

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Danielle dos Santos Bonfim de Castro

**OBTENÇÃO DE EXTRATO DE PITAYA E AVALIAÇÃO DA SUA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIPROLIFERATIVA EM LINHAGENS
CELULARES HUMANAS DE CÂNCER DE MAMA**

Rio de Janeiro

2015

Danielle dos Santos Bonfim de Castro

**OBTENÇÃO DE EXTRATO DE PITAYA E AVALIAÇÃO DA SUA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIPROLIFERATIVA EM LINHAGENS
CELULARES HUMANAS DE CÂNCER DE MAMA**

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós
Graduação em Alimentos e Nutrição – da
Universidade Federal do Estado do Rio de
Janeiro, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Alimentos
e Nutrição.

Rio de Janeiro

2015

De Castro, Danielle dos Santos Bonfim.

Obtenção de extrato de pitaya e avaliação da sua atividade antioxidante e antiproliferativa em linhagens celulares humanas de câncer de mama / Danielle dos Santos Bonfim de Castro, 2015.

130 f. ; 30 cm

Orientador: Anderson Junger Teodoro.

Coorientador: Marco Antonio Mota da Silva.

Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

1. Pitaya. 2. Câncer de mama. 3. Antioxidante. 4. Compostos bioativos.
7I. Teodoro, Anderson Junger. II. Da Silva, Marco Antonio Mota. III. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Centro de Ciências Biológicas e de Saúde. Curso de Mestrado em Alimentos e Nutrição. IV. Título.

CDD -

Danielle dos Santos Bonfim de Castro

**OBTENÇÃO DE EXTRATO DE PITAYA E AVALIAÇÃO DA SUA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIPROLIFERATIVA EM LINHAGENS
CELULARES HUMANAS DE CÂNCER DE MAMA**

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós
Graduação em Alimentos e Nutrição – da
Universidade Federal do Estado do Rio de
Janeiro, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Alimentos
e Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Junger Teodoro

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Mota da Silva

Aprovado em: ___/___/___

Banca examinadora

Dr. Anderson Junger Teodoro

Instituto de Nutrição / Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Dr. Felipe Leite de Oliveira

Instituto de Ciências Biomédicas / Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dra. Tatiana El-Bacha

Instituto de Nutrição / Universidade Federal do Rio de Janeiro

DECICATÓRIA

Dedico esta vitória a Deus, por ser meu guia na minha caminhada e renovar minha fé a cada dia. Aos meus pais, Neusa e Ronaldo, que sempre torceram pelo meu sucesso. E claro e especialmente ao meu querido e amado esposo, Benedito, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades, e não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por todas as bênçãos e oportunidades.

À FAPERJ pelo apoio financeiro.

Aos meus pais que tanto amo, Neusa e Ronaldo, e que sempre me apoiaram em tudo.

Ao meu querido esposo, Benedito, que sempre me incentivou nesta longa caminhada.

A amiga Nathalia da Costa Pereira Soares por seus ensinamentos, pelo apoio, paciência e auxílio em diversos experimentos.

Ao meu orientador, o professor Dr. Anderson Junger Teodoro, por toda a atenção, compreensão, disponibilidade e prontidão em ajudar.

Aos amigos da graduação pelos anos maravilhosos de amizade.

Ao pessoal UEZO, especialmente ao professor Marco Antônio, ao Antônio Marcos e a Vanessa, pela amizade e ajuda em todos os momentos.

Ao pessoal da UFRJ, especialmente à professora Mariana, que muito me ajudou na realização das análises.

Ao professor Eduardo Nogueira, por toda ajuda e apoio no desenvolvimento das análises de expressão gênica.

Aos Professores Felipe Leite Oliveira e Camila Brand, pela colaboração nas análises de citometria de fluxo.

Aos meus professores pelos ensinamentos, incentivos, que muito contribuíram para a minha trajetória acadêmica.

Existe uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade.

Albert Einstein

RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia mais comum entre as mulheres e a forma mais letal para o sexo feminino, sendo a causa mais frequente de morte associada ao câncer em mulheres no mundo. Esta é uma doença complexa causada por um acúmulo progressivo de mutações genéticas múltiplas, combinada a outros fatores, sendo de extrema importância a melhoria nos protocolos de tratamento e prevenção. A utilização de alimentos funcionais e compostos quimiopreventivos, parece contribuir muito neste processo, atuando com mecanismos de ação antioxidante, anti-inflamatório e antiangiogênicos. A pitaya vermelha, uma fruta rústica pertencente à família *Cactaceae*, apresenta elevado potencial funcional relacionado a pigmentos como betacianinas, betaxantinas, antocianinas e compostos fenólicos que estão envolvidos em processos de prevenção ao câncer por possuírem atividade antioxidante. Neste sentido, o objetivo do trabalho é a obtenção e avaliação do efeito do extrato de pitaya sobre a proliferação, ciclo celular, apoptose e expressão gênica de diferentes linhagens cancerígenas humanas de mama. Utilizando o ensaio de MTT, foi demonstrada uma diminuição importante da viabilidade celular na linhagem MCF-7 após o tratamento com o extrato. A análise do ciclo celular revelou que o extrato de pitaya aumentou o percentual de células na fase G₀/G₁ e diminuiu na fase G₂/M após 24 e 48 horas de tratamento. O extrato ainda mostrou-se capaz de induzir apoptose nas células de adenocarcinoma MCF-7 e suprimiu a expressão dos genes BRCA1, BRCA2, PRAB e RE α . Em relação às células MDA-MB-435 nenhum efeito foi observado entre células tratadas e não-tratadas com o extrato, com exceção no ensaio de MTT. Neste sentido, o extrato de pitaya mostrou ser um inibidor do crescimento celular, promotor de parada de ciclo celular e capaz de aumentar a apoptose em células de adenocarcinoma de mama MCF-7, sugerindo um efeito na regulação da expressão de receptores hormonais e oncogenes.

Palavras-chave: Pitaya. Câncer de mama. Antioxidante. Compostos bioativos.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common neoplasia among women and the most lethal for females, being the most frequent cause of cancer related death in women worldwide. This is a complex disease caused by a progressive accumulation of multiple genetic mutations, combined with other factors, this it is extremely important to improve treatment protocols and prevention. The use of functional foods and chemopreventive compounds, seems to contribute to this process, where the possible mechanisms an antioxidant, anti-inflammatory, anti-angiogenic and hormonal. The red pitaya presents as a potential functional food due to reactions of its pigments as betacyanin, betaxantinas, anthocyanins and phenolic compounds, that are involved in of this study cancer prevention due to their antioxidant activities. In this sense, the objective of this study is to obtain and evaluate the effect of pitaya extract on cell proliferation, cell cycle, apoptosis and gene expression of different human breast cancer lines. Using the MTT assay, a significant decrease in cell viability was demonstrated in MCF-7 line after treatment with the extract. The cell cycle analysis showed that the dragon fruit extract increased the percentage of cells in G₀ / G₁ phase decreased and the G₂ / M phase after 24 and 48 hours of treatment. The extract also proved capable of inducing apoptosis in MCF-7 adenocarcinoma cells and suppressed the expression of genes BRCA1, BRCA2, and PRAB Er α . Regarding MDA-MB-435 cells was observed no effect between treated and non-treated cells with the extract, except the MTT assay. In this regard, dragon fruit extract showed to be an inhibitor of cell growth, cell cycle arrest promoter and capable of increasing apoptosis in breast adenocarcinoma MCF-7, suggesting an effect on the regulation of the expression of hormone receptors and oncogene.

Keywords: Pitaya. Breast cancer. Antioxidant. Bioactive compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classes de compostos bioativos em alimentos	19
Figura 2	Visão esquemática do processo da carcinogênese	22
Figura 3	Estrutura química dos principais tipos de flavonoides	
Figura 4	Aspecto do fruto e da polpa da pitáia branca (<i>Hylocereus undatus</i>) (A); pitáia de polpa e casca vermelha (<i>Hylocereus polyrhzius</i>) (B); pitáia amarela (<i>Selenicereus megalanthus</i>) (C) e pitáia do cerrado (<i>Selenicereus setaceus</i>) (D).	28
Figura 5	Imagem microscópica das células MDA-MB-435 em baixa e alta densidade (Adaptado de American Type Culture Collection - ATCC)	41
Figura 6	Imagem microscópica das células MDA-MB-435 em baixa e alta densidade (Adaptado de American Type Culture Collection - ATCC).	41
Figura 7	Esquema de preparação da microplaca para leitura	47
Figura 8	Exemplo da Curva AUCnet versus concentrações de Trolox	48
Figura 9	Antocianinas totais da polpa, da casca e extrato de pitaya vermelha em mg/100g.	54
Figura 10	Efeito do extrato de pitaya (2,5-1000 mcg/mL) sobre a viabilidade celular de células MDA-MB-435 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento.	55
Figura 11	Efeito do extrato de pitaya sobre a viabilidade celular de células MCF-7 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento.	56
Figura 12	Efeito do extrato de pitaya sobre a viabilidade celular de células MCF-7 e MDA-MB-435 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento, usando azul de trypan.	57
Figura 13	Formação de colônia de células MCF-7	58
Figura 14	Efeito do extrato de pitaya na progressão do ciclo celular de linhagens de adenocarcinoma de mama após 24 e 48 horas de tratamento.	59
Figura 15	Taxa de aumento relativo de apoptose nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-435 tratadas com extrato de pitaya após 24 e 48 horas.	60
Figura 16	Análise quantitativa por PCR em tempo real de diferentes genes associados a progressão do câncer, após 48 horas de incubação com o extrato de pitaya em células MCF-7.	61

Figura 17 Análise quantitativa por PCR em tempo real de diferentes genes associados a 62
progressão do câncer, após 48 horas de incubação com o extrato de pitaya em
células MDA-MB-435.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Compostos bioativos presentes em alimentos envolvidos na modulação da resposta inflamatória	20
Tabela 2	Grupo de flavonóides, seus componentes bioativos e fontes alimentares	24
Tabela 3	Componentes nutricionais encontrados em 100g de polpa de pitáia vermelha (<i>H. polyrhizus</i>).	30
Tabela 4	Atividade antioxidante da pitaya vermelha avaliada por diferentes métodos	53
Tabela 5	Efeito do extrato de pitaya (500-1000 mcg/mL) na progressão do ciclo celular em diferentes linhagens humanas de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-435) após 24 e 48 horas de tratamento	60

Lista de siglas

μmol	Micromol
5-LOX	5-lipoxigenase
AA	atividade antioxidante
AAPH	iniciador radical azo (2,2'-azinobis(2-amidinopropano) dihidrocloro).
AGS	adenocarcinoma gástrico
ANOVA	análise de variância
AP-1	proteína ativadora
ATCC	american type Culture Collection
AUC	área abaixo da curva
B16F10	linhagem celular de melanoma
Bcap-37	câncer de mama humano
Bcl-2	célula-b de linfoma 2 (do inglês, b-cell lymphoma 2)
CBA	Compostos bioativos
cDNA	dna complementar (do inglês, complementary dna)
COX-2	ciclooxigenase-2
CPIR	taxa de inibição da proliferação celular
Ct	limiar de ciclo (do inglês, threshold cycle)
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DMEM	meio base de eagle modificado por dulbecco (do inglês, dulbecco's modified eagle's medium)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico (do inglês, deoxyribonucleic acid)
DNase	enzima que catalisa a clivagem hidrolítica de ligações fosfodiéster na estrutura do DNA
DPPH	radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR ou ERBB	fator de crescimento epidérmico
ERES	elementos do dna responsivos ao estrogênio
FITC	isotiocianato de fluoresceína (do inglês, fluorescein isothiocyanate)
FRAP	capacidade ferri-redutora
g	grama
G0	estado de quiescência das células durante o ciclo celular

G1	primeira fase do ciclo celular
G2	primeira fase do ciclo celular
GADPH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSH-px	glutaciona peroxidase
GSTM ₁	glutaciona s-transferase m1
GSTP ₁	glutaciona s-transferase p1
HeLa	linhagem de adenocarcinoma humano de câncer cervical
HER-2	receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (do inglês, human epidermal growth factor receptor 2)
HER-3	receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 3 (do inglês, human epidermal growth factor receptor 3)
HER-4	receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 4 (do inglês, human epidermal growth factor receptor 4)
IL-1	interleucina-1
IL-12	interleucina-12
IL-6	interleucina-6
IL-8	interleucina-8
INCA	Instituto Nacional de Câncer
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
JNK	c-jun n-terminal quinase
K562	linhagem celular derivada de leucemia mielóide crônica humana
L	Litro
M	Mitose
MAPK	via de sinalização intracelular da quinase protéica ativada por mitógeno
MCF-7	linhagem celular epitelial derivada de um adenocarcinoma mamário humano
mcg/ml	micrograma/mililitro
MDA-MB-231	linhagem celular epitelial derivada de um adenocarcinoma mamário humano
MDA-MB-435	linhagem celular epitelial derivada de um carcinoma ductal mamário humano
MEK	mapk quinase
MGC-803	câncer gástrico humano
MMP-9	metaloproteinase de matriz-9
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

NF-kappa B	fator nuclear kappa b
Nrf2	fator relacionado ao e2
ORAC	capacidade de absorção de radical de oxigênio
p53	proteína citoplasmática supressora de tumor
PBS	solução salina tamponada (do inglês, phosphate buffered saline)
PC3	câncer de próstata humano
PCR	reação em cadeia da polimerase (do inglês, polymerase chain reaction)
PGR	gene do receptor de progesterona
PKC	proteína quinase c
PPAR- γ	receptor ativado por proliferadores de peroxissomos- γ
PRAB	isoformas A e B do receptor de progesterona
RE	receptor de estrogênio
RNA	ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
RP	receptor de progesterona
RT-PCR	reverse transcription pcr
S	fase de replicação do dna durante o ciclo celular
SFB	soro fetal bovino
TNF- α	fator de necrose tumoral
TPTZ	reagente 2,3,5-cloreto trifeniltetrazolium
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
VCAM-1	moléculas de adesão celular vascular-1

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1.	COMPOSTOS BIOATIVOS.....	17
2.2.	COMPOSTOS FENÓLICOS.....	22
2.2.1.	Flavonóides.....	23
2.2.2.	Não Flavonóides.....	25
2.3.	PITAYA: ASPECTOS NUTRICIONAIS E FITOQUÍMICOS.....	26
2.4.	COMPOSTOS BIOATIVOS X CÂNCER.....	31
2.5.	CÂNCER DE MAMA.....	35
3.	OBJETIVOS.....	43
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	43
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1.	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	44
4.2.	PREPARO DOS EXTRATOS.....	44
4.3.	DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS.....	44
4.4.	DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	45
4.5.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SEQUESTRANTE DO RADICAL DPPH.....	45
4.6.	ENSAIO DA CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO – ORAC (OXYGEN RADICAL ABSORPTION CAPACITY).....	46
4.7.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO – FRAP (FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER).....	49
4.8.	CULTURA DE CÉLULAS E PROTOCOLO DE TRATAMENTO.....	49
4.9.	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE MTT.....	49
4.10.	MEDIDA DA VIABILIDADE CELULAR COM O EMPREGO DO AZUL DE TRYPAN.....	50
4.11.	ANÁLISE DE CICLO CELULAR.....	50
4.12.	AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA APOPTOSE.....	51
4.13.	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL.....	51

4.13.1.	Extração do RNA total.....	51
4.13.2.	PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão dos genes.....	52
4.14.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5.	RESULTADOS	53
5.1.	COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NO EXTRATO DE PITAYA.....	53
5.2.	VIABILIDADE CELULAR.....	54
5.2.1.	Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT.....	54
5.2.2.	Viabilidade celular avaliada usando azul de trypan.....	56
5.2.3.	Unidade formadora de colônia (UFC).....	57
5.3.	EFEITO DO EXTRATO DE PITAYA NO CICLO CELULAR E APOPTOSE.....	59
5.4.	EXPRESSÃO GÊNICA.....	61
6.	DISCUSSÃO	63
7.	CONCLUSÃO	72
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

INTRODUÇÃO

Desde 1930 estudos epidemiológicos têm demonstrado a relação entre dieta e risco de câncer, dentre eles o de mama (HILL, 1997). Está bem estabelecido que o controle do peso corporal, redução do consumo de gordura animal e alta ingestão de frutas, hortaliças e grãos integrais protegem contra o câncer (HILL,1997; BÉLIVEAU et al, 2007). Estudos confirmam a associação entre o consumo de nutrientes e compostos bioativos presentes em frutas e hortaliças e redução do risco de desenvolvimento de diversos tipos de câncer (MIGNONE et al, 2009; LEWIS et al, 2009).

Muitos estudos têm relatado as propriedades antioxidantes dos sucos de frutas e polpas de frutas comestíveis (MOKBEL & HASHINAGA, 2006). No entanto, existem poucas informações disponíveis sobre o valor medicinal e nutricional dos frutos subtropicais, especialmente sobre as espécies mais exóticas.

Aliados aos avanços da ciência e ancorados na divulgação das propriedades nutricionais dos alimentos e suas potenciais ações benéficas à saúde humana, prevenindo e tratando doenças, as frutas tropicais exóticas têm sido consideradas promotoras da saúde e peças-chave na promoção da qualidade de vida (MENCARELLI et al, 2010; SUN et al, 2010).

A pitaya vermelha (*Hylocereus polyrhizus*) é uma fruta rústica pertencente à família *Cactaceae*, originada da América Tropical e Subtropical, que apresenta elevado potencial funcional relacionado a pigmentos como betacianinas e betaxantinas, que estão envolvidos em processos de prevenção ao câncer por possuírem atividade antioxidante, atuando principalmente na prevenção do melanoma (WU et al, 2006), tipo maligno de câncer de pele, que possui elevada probabilidade de metástases para outros órgãos.

Na sua composição, a pitaya vermelha (*Hylocereus polyrhizus*) é rica em compostos fenólicos que exibem forte atividade antioxidante (VAILLANT et al, 2005). Atualmente, grande atenção tem sido dada a estratégias preventivas e, neste contexto, a utilização de alimentos funcionais como compostos quimiopreventivos parece contribuir muito neste processo, atuando com mecanismos de ação anti-carcinogênicos, antioxidantes, anti-inflamatórios, antiangiogênicos (UPADHYAYA et al, 2007). Embora alguns trabalhos tenham sido desenvolvidos para identificar os perfis de compostos fenólicos e a avaliar a capacidade antioxidante na fruta (ESQUIVELA et al,

2007), atualmente pouca atenção tem sido dada aos extratos de cascas e polpas de pitaya, com poucas informações sobre as possíveis correlações entre suas propriedades químicas e biológicas.

