptosis. The excess of O⁻² can react with molecules as nitric oxide (NO) producing reactive nitrogen species as peroxynitrite (ONOO⁻), that causes extensive lipoperoxidation (TBARS) as well as protein carbonylation (PC). These reactions change the membrane permeability and fluidity leading a cytotoxic state. ATRA also presents similar influence on cytoplasmic oxidative stress, and in addition cause imbalance on mitochondria from increase in SOD2 activity without subsequent increase in antioxidant enzymes that catalyze the H₂O₂. This additive effect can be responsible to higher ATRA toxicity in MCF-7 cells.

Table 1 Primers list of genes investigated in MCF-7 treated with *A. aculeatum* extract and ATRA

Genes	Primers	
	Foward	Reverse
β - actin	TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA	TGCGCAAGTTAGGTTTTGICA
SOD1	GCACACTGGTGGTCCATGAA	ACACCACAAGCCAAACGACTT
SOD2	GCCCTGGAACCTCACATCAA	GGTACTTCTCCTCGGTGACGTT
CAT	GATAGCCTTCGACCCAAGCA	ATGGCGGTGAGTGTGAGGAT
GPX1	GGTTTTCATCTATGAGGGTGTTC	GCCTTGGICTGGCAGAGACT
Bcl-2	GAGGATTGTGGCCTTCTTTGAGT	AGTCATCCACAGGGCGATGT
BAX	CCCTTTTCTACTTTGCCAGCAA	CCCGGAGGAAGTCCAATGT

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



Fig 1

254x190mm (96 x 96 DPI)

review

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

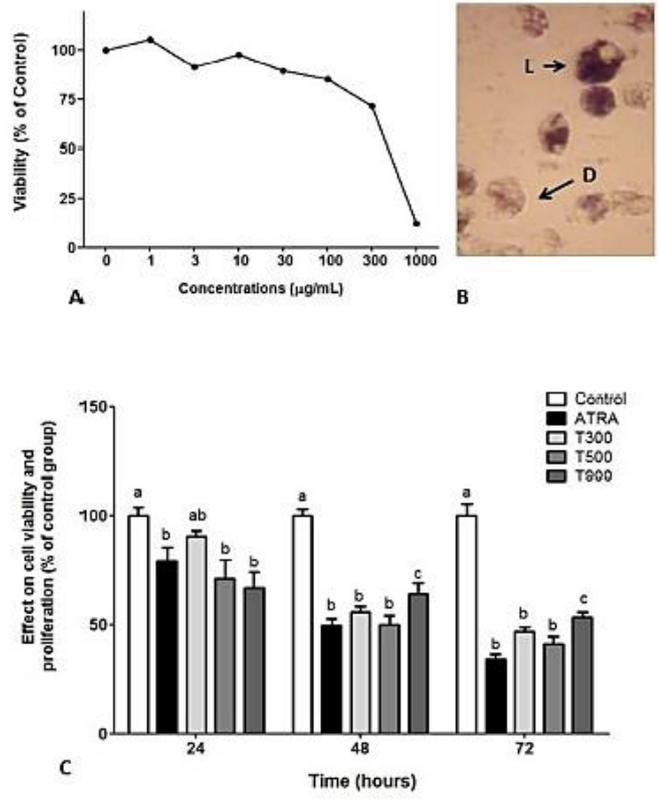
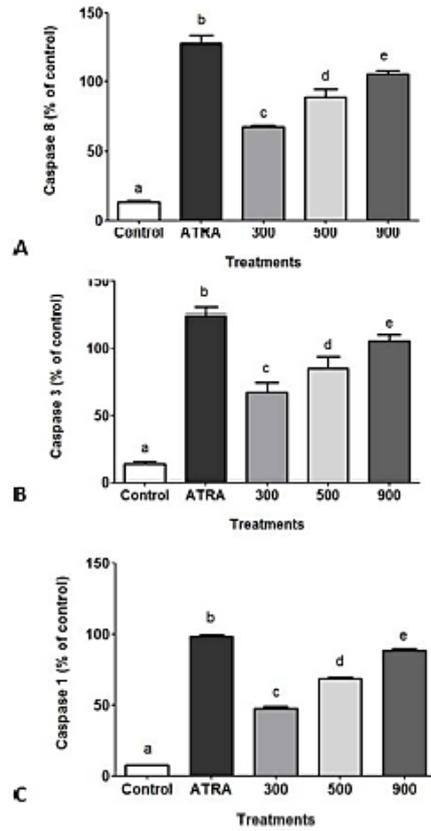


Fig 2

190x254mm (96 x 96 DPI)

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



190x254mm (96 x 96 DPI)

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

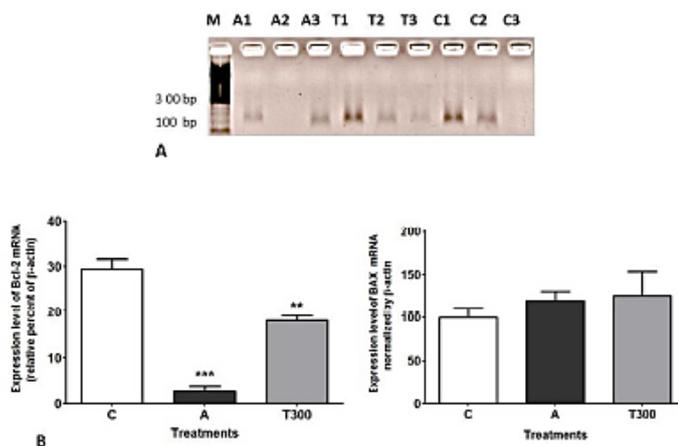
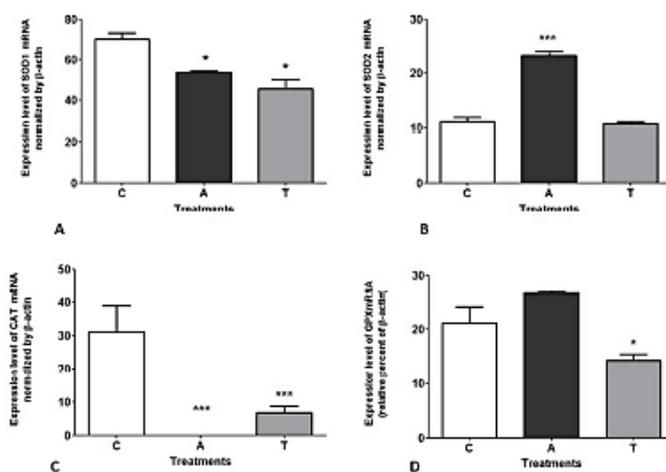


Fig 4

254x190mm (96 x 96 DPI)

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



254x190mm (96 x 96 DPI)

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

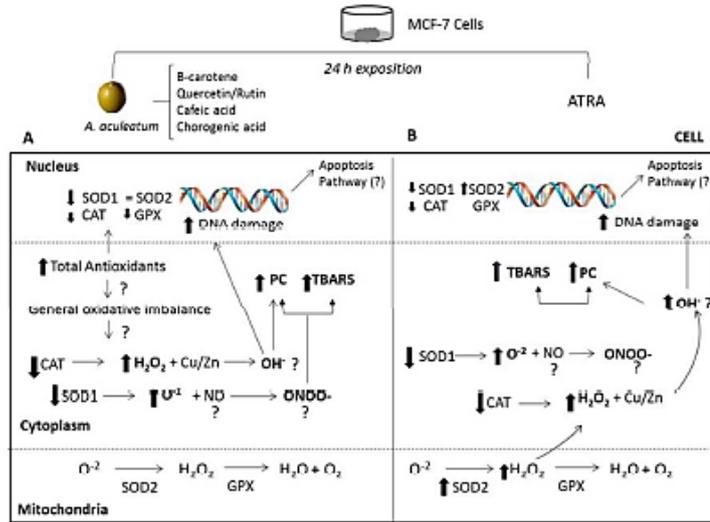


Fig 6

254x190mm (96 x 96 DPI)

DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o efeito biológico do tucumã, um fruto amazônico rico em carotenóides, a partir de modelos experimentais *in vitro*. Os resultados mostraram que concentrações altas dos extratos de polpa e casca apresentavam ação cito-genotóxica em CMSPs obtidas a partir de indivíduos adultos saudáveis. Por outro lado, concentrações do extrato de polpa na faixa de 300 a 900 µg também indicaram ação anticarcinogênica na linhagem comercial de câncer de mama MCF7. Estudos adicionais dos mecanismos causais relacionados com a propriedade anti-carcinogênica mostraram ação farmacogenômica nas vias da apoptose e do metabolismo oxidativo.

Os resultados obtidos estão em consonância com estudos epidemiológicos e experimentais relacionados ao efeito protetor de alguns componentes da dieta contra o câncer de mama. Uma meta-análise recente feita por Aune et al. (2012) incluiu cinquenta estudos prospectivos publicados até abril de 2011 em revistas indexadas no MEDLINE. O estudo mostrou que mulheres que comem habitualmente frutas ou uma combinação de frutas e vegetais possuem menor risco de desenvolver câncer de mama do que as que não apresentam tal dieta. Por outro lado, a ingestão habitual somente de vegetais não apresentou efeito protetor. Portanto, a ingestão de frutos parece ser fundamental para a prevenção do câncer de mama.

O efeito protetor dos frutos no câncer de mama deve-se à presença de moléculas antioxidantes que também possuem potencial ação farmacogenômica, como é o caso do beta-caroteno e dos polifenóis. No caso, o tucumã é conhecido por ser rico em carotenóides (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007). Entretanto, um estudo posterior realizado por Gonçalves (2008) também descreveu a presença no tucumã de outros compostos antioxidantes e anticarcinogênicos como a quercetina. O presente estudo confirmou a presença do beta-caroteno e da quercetina em concentrações significativas tanto na polpa quanto na casca do tucumã. Análises complementares também identificaram, nos extratos aqui estudados, a presença de outras moléculas que usualmente são encontradas em frutos e que também possuem efeito biológico. Este é o caso da rutina e dos ácidos clorogênico, caféico e gálico. Tais moléculas também estavam presentes em concentrações importantes,

principalmente o ácido gálico, no extrato da polpa do tucumã.