Processos diretamente relacionados ao desenvolvimento do câncer como proliferação celular, apoptose, angiogênese, metabolismo de carcinógenos, diferenciação celular, regulação hormonal, reparo do DNA e inflamação podem ser influenciados por componentes bioativos dos alimentos, por meio da regulação da expressão gênica (DAVIS & MILNER, 2007; KOK et al, 2008).

Algumas das propriedades biofarmacológicas atribuídas a pitaya após a realização de estudos *in vivo* e *in vitro* incluem: atividade antioxidante (LUO et al, 2014; SUH et al, 2014; GARCÍA-CRUZ et al., 2013), atividade antiviral e antimicrobiana (STRACK et al, 2003); melhora do perfil lipídico (KHALILI et al, 2009); propriedades prebióticas (WICHENCHOT et al. 2010), prevenção de Doenças Crônicas Não Transmissíveis (STINTZING et al, 2004; STINTZING et al, 2002, WICHENCHOT et al, 2010), efeito antiproliferativo e como agente anticancerígeno (AZIZ & NOOR, 2010). Suas sementes são ricas em ácidos graxos essenciais e fitoesteróis (ARIFFIN et al, 2009) .

A partir do exposto acima, justifica-se a realização de pesquisas direcionadas ao estudo da atividade antioxidante da pitaya vermelha e o seu efeito sobre células de câncer de mama humano, no intuito de avaliar a implicação dessa fruta na prevenção do desenvolvimento do câncer de mama.

1. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. COMPOSTOS BIOATIVOS

Além dos macro e micronutrientes essenciais, a dieta habitual fornece alguns compostos químicos, presentes em sua maioria, em frutas e hortaliças, que exercem potente atividade biológica, já comprovada por vários pesquisadores. Esses compostos são chamados de compostos bioativos (CBAs) ou, algumas vezes, de fitoquímicos e podem desempenhar diversos papéis em benefício da saúde humana (CARRATU; SANZINI, 2005).

Existem convincentes evidências científicas em favor da associação entre dieta e doenças crônicas. Baseado em tais evidências, diretrizes dietéticas foram formuladas ao redor do mundo para a prevenção de doenças crônicas tal como câncer, doença cardiovascular, diabetes e osteoporose (RAO; RAO, 2007).

A constatação de que dietas ricas em vegetais, como a da população mediterrânea contemporânea e da população asiática, reduzem o risco das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) impulsionou pesquisas que identificaram substâncias nutrientes e não nutrientes atuantes em alvos fisiológicos específicos e que, dessa forma, interferem nos processos patogênicos dessas doenças.

Essas evidências resultaram, entre outras coisas, em mudanças nas recomendações dos guias alimentares, os quais passaram a indicar a ingestão de maior número de porções de frutas e de hortaliças na dieta (SABATE, 2003; LARSEN, 2003; MINICH; BLAND, 2008). Alimentos de origem vegetal são fontes de energia, proteína, vitaminas e minerais e a única ou principal fonte de vitamina C, folato, fibras e compostos bioativos (CBAs), dos quais o metabolismo humano também é dependente.

Em um novo paradigma, a ingestão insuficiente de CBAs provenientes de vegetais constitui importante componente de risco das DCNT, contribuindo na mesma magnitude do consumo excessivo de energia e de gorduras totais e saturadas na dieta. Isso indica que os CBAs, da mesma forma que os demais nutrientes, são essenciais para que se atinja a carga completa (geneticamente determinada) de longevidade. Segundo esse novo paradigma, as DCNT seriam doenças relacionadas também à deficiência de substâncias “essenciais para a longevidade” (HOLST; WILLIAMSON, 2008; WILLIAMSON; HOLST, 2008; JACOBS; TAPSELL, 2007). O aumento da ingestão de ácidos graxos saturados (AGS) pela dieta favorece a ativação da resposta

inflamatória e, conseqüentemente, o aumento do risco para DCNT (KENNEDY et al, 2009). Já que os AGS estimulam a via de sinalização do fator de transcrição denominado fator nuclear kappa B (NF- κ B), que resulta no aumento da expressão de genes que codificam para proteínas envolvidas na resposta inflamatória.

Os CBAs presentes nos alimentos podem agir de diferentes formas, tanto no que se refere aos alvos fisiológicos como aos seus mecanismos de ação. A ação antioxidante, comum nesses compostos, por exemplo, deve-se ao potencial de óxido-redução de determinadas moléculas, à capacidade dessas moléculas em competir por sítios ativos e receptores nas diversas estruturas celulares ou, ainda, à modulação da expressão de genes que codificam proteínas envolvidas em mecanismos intracelulares de defesa contra processos oxidativos degenerativos de estruturas celulares (DNA, membranas).

Embora seja reconhecido que CBAs presentes na dieta atuem na manutenção da saúde, faz-se necessário reconhecer que o efeito protetor às DCNT parece não se reproduzir pela sua ingestão isolada, na forma de suplementos. Estudos clínicos, em que a dieta foi suplementada com β -caroteno, vitamina C ou vitamina E, mostraram que essas substâncias, isoladas da matriz alimento, não foram eficazes na diminuição de risco à DCNT (LIU, 2004), indicando que fatores como a biodisponibilidade e a ação sinérgica, entre outros, atuam nesse processo.

Na dieta habitual, alguns gramas de CBAs por dia são ingeridos. No entanto, as concentrações desses compostos no organismo humano são muito baixas – na faixa de micromoles, o que está relacionado à sua limitada absorção e biodisponibilidade.

Esses compostos variam extensamente em estrutura química e, conseqüentemente, na função biológica, e estes apresentam algumas características em comum: pertencem a alimentos do reino vegetal, são substâncias orgânicas e geralmente de baixo peso molecular, não são indispensáveis nem sintetizados pelo organismo humano e apresentam ação protetora na saúde humana quando presentes na dieta em quantidades significativas. Em sua maioria, são metabólitos secundários e geralmente, estão relacionados com os sistemas de defesa das plantas contra a radiação ultravioleta ou as agressões de insetos ou patógenos (MANACH et al, 2004).

Como existem em grande número, eles podem ser subdivididos em grupos com milhares de compostos distintos. Algumas substâncias são próprias de alguma espécie ou gênero de plantas, outras são unidas por um complicado critério de classificação. A Figura 1 mostra as diversas classes de compostos bioativos presentes nos alimentos.

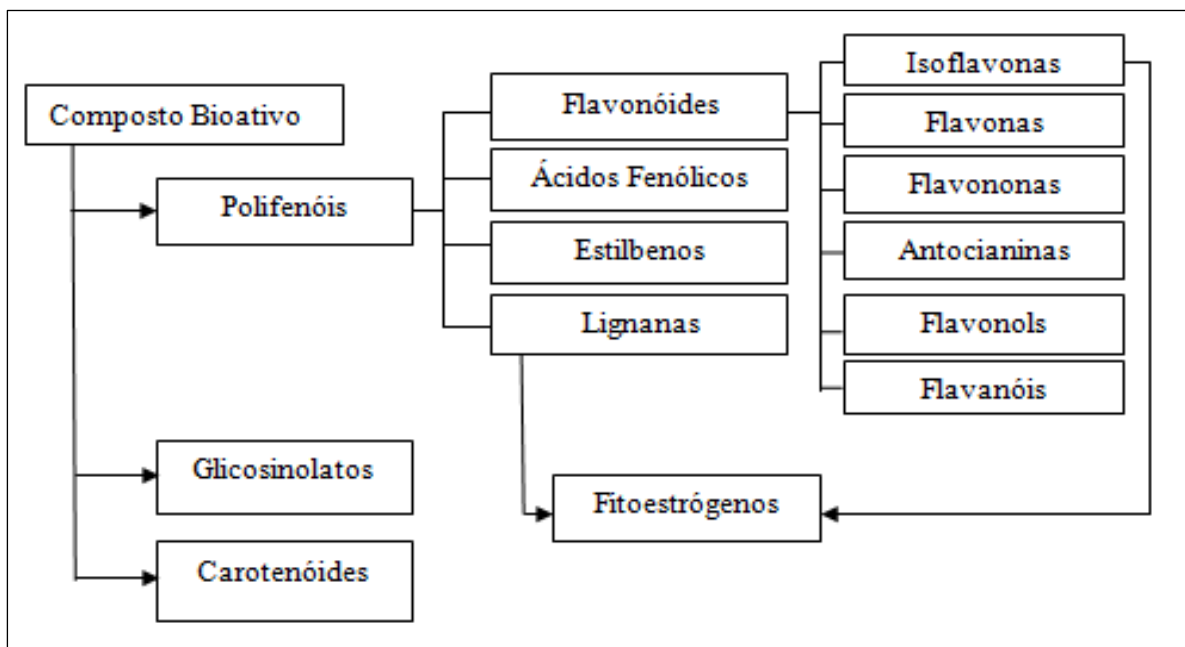


Figura 1. Classes de compostos bioativos em alimentos

Os CBAs podem ativar, por exemplo, as vias de sinalização intracelulares adaptativas contra o estresse oxidativo e à exposição ao ambiente. Eles exercem ainda benefícios à saúde, ao menos em parte, atuando como “agentes de estresse de baixa dose” ou pró-oxidantes, e preparam as células para resistirem às condições mais severas de estresse: doses baixas ativam vias de sinalização que resultam no aumento da expressão de genes, os quais codificam proteínas visando à proteção celular. Provavelmente, um CBA é capaz de modular uma ou duas reações *in vivo* que, como consequência, afetarão diferentes processos. A inibição de uma única enzima como a ciclooxigenase (COX-2), por exemplo, afeta a inflamação e, conseqüentemente, o desenvolvimento de diversas DCNT. (BASTOS et al, 2009). A tabela 1 resume a relação entre os diferentes CBAs, os alimentos em que estão presentes e a ação na resposta inflamatória.

Essas substâncias exercem ainda outras várias ações do ponto de vista biológico, como modulação de enzimas de detoxificação, estimulação do sistema imune, redução da agregação plaquetária, modulação do metabolismo hormonal, redução da pressão sanguínea, e atividade antibacteriana e antiviral (CARRATU; SANZINI, 2005).

O organismo humano é dotado de um complexo sistema de defesa, e os xenobióticos, que entram no corpo, sofrem uma série de transformações mediadas por enzimas. Existem basicamente dois tipos de enzimas de bio-transformação de xenobióticos. As enzimas de fase I, que incluem as enzimas da família do citocromo P-450 dependentes de monoxigenases, geralmente são responsáveis pela ativação dos

compostos e, por esse motivo, são chamadas de ativadoras. E as enzimas de fase II, como as glutationas, quinona redutase, UDP-glucuronosil transferase, dentre outras, que possuem como principal característica o poder de adição ou conjugação de cofatores endógenos, como glutatona, ácido glucurônico, formando produtos não tóxicos e, por essa razão, também são chamadas de detoxificadoras (CHEN; ANDREASSON, 2001).

Tabela 1. Compostos bioativos presentes em alimentos envolvidos na modulação da resposta inflamatória (Adaptado de Kang *et al*, 2009).

Compostos bioativos	Fontes alimentares	Efeito na resposta inflamatória
Resveratrol	Uvas (<i>Vitis vinifera</i>)	COX-2, ↓ iNOS, ↓ JNK, ↓ MEK, ↓ NF-Kappa B, ↓ AP-1, ↓ PKC, ↓ 5-LOX, ↓ IL-6, ↓ IL-8, ↓ IL-1, ↓ Nrt2, ↓ VCAM-1
Curcumina	Cúrcuma (<i>Curcuma longa</i>)	↓ NF-kappa B, ↓ AP-1, ↑ PPAR γ , ↑ Nrt2, ↓ JNK, ↓ PXC, ↓ VCAM-1, ↓ 5-LOX, ↓ COX-2, ↓ iNOS, ↓ TNF- α , ↓ IL-6, ↓ IL-12, ↑ GSH-px
Genisteína	Soja (<i>Glycine max</i>)	↓ NF-kappa B, ↑ GSH-px
Quercetina	Frutas cítricas, maçã	↓ NF-kappa B
Sulforafano	Crucíferas	↓ NF-kappa B
Capsaicina	Pimenta vermelha (<i>Capsicum annum</i>)	↓ NF-kappa B
Indol-3-carbinol	Crucíferas	↓ NF-kappa B
Ácido elágico	Romã (<i>Punica granatum</i>)	↓ NF-kappa B, ↓ COX-2, ↓ MMP-9
6-Gingerol	Gengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	↓ TNF- α , ↓ NF-kappa B, ↓ AP-1, ↓ COX-2, ↓ iNOS, ↓ p38MAPK
Catequinas	Chá verde (<i>Camellia sinensis</i>)	↓ NF-kappa B, ↓ AP-1, ↓ JNK, ↓ COX-2, ↓ MMP-9, ↓ IL-6

COX-2: ciclo-oxigenase-2; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; JNK: c-Jun N-terminal quinase; MEK: MAPK quinase; NF-kappa B: fator nuclear kappa B; AP-1: proteína ativadora-1; PKC: proteína quinase C; 5-LOX: 5-lipoxigenase; IL-6: interleucina-6; IL-8: interleucina-8; IL-1: interleucina-1; IL-12: interleucina-12; Nrf2: fator relacionado ao E2; VCAM-1: moléculas de adesão celular vascular-1; GSH-px: glutatona peroxidase; PPAR- γ : receptor ativado por proliferadores de peroxissomos- γ ; MMP-9: metaloproteinase de matriz-9; TNF- α : fator de necrose tumoral.

Compostos bioativos podem alterar o metabolismo de carcinogênicos químicos por modificar o sistema endógeno das enzimas descritas acima. Muitos estudos demonstram que os compostos bioativos atuam como quimioprotetores, agindo na indução de enzimas que metabolizam os carcinógenos, transformando-os em suas formas menos reativas.

Compostos bioativos atuam na redução da agregação plaquetária e do risco de trombose e aterosclerose, bem como nas alterações no metabolismo do colesterol. Compostos sulfurados do alho e polifenólicos de uvas e vinhos tintos (procianidinas), do cacau, do chocolate e dos chás orientais, dentre outros, são importantes compostos relacionados a esses efeitos (MANACH et al, 2004). Atuam também no controle das concentrações de hormônios esteróides e do metabolismo endócrino. As isoflavonas presentes na soja são uma alternativa para a terapia de reposição hormonal, tendo como efeitos benéficos a diminuição do risco de câncer, de doenças cardiovasculares e da osteoporose (inibem a atividade dos osteoclastos, células ósseas responsáveis pela reabsorção óssea) (SOMEKAWA et al, 2001).

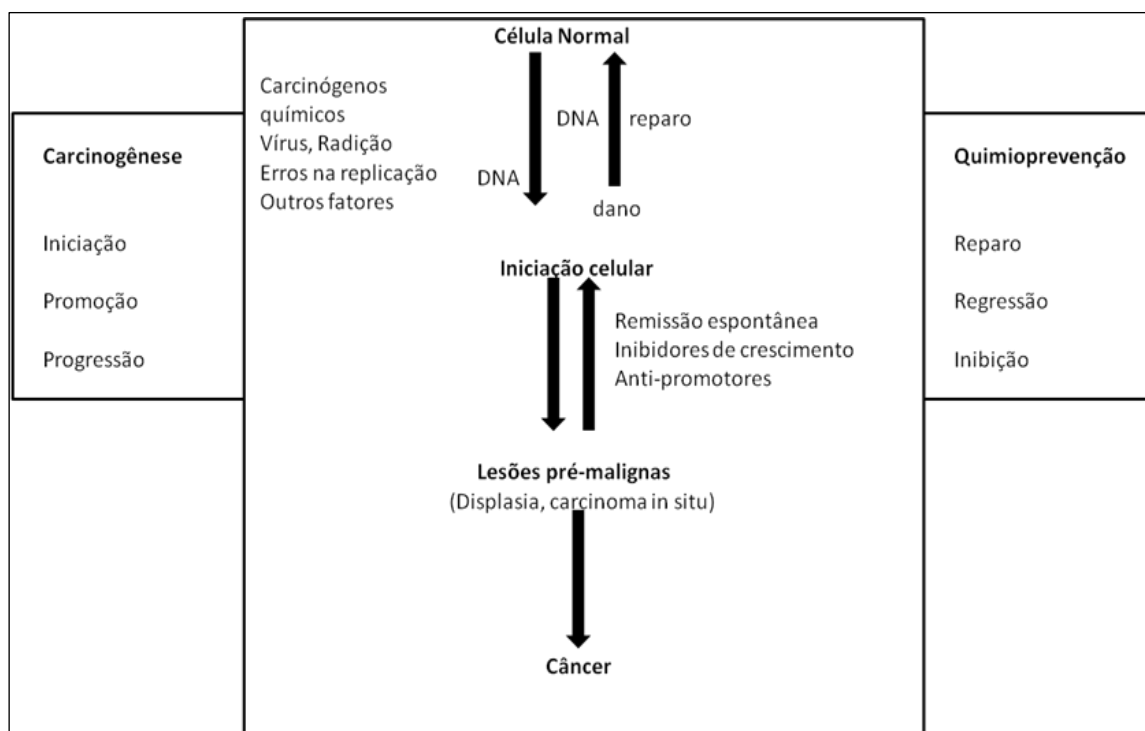
Estudos mostram que os polifenóis apresentam atividade anti-inflamatória. Dentre os potenciais mecanismos moleculares para essas atividades, pode-se incluir a inibição de enzimas relacionadas à resposta inflamatória, como as cicloxigenases e as lipoxigenases. (YOON; BAEK, 2005).

Vale ressaltar, que as células cancerosas devem produzir os fatores da inflamação para sustentar e manter o crescimento tumoral em desenvolvimento. Elas produzem exageradamente as mesmas substâncias inflamatórias, que desempenham o papel natural na reparação das feridas (citocinas, prostaglandinas e leucotrienos), agindo como agentes químicos que favorecem a multiplicação celular. O câncer vai se servir dessas substâncias para induzir sua própria proliferação e tornar permeáveis as barreiras que o cercam.

Assim, o processo que permite ao sistema imunológico reparar lesões e destruir os agentes agressores em todos os recônditos do organismo é desviado em favor das células cancerosas, que vão se apoderar dele para proliferar e se propagar. Graças à inflamação, elas vão se infiltrar nos tecidos vizinhos e penetrar no fluxo sanguíneo e linfático para disseminar e originar as metástases (DE CASTRO BARRETO et al, 2011).