O efeito destas moléculas na linhagem MCF-7 de câncer de mama tem sido previamente estudado, com exceção da rutina. Estudos prévios, como o realizado por Hsu et al. (2011), mostraram que a exposição de células MCF-7 ao ácido gálico levou a uma redução na proliferação celular. Os ácidos clorogênico e cafeíco são dois polifenóis encontrados no café que parecem ter efeito farmacogenômico sobre as células MCF-7 via inibição da metilação de genes de supressão tumoral (PARIHAR et al., 2012). Uma das moléculas com ação anticarcinogênica bem estabelecida contra células MCF-7 de câncer de mama é a quercetina, sendo que, estudos prévios têm descrito que esta molécula possui a capacidade de inibir a proliferação celular via indução de apoptose e inibição dos níveis de survivina (DENG et al., 2013). A quercetina também contribui na inibição da resistência das células cancerosas à adriamicina que é um quimioterápico utilizado no tratamento do câncer de mama (LI et al., 2013). Infelizmente, na revisão de literatura feita não foi possível identificar estudos que avaliaram o efeito específico da rutina nas células MCF-7.

Considerando que o tucumã é rico em carotenóides, investigações *in vitro* têm mostrado que células de câncer de mama tratadas com retinóides apresentam efeitos antiproliferativos, principalmente naquelas com receptor de estrogênio positivo como é o caso da linhagem MCF-7 (CZECZUGA-SEMENIUK; LEMANCEWIKS; WOLCZYNSKI, 2009). Deste modo, o conjunto de moléculas bioativas encontradas no tucumã indicou potencial efeito anticarcinogênico contra as células da linhagem MCF-7 de câncer de mama. Porém, muitas destas moléculas em concentrações elevadas também podem ter efeito cito-genotóxico. Por este motivo inicialmente se analisou a ação do tucumã em células humanas saudáveis.

No primeiro experimento, que avaliou o potencial efeito dos extratos do tucumã na desnaturação do DNA, foi observada uma ação genoprotetora principalmente no extrato da casca. Estes resultados são muito semelhantes aos relatados para altas concentrações de compostos antioxidantes, principalmente o beta-caroteno o qual é encontrado no tucumã.

Entretanto, com outros resultados obtidos nos tratamentos em CMSPs, nos quais a fragmentação do DNA foi analisada, o dano ao DNA celular avaliado pelo ensaio do cometa e a análise da instabilidade cromossômica sugeriram alguns efeitos genotóxicos do extrato do tucumã em concentrações maiores que 500 µg/mL.

Visto que não foram encontradas diferenças na produção de EROs entre o grupo controle e o grupo tratado das CMSPs com os extratos do tucumã, pode-se hipotetizar que os compostos antioxidantes presentes nos extratos foram metabolizados pelas células nas primeiras horas. Nestes termos, visto que o tucumã apresentou outras moléculas (taninos e alcalóides) sobre as quais se desconhece sua especificidade, não é possível descartar a probabilidade de que alguma delas poderia apresentar efeitos tóxicos nas CMSPs. Além disso, várias investigações têm mostrado efeitos antioxidantes, pro-oxidantes ou ambos.

Por que estes resultados ambíguos existem com relação aos carotenóides? Autores como Krinsky e Johnson (2005) consideraram que a razão para esta discrepância pode ser atribuída ao uso de diferentes metodologias na dissolução do carotenóide a ser avaliado, na iniciação do estresse oxidante, na presença de outros antioxidantes, no tipo do animal utilizado para os estudos *in vivo* e na técnica de avaliação utilizada para determinar a eficácia de vários carotenóides. Os resultados do presente estudo corroboram esta sugestão, pois, diferentes efeitos foram encontrados considerando o tratamento agudo ou crônico das CMSPs com os extratos de tucumã.

Outros importantes resultados estão relacionados às diferenças na resposta genotóxica dependente das concentrações do tucumã. Nos resultados aqui apresentados foi observado que as baixas concentrações do extrato de tucumã (5 a 100 µg/mL) apresentaram mais efeitos positivos que as altas concentrações. A ocorrência da curva em U relacionada à dose-resposta (habitualmente chamada hormese) de vários produtos herbais tem sido documentada em numerosas investigações biológicas, toxicológicas e farmacológicas. Muitos dos resultados estudados são de considerável significância para a saúde pública (CALABRESE; BALDWIN, 2001).

O potencial efeito diferencial dose dependente do extrato do tucumã é reforçado pelos resultados relacionados à atividade da caspase 1, a qual se eleva nas culturas de CMSPs tratadas com altas concentrações do extrato do tucumã (>500 µg/mL).

Entre as vias de morte celular encontra-se a necrose e a apoptose, que são processos que apresentam alterações morfológicas distintas. Na necrose, habitualmente, ocorre “inchaço” da célula e das organelas com ruptura da membrana plasmática e perda do conteúdo intracelular respondendo a um estímulo

patológico. Já, no caso da apoptose acontece o “enrugamento” da célula com fragmentação do DNA, condensação da cromatina, com lise celular e liberação de conteúdo citosólico para o espaço extra celular devido a um estímulo fisiológico programado. A piroptose é um tipo específico de apoptose que ocorre de maneira mais rápida, relacionada a um evento inflamatório. A ativação da caspase 1 resulta na apoptose via caspase 7 que também é uma molécula chave no processo da piroptose (MIAO; RAJAN; ADEREM, 2011). A alta atividade da caspase 1 nas CMSPs tratadas com altas concentrações do extrato do tucumã mostrou que estes extratos estão habilitados a desencadear a morte celular programada, especificamente piroptose e apoptose. Estes resultados sugeriram que os extratos do tucumã podem ter algum efeito na biologia do câncer devido a propriedades que induzem a ativação da caspase 1.

Os resultados aqui descritos também suportam o fato de que os efeitos benéficos do tucumã são dependentes da concentração e do tempo de tratamento, assim como, estas variáveis estão relacionadas a um aumento dos efeitos genotóxicos observados nas CMSPs. Os efeitos genotóxicos concentração-dependente foram previamente descritos para outras plantas usadas por humanos. Por exemplo, Wnuk et al. (2009) descreveram que os extratos de erva mate (*Ilex paraguariensis*) aumentam o nível de apoptose e necrose dos linfócitos de uma maneira dose-dependente.

O delineamento experimental do segundo estudo foi feito considerando os resultados previamente obtidos em termos do tipo de extrato e da faixa de concentração a ser utilizada nas análises do efeito anticarcinogênico do tucumã nas células MCF-7.

Assim, optou-se por utilizar o extrato da polpa do tucumã, que apresentou menor cito-genotoxicidade nas células saudáveis em concentrações contidas entre 1 a 1000 µg/mL. Esta análise inicial indicou que as concentrações entre 300 a 1000 µg/mL teriam maior potencial anticarcinogênico. Como, a partir de 1000 µg/mL o extrato apresentou uma alta citotoxicidade nas células saudáveis (CMSPs), três concentrações do extrato foram escolhidas para a realização das análises adicionais: 300 µg/mL, que possui baixo efeito cito-genotóxico, 500 e 900 µg/mL que possuem efeitos cito-genotóxicos intermediários.

Os resultados obtidos a partir da exposição das células MCF-7 a estas três concentrações mostraram, em geral, efeitos anticarcinogênicos e farmacogenômicos

similares ao ATRA. Este fato indicou que, possivelmente, os beta-carotenos presentes em grande concentração no extrato da polpa atuam na viabilidade e proliferação celular das células de câncer de mama.

Análise adicional dos mecanismos causais mostrou que o extrato da polpa do tucumã induz a rota apoptótica e a um desbalanço no metabolismo oxidativo. Tal efeito pode estar associado tanto à presença do ATRA (HONG; LEE KIM, 2009) no extrato quanto à presença das outras moléculas bioativas, em especial da quercetina (DENG et al., 2013) e ácido gálico (PARIHAR et al., 2012).

É relevante comentar que o extrato apresentou ação similar ao ATRA quando o seu efeito farmacogenômico foi investigado. No caso, mesmo que sua ação não tenha sido tão intensa quanto à observada nas células tratadas com ATRA, o tucumã diminuiu significativamente os níveis da expressão do gene antiapoptótico Bcl-2. Igualmente, aumentou o estresse oxidativo através do aumento da lipoperoxidação e carbonilação de proteínas. Este efeito também envolveu diminuição na expressão gênica da SOD1, SOD2, CAT e GPX (Figura 6, Artigo 2). A única diferença mais acentuada em relação ao ATRA foi que este agiu tanto em nível citosólico quanto em nível mitocondrial no que tange à regulação gênica das enzimas antioxidantes, enquanto o extrato da polpa do tucumã agiu somente em nível citosólico. Tais diferenças, possivelmente, envolvam a ação conjunta das outras moléculas bioativas presentes no extrato.

A partir da revisão da literatura publicada, até o presente momento sobre os efeitos biológicos do tucumã, é possível afirmar que este é o primeiro estudo que relata atividade anticarcinogênica deste fruto, considerando também o seu potencial efeito farmacogenômico. Estes resultados abrem a perspectiva de estudos adicionais de interesse científico, epidemiológico e clínico.