A ingestão média de fitoquímicos é de aproximadamente 1 a 1,5 g/dia em uma dieta que inclua frutas, verduras, chá e vinho tinto. Entre os mais importantes do reino vegetal pode-se citar quatro grandes famílias químicas, como as substâncias nitrogenadas, as sulfuradas, as terpênicas e as mais amplamente estudadas, as fenólicas (TOMÁS-BARBERÁN, 2003). Porém, os fitoquímicos presentes nas frutas pertencem, em sua maioria, aos dois últimos grupos: substâncias terpênicas e fenólicas. No presente estudo daremos enfoque às substâncias fenólicas.

A atuação dos fitoquímicos, em especial as antocianinas, nessas diversas fases pode estar relacionada à sua ação antioxidante, ao aumento da resposta imune ou ainda à modulação da expressão do gene supressor tumoral. Entretanto, os estágios da carcinogênese em que os fitoquímicos podem agir ainda não estão bem estabelecidos. Uma visão esquemática deste processo pode ser observada na figura 2.



Fonte: Adaptado de Singh e Gaby, 1991.

Figura 2. Visão esquemática do processo da carcinogênese e ação de quimioprevenção.

2.2. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais. Já foi detectada a ocorrência de mais de 8000 compostos fenólicos (PEREIRA, 2011), sendo que os principais podem ser classificados em dois grupos: os flavonóides (polifenóis) e os não flavonóides (fenóis simples ou ácidos) (MELO; GUERRA, 2002; BURNS et al, 2001).

Esses compostos agem neutralizando e sequestrando radicais livres e também quelam metais de transição. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias. Os átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila adjacentes (orto-difenóis), localizados em várias posições dos anéis A, B e C, as duplas ligações dos anéis benzênicos e a dupla ligação com o oxigênio (-C=O) de algumas moléculas de flavonóides garantem a esses compostos sua alta atividade antioxidante (HRAZDINA et al, 1970; RICE-EVANS et al, 1996).

Estudos realizados com os compostos fenólicos demonstram sua capacidade antioxidante, assim como seu possível efeito na prevenção de diversas enfermidades cardiovasculares, cancerígena e neurológica (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, 2002). De maneira geral, a ação benéfica dos compostos fenólicos na saúde humana vem sendo relacionada com a sua atividade antiinflamatória e com a atividade que impede, não só a aglomeração das plaquetas sanguíneas, mas também a ação de radicais livres no organismo. Uma vez que protegem moléculas como o DNA, podem vir a abortar alguns processos carcinogênicos.

2.2.1. Flavonóides

Os flavonóides englobam uma classe muito importante de pigmentos naturais e têm a estrutura química C6-C3-C6, sendo que as duas partes da molécula com seis carbonos são anéis aromáticos (Bobbio & Bobbio, 1995) interligados via carbono heterocíclico do pirano. Conforme o estado de oxidação da cadeia heterocíclica do pirano, têm-se diferentes classes de flavonóides: antocianinas, flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas e flavanas (CHEYNIER, 2005). Os quatro maiores grupos e seus componentes e fontes alimentares estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Grupo de flavonóides, seus componentes bioativos e fontes alimentares.

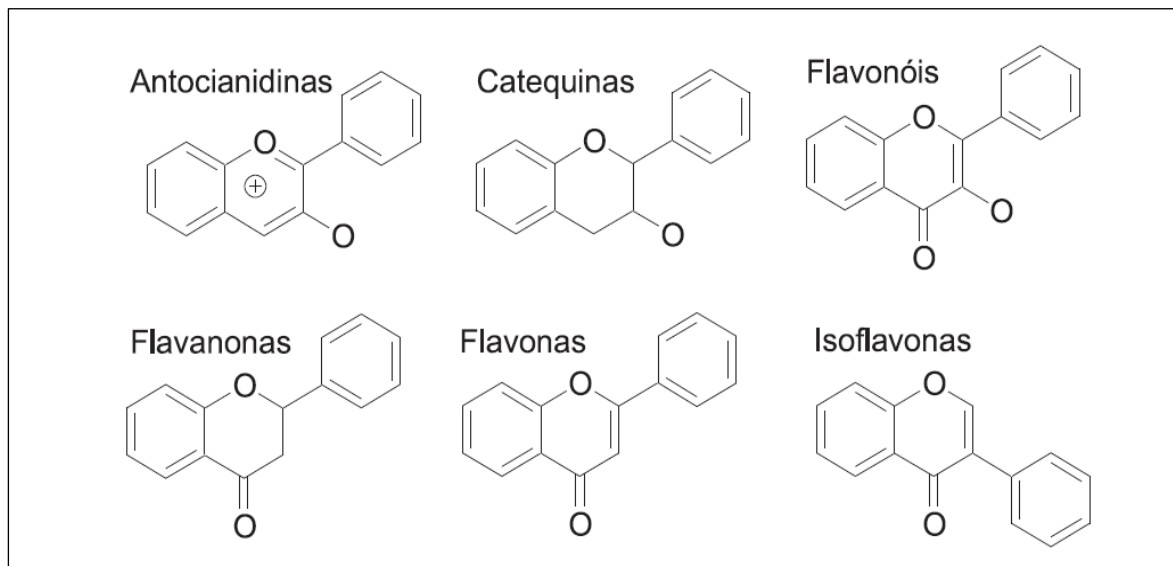
GRUPOS	COMPONENTES	FONTE ALIMENTAR
Flavonas	Apigenina	Cascas de maçãs
	Chrisina	Cerejas
	Kaempferol	Brocólis
	Luteolina	Peles de frutas
	Miricetina	Cranberries
	Rufina	Uvas
	Sibelina	Alface
	Quercetina	Oliva, Alho
Flavanonas	Fisetina	
	Hesperetina	Frutas cítricas
	Narigina	Peles de frutas cítricas
	Naringenina	
	Taxifolina	
Catequinas	Catequina	Vinho tinto
	Epicatequina	Chá
	Epigallocatequina galate	
Antocianinas	Cianidina	Cerejas
	Delfinidina	Uvas
	Malvidina	Framboesa
	Pelargonidina	Uvas vermelhas
	Peonidina	Morangos
	Petunidina	Chá, Peles de frutas com pigmentos escuros

Fonte: NIJVELDT et al., 2001; BEECHER, 2003.

Dentre as flavonas, a quercetina e a miricetina são os principais componentes em frutas, estando presente na maçã, na romã, na uva e no damasco (HOLLMAN; ARTS, 2000; SCALBERT; WILLIAMSON, 2000; ROSS; KASUM, 2001; KRIS-ETHERTON et al, 2002; POYRAZOGLU et al, 2002; TOMÁS-BARBERÁN, 2003; ESPÍN; TOMÁS-BARBERÁN, 2005). As frutas cítricas são exemplo de fonte de flavanonas, representada por naringenina e hesperitina e flavonas representadas por apigenina e luteolina (TOMÁS-BARBERÁN, 2003; ESPÍN; TOMÁS-BARBERAN, 2005). A catequina, entre as flavanas, é o composto mais frequentemente encontrado em maçã, pêra, romã, cereja e chás (POYRAZOGLU et al, 2002; TOMÁS-BARBERÁN, 2003; ESPÍN; TOMÁS-BARBERÁN, 2005).

Dos flavonóides, a antocianina é o composto mais estudado. É um grupo de pigmentos vegetais hidrossolúveis, amplamente distribuídos no reino vegetal, encontrados em diversas frutas como o mirtilo, a amora, o morango, a framboesa, o

jambolão, a jabuticaba, a uva, entre outras (WANG; LIN, 2000; CONNOR et al, 2002; VIZZOTTO; PEREIRA, 2008). Seu espectro de cor vai do vermelho ao azul, ou púrpura.



Fonte: MARÇO et al, 2008.

Figura 3. Estrutura química dos principais tipos de flavonóides

2.2.2. Não Flavonóides

Os compostos fenólicos não flavonóides, são divididos em: derivados das estruturas químicas C6-C1 específicas dos ácidos hidroxibenzoico, gálico e elágico; derivados das estruturas químicas C6-C3 específicas dos ácidos caféico e *p*-cumárico hidroxicinamatos; e derivados das estruturas químicas C6-C2-C6 específicas do *trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol e *trans*-resveratrol glicosídeo (BURNS et al, 2001). Sua atividade antioxidante está relacionada com a posição dos grupos hidroxilas e também com a proximidade do grupo $-CO_2H$ em relação ao grupo fenil. Quanto mais próximo esse grupo estiver do grupo fenil, maior será a capacidade antioxidante do grupo hidroxila na posição meta (HRAZDINA et al, 1970 *apud* PEREIRA, 2011).

Em termos de composição dos alimentos, fontes de ácido gálico e elágico podem ser encontradas em morango, romã e framboesa (ESPÍN; TOMÁS-BARBERÁN, 2005; POYRAZOGLU et al, 2002), de cumarinas em frutas cítricas (FREITAS, 2000) e resveratrol em vinho tinto, damasco e groselha negra (KRIS-ETHERTON et al, 2002; TOMÁS-BARBERÁN, 2003; ESPÍN; TOMÁS-BARBERÁN, 2005).

2.3. PITAYA: ASPECTOS NUTRICIONAIS E FITOQUÍMICOS

A fruticultura nacional tem grande potencial de expansão, pois há inúmeras frutas nativas e exóticas muito pouco exploradas economicamente, cujos estudos para expandi-las, na sua maioria, estão em andamento, como por exemplo, atemóia, maná, canistel, mirtilo, lichia, physalis, carambola, entre outras (KISS, 2003; SILVA et al, 2002). Há algumas décadas, essas plantas eram desconhecidas do mercado mundial, mas atualmente ocupam um crescente nicho no mercado de frutos exóticos na Europa e Estados Unidos, onde vêm atraindo cada vez mais a atenção de comerciantes e consumidores, não só por sua exótica aparência, como também por suas características sensoriais, nutracêuticas e alto valor comercial (ESQUIVEL; AYARA-QUESADA, 2012).

O mercado brasileiro de frutas tropicais exóticas deixou de ser exclusivo de áreas rurais e expandiu-se amplamente para os centros metropolitanos (OLIVEIRA et al, 2006).

Atualmente, observa-se um aumento na relevância e o consumo destas frutas cultivadas no Brasil, tanto em função do valor nutricional quanto pela divulgação científica, além do possível efeito terapêutico em uma série de funções no organismo. Dentre as espécies não convencionais no Brasil algumas merecem destaque como o mangostão (*Garcinia mangostana*), rambutan (*Nephelium lappaceum*), dovyalis (*Dovyais* sp), mangostão amarelo (*Garcinia xanthochymus* Hook) e a pitaya (*Cereus undatus*) também se insere nesse contexto. (OLIVEIRA et al, 2006).

No Brasil, ainda são poucas as áreas de pitaya cultivadas, o que resulta na necessidade de importação da maior parte dos frutos comercializados fazendo com que os preços sejam elevados e não acessíveis às camadas mais populares da população. No Brasil a espécie *H. undatus* passou a ser cultivada na década de 1990, no estado de São Paulo, sendo a região de Catanduva a principal produtora, mas na década de 2000 outras espécies do mesmo gênero foram introduzidas, como *H. polyrhizus*, e também foi reportada uma pitaya nativa do Brasil, denominada pitaya do Cerrado (*Selenicereus setaceus*) (JUNQUEIRA et al, 2002), sendo registrada também em regiões de brejo de altitude no estado da Paraíba (TORRES et al, 2009).

Atualmente, a região Sudeste do Brasil é a principal produtora do país, onde a cultura da pitaya se aclimatou muito bem, com produção de frutos nos meses de dezembro a maio, e produtividade média anual de 14 toneladas de frutos por hectare

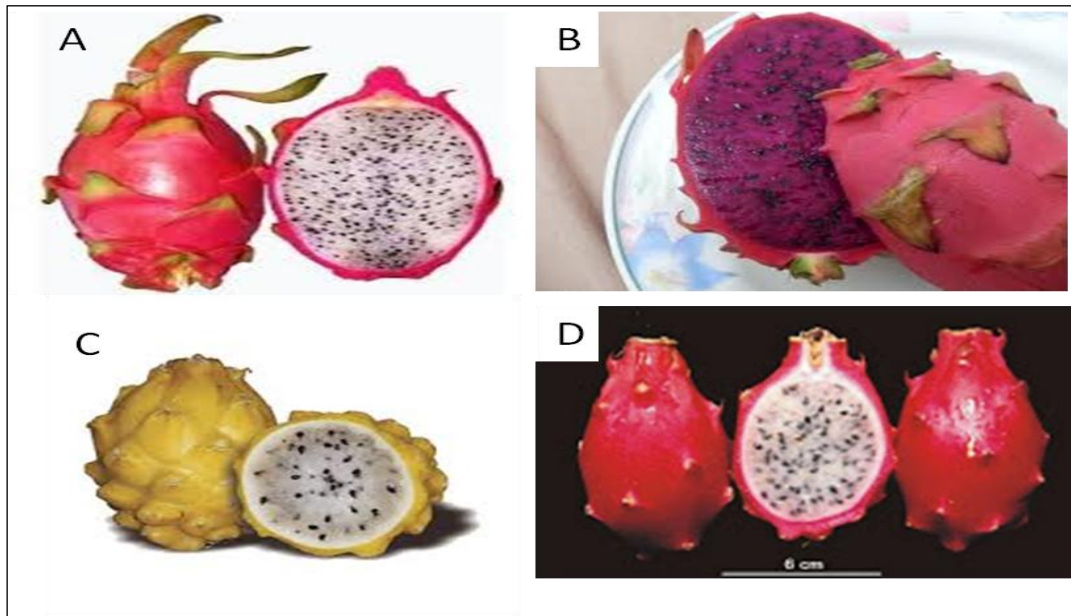
(BASTOS et al, 2006). Existem diversos plantios distribuídos no Brasil, sendo alguns desses na região da Chapada do Apodí, nos municípios de Limoeiro do Norte e Quixeré, estado do Ceará, totalizando aproximadamente 15 hectares da cultura, onde as plantas produzem frutos o ano inteiro, com pequeno decréscimo nos meses mais chuvosos, que geralmente vão de janeiro a abril, e a produção é comercializada nas principais redes de supermercados de Fortaleza, capital do Estado, a preços elevados.

A pitaya é uma das principais alternativas para diversificação da propriedade rural e aumento de renda do produtor. Apesar do elevado custo de implantação do pomar, os preços cotados para a pitaya têm sido um atrativo para potenciais produtores, especialmente no mercado internacional, onde a fruta pode atingir US\$ 22,00/kg nos EUA e € 19,90/kg na Alemanha, embora no Brasil o valor máximo de R\$ 60,00/kg também seja um atrativo (OLIVEIRA et al, 2006).

A planta que produz a fruta denominada pitaya é uma cactácea originada da América Tropical e Subtropical e pertence ao grupo de frutíferas consideradas promissoras para cultivo. Até há pouco tempo, essas frutíferas eram desconhecidas e, recentemente, representam um crescente nicho no mercado de frutas exóticas. No Brasil, essas frutas são procuradas, não só pelo exotismo da aparência e sabor, como também por suas características organolépticas (OLIVEIRA et al, 2006).

A pitaya é uma fruta rústica, pertencente à família *Cactaceae*, sendo conhecida mundialmente como "Fruta-do-Dragão". De acordo com a espécie, seus frutos podem apresentar características diversificadas, como formato, presença de espinhos, cor da casca e da polpa, refletindo em alta variabilidade genética (JUNQUEIRA et al, 2007).

De acordo com Le Bellec, Vaillant & Imbert (2006) a pitaya pode ser agrupada em quatro gêneros botânicos: *Stenocereus* Briton & Rose, *Cereus* MILL., *Selenicereus* (A. Beger) Riccob e *Hylocereus* Briton & Rose. A variabilidade das espécies está relacionada, principalmente, com o tamanho e coloração dos frutos e tempo de produção (MARQUES, 2010). As espécies mais encontradas e comercializadas são: *Selenicereus megalanthus*, pitaia amarela de polpa branca, conhecida como "pitaia colombiana" (Figura 4C); *Hylocereus polyrhzius*, pitaia de casca e polpa vermelha (Figura 4B); *Hylocereus undatus*, pitaia vermelha de polpa branca (Figura 4A) (DONADIO, 2009). A espécie *Selenicereus setaceus*, também conhecida como pitaia do cerrado, é comumente encontrada no Brasil, apresenta frutos pequenos com espinhos (Figura 4D) (JUNQUEIRA, 2002).



Fonte: Moreira et al. (2011).

Figura 4. Aspecto do fruto e da polpa da pitáia branca (*Hylocereus undatus*) (A); pitáia de polpa e casca vermelha (*Hylocereus polyrhizius*) (B); pitáia amarela (*Selenicereus megalanthus*) (C) e pitáia do cerrado (*Selenicereus setaceus*) (D).

No Brasil é comum serem encontradas, em estágio nativo no Cerrado e Caatinga nas espécies do gênero *Selenicereus* e *Hylocereus*. As espécies de pitaya mais cultivadas no mundo são a pitaya de casca vermelha (*Hylocereus undatus*) e a de casca amarela (*Selenicereus megalanthus*) (MIZRAHI et al, 1997; NERD et al, 2002).

Apesar de ser uma fruta rústica, que se aclimata com facilidade, requer uma adubação rica em matéria orgânica e nutrientes, tais como nitrogênio, potássio e fósforo (ORTIZ-HERNANDEZ, 2000). O nitrogênio é requerido durante o crescimento vegetativo até o pré-florescimento por estimular a emissão de raízes e brotações (LUDERS et al, 2004), o potássio está relacionado à translocação de carboidratos e regulação da abertura e fechamento dos estômatos (MARENCO; LOPES, 2011; DUARTE, 2013) e o fósforo é necessário para a formação do fruto (MARENCO; LOPES, 2011).

O fruto da pitáia é uma baya, tamanho médio, formato globuloso e subglobuloso, apresentando coloração externa verde quando imatura e amarela ou vermelha quando madura. O fruto é coberto por brácteas e algumas espécies apresentam espinhos em sua casca (NERD; MIZRAHI, 1999). A polpa apresenta cores que variam do vermelho-

púrpura brilhante ao branco, com inúmeras sementes escuras comestíveis que se encontram distribuídas por toda a polpa. A colheita do fruto, geralmente, ocorre quando atinge a maturação completa em torno de 30 a 35 dias após a antese (abertura da flor) (CANTO, 1993).