Finalmente, é importante tecer considerações sobre algumas limitações metodológicas relacionadas ao estudo apresentado aqui. A principal diz respeito ao uso somente de protocolos *in vitro* na determinação do potencial efeito genotóxico e anticarcinogênico do tucumã. Portanto, estes resultados não podem ser diretamente transferidos para modelos *in vivo*. A utilização futura de modelos experimentais poderá auxiliar na determinação do quanto o efeito biológico do tucumã é mantido, uma vez que, existem outras variáveis intervenientes relacionadas aos compostos bioativos e à biodisponibilidade assim como a absorção e o metabolismo biológico.

Outra limitação diz respeito à necessidade de estudos complementares que determinem qual(ais) molécula(s) presente(s) na matriz nutricional do tucumã agem, tanto na cito-genotoxicidade quanto na ação anticarcinogênica contra o câncer de mama.

CONCLUSÕES

A presente investigação que avaliou o efeito *in vitro* de extratos de polpa e casca de *A.aculeatum* conhecido popularmente no Brasil como “tucumã” identificou as seguintes moléculas bioativas netes extratos: beta-caroteno, quercetina, rutina, ácidos gálico, clorogênico e cafeíco. As concentrações de beta-caroteno foram as mais elevadas, principalmente na casca. Na polpa, além da grande concentração de beta-caroteno foi observada concentração elevada de ácido gálico.

A análise do efeito cito-genotóxico dos extratos de tucumã (polpa e casca) em CMSPs mostrou ação cito-genotóxica baixa em concentrações <300 µg/mL, intermediárias entre 300 a 500 µg/mL e elevadas >500 µg/mL. Os níveis da caspase 1 se elevaram nas CMSPs tratadas com os extratos de um modo dose-dependente.

O extrato da polpa do tucumã nas concentrações de 300, 500 e 900 µg/mL diminuiu a viabilidade e proliferação celular das células de câncer de mama MCF-7.

O efeito anticarcinogênico do extrato envolveu indução da via apoptótica através da inibição de gene antiapoptótico Bcl-2 e do aumento nos níveis das caspases 1, 3 e 8.

O extrato de tucumã também causou um desbalanço oxidativo através do aumento dos níveis de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas. Este efeito envolveu modulação farmacogenomica da expressão dos genes das enzimas antioxidantes.

Em geral os efeitos do extrato da polpa do tucumã observados nas células MCF-7 foram similares aos observados em células tratadas com o quimioterápico ATRA.

O conjunto dos resultados descreveu pela primeira vez a ação anticarcinogênica do tucumã em células de câncer.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J.P.L. Tabela de composição de alimentos da Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 26, n. 1,2, p. 121-126, 1996.
- AGUIAR, J.P.L. et al. Aspectos nutritivos de alguns frutos da Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 10, n. 4, p. 755-758, 1980.
- AL-GHOUL, M.; VALDES, R. Fundamentals of Pharmacology and Applications in Pharmacogenetics. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 28, p. 485-497, 2008.
- ALTUCCI, L.; GRONEMEYER, H. The promise of retinoids to fight against cancer. **Nature Reviews/Cancer**, v. 1, p. 181-191, 2001.
- AUNE, D. et al. Dietary compared with blood concentrations of carotenoids and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, n. 2, p. 356-373, 2012.
- BORA, P.S. et al. Caracterización de las fracciones proteicas y lipídicas de pulpa y semillas de tucuma (*Astrocarium vulgare* Mart.). **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 3, n. 2, p. 111-116, 2001.
- BRASIL – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama+>. Acesso em: 18 mar. 2011.
- BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE – MS. DATASUS . Disponível em: <<http://w3.datasus.gov.br/siscam/index.php?area=03>>. Acesso em: 12 ago. 2011.
- BRTKO, J. Role of retinoids and their cognate nuclear receptors in breast cancer chemoprevention. **Central European Journal of Public Health**, v. 15, n. 1, p. 3-6, 2007.
- BUSHUE, N.; WAN, Y.J.Y. Retinoid pathway and cancer therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 1285-1298, 2010.
- CALABRESE, E.J.; BALDWIN, L. A. U-shaped dose-responses in biology, toxicology, and public health. **Annual Review of Public Health**, v. 12, p. 15-33, 2001.
- CAMPOS, F.M.; ROSADO, G.P. Novos fatores de conversão de carotenóides provitamínicos A. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 571-578, 2005.
- CAVALCANTE, P. B. **Frutas Comestíveis da Amazônia**. 5. ed. Belém: Edições CEJUP, 1991. 279 p.
- CHUNG, L. et al., Tissue biomarkers of breast cancer and their association with conventional pathologic features. **British Journal of Cancer**, v. 108, p. 351-360, 2013.
- CLARK, A.R.; LEVINE, R.; SNEDEKER, S. The Biology of Breast Cancer. **Cornell University Program on Breast Cancer and Environmental Risk Factors**

(**BCERF**), n. 5. p. 1-6, 1997.

CLARKE, N.; GERMAIN, P.; ALTUCCI, L.; GRONEMEYER, H. Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 6, n. 25, p. 1-23, 2004.

CZECZUGA-SEMENIUK, E.; LEMANCEWICZ, D.; WOLCZINSKY, S. Estradiol and tamoxifen differently affects the inhibitory effects of vitamin A and their metabolites on the proliferation and expression of alpha2beta1 integrins in MCF-7 breast cancer cells. **Advances in Medical Sciences**, v. 54, n. 1, p. 91-98, 2009.

DE ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. Identification and Quantification of Carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5062-5072, 2007.

DENG, X.H. et al. Effects of quercetin on the proliferation of breast cancer cells and expression of surviving in vitro. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 6, n. 5, p. 1155-1158, 2013.

EDEN, J.A. Breast cancer, stem cells and sex hormones. Part 1. The impact of fetal life and infancy. **Maturitas**, n. 67, p. 117-120, 2010.

FAUSER, B.C.J.M.; DIEDRICH, K.; DEVROEY, P. Predictors of ovarian response: progress towards individualized treatment in ovulation induction and ovarian stimulation. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2008.

FATTAHI, S. et al. Antioxidant and Apoptotic Effects of an Aqueous Extract of *Urtica dioica* on the MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 9, p. 5317-5323, 2013.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA – FEBRASGO. Disponível em: <<http://www.febrasgo.org.br>>. Acesso em: 18 abr. 2013.

FLODROVA, D. et al. Effects of retinoic acid isomers on proteomic pattern in human breast cancer MCF-7 cell line. **Endocrine Regulations**, v. 47, n. 4, p. 205-209, 2013.

FRICK, A. et al. In vitro and in vivo mouse models for pharmacogenetic studies. **Methods in Molecular Biology**, n. 1015, p. 263-278, 2013.

FRISCH, S.M.; SCREATON, R.A. Anoikis mechanisms. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, p. 555-562, 2001.

GARCIA, L.F.M. **Caracterização, avaliação antioxidante e citotóxica dos extratos da polpa e da casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*)**. 2012, 93f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

GINESTIER, C. et al. Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation. **Cell Cycle**, v. 8, n. 20, p. 3297-3302, 2009.

GODOY, H.T.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Occurrence of *Cis* Isomers of Provitamins

A in Brazilian Vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 3081-3086, 1998.

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

GONZALES, C.A.; RIBOLI E. Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. **European Journal of Cancer**, v. 46, p. 2555-2562, 2010.

HAILE, C.N.; KOSTEN, T.R.; KOSTEN, T.A. Pharmacogenetic treatments for drug addiction: cocaine, amphetamine and methamphetamine. **American Journal of Drug and Alcohol Abuse**, v. 35, n. 3, p. 161-177, 2009.

HENDERSON, A.J. **The Palms of the amazon**. New York: Oxford University Press, 1995. 362 p.

HONG, T.K.; LEE KIM, Y.C. Effects of retinoic acid isomers on apoptosis and enzymatic antioxidant system in human breast cancer cells. **Nutrition Research and Practice**, v. 3, n. 2, p. 77-83, 2009.

HSU, J.D. Gallic acid induces G2/M phase arrest of breast cancer cell MCF-7 through stabilization of p27(Kip1) attributed to disruption of p27(Kip1)/Skp2 complex. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 1996-2003, 2011.

JAIN, P.; ALAHARI, S.K. Breast cancer stem cells: a new challenge for breast cancer treatment. **Frontiers in Bioscience**, v. 16, p. 1824-1832, 2011.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; MURRAY, T.; XU, J.; THUN, M.J. Cancer Statistics, 2007. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 57, p. 43-66, 2007.

KELBER, O.; STEINHOFF, B.; KRAFT, K. Assessment of genotoxicity of herbal medicinal products: A co-ordinated approach. **Phytomedicine**, v. 19, p. 472-476, 2012.

KOAY, D C. et al. Anti-tumor effects of retinoids combined with trastuzumab or tamoxifen in breast cancer cells: induction of apoptosis by retinoid/trastuzumab combinations. **Breast Cancer Research**. v. 12, n. 4, p. 1-19, 2010.

KREWER, C.C. et al. Habitual intake of guaraná and metabolic morbidities: an epidemiological study of an elderly Amazonian population. **Phytotherapy Research**. Wiley Online Library, 2011. Disponível em: < <http://www.wileyonlinelibrary>>. Acesso em: 28 mai. 2011.

KRINSKY, N.I.; JOHNSON, E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 6, p. 459-516, 2005.

LAZARUS, P. et al. Potential role of UGT pharmacogenetics in cancer treatment and prevention: focus on tamoxifen. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1155, p. 99-111, 2009.