Do ponto de vista nutricional (Tabela 3) a pitáia (*Hylocereus sp.*) não apresenta um conteúdo diferenciado se compararmos com outras frutas, principalmente com frutas tropicais, mas se destaca com sabor e textura de polpa com sua grande quantidade de sementes, lembrando um pouco o kiwi (*Actinidia deliciosa*) e as especulações sobre seu conteúdo de compostos bioativos.

Contém muita umidade, poucos lipídios, e juntamente com outros alimentos, podem auxiliar para uma dieta equilibrada nutricionalmente, mas o que chama a atenção para inúmeros estudos é a quantidade de compostos bioativos, principalmente pigmentos e compostos fenólicos, geralmente relacionado com a defesa do vegetal.

Esses compostos bioativos, tais como vitaminas, compostos fenólicos e pigmentos, são em sua maioria metabólitos secundários, que geralmente, estão relacionados com os sistemas de defesa das plantas contra a radiação ultravioleta ou as agressões de insetos ou patógenos, mas que nos seres humanos, em baixas concentrações, desempenham um importante papel de proteção como agentes antioxidantes, capazes de retardar ou inibir a oxidação de diversos substratos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000; MANACH et al, 2004). Os compostos fenólicos estão entre as mais difundidas classes de metabólitos secundários, sendo conhecidos pela sua grande importância no sistema de defesa das plantas, onde a maioria dos estudos relaciona esses compostos com estresse metabólico, parede celular e exsudatos de raízes e sementes (MANACH et al, 2004). Os compostos fenólicos fazem parte da composição de pigmentos das flores, agindo na proteção constitutiva contra pragas, funcionam como moléculas sinais e atuam como compostos alelopáticos, sendo componentes estruturais e funcionais da matéria orgânica do solo (SIQUEIRA et al, 1991) e que nos organismos vivos atuam como quelantes de metais de transição. Nestes pigmentos naturais encontram-se os do grupo dos flavonoides, carotenoides e antocianinas que proporcionam uma alta capacidade antioxidante (RICE-EVANS, 1996).

Dentre os pigmentos presentes nas pitayas encontram-se as betalaínas, que são compostos N-heterocíclicos solúveis em água, localizados principalmente nos vacúolos das plantas. As betalaínas se dividem em dois grupos distintos, as betacianinas e

betaxantinas (WYBRANIEC et al, 2007; CAI et al. 2005). As betacianinas apresentam geralmente cor vermelho-púrpura e as betaxantinas cor amarelo-alaranjado, e compõem diferentes cores em flores e frutos. Dentre suas propriedades funcionais, as betalainas são identificadas como um forte antioxidante natural (STRACK et al, 2003; TESORIERE et al, 2004; NETZEL et al, 2005).

Tabela 3. Componentes nutricionais encontrados em 100g de polpa de pitaya vermelha (*H. polyrhizus*).

Umidade	85,52 ¹ g
Proteína	1,06 ¹ g
Carboidratos	12,34 ¹ g
Lipídios	0,21g- 0,61 ² g
Fibra Bruta	0,34 ¹ g
Cinzas	0,36 ¹ g
Ácido Ascórbico (Vitamina C)	0,009 ² g

¹ OLIVEIRA et al. (2010); ² JAAFAR et al. (2009).

Assim como ocorre com outras frutas provenientes de cactos, a pitaya tem propriedades que ajudam o processo digestivo. As pitayas têm uma grande quantidade de pigmentos vermelhos do grupo das betalainas, compostos estes com propriedades antioxidantes e que estão associados a menor incidência de câncer e ataques cardíacos. Vários estudos recentes têm demonstrado os efeitos plurifarmacológicos (bactericida, antiviral, antialérgico, antitrombótico, anti-inflamatório, anticarcinogênico, hepatoprotetor, vasodilatador), despertando grande interesse principalmente por sua alta prevalência nas dietas, já que são compostos onipresentes nos vegetais (CHEYNIER, 2005; SOOBRAATTEE et al, 2005).

Estudos mostraram que o extrato de polpa de pitaya vermelha, maçã e manga apresentaram maior atividade antioxidante comparado às cascas, sendo a quantidade de compostos bioativos associados à elevada atividade antioxidante (WU et al, 2006;. KIM et al, 2010).

Como a pitaya encontra-se entre as frutíferas tropicais pouco conhecidas, porém com elevado potencial para os mercados interno e externo, deve haver intensificação das pesquisas, visando principalmente à obtenção de informações sobre os compostos bioativos presentes nessa fruta, para que as mesmas informem a população em geral sobre a utilização da pitaya na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, tais

como câncer, entre outras. Os trabalhos desenvolvidos no Brasil com a pitaya ainda são incipientes. Portanto, há necessidade de estudos sobre a determinação de compostos bioativos presentes nessa fruta, que forneçam a população em geral informações sobre a utilização dessa fruta na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, tais como câncer, entre outras.

Uma abordagem completa sobre a atividade biológica de extratos de pitaya em modelos de câncer deve envolver o estudo da sua biodisponibilidade, englobando a absorção e metabolismo, junto com os mecanismos de ativação dos compostos em questão. Atualmente, somente uma pequena parte dos estudos foi adequadamente estudada neste ponto de vista.

Algumas frutas vêm sendo descobertas recentemente como uma alternativa aos cultivos tradicionais que estão sofrendo, não apenas a perda de competitividade e rentabilidade, como também em algumas regiões as opções produtivas nas zonas rurais estão se extinguindo e se restringindo. No entanto, existe uma variedade de produtos agrícolas cujo conhecimento é limitado e seus níveis de produção e consumo são comparativamente modestos podendo ser chamados de comercialmente não tradicionais, os quais podem ser definidos como o conjunto de produtos agrícolas nativos ou exóticos, de uma determinada região manifestada pela rica biodiversidade e que são pouco conhecidos nos mercados pelos consumidores.

Nesse contexto, a pitaya assume destaque no cenário das frutas exóticas devido ao seu sabor doce e diferenciado e o alto valor nutricional e funcional. Isso desperta o grande interesse do mercado consumidor, tanto interno quanto externo, em consumir esta fruta exótica. Isso é interessante, principalmente, para os produtores que visando o lucro podem faturar com o quilo da fruta que varia de dez a oitenta reais. Mediante o potencial da pitaya para a fruticultura não convencional brasileira e a necessidade de disponibilizar informações científicas e técnicas aos produtores, é útil a intensificação das pesquisas para que se possa obter um vasto conhecimento em relação ao presente assunto.

2.4. COMPOSTOS BIOATIVOS X CÂNCER

O consumo de compostos bioativos, presentes em frutas e vegetais, auxilia na prevenção de processos degenerativos diminuindo a incidência e a taxa de mortalidade por câncer ou doenças cardiovasculares, por exemplo. A prevenção que as frutas e os

vegetais promovem contra estas patologias tem sido atribuída à ação de antioxidantes presentes nestes alimentos (YEN et al, 2001).

O câncer, inclusive o de mama, é uma doença complexa causada por um acúmulo progressivo de mutações genéticas múltiplas, combinada a outros fatores. O Instituto Nacional de Câncer (INCA) mostrou que a incidência do câncer de mama tem aumentado com a urbanização que é caracterizada pelo aumento do consumo de alimentos industrializados, redução da atividade física e mudanças no comportamento reprodutivo. Estudos evidenciam também a associação do câncer de mama com o excesso de peso corporal (COOPER, 1993; GREENWALD et al, 2001). Isso sugere a importância da alimentação na prevenção desse processo patológico. Tendo em vista que, o câncer de mama é um problema de saúde mundial, a melhoria nos protocolos de tratamento e prevenção é de extrema importância.

Atualmente, grande atenção tem sido dada a estratégias preventivas e, neste contexto, a utilização de alimentos funcionais com compostos quimiopreventivos parece contribuir muito neste processo, atuando com mecanismos de ação anti-carcinogênicos, antioxidantes, antiinflamatórios, antiangiogênicos (PALOZZA et al, 2002; NAZARIAN et al, 2010).

A pitaya têm recentemente atraído muita atenção, não só por causa da sua notável cor e valor econômico, mas também pelas suas propriedades fisiológicas (LI et al, 2003; CHEN; HE, 2007). Alguns autores relataram diversos benefícios à saúde, incluindo a quimioprevenção do câncer, ação anti-inflamatória e efeitos antidiabéticos, com redução no risco da mortalidade de doenças cardiovasculares (STINTZING et al, 2002; COS et al, 2004), bem como propriedades antioxidantes conferidas pelo seu conteúdo de betacianina (WYBRANICE; MIZRAHI, 2002).

A capacidade de um composto ou alimento em inibir a proliferação das células cancerígenas é um fator desejável na progressão do câncer. A função de nutrientes antioxidantes na etiologia do câncer continua em discussão, visto que estes nutrientes possuem importante função estrutural e atuam como cofatores de diversas enzimas (BARGELLINI et al, 2003). Asmah et al (2008) relataram que as polpas de *H. polyrhizus* (pitaya vermelha) e *H. undatus* (pitaya branca) são ricas em polifenóis e apresentam elevado potencial antioxidante. Somado a isso, demonstraram que o extrato etanólico da polpa de pitaya vermelha mostrou-se um promissor antioxidante, com efeitos anti-proliferativos na linhagem HeLa (linhagem de adenocarcinoma humano de

câncer cervical). Outro estudo mostrou ainda que a pitaya vermelha mostrou citotoxicidade em células metastáticas de câncer bucal (MENON et al, 1995).

Diferenças de atividade antiproliferativa podem ainda variar dependendo da forma de utilização do alimento e das partes utilizadas no preparo dos extratos potencialmente bioativos. Extratos da polpa de pitaya branca e vermelha mostraram elevada atividade antiproliferativa nas linhagens de câncer AGS (carcinoma humano gástrico) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), sendo estes efeitos superiores à casca. Neste estudo, observou-se uma correlação direta entre o conteúdo fenólico e o efeito antioxidante dos extratos, mas não foi observada correlação entre a atividade antioxidante e atividade antiproliferativa. (KIM et al, 2010)

Outro estudo revelou que componentes da casca da pitaya apresentaram forte inibição na proliferação de células cancerosas de melanoma (B16F10), sendo este efeito maior para a polpa quando comparado à casca. Os resultados indicaram que a polpa e a casca eram ricos em polifenóis e boas fontes de compostos antioxidantes (WU et al, 2006). Estes resultados sugerem que tanto a polpa como a casca, da pitaya branca e vermelha, podem ser ingredientes úteis nas áreas de alimentos, cosmética, aplicações nutracêuticas, e farmacêutica.

Uma sequência programada de acontecimentos leva à eliminação de células sem causar danos adjacentes aos tecidos, sendo o processo de apoptose o responsável por manter as células saudáveis, eliminando o excesso ou células anormais. Alterações na coordenação desse tipo de morte celular estão implicadas na tumorigênese. Apesar da enorme variabilidade do câncer, evidências demonstram que a resistência à apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos. A apoptose na prática clínica é alvo para um potencial uso terapêutico da morte celular programada ou para a compreensão dos mecanismos de resistência à radioterapia e à quimioterapia (GRIVICICH et al, 2007).

Muitas são as moléculas envolvidas no controle das vias de ativação da apoptose, dentre estas, as proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas, além das caspases. As caspases (cysteine-dependent aspartate-specific proteases) pertencem à família das cisteínas proteases (possuem uma cisteína no sítio ativo) que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato. As caspases sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos. São conhecidas 14 caspases humanas, sendo

que seis (caspases -3, -6, -7, -8, -9, -10) participam da apoptose. As caspases -1, -4, -5, -11, -12, -13, -14 estão envolvidas na maturação de citoquinas, e sua contribuição na apoptose permanece não esclarecida (BOATRIGT; SALVESEN, 2003).

Caspases promovem apoptose por: (a) indução de enzimas destrutivas, como DNases; (b) liberação de citocromo C via Bcl-2 proteínas da família; e (c) destruição das principais proteínas estruturais e regulatórias (SLEE et al, 2001).

O extrato etanólico de antocianinas, substâncias presentes na pitaya, mostrou induzir apoptose significativamente em células de ratos epiteliais esofágicas neoplásicas junto ao aumento da expressão de caspases 3 e 7. Estes dados estão de acordo com outros estudos, indicando que a indução de apoptose é um mecanismo de ação potencial quimiopreventivo (HOU et al, 2004; LAZZE et al, 2004).

O controle do ciclo celular é um dos outros fatores determinantes nos processos de desenvolvimento de células, diferenciação celular e tumorigênese. As células cancerosas normalmente perdem a capacidade de regular o ciclo celular e de controlar seu índice de proliferação. Um passo limitante no ciclo celular, que é frequentemente não regulado em células cancerosas, é a progressão de células pela primeira fase do ciclo (G1) (DIEHL et al, 2003).

Extratos de pitaya mostraram inibir significativamente o crescimento do câncer em células PC3 (câncer de próstata humano), Bcap-37 (câncer de mama humano), e MGC-803 (câncer gástrico humano). O trabalho também mostrou a alta capacidade antioxidante do extrato (LUO et al, 2014).

Um dos grandes desafios na prevenção e tratamento do câncer de mama é a descrição dos mecanismos de ação destes compostos bioativos, visto que carcinomas de mama com respostas negativas a receptores de estrogênio não respondem à terapia hormonal, fazendo com que o seu tratamento eficaz seja muito difícil (ESHRE, 2004). Uma das estratégias é ativação de uma ou mais vias de ação nas células cancerosas como forma de garantir uma resposta mais efetiva destes compostos no tecido tumoral. Estudos recentes relataram estudar a ação de antocianinas sobre os ativadores dos receptores proliferadores dos peroximas γ (PPAR γ), como um potencial alvo para a prevenção e tratamento do câncer em humanos. Vários estudos têm sugerido que as antocianinas presentes em extratos botânicos podem modificar o metabolismo da glicose e dos lipídeos com aumento de transcrição dos PPARs levando a uma redução de fatores de risco para diabetes, doenças cardíacas e câncer (PANIGRAHY et al, 2002; OSAWA et al, 2003).

Os trabalhos desenvolvidos no Brasil e no mundo com a pitaya ainda são escassos, tendo sua participação como alimento funcional ainda limitada. Portanto, há necessidade de mais estudos sobre a utilização dessa fruta na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, tais como câncer.

2.5. CÂNCER DE MAMA

O termo “câncer” é utilizado para designar um conjunto de mais de 100 doenças comumente caracterizadas pelo crescimento descontrolado e pela proliferação de células anormais (INCA/MS, 2013).

Acredita-se que o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas sejam responsáveis por determinar a progressão de células normais, através de estágios hiperplásicos e displásicos, em um câncer invasivo e, finalmente, em uma doença metastática (GARNIS et al, 2004).

O câncer de mama é a neoplasia mais comum entre as mulheres e a forma mais letal para o sexo feminino, sendo a causa mais frequente de morte associada ao câncer em mulheres no mundo (BRISKEN; O’MALLEY, 2010; OMS, 2013).

Dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), válidos para o ano de 2014, estimam incidência de aproximadamente 580 mil novos casos de câncer. Destes, são esperados 57.120 casos de câncer da mama.

A carcinogênese mamária é caracterizada por vários estágios, incluindo imortalidade celular, hiperplasia, tumorigenicidade e invasividade (MEDINA, 1996). Os eventos que conduzem à malignidade levam a mudanças nos processos celulares, como proliferação celular, apoptose e angiogênese, resultando na aquisição de fenótipo maligno (GALVÃO et al, 2011).

As primeiras lesões estruturalmente evidentes constituem as hiperplasias intraductais, nas quais o epitélio apresenta alterações em sua estrutura, mas não atipia citológica, contendo poucas alterações genéticas. Tais hiperplasias avançam a um estado de atipia celular e oclusão dos ductos, resultando em um carcinoma intraductal *in situ* (CIS). Neste, a atipia é mais evidente e há um aumento significativo da atividade mitótica epitelial e das alterações genéticas. O processo progride a carcinoma localmente invasivo (CI), no qual a membrana basal é rompida e as células epiteliais invadem o estroma circundante, com possibilidade de metástase para vários órgãos, como pulmões, ossos e fígado (TLSTY et al, 2004).

No câncer de mama não é o tumor primário que causa a morte das pacientes, mas sim a distribuição de células tumorais à distância, as chamadas metástases (WEIGELT et al, 2005). Os principais alvos de metástase nesse tipo de câncer são os ossos, pulmões, fígado e cérebro. Portanto, estes órgãos, quando acometidos, são responsáveis pela alta taxa de mortalidade (ARTACHO-CORDÓN et al, 2012). Ainda não é possível avaliar o risco de metástases, e por causa disso, mais de 80% das pacientes com câncer de mama recebem terapia adjuvante. No entanto, 40% destas apresentam recidiva e morte em decorrência das metástases (WEIGELT et al, 2005).

As taxas de incidência de câncer de mama também são influenciadas, dentre outros fatores, pelo gênero, idade, história reprodutiva da mulher, predisposição genética (mutações nos genes BRCA1 e BRCA2), doença benigna prévia, estilo de vida e exposição da mama à radiação (TRICHOPOULOS et al, 2008). Mulheres que apresentam mutação nos genes BRCA1 e BRCA2 têm 85% de chance de desenvolver câncer de mama antes dos 70 anos de idade (INCA, 2010). De fato, as taxas de incidência de câncer de mama aumentam rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, o mesmo se dá de forma mais lenta. Essa mudança no comportamento desta taxa é conhecida na literatura como "*Clemmesen's hook*" e tem sido atribuída ao início da menopausa. Alguns estudos apontam para dois tipos de câncer de mama relacionados com a idade: o primeiro tipo, que acomete 90% dos tumores, ocorre na idade da pré-menopausa e é caracterizado por ser mais agressivo e negativo para o receptor de estrogênio (RE), isto é, que não depende do RE para o crescimento das células. O segundo, ocorre na idade da pós-menopausa e apresenta-se RE-positivo, podendo ser efetivamente tratado por inibição da função do RE, uma vez que RE é importante para o crescimento dessas células. As variações morfológicas dos tumores também estão relacionadas ao RE, como por exemplo, os carcinomas medulares são RE -negativos, enquanto que os carcinomas tubulares e lobulares apresentam um fenótipo ER-positivo. Com relação aos carcinomas medulares, pode-se dizer ainda que eles estão associados às mutações no gene *BRCA1* e são mais frequentes em populações de baixo risco, como as japonesas. Por outro lado, os carcinomas tubulares e lobulares têm associação com as mutações do gene *BRCA2* e são mais comuns em populações de alto risco, como a dos Estados Unidos (INCA, 2010; CHAN et al, 2008).