- LI, S. et al. **The effect of quercetin on doxorubicin cytotoxicity in human breast cancer cells.** *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, v. 13, n. 2, p. 352-355, 2013.
- MARCHETTI, M. et al. All trans-retinoic acid modulates the procoagulant activity of human breast cancer cells. **Thrombosis Research**, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii>>. Acesso em: 28 maio 2011.
- MARINHO, H.A.; CASTRO, J.S. Carotenóides e valor de pró-vitamina A em frutos da região amazônica: pajurá, piquiá, tucumã e umari. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Anais...** Belém: Meio magnético, 2002.
- MENDONÇA, M.S.; ARAÚJO, M.G.P. A semente de bacaba (*Oceanocarpus bacaba* Mart. ARECACEAE); aspectos morfológicos. **Revista Brasileira de Sementes**, v.21, p. 122-124, 1999.
- METZGER, I.F.; SOUZA-COSTA, D.C.; TANUS-SANTOS, J.E. Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 39, n. 4, p. 515-521, 2006.
- MIAO, E.A.; RAJAN, J.V.; ADEREM, A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. **Immunological Reviews**, v. 243, n. 1, p. 206-214, 2011.
- MIRANDA, I.P.A. et al. **Frutos de Palmeiras da Amazônia.** Manaus: MCT/INPA, 2001. 120 p.
- MLAKAR, V.; MARC, J. Highlights from the latest pharmacogenomic genome-wide association studies. **Pharmacogenomics**, v. 14, n. 4, p. 357-360, 2013.
- MOREIRA, R.V.R. **Avaliação dos componentes nutricionais de frutos de algumas palmeiras...** 2000. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2000.
- NETTER, F.H. **Atlas de Anatomia Humana.** Tradução: Jacques Vissok. Porto Alegre: Artes Médicas, [1998].
- NIKHIL, K. et al. Role of isothiocyanate conjugate of pterostilbene on the inhibition of MCF-7 cell proliferation and tumor growth in Ehrlich ascitic cell induced tumor bearing mice. **Experimental Cell Research**, doi: 10.1016/j.yexcr.2013.10.015. [Epub ahead of print].
- PARIHAR, S. et al. Gallic acid based steroidal phenstatin analogues for selective targeting of breast cancer cells through inhibiting tubulin polymerization. **Steroids**, v.77, n. 8-9, p. 878-886, 2012.
- PÉREZ-LÓPEZ, F.R. et al. Effects of the Mediterranean diet on longevity and age-related morbid conditions. **Maturitas**, v. 64, n. 2, p. 67-79, 2009.
- PETERS, B.J.M. et al. Pharmacogenomic insights into treatment and management of statin-induced myopathy. **Genome Medicine**, v. 1, n. 12, p. 1-10, 2009.

PICANÇO, N.S. **Aproveitamento industrial da polpa de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* G.F.W. Meyer)**. 1997. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 1997.

RIBEIRO, E.E.; CRUZ, I.B.M. **Dieta Amazônica: saúde e longevidade**. Manaus: Editora Cultural do Amazonas, 2012. 152 p.

SHEFFIELD, L.J.; PHILLIMORE, H.E. Clinical use of pharmacogenomic tests in 2009. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 30, p. 55-65, 2009.

STOCCO, G. et al. Pharmacogenomic approaches for tailored anti-leukemic therapy in children. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 17, p. 2237-2253, 2013.

SUN, S.Y.; LOTAN, R. Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 41, p. 41-55, 2002.

TANG, X.H.; GUDAS, L.J. Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. **Annual Review of Pathology**, v. 6, p. 345-364, 2011.

UHL, N.W.; DRANSFIELD, J. **Genera Palmarum**. A Classification of Palms based on the work of Harold E. Moore, Jr. Lawrence: Allen Press, 1987. 610 p.

WNUK, M. et al. Evaluation of the cyto- and genotoxic activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in human lymphocytes in vitro. **Mutation Research**, v. 679, n. 1-2, p. 18-23, 2009.

XIONG, I. et al. Apoptosis induced by β,β -dimethylacrylshikonin is associated with Bcl-2 and NF- κ B in human breast carcinoma MCF-7 cells. **Oncology letters**, v. 6, n. 6, p. 1789-1793, 2013.

XUAN, J. et al. Effects of the dopamine D3 receptor (DRD3) gene polymorphisms on risperidone response: a pharmacogenetic study. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 305-311, 2008.

YU, B.; HANDELSMAN, D. J. Pharmacogenetic polymorphisms of the AR and metabolism and susceptibility to hormone-induced azoospermia. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 9, p. 4406-4411, 2001.

YUYAMA, L.K.O. et al. Polpa e Casca de Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) quais os constituintes nutricionais? In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO, 8.; 2005, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2005, v. 30, Suplemento, p. 332.

_____. Processamento e Avaliação da vida-de-prateleira do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) desidratado e pulverizado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 408-412, 2008.

ZENG, W.G. et al. [All-trans retinoic acid effectively inhibits breast cancer stem cells growth in vitro] *Article in chinese*. **Chinese Journal of Oncology**, v. 35, n. 2, p. 89-93, 2013.

ANEXOS

ANEXO A

Autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético



3905612739716199

AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010547/2013-4

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq nº 161/2010, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA - UFSM

CNPJ: 955.917.640/0001-05

Representante Legal: IVANA BEATRICE MANICA DA CRUZ

Cargo/Função: Docente - Departamento de Morfologia -Centro de Ciências da Saúde - UFSM

CPF: 331.322.400-87 **RG:** 8017462709

Projeto: ESTUDOS IN VITRO E IN VIVO DOS EFEITOS BIOATIVOS PRESENTES EM FRUTOS AMAZÔNICOS

Coordenador do Projeto: Ivana Beatrice Mânica Da Cruz

CPF: 331.322.400-87 **RG:** 8017462709 - ssp / RS

Finalidade do projeto: Este projeto irá realizar estudos in vitro e in vivo para avaliar a atividade biológica (antioxidante, antimicrobiana, anticolinesterásica, hipolipimante, hipotensiva, antiobesogênica, hipoglicêmica, anticarcinogênica, no metabolismo e comportamentos circadianos) de frutos nativos da região amazônica.

Amostras a serem acessadas:

Espécie(s): frutos das seguintes famílias botânicas serão investigados: *Arecaceae*, *Sapindaceae*, *Lecythidaceae*, *Myrtaceae*, *Clusiaceae*, *Solanaceae*, *Malvaceae* e *Fabaceae*.

Tipo de material/quantidade de amostras: Serão coletados frutos, em um total máximo de 50 kg

Local de depósito de subamostra: NÃO INFORMADO

Equipe do projeto: IVANA BEATRICE MANICA DA CRUZ / CPF 331.322.400-87

EULER ESTEVES RIBEIRO / CPF 000.678.812-20

MARIA FERNANDA MANICA RIZZI CATTANI / CPF 983.518.260-49

MARIA IZABEL DE UGALDE MARQUES DA ROCHA / CPF 243.430.990-91

CRISTINA DA COSTA KREWER / CPF 805.802.890-87

MARTA MARIA MEDEIROS FRESCURA DUARTE / CPF 428.275.150-91

MICHEL MANSUR MACHADO / CPF 936.104.590-34

MICHELE RORATO SAGRILLO / CPF 926.721.830-15

OLMIRO CEZIMBRA DE SOUZA FILHO / CPF 322.916.710-49

ALENCAR KOLINSKI MACHADO / CPF 007.046.370-06

ARAE RIGAO DE OLIVEIRA / CPF 023.215.180-65

CINTIA CORTE REAL RODRIGUES / CPF 014.581.210-38

CLARICE PINHEIRO MOSTARDEIRO / CPF 457.318.370-15

ELIZA RIBAS DA SILVEIRA FLORES / CPF 023.464.970-45

FERNANDA BARBISAN / CPF 022.159.910-03

FRANCINE CARLA CADONA / CPF 005.561.340-36

GREICE FRANCIELE FEYH DOS SANTOS MONTAGNER / CPF 005.505.050-67

IVO EMILIO DA CRUZ JUNG / CPF 989.567.010-91

LUIZ FILIPE MACHADO GARCIA / CPF 003.418.820-70

RAUL MOREIRA OLIVEIRA / CPF 022.226.840-99

Validade da Autorização: 06/08/2013 a 06/08/2017

A instituição acima qualificada deverá enviar ao CNPq, por meio da Plataforma Carlos Chagas, relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto nº. 4.946/2003.

Esta autorização está vinculada às informações, declarações e termos de compromisso firmados pelo coordenador do projeto e pelo representante legal, constantes do Processo nº 010547/2013-4. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, a instituição beneficiada se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGEN/MMA.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRM). Para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, por meio de formulário específico e mediante a apresentação de TTM ou TRTM, licença de exportação complementar a autorização de remessa, mormente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Brasília, 18 de Julho de 2013

Paulo Sergio Lacerda Beirao

Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde

Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 3905612739716199 para recuperá-la do banco de dados do CNPq, ou poderá selecionar o arquivo salvo em seu computador (em formato PKCS7). V.Sa. pode também usar outro aplicativo disponível no mercado capaz de reconhecer arquivos no padrão PKCS7 para fazer a visualização e extração do documento.

ANEXO B

Aprovação do Comitê de Ética

 <p>MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Comitê de Ética em Pesquisa - CEP- UFSM REGISTRO CONEP: 243</p> 
---	--

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS) analisou o protocolo de pesquisa:

Título: Estudos in vitro em células humanas e linhagens celulares de extratos e compostos bioativos presentes em alimentos da dieta Amazônica

Número do processo: 23081.015838/2011-10

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0332.0.243.000-11

Pesquisador Responsável: Ivana Beatrice Manica da Cruz

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

O pesquisador deve apresentar ao CEP:

Janeiro/ 2013- Relatório parcial

Janeiro/ 2014- Relatório parcial

Janeiro/ 2015-Relatório parcial

Janeiro/ 2016- Relatório final

Os membros do CEP-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 13/12/2011

Santa Maria, 20 de Dezembro de 2011



Félix A. Antunes Soares
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa-UFSM
Registro CONEP N. 243.