O câncer é uma doença originada a partir de três fatores preponderantes: os fatores ambientais, fatores hereditários e a pré-disposição genética (quando há um risco mais elevado para o familiar de um doente desenvolver a doença, do que para a

população em geral) (NIGRO et al, 1989). Contudo, alguns estágios devem ser percorridos até que o câncer se instale, destacando-se a indução, promoção e progressão. O estágio da “indução” é caracterizado pela instabilidade genômica que leva a lesão no DNA, podendo induzir a mutações. Essa alteração genômica ocorre por vários fatores, dentre eles: rearranjos cromossômicos, radiação ultravioleta, agentes químicos e vírus oncogênicos. Todos estes fatores poderão gerar uma mudança irreversível do genótipo da célula normal progenitora, produzindo uma célula “iniciada”. O segundo estágio consiste na ativação de oncogenes ou inibição de genes supressores do tumor e é denominado “promoção”. Um exemplo é o do gene *p53* que na sua forma não mutada é um gene supressor de tumor e as células neste estágio são denominadas “transformadas” (NIGRO et al, 1989). Embora o surgimento do câncer ocorre quando a célula perde o controle no seu processo de multiplicação passando a fazê-la de forma desordenada e acelerada, o motivo pelo qual a célula perde o equilíbrio no seu desenvolvimento ainda não está totalmente esclarecido (WEINBERG, 2008). O último estágio da carcinogênese é chamado de “progressão”, onde há mudanças do microambiente celular com o objetivo de manter o processo maligno e a capacidade de gerar metástases. Durante esta fase, são geradas condições para o crescimento das células imortalizadas, tais como produção de fatores de crescimento e citocinas (PETÉN et al, 1990).

Duas teorias tentam explicar a origem dos carcinomas mamários. Em uma delas, o câncer de mama têm sua origem em uma célula única do epitélio glandular mamário que adquire uma ou mais mutações em genes que controlam programas essenciais, como proliferação, morte e diferenciação celular. Por apresentar vantagem seletiva, a célula transformada é selecionada e passa por uma expansão clonal, sendo que cada uma de suas células-filha tem o potencial de adquirir novas alterações moleculares. A progressão da neoplasia continua até a formação de uma massa tumoral com assinatura de expressão gênica específica. Os sucessivos eventos de alteração molecular, seleção e expansão clonal levam a um acúmulo de modificações genéticas e epigenéticas, induzindo a progressão tumoral (AXELROD et al, 2006).

No modelo da célula-tronco de câncer (cancer stem cell - CSC), os tumores são organizados em uma hierarquia celular em que as células-tronco são as únicas células com potencial de proliferação ilimitada e com a capacidade de impulsionar o crescimento e progressão tumoral. Segundo esse modelo, os cânceres se originam a partir da transformação maligna de uma célula-tronco adulta. Isto leva a expansão

clonal das células progenitoras que sofrem outras alterações genéticas e/ou epigenéticas para se tornarem totalmente transformadas. Dessa forma, os tumores contêm um componente celular que retêm as propriedades fundamentais de células-tronco que iniciam e conduzem a carcinogênese (CHARAFE-JAUFFRET et al, 2009).

As hiperplasias epiteliais de mama são caracterizadas pela proliferação de células epiteliais para o interior de ductos ou lóbulos mamários e são classificadas com base no padrão citológico e de crescimento arquitetural das células. Os mais incidentes são o do tipo ductal, o qual corresponde a cerca de 80% dos tumores diagnosticados, e os lobulares, com aproximadamente 15% (BOMBONATI; SGROI, 2011).

O carcinoma de mama in situ constitui um conjunto de lesões da mama caracterizado pela proliferação epitelial maligna restrita aos ductos ou lóbulos mamários e, portanto, totalmente limitadas pela lâmina basal (SCHMITT; GOBBI, 2006). O grupo dos carcinomas invasivos é caracterizado por uma profunda heterogeneidade histomorfológica e clínica (BOMBONATI; SGROI, 2011) e inclui todos os carcinomas mamários que infiltram o estroma, independentemente da coexistência de componente in situ. O carcinoma ductal invasivo é o tipo mais frequente de câncer de mama e apresenta comportamento agressivo (SCHMITT; GOBBI, 2006).

O tratamento do câncer de mama sofreu várias mudanças nas últimas décadas devido à descoberta de biomarcadores específicos de diagnóstico e prognóstico que permitem a aplicação de terapias individualizadas para os diferentes subgrupos moleculares. Estes subgrupos mostram diferenças específicas em relação ao comportamento clínico-biológico (WEIGEL; DOWSETT, 2010). Alguns exemplos de genes envolvidos no processo da tumorigênese da mama e que são usados como marcadores moleculares de diagnóstico são os receptores de hormônios esteróides (receptor de estrogênio - RE e receptor de progesterona - RP), o oncogene ERBB2 e o gene supressor de tumor *p53* (o qual algumas vezes é denominado *Trp53* em camundongos ou *TP53* em humanos) (HARRIS, 1996).

O estrogênio é um hormônio esteroidal que atua como estímulo proliferativo em células normais dos órgãos proliferativos, sendo considerado um estimulante para a iniciação e promoção de tumores nestes órgãos (FABIAN; KIMLER, 2007). O grau de expressão do RE é, sem dúvida, o mais importante marcador molecular no câncer da mama, uma vez que fornece o índice de sensibilidade ao tratamento endócrino e está relacionado a uma variedade de características histológicas nesse tipo de câncer. Tumores de pacientes que apresentam RE positivo, os quais correspondem a cerca de

80% dos casos de câncer de mama, utilizam o hormônio estrógeno como o principal estímulo de crescimento. Por este motivo, o RE é alvo direto das terapias hormonais, sendo a ausência ou presença da sua expressão um ponto decisivo no tratamento (WEIGEL; DOWSETT, 2010). Sabe-se que boa parte das pacientes que apresentam resistência aos tratamentos adjuvantes se dá, em parte, pela inativação do gene que codifica para RE (ESR1) por metilação da sua região promotora. Este dado tem sido descrito para diferentes populações (MIRZA et al, 2009), inclusive em pacientes brasileiras (RAMOS et al, 2010).

O gene do RP (PGR) também tem papel fundamental da tumorigênese do câncer de mama promovendo a proliferação celular. Este receptor pode ser expresso tanto em tecidos normais quanto em neoplásicos (LIU et al, 2004). A perda de expressão de RP e RE constitui um potencial mecanismo de resistência à terapia hormonal e, em ambos os casos, a inativação da expressão desses genes por mecanismos epigenéticos tem um importante papel neste contexto (LIU et al, 2004; DUNNWALD et al, 2007).

O gene ERBB2 é altamente expresso em aproximadamente 20% a 25% dos carcinomas ductais de mama (COUTURIER et al, 2008) e codifica para a proteína denominada HER2. Em geral, mulheres com carcinoma invasivo HER2 positivo possuem uma doença mais agressiva, com pior prognóstico e maior probabilidade de recidiva, com sobrevida global menor quando comparadas com as mulheres HER2 negativas (HENRY; HAYES, 2006; WEIGEL; DOWSETT, 2010). Entretanto, a superexpressão de HER2 em tumores primários de mama beneficia as pacientes com a terapia anti-HER2 (WEIGEL; DOWSETT, 2010), que consiste no anticorpo monoclonal Herceptin® (trastuzumab) que se liga ao HER2, impedindo a sinalização de crescimento (CARTER et al, 1992).

O gene p53 apresenta-se mutado em 80% dos cânceres humanos, além de ser o gene mais frequentemente mutado. A p53 tem como função fisiológica a regulação do ciclo celular podendo promover a interrupção do mesmo ou a apoptose em resposta ao dano no DNA (YOUNG; ANDERSON, 2008). Nas células de cânceres, a p53 induz a apoptose pela via intrínseca associada à mitocôndria (CHEN et al, 2009). Além disso, a p53 tem um papel chave na regulação do consumo de glicose por induzir a ativação sistemática de muitas vias devido, por exemplo, ao aumento de transportadores de glicose, estimulando a glicólise, ou por afetar a biogênese mitocondrial (JOSEPH et al, 2004). Os efeitos da p53 na glicólise podem ser afetados pela proteína TIGAR (regulador da apoptose e da glicólise estimulado pela p53), a qual inibe o metabolismo

de glicose por diminuir os níveis de frutose 2,6- bifosfato na célula (BENSAAD et al, 2006). Entretanto, este efeito modulador negativo da glicólise somente acontece quando a *p53* não está mutada, ou seja, em aproximadamente 20% dos casos neoplásicos, como já descrito anteriormente.

Além dos oncogenes, uma outra característica de extrema relevância nos cânceres de mama, que são mais comuns em mulheres, é que estes podem ser triplamente negativo para o estrogênio receptor, deixando de expressar esses receptores ou o receptor ficando negativo. Esses receptores se ligam ao estrogênio, um hormônio ovariano, que promove a proliferação e o crescimento celular (MONROE et al, 2005). O estrogênio afeta o desenvolvimento e diferenciação da glândula mamária mediada por seus receptores (LINDBERG, 2010). Já foi demonstrado que cerca de 66% dos cânceres mamários expressam o receptor de estrogênio (RE). Os REs medeiam as ações do estrogênio, aumentando a transcrição de genes ou diretamente através da ligação aos elementos do DNA responsivos ao estrogênio (EREs) nas regiões de controle do estrogênio (ou SERM) dos genes alvos ou através de precursores alternativos envolvendo interações reguladoras com a transcrição de outros fatores (MONROE et al, 2005; LINDBERG, 2010). Há dois tipos de RE: o RE α e o RE β . A proliferação e a progressão do câncer de mama são conduzidas por RE α e a maioria das células, pelo menos inicialmente, expressam este receptor. Ao contrário, o RE β não está relacionado com a tumorigênese e sua ausência pode afetar o desenvolvimento da glândula mamária. A expressão de RE β está associada com tumores menos invasivos e proliferativos (LINDBERG et al, 2010). As linhagens de câncer de mama podem ser agrupadas em RE α -positivas e RE α -negativas. O grupo RE α -positivo (que engloba a linhagem celular MCF-7) pode ser efetivamente tratado pela inibição da função do RE α , como pelo tamoxifeno. Já o grupo RE α -negativo (que engloba a linhagem MDA-MB-435) é altamente invasivo, sendo resistente ao tratamento baseado em antagonistas de RE α (CHAN et al, 2008, LINDBERG et al, 2010).

Somando-se os fatores já citados e devido ao seu estágio avançado de desenvolvimento e suas propriedades metastáticas, o carcinoma mamário é considerado um tumor humano de crescimento acelerado (PEDERSEN, 1978; ZU; GUPPY, 2004). A grande maioria das linhagens tumorais que apresentam um crescimento rápido possui um metabolismo energético notavelmente modificado se comparadas com os tecidos de origem, como observado em tumores das glândulas mamárias (MCF-7, MDA-MB-435, MDA-MB-231) (MAZUREK et al, 1997).

As linhagens utilizadas no trabalho são derivadas de carcinoma de mama. A linhagem MDA-MB-435 não expressa receptores hormonais, apresenta alto potencial metastático e alta tumorigenicidade. Esta linhagem tem morfologia estrelada e é considerada célula epitelial mesenquimal (LACROIX et al, 2004) (Figura 5).

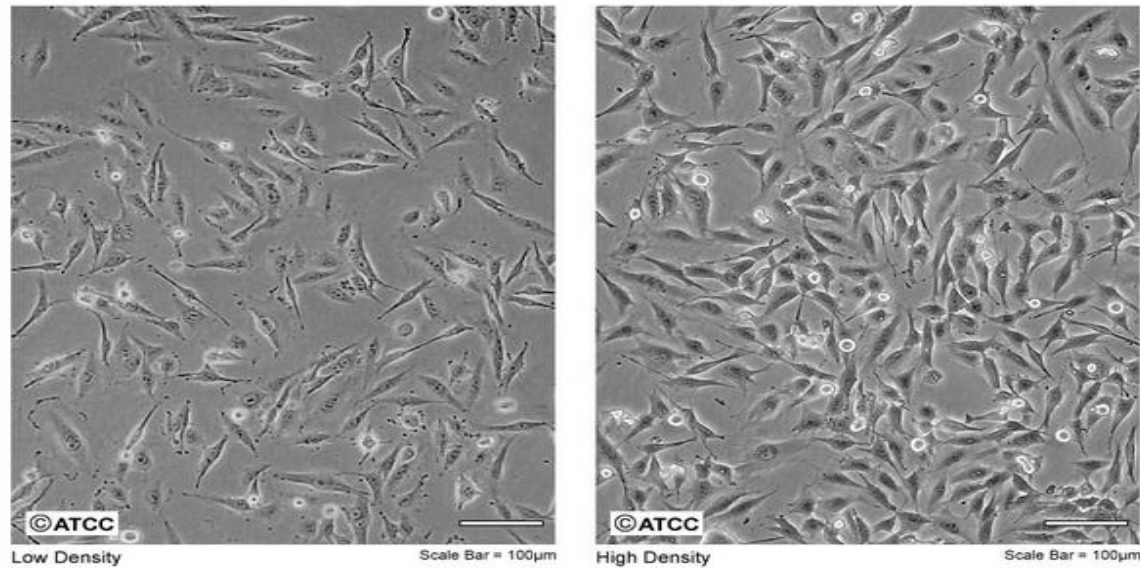


Figura 5. Imagem microscópica das células MDA-MB-435 em baixa e alta densidade (Adaptado de American Type Culture Collection - ATCC).

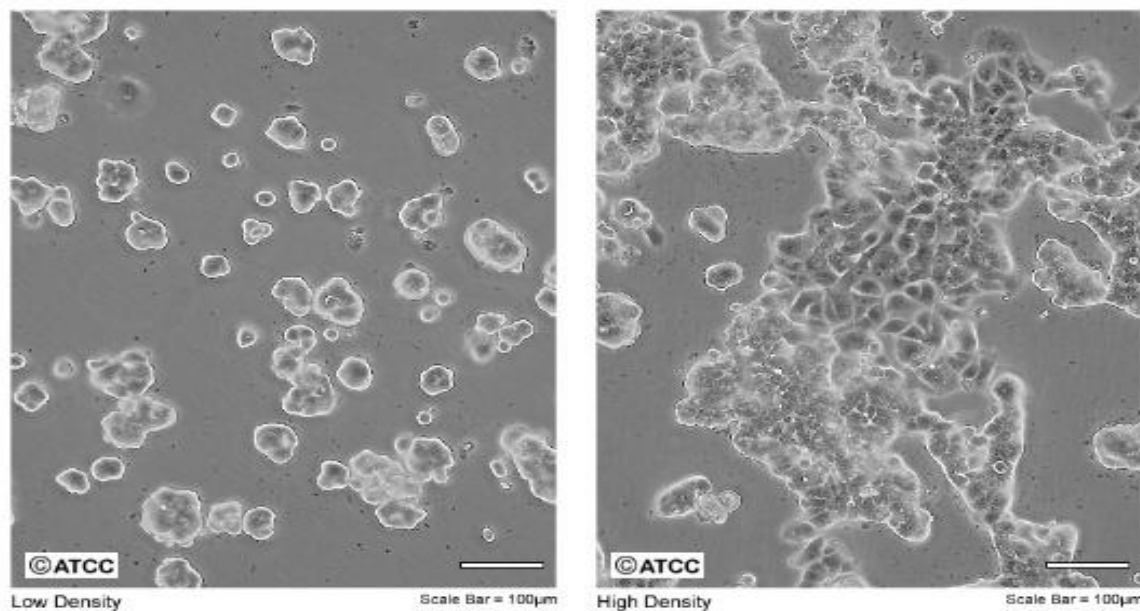


Figura 6. Imagem microscópica das células MCF-7 em baixa e alta densidade (Adaptado de American Type Culture Collection - ATCC).

A linhagem celular epitelial MCF-7 apresenta receptores de estrogênio e progesterona e baixo potencial metastático. No tratamento de um tumor maligno sensível a hormônios, se o receptor é bloqueado, o crescimento celular pode ser inibido (ALKHALAF, 2003). Esta linhagem tem morfologia fusiforme e são consideradas luminais (LACROIX et al, 2004) (Figura 6).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral:

O presente trabalho tem como objetivo a obtenção de extrato de pitaya e a avaliação da sua atividade antioxidante e antitumoral em linhagens celulares humanas de câncer de mama.

3.2. Específicos:

1 – Produzir extrato de casca e polpa de pitaya e avaliar a atividade antioxidante da fruta e do extrato produzido.

2 - Avaliar o efeito do extrato de pitaya sobre a proliferação das linhagens MDA-MB- 435 e MCF-7 em diferentes tempos de incubação.

3 – Verificar o efeito do extrato de pitaya no ciclo celular das linhagens MDA-MB-435 e MCF-7.

4 - Avaliar os efeitos do extrato de pitaya sobre o processo de morte celular em linhagens cancerosas humanas de mama.

5- Avaliar se o extrato de pitaya regula a expressão de receptores hormonais e de oncogenes em modelos *in vitro* de linhagens de câncer de mama.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção das amostras

As amostras de frutas in natura de pitaya foram obtidas diretamente de um produtor de Petrópolis, no Rio de Janeiro. Foram colhidos manualmente e cuidadosamente transportados sob refrigeração (4°C) para o Laboratório de Bioquímica Nutricional da Faculdade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO. No laboratório, os frutos foram higienizados e as partes deterioradas foram removidas e descartadas, e em seguida foram cortados transversalmente em três partes para a remoção da polpa, casca e semente.

4.2. Preparo dos Extratos

Os extratos da fruta in natura foram obtidos a partir de 2g de amostra (polpa e casca de pitaya vermelha) com a adição de 10mL de etanol absoluto P.A. e homogeneização em vórtex por aproximadamente 2 minutos. Após esta etapa, a solução foi colocada em banho com agitação durante 60 minutos. Em seguida, as amostras foram filtradas a vácuo com papel de filtro quantitativo e avolumadas em balões volumétricos de 25 ml com água destilada. Os filtrados foram acondicionados em tubos de ensaio para posteriores análises.

O extrato liofilizado de pitaya foi preparado conforme metodologia adaptada descrita por Rocha et al (2007). Foi obtido a partir de 50g de amostra (polpa de pitaya), com a adição de 50 ml de etanol, e avolumada em balão volumétrico de 100 ml com água destilada. Após esta etapa, houve a homogeneização em vórtex por aproximadamente 2 minutos e posteriormente sofreu agitação por meio de banho com agitação durante 60 minutos. A solução foi filtrada à vácuo com papel de filtro quantitativo Whatman n°. 1 e colocada em um balão para a etapa de retirada completa do solvente em rotaevaporador (Marconi®) a 60° C por 2 horas. Após o procedimento, o material foi congelado a 0°C por 24 horas. Posteriormente, seguiu para o liofilizador, no qual permaneceu por 72 horas. Em seguida, foi acondicionado em frasco âmbar e congelado à -20°C, para posteriores análises.

4.3. Determinação de antocianinas

A determinação de antocianinas totais seguiu a metodologia de Lees & Francis (1972). Pesou-se 1 g de polpa, casca e extrato produzido em um Becker envolto com

papel alumínio, transferindo em seguida às amostras para um balão volumétrico de 50 ml (sem filtrar) e aferiu-se o volume com a solução extratora (solução de etanol 95% + HCL 1,5N previamente preparada (85:15)). O balão foi envolvido com papel alumínio e após permanecer por 21 horas em refrigerador (4°C), o material foi filtrado para um Becker, envolto também com papel alumínio, lendo-se logo em seguida em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 535nm, com os resultados expressos em $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de amostra e calculados através da fórmula: fator de diluição x absorbância/98,2. O zero ou branco foi feito somente com a solução extratora (solução de etanol 95% + HCl 1,5N (85:15) (v/v)).

4.4. Determinação de compostos fenólicos totais

A análise de compostos fenólicos totais dos extratos foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton & Rossi (1965), utilizando o ácido gálico como padrão. A determinação foi realizada usando alíquotas de 0,1 mL a 1 mL dos extratos obtidos anteriormente, que foram transferidas para tubos de ensaio e adicionado 2,5 mL do reagente Folin Ciocalteu, diluído em água 1:10. A mistura permaneceu em repouso de 3 a 8 minutos. Em seguida foi adicionado 2 mL de carbonato de sódio 4% e os tubos deixados em repouso por 2 horas, ao abrigo da luz. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Turner TM®) a 760nm. Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições e os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente de ácido gálico, com base em uma curva de calibração de ácido gálico com concentrações variando de 5 a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4.5 Avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams et al (1995). O DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) é um radical livre estável que aceita um elétron ou um radical de hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável e, desta forma, é reduzido na presença de um antioxidante. Para avaliação da atividade antioxidante, os extratos de pitaya foram adicionados para reação com o radical estável DPPH em uma solução de metanol. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 515 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio arrancado de um composto antioxidante. A redução do radical do DPPH foi medida através da leitura da

absorbância a 515 nm em 100 min de reação. A atividade antioxidante foi expressa de acordo com a Equação 1 de Mensor *et al.* (2001), descrita abaixo:

$$\%AA = 100 - \{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100] / Abs_{controle}\}$$

4.6. Ensaio da Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio – ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity)

A extração e determinação da atividade antioxidante total pelo método ORAC seguiu a metodologia descrita por Ou *et al.* (2001), com modificações. Em um tubo *ependorf*, pesou-se 0,1g de polpa de pitaya liofilizada, adicionando-se 1ml de solução tampão fosfato (75mM, pH 7.4) . Para a realização das leituras, foram feitas diluições, de 10mg/ml, 5mg/ml, 2mg/ml, 1mg/ml e 0,5mg/ml , a partir da solução descrita acima de 100mg/ml em solução tampão fosfato.

A microplaca contendo a amostra foi incubada por 15 minutos a 37°C, antes da injeção automática do AAPH (2,2'-azinobis (2-amidinopropano) dihidroclorato). A fluorescência foi medida imediatamente após a adição do AAPH e as medições foram então monitoradas a cada 5 min até que a intensidade relativa de fluorescência (FI%) fosse inferior a 5% do valor inicial da leitura. Diante disso, o tempo de leitura das amostras foi de 147 minutos, utilizando o programa Wallac 1420 do equipamento espectro fluorímetro *VICTOR multilabel contador* (Perkin-Elmer, EUA), com filtros de fluorescência para uma excitação com comprimento de onda de 485 nm e um comprimento de onda de emissão de 535nm. As medidas foram realizadas em triplicatas.

Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 100 µL do branco (Tampão fosfato), de cada concentração da curva do padrão Trolox (5 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM e 160 µM) de cada diluição da amostra, para uma microplaca preta de 96 poços, colocando-se cada concentração em um poço distinto, em ordem crescente de concentração e no sentido em que o equipamento realizava as leituras, conforme a Figura 7. Foram utilizadas três repetições para o branco, para cada concentração da curva e para cada concentração da amostra.

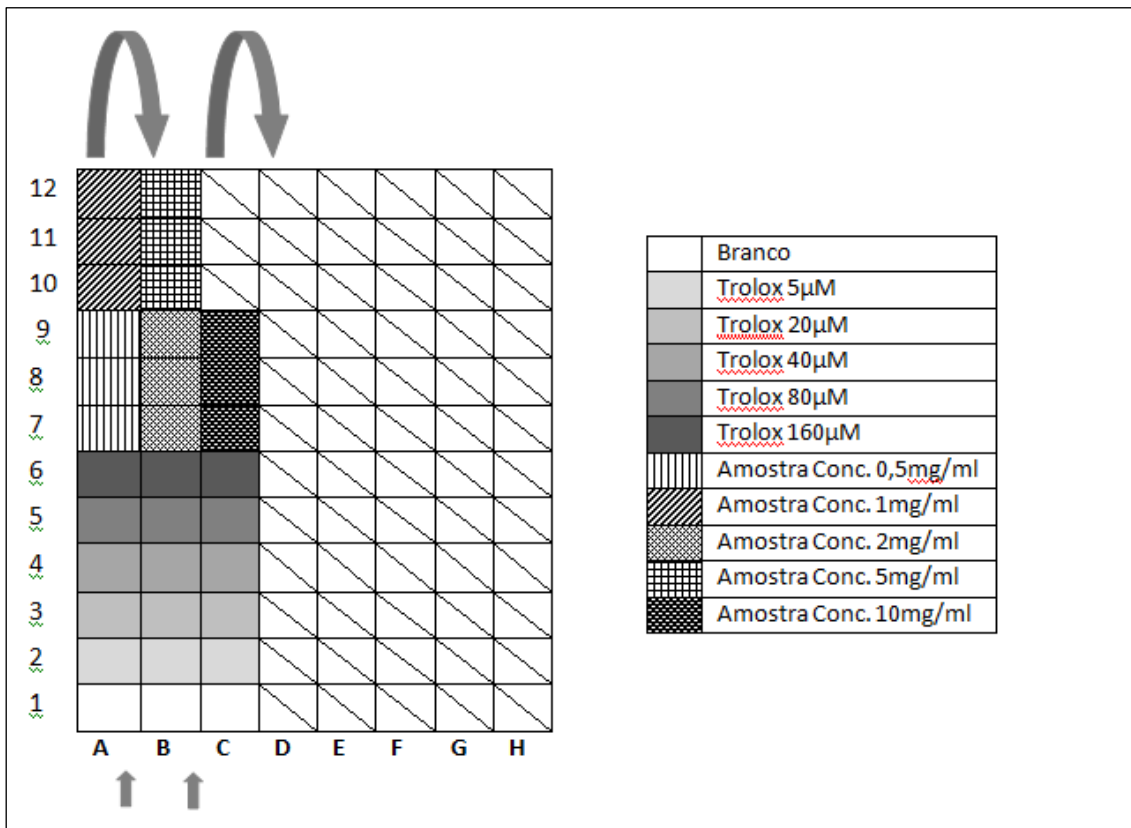


Figura 7. Esquema de preparação da microplaca para leitura

Foram adicionados 100 μL de solução de fluoresceína (78 nM) em cada poço da placa. Em seguida, houve a injeção automática de 50μl da solução de AAPH (221nM) e a microplaca foi agitada pelo próprio aparelho, para a mistura dos compostos. A leitura foi iniciada imediatamente. Para realização do ensaio, foram adicionados 100 μL de amostra ou padrão (Trolox) + 100 μL de Fluoresceína (78 nM) + 50 μL da solução de AAPH (221 mM), perfazendo um volume total de 250 μL em cada poço da microplaca.

O valor ORAC é calculado pela área sob a curva de emissão da fluorescência, que será proporcional à concentração de Trolox. A partir dos valores das intensidades ao longo do tempo, calcula-se a área sob a curva (AUC) utilizando-se a seguinte equação:

$$AUC = (0,5 + f_5/f_0 + f_{10}/f_0 + \dots + f_{n+5}/f_0) \times 5$$

Onde f_0 = leitura inicial da fluorescência com 0 min e f_n = leitura da fluorescência no tempo n .

Em seguida, calcula-se a AUCnet, que corresponde a AUC menos a AUC do branco.

$$\text{AUCnet} = \text{AUC padrão} - \text{AUC branco}$$

Utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0, plotou-se os valores médios da AUCnet obtidos no eixo Y e as respectivas concentrações da curva do padrão Trolox (5 μM , 20 μM , 40 μM , 80 μM e 160 μM) no eixo X (Figura 8), exibindo a equação da reta.

$$Y = ax + b$$

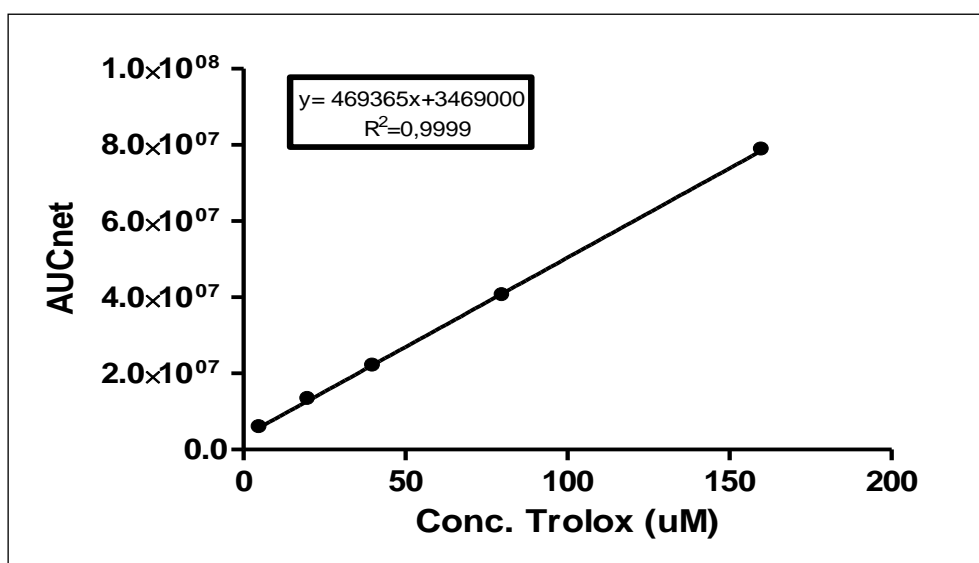


Figura 8. Exemplo da Curva AUCnet versus concentrações de Trolox.

Substitui-se na equação da reta y pelos valores da AUCnet obtidos para as diferentes concentrações da amostra analisada, obtendo-se o valor de x correspondente em μM Trolox. Multiplicou-se o valor obtido pelo fator de diluição feito nos extratos (FD) para obtenção das seis concentrações diferentes da amostra.

$$\text{Valor (ORAC)} = \frac{\text{AUCnet} - b}{a} \times \text{FD}$$

Onde:

Valor (ORAC): μM de equivalentes de trolox por grama de amostra (μM Trolox/g)

AUCnet: Área sob a curva da amostra analisada corrigido.

b: Intercepção da curva de calibração padrão (Trolox).

a: Inclinação da curva de calibração padrão (Trolox).

FD: Fator de diluição utilizado.

4.7. Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro – FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Para a determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) foi utilizada a metodologia descrita por Benzie & Strain (1996), com algumas modificações. Esta se baseia na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) da amostra em reduzirem, em meio ácido (pH=3,6), o complexo Fe^{3+} /tripiridiltriazina (TPTZ), para formar Fe^{2+} , de intensa cor azul e absorção máxima a 593nm. O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, através da mistura de 20 ml de tampão acetato (300 nM, pH 3,6), 2,0 ml de TPTZ (10mM TPTZ em 40 mM HCl) e 2,0 ml de FeCl_3 (20mM) em solução aquosa. Para realização do ensaio, foram adicionados 20 μL de amostra, 20 μL do padrão (sulfato ferroso), e 20 μL do branco (água Mili-Q) + 180 μL do reagente FRAP que foi injetado automaticamente pelo leitor de microplacas *VICTOR multilabel contador* (Perkin-Elmer, EUA) perfazendo um volume total de 200 μL em cada poço da microplaca. As medidas foram realizadas em triplicata. A curva de calibração foi feita com sulfato ferroso (50-750 $\mu\text{mol/L}$) e os resultados foram expressos em $\mu\text{molFe}^{2+}/\text{L}$.

4.8. Cultura de células e protocolo de tratamento

As linhagens de carcinoma de mama (MCF-7 e MDA-MB-435) foram obtidas a partir do Banco de células do Rio de Janeiro (Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Brasil). As linhagens celulares foram cultivadas em meio Dulbecco's suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 2 g/L tampão HEPES, pH 7,4, sob atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C. Para cada experimento, todas as células foram semeadas em concentração de 1.0×10^4 células/ cm^2 em placas de 06 e 96 poços, para análises de ciclo celular e proliferação celular, respectivamente. Após 24 horas, as células foram incubadas com meio de cultura padrão com 2,5-1000 mcg/mL de extrato de pitaya previamente liofilizado e diluído em 1ml de PBS. Grupos controle foram incluídos em cada placa. Os tempos de incubação estudados foram de 24 e 48 horas após o início do tratamento.

4.9. Ensaio de viabilidade celular pelo ensaio de MTT

A viabilidade celular foi determinada pelos ensaios de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio), conforme descrito por Mosmann (1983). Foram plaqueadas 1.0×10^4 células/poço em placas de 96 poços que, 24 horas depois, foram incubadas com diferentes concentrações de extrato de pitaya, que variavam de 2,5 a 1000 mcg/mL. Após 24 h e 48 h de incubação, foram adicionados 10 μ L de MTT (5g/L) em cada poço. O meio foi, então, recolhido depois de 4 h de incubação e 100 μ L/poço de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados, a fim de dissolver o produto gerado. Por fim, a placa foi lida em leitor de microplacas (Bio-Rad 2550, USA) a 570nm. A taxa de inibição da proliferação celular (CPIR) foi calculada com base na fórmula: $CPIR = (1 - \text{valor médio do grupo experimental} / \text{valor médio do grupo controle}) \times 100\%$.

4.10. Medida da viabilidade celular com o emprego do azul de Trypan

Para a realização dos experimentos de citotoxicidade, bem como para a manutenção das células viáveis em estoque, foi estimado o número de células viáveis com o uso do corante azul de Trypan. O fundamento desse método baseia-se na observação de que células viáveis são impermeáveis ao referido corante, ao passo que as células não viáveis apresentam permeabilidade, devido à formação de poros na membrana, o que permite a penetração do corante e assim as células não viáveis exibem coloração azul após tratamento (KONOPKA et al, 1996). Para a realização do ensaio, as células foram plaqueadas e após atingirem 50% de confluência, em média 24 horas após o plaqueamento, o meio foi retirado e, então, adicionou-se ao meio diferentes concentrações de extrato de pitaya. Posteriormente a essa etapa, foi realizada a leitura em tempos distintos, as células foram coletadas através de tripsinização e adicionou-se à suspensão de células o corante Azul de Trypan na proporção 1:3. Foram contadas células viáveis na câmara de Neubauer.

4.11. Ensaio de ciclo celular

A análise de ciclo celular foi realizada utilizando ensaio com iodeto de propídio. As células foram ressuspensas em 500 μ L de solução fria de Vindelov (VINDELOV, 1977), contendo 0,1% de Triton X-100, 0,1% de RNase e 50 μ g/mL iodeto de propídio (Sigma). Após incubação por 15 minutos, a suspensão celular foi analisada para conteúdo de DNA em citômetro de fluxo (FACScalibur BD

Biosciences). Após a aquisição de 20000 eventos, os dados foram analisados em software Cell Quest. As células com conteúdo menor de DNA que G1 na distribuição do ciclo celular foram contadas como células hipodiplóides (sub-fase G1). A percentagem de população de células em uma fase específica foi estimada com WinMDI 2.9.

As proporções relativas de células com conteúdo de DNA indicativo de apoptose ($<2n$), fase G0-G1 ($2n$), fase S (fase $> 2n$ mas $<4n$), e fase G2/M ($4n$) foram adquiridos e analisados utilizando CellQuest. A percentagem de população de células em uma fase específica foi estimada com o auxílio do software WinMDI 2.9.

4.12. Ensaio de apoptose

Para avaliação de apoptose, as células em estudo foram submetidas à marcação com anexina V conjugada à FITC (BD Pharmigen, San Diego, EUA). As células foram ressuspendidas em 400 μ L de solução tampão do kit II de detecção de apoptose (BD Pharmigen), 5 μ L de anexina V FITC e 5 μ L de iodeto de propídio por 15 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACScalibur BD Biosciences), após a aquisição de 20000 eventos e, os dados analisados em software Cell Quest.

4.13. Análise de expressão gênica

4.13.1. Extração do RNA total

O RNA total das células foi isolado utilizando-se 1 mL de TRIZOL Reagent (Invitrogen, USA) e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente para a destruição da membrana celular e nuclear e liberação dos ácidos nucléicos. Após o período de incubação, as suspensões foram transferidas para um tubo eppendorf seguidas da adição de 200 μ L/tubo de clorofórmio gelado. As amostras foram homogeneizadas durante 15 segundos, incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Após o término da centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foram adicionados 500 μ L de álcool isopropílico gelado. As amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas a 14.000 rpm por 20 minutos à 4 °C. Os precipitados foram lavados com

1.000 μL de etanol 75% gelado e centrifugados a 7.500 rpm por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi aspirado e os tubos foram colocados em uma centrífuga à vácuo por 3 minutos para secar o precipitado. Uma vez secos, os RNAs foram solubilizados com 50 μL de H_2O tratada com dietilpirocarbonato (DEPC 0,1 %, Invitrogen, USA) contendo 1 μL de inibidor de RNase (40 U/dL; Invitrogen, USA). A integridade e qualidade do RNA total extraído das amostras foram analisadas por espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 V 3.2 (Nanodrop Technologies, INC., USA) (OD260/280).

Para evitar uma possível contaminação com DNA na extração de RNA total, prévia à transcrição reversa, as amostras foram tratadas com a enzima Deoxiribonuclease I (DNase I 124 U/dL, Invitrogen, USA). Esta enzima cliva DNA de fita simples e dupla que contém extremidades 5' fosfato. As amostras foram incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente. Após este período, a enzima foi inativada pela adição de 1 dL de 25 mM de EDTA e incubadas por 10 minutos a 65 °C.

4.13.2. PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão dos genes

Uma vez obtido o RNA total das células e tratado com a DNase I, foi realizada a reação de transcrição reversa para a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) para subsequente PCR, utilizando-se a enzima Superscript II (Invitrogen, USA) e Oligo-dT12-18 (Invitrogen, USA). Para cada reação foram utilizados 100 ng de RNA total, 0,5 μL da enzima Superscript II (200 U/ μL ; Invitrogen, USA), 0,2 μL de Oligo μT , 4,5 μL de DTT (0,1 M; Invitrogen, USA), 4,5 μL de dNTPS (100 mM; Invitrogen, USA), 4,5 μL de MgCl_2 (50 mM), 9 μL de tampão da enzima (5x; Invitrogen, USA), completando 45 μL de solução de reação. O cDNA foi utilizado como modelo para a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT – PCR). O RT - PCR quantitativo foi realizado em um termociclador Step One Plus®, da Applied Biosystems®, utilizando fluorocromo SYBR Green (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. O nível de expressão de mRNA de ERBB2, GSTM1, BRCA1, BRCA2, Era, PRAB, foi normalizado com o nível de expressão de β -actina e GADPH. Para avaliar a qualidade dos produtos RT-PCR foi realizada uma curva de análise (curva de Melting) após cada ensaio. A curva de Melting confirma a especificidade da reação, indicando o ponto correspondente à temperatura de dissociação dos *primers* específicos para as sequências-alvo que estão sendo pesquisadas. A expressão relativa foi determinada com base no método delta delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$), tendo o rRNA de β -actina e GADPH como genes de referência.

4.14. Análise Estatística

Os dados apresentados serão médias e (\pm) desvio padrão de dois experimentos independentes feitos em triplicata (n=6). Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa GraphPad Prism 4.0 e Statistical 6.0.

5. RESULTADOS

5.1. Compostos bioativos presentes no extrato de pitaya

Na Tabela 4 encontra-se, a atividade antioxidante do extrato de pitaya avaliada por três métodos distintos: sequestro de radicais livres do DPPH, capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) e atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP). Além disso, apresenta-se nesta tabela o coeficiente de regressão linear (R^2) obtido em cada método utilizado.

A curva de calibração que relaciona a concentração do extrato de pitaya com a respectiva área do pico consiste numa representação gráfica de um coeficiente de determinação (R^2), que permite uma estimativa da qualidade da curva. Deste modo, a linearidade do método foi expressa pelo coeficiente de determinação (R^2) (FDA, 2001).

Para os três métodos em estudo, o extrato foi analisado em concentrações que variaram de 0,5 mg/ml a 10 mg/ml. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata e até o término da reação. Tal como se pode observar pelos valores de R^2 obtidos, pode-se afirmar que existe uma boa linearidade nos métodos ORAC e FRAP, sendo os valores superiores a 0,95.

Tabela 4. Atividade antioxidante da pitaya vermelha avaliada por diferentes métodos

	0,5	1	2	5	10	R^2
Método DPPH (% redução)	19,59±0,72	21,51±0,54	33,05±0,32	73,01±0,38	83,99±0,30	0,8892
Método ORAC (μ M)	43,80±1,90	58,8±2,2	140,5±1,9	560,0±48,9	1079,70±75,20	0,9943
Método FRAP (μ mol)	201,51±11,62	476,36±22,84	909,20±68,46	1698,64±33,17	2519,36±53,99	0,9621

Concentrações: 0,5; 1; 2; 5; 10 mg/ml;

Resultados expressos em media \pm desvio padrão.

Uma vez alcançada a estabilização da absorbância, o tempo máximo da reação (30 minutos) foi utilizado para análise da atividade antioxidante do extrato. O extrato hidroalcoólico da polpa da pitaya mostrou que, mesmo em baixas concentrações, há grande capacidade na redução do radical DPPH. A concentração máxima testada (10 mg/ml) apresentou uma porcentagem redutora de 83,99 (\pm 0,35) sobre o radical (tabela 4).

Ao analisar a atividade antioxidante do extrato pelos métodos FRAP e ORAC, observou-se que, houve um aumento significativo da atividade antioxidante com o aumento da concentração, corroborando com os resultados observados quando avaliados pelo DPPH. Pelos métodos três métodos utilizados, a concentração que apresentou o maior potencial redutor foi a de 10 mg/ml. O método ORAC foi o que apresentou melhor linearidade de resposta de acordo com o aumento da concentração ($R^2= 0,9943$) (Tabela 4).

Como pode ser observado na Figura 9, o extrato da polpa de pitaya apresentou maior teor de antocianinas totais do que a casca e a polpa fresca ($p<0,05$), o que também foi observado em outros estudos, devido a forte coloração da polpa.

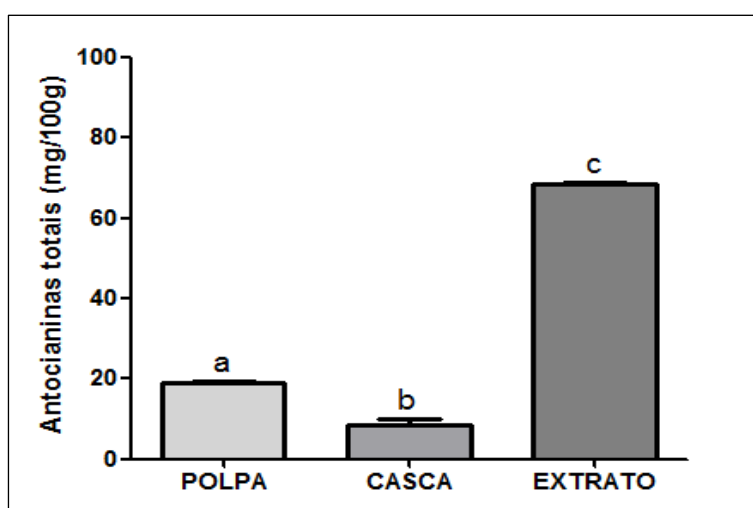


Figura 9. Antocianinas totais da polpa, da casca e extrato de pitaya vermelha em mg/100g. Os resultados são expressos como média \pm desvio-padrão de três experimentos. Letras diferentes indicam diferença estatística (One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey, $p\leq 0,05$)

5.2. Viabilidade celular

5.2.1. Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT

O ensaio de MTT foi utilizado para monitorar a viabilidade celular. Na linhagem celular MDA-MB-435, foi possível observar que o extrato de pitaya modificou o perfil de crescimento celular após 24 e 48 horas de tratamento ($p>0,05$), não havendo diferença estatística nas menores doses utilizadas ($p<0,05$) (Figuras 10A e 10B). Entretanto, o extrato promoveu um efeito mais pronunciado nas concentrações de 500 e 1000 mcg/mL com 20% de redução máxima na viabilidade celular (Figura 10).

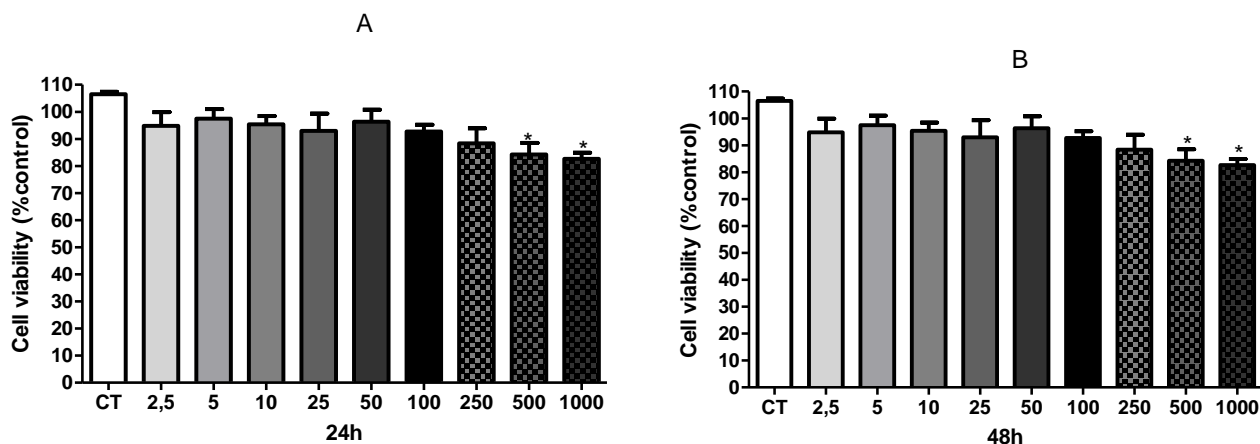
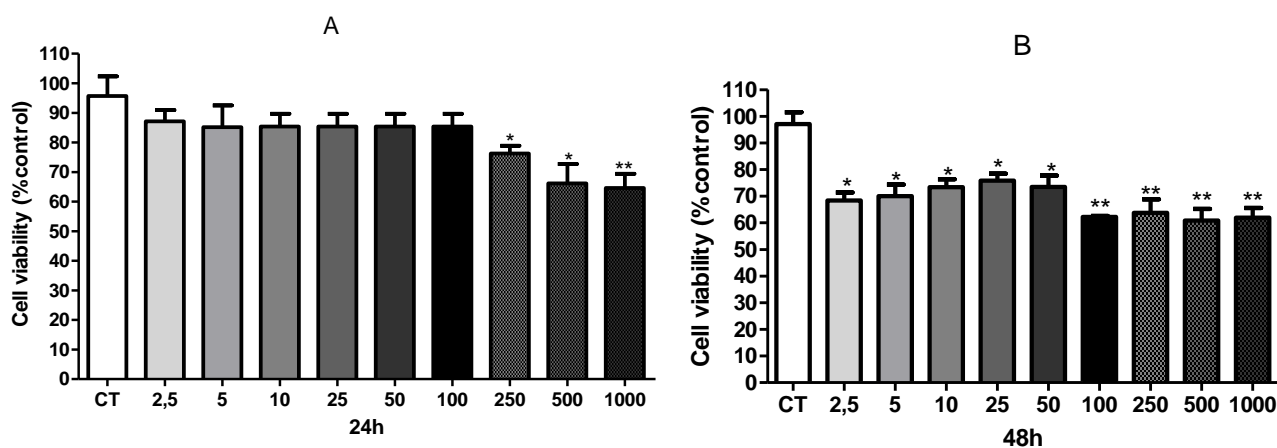


Figura 10. Efeito do extrato de pitaya (2,5-1000 mcg/mL) sobre a viabilidade celular de células MDA-MB-435 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento. Os dados representam média \pm desvio padrão, $n = 3$, $*p < 0.05$ versus grupo controle (Teste de Tukey).

O extrato de pitaya mostrou efeito inibitório na viabilidade celular, em comparação ao grupo controle, na linhagem MCF-7 após 24 e 48 horas de tratamento. Inicialmente, após 24 horas de tratamento as menores doses utilizadas de extrato não modificaram o perfil de crescimento celular ($p > 0,05$) (Figura 11A). Entretanto, notou-se que nas concentrações mais elevadas (250-1000 mcg/mL) ocorreu uma redução média de 25,15% na viabilidade celular. Após 48 horas (Figura 11B), em contato com o extrato de pitaya, constatou-se que até mesmo as menores doses utilizadas foram capazes de promover uma redução no percentual destas células, com redução mínima e máxima de 29,33% e 40,22% nas concentrações de 2,5 e 1000 mcg/mL, respectivamente (Figura 11B).



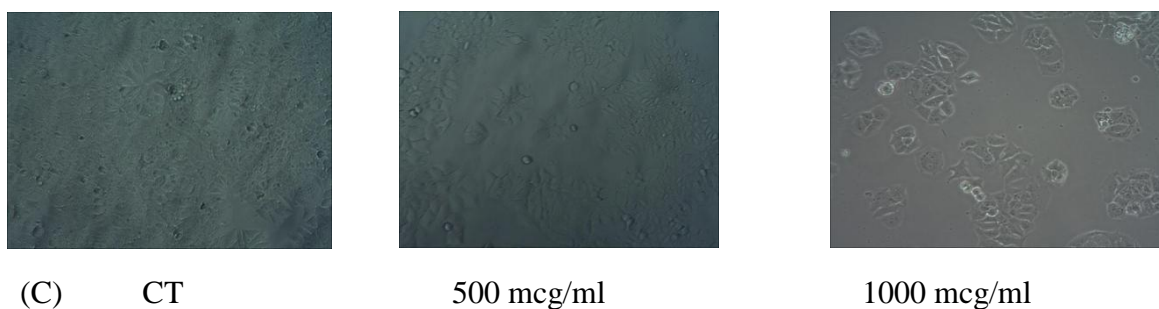


Figura 11. Efeito do extrato de pitaya sobre a viabilidade celular de células MCF-7 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento. Os dados representam média \pm desvio padrão, $n = 3$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ versus grupo controle (Teste de Tukey). Células MCF-7 visualizadas em microscópico não tratadas (CT) e após tratamento com duas concentrações do extrato de pitaya por 48 horas (C).

5.2.2. Viabilidade celular avaliada usando azul de trypan

A fim de avaliar o potencial inibitório do extrato de pitaya sobre as linhagens MCF-7 e MDA-MB-435, realizou-se o ensaio de Azul de Trypan. Na linhagem MCF-7, após 24 e 48 horas de tratamento, observou-se uma redução no número de células viáveis, quando comparado ao grupo controle. Notou-se, ainda, que este efeito foi mais pronunciado após 48 horas de incubação na concentração de 1000 mcg/ml ($p < 0,01$). O extrato de pitaya promoveu uma inibição em torno de 30% na dose 500 mcg/ml e 50% na dose de 1000 mcg/ml para este tipo de celular com tempo de incubação de 24 horas, houve diferença estatística entre as doses utilizadas ($p < 0,05$). Já com o tratamento de 48 horas, foi possível observar uma redução em torno de 50% para a primeira dose e em torno de 80% para a segunda dose, houve diferença significativa entre as doses ($p < 0,05$). Na linhagem MDA-MB-435, foi possível observar que o extrato não modificou o número de células viáveis após 24 e 48 horas de tratamento ($p > 0,05$). Constatou-se, ainda, que na dose de 1000 mcg/ml, a redução do número de células foi mais pronunciada e não houve diferença significativa entre as doses utilizadas ($p > 0,05$) (Figura 12).

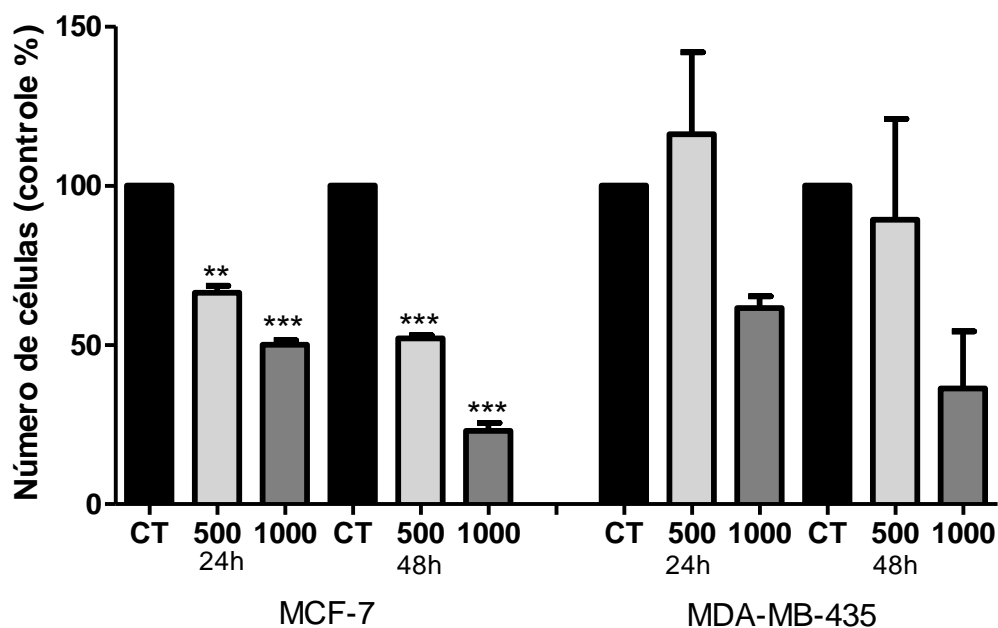
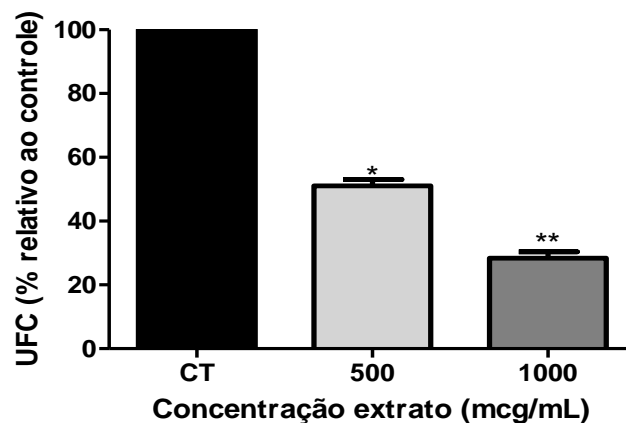


Figura 12. Efeito do extrato de pitaya sobre a viabilidade celular de células MCF-7 e MDA-MB-435 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento, usando azul de trypan. O experimento é expresso em média \pm desvio padrão, sendo diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas com extrato de pitaya (500 e 1000 mcg/ml) comparadas pelo teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.2.3. Unidade formadora de colônia (UFC)

O extrato de pitaya mostrou efeito inibitório no perfil de crescimento celular após de 18 dias de incubação ($p < 0,05$). A pitaya promoveu uma inibição em torno de 50% na menor dose e aproximadamente 70% na maior dose, havendo diferença estatística entre as doses ($p < 0,05$) (Figura 13).

(A)



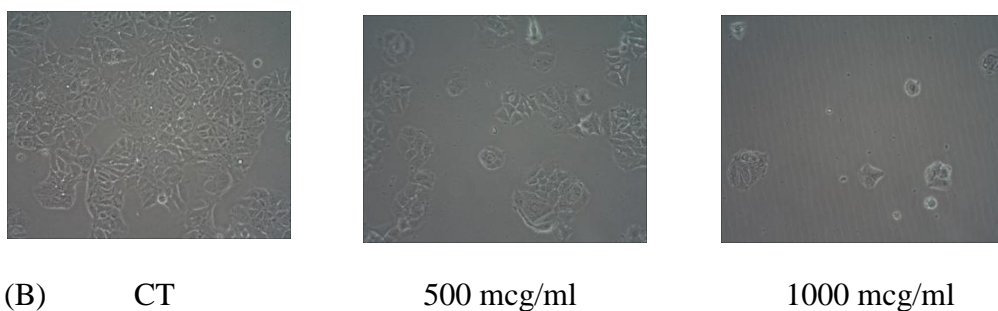


Figura 13. Formação de colônias de células MCF-7. O número de colônias foi determinado depois de 18 dias de cultura em DMEM suplementado com extrato de pitaya em concentrações de 500 e 1000 mcg/ml. O número de colônias formadas foi detectada por solução de cristal violeta. O experimento é expresso em média \pm desvio padrão, sendo diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas com extrato de pitaya (500 e 1000 mcg/ml) comparadas pelo teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) (A). Células MCF-7 não tratadas (CT) e tratadas com extrato de pitaya (500 mcg/ml e 1000 mcg/ml) após 18 dias de tratamento (B).

5.3. Efeito do extrato de pitaya no ciclo celular e apoptose

Com o objetivo de avaliar a influência do extrato de pitaya no ciclo celular das linhagens de adenocarcinoma de mama humano, estas foram incubadas durante 24 e 48 horas com o extrato de pitaya e, posteriormente, foram quantificados o percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular (Figura 14 e Tabela 5).

Após 24 e 48 horas, foi possível observar que o extrato de pitaya foi capaz de produzir um aumento da proporção de células da linhagem MCF-7 na fase G0/G1 e uma diminuição de células na fase G2/M, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre as diversas concentrações estudadas (Figura 14 e Tabela 5).

Corroborando com os dados de proliferação celular, não foi identificada nenhuma alteração na distribuição das células da linhagem MDA-MB-435 nas diferentes fases do ciclo celular, quando as mesmas sofreram tratamento com extrato de pitaya por 24 e 48 horas.

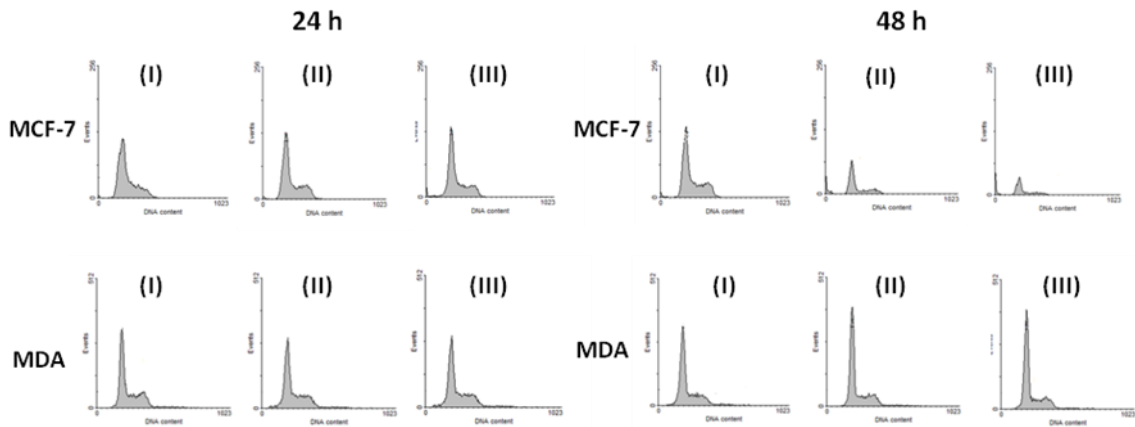


Figura 14. Efeito do extrato de pitaya na progressão do ciclo celular de linhagens de adenocarcinoma de mama após 24 e 48 horas de tratamento. O experimento é expresso em média \pm desvio padrão, sendo diferenças significativas entre as células não tratadas (I) e as tratadas com extrato de pitaya 500(II) e 1000(III) mcg/mL comparadas pelo teste de Tukey (* $p < 0,05$).

Tabela 5. Efeito do extrato de pitaya (500-1000 mcg/mL) na progressão do ciclo celular em diferentes linhagens humanas de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-435) após 24 e 48 horas de tratamento.

Linhagem	Tempo	Fase do Ciclo Celular	Controle	500 mcg/mL	1000 mcg/mL
MCF-7	24h	G ₀ /G ₁	59.59 \pm 0.16	63.47 \pm 2.07*	65.02 \pm 0.23*
		S	16.91 \pm 1.20	14.03 \pm 0.61	14.80 \pm 2.36
		G ₂ /M	19.28 \pm 1.87	19.77 \pm 1.42	17.48 \pm 3.22
	48h	G ₀ /G ₁	58.49 \pm 0.45	65.40 \pm 1.10*	69.61 \pm 3.90*
		S	16.45 \pm 0.55	10.63 \pm 0.25	13.64 \pm 1.71
		G ₂ /M	22.28 \pm 0.93	20.19 \pm 0.04*	15.66 \pm 3.72**
MDA-435	24h	G ₀ /G ₁	62.30 \pm 1.12	61.99 \pm 1.99	61.60 \pm 0.64
		S	14.84 \pm 0.43	14.93 \pm 0.24	14.87 \pm 0.51
		G ₂ /M	19.90 \pm 1.29	19.83 \pm 2.04	18.88 \pm 0.68
	48h	G ₀ /G ₁	69.64 \pm 1.18	70.64 \pm 0.80	70.01 \pm 1.85
		S	11.88 \pm 0.89	11.30 \pm 0.62	11.50 \pm 0.53
		G ₂ /M	15.17 \pm 1.03	15.52 \pm 0.52	15.76 \pm 0.83

Teste de Tukey: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Os dados sobre a influência do extrato de pitaya no processo de apoptose das diferentes linhagens celulares encontram-se na figura 14. Na linhagem MDA-MB-435, após 24 e 48 horas de incubação com extrato de pitaya, não foi observado nenhuma alteração no percentual de células em apoptose, quando comparadas às células não tratadas ($p > 0,05$) (Figura 15).

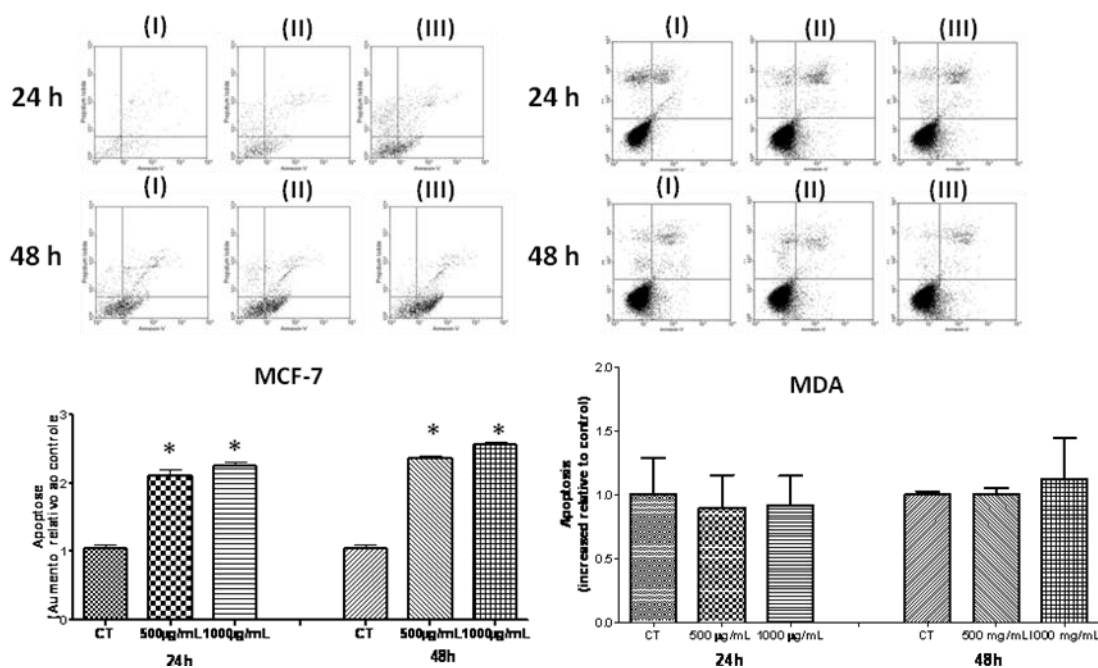


Figura 15. Taxa de aumento relativo de apoptose nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-435 tratadas com extrato de pitaya após 24 e 48 horas. O experimento é expresso em média \pm desvio padrão, sendo diferenças significativas entre as células não tratadas (I) e as tratadas com extrato de pitaya 500(II) e 1000(III) mcg/mL comparadas pelo teste de Tukey (* $p < 0,05$).

Na avaliação do processo de apoptose induzida pelo extrato de pitaya, foi verificado um aumento do percentual de células apoptóticas com taxa de aumento relativo de 2,1 vezes quando comparados ao grupo não tratado nas concentrações mais altas (500 e 1000 mcg/mL) após 24 e 48 horas de tratamento na linhagem MCF-7, corroborando com os dados de ciclo e proliferação celular.

5.4. Expressão gênica

Para estabelecer possíveis vias de sinalização pelas quais a pitaya possa estar envolvida, em relação a progressão tumoral nas células estudadas, foi investigado o perfil de expressão gênica relacionado ao câncer de mama nas células tratadas com extrato de pitaya após 48 de incubação (Figura 16). Foi possível observar que o extrato de pitaya regulou negativamente a expressão dos genes BRCA 1, BRCA 2, PRAB e Era na linhagem MCF-7.

Na linhagem MDA-MB-435 nenhum dos genes sofreu regulação pela ação do extrato de pitaya (Figura 17).

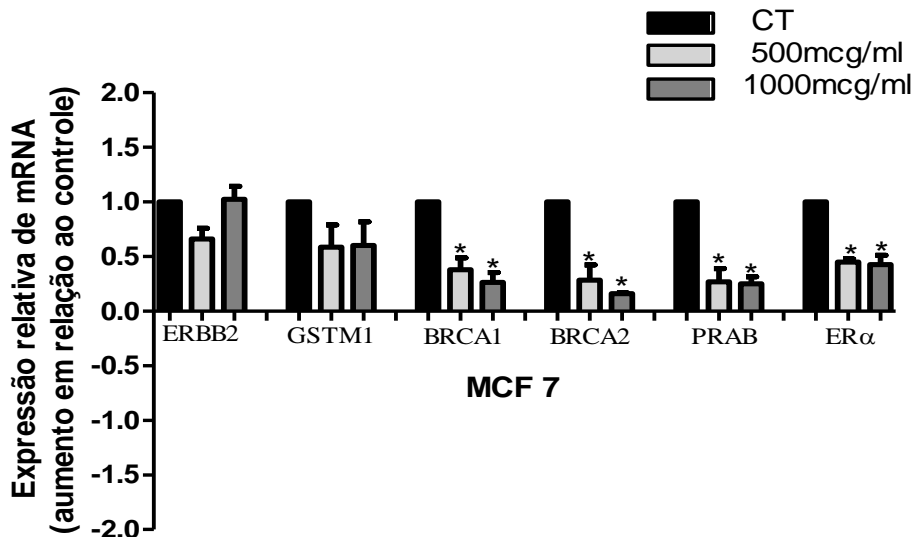


Figura 16. Perfil de expressão gênica em células cancerosas da mama humana. Análise quantitativa por PCR em tempo real de diferentes genes associados a progressão do câncer, após 48 horas de incubação com o extrato de pitaya. Níveis de transcrição de RNA dos genes β -actina e GADPH foram utilizados como controle interno. O experimento é expresso em média \pm desvio padrão, sendo diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas com o extrato (500 e 1000 mcg/ml) comparadas pelo teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

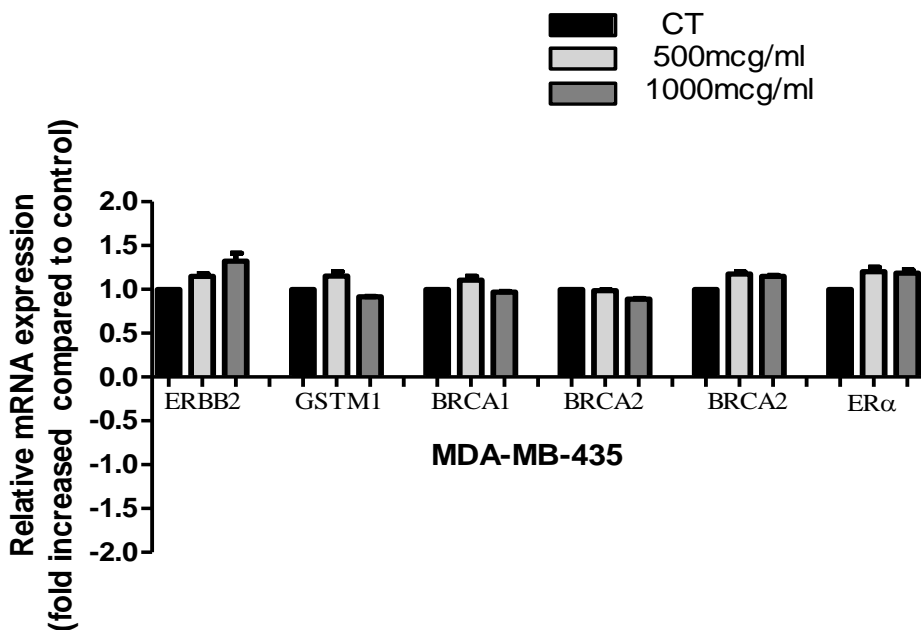


Figura 17. Perfil de expressão gênica em células cancerosas da mama humana. Análise quantitativa por PCR em tempo real de diferentes genes associados a progressão do câncer, após 48 horas de incubação com o extrato de pitaya. Níveis de transcrição de RNA dos genes β -actina e GADPH foram utilizados como controle interno. O experimento é expresso em média \pm desvio padrão, sendo diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas com o extrato (500 e 1000 mcg/ml) comparadas pelo teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho forneceu diversos subsídios que apontam para o papel do extrato de pitaya na prevenção do câncer de mama. O câncer mais diagnosticado do mundo é o de mama e no Brasil apresenta-se como a neoplasia maligna mais incidente entre mulheres, assim como a principal causa de morte por câncer. Evidências epidemiológicas indicam que a utilização de alimentos funcionais e compostos quimiopreventivos, parece contribuir muito na prevenção e tratamento do câncer, atuando com mecanismos de ação antioxidante, anti-inflamatório, anti-hormonais e antiangiogênicos. A pitaya vermelha apresenta potencial funcional relacionado à sua elevada atividade antioxidante (HYOENJI KIM et al, 2010).

Apesar destes dados, existe uma grande dificuldade de comparação entre dados experimentais referentes à avaliação da atividade antioxidante, aferida por diferentes métodos, bem como de comparar dados da literatura, haja vista que as metodologias para análise da determinação da atividade antioxidante baseiam-se em diferentes fundamentos. Soma-se a isto, ainda, a complexidade das reações envolvidas na atividade antioxidante. Portanto, é recomendada a utilização de dois ou mais métodos, já que nenhum ensaio utilizado isoladamente para determinar a atividade antioxidante irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (HUANG et al, 2005; PRIOR et al, 2003).

Neste trabalho, a atividade antioxidante do extrato foi analisada por três diferentes métodos (DPPH, FRAP e ORAC). Para os três métodos utilizados foram observados uma elevada atividade antioxidante. Foi possível ainda observar, em todos os métodos utilizados, um aumento na atividade antioxidante com o aumento da concentração do extrato.

Os resultados encontrados no presente trabalho coincidem com os resultados demonstrados na literatura, que mostram a capacidade antioxidante da pitaya (KIM et al, 2011; LUO et al, 2014). Em estudos envolvendo outras frutas, polpas de acerola e uva se destacaram na avaliação antioxidante, com mais de 90% de sequestro de DPPH após 30 minutos (VARGAS et al, 2008). Duarte-Almeida et al (2006) encontraram elevada atividade antioxidante no extrato de acerola, seguido pelos extratos de amora, açaí e morango. Segundo Rocha (2009) os valores médios encontrados para a atividade antioxidante de mirtilo foram de 32% e 43%, respectivamente para a polpa e extrato.

Esse valor é inferior ao que foi encontrado para o extrato de pitaya nas concentrações de 5.0 mg/ml e 10.0 mg/ml, o que indica que a pitaya tem um alto potencial antioxidante.

Em estudos anteriores que avaliaram extratos de outras frutas pelo método de ORAC, mostraram valores inferiores aos encontrados neste estudo para o extrato de pitaya. A capacidade antioxidante do extrato concentrado hidroalcoólico do bagaço de uva tinto apresentou 22,94 $\mu\text{mol Trolox/g}$ para o ensaio ORAC. Já o extrato concentrado de pitaya apresentou elevada capacidade antioxidante com redução de até 1000 $\mu\text{mol Trolox/mg.ml}^{-1}$. O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2007) publicou, como parte do Programa Nacional de Análise de Alimentos e Nutrientes, um estudo contendo dados sobre a capacidade antioxidante de extratos de frutas concentrados, utilizando o método ORAC. Dentre as frutas avaliadas, encontravam-se a amora preta (88,575 $\mu\text{M de Trolox/g}$), framboesa (37,9875 $\mu\text{M de Trolox/g}$) e o morango (32,265 $\mu\text{M de Trolox/g}$).

Os resultados encontrados neste estudo, pelo método de FRAP, mostram valores médios superiores aos encontrados na literatura para extratos de outras frutas também consideradas com alto potencial antioxidante. O potencial redutor do extrato de pitaya, neste estudo (2519,36 $\mu\text{mol sulfato ferroso/L}$), foi superior ao que foi encontrado por Rufino (2008) que avaliou a capacidade antioxidante de alguns extratos concentrados de frutas não tradicionais brasileiras, tais como camu-camu, uvaia e jambolão. Os frutos de camu-camu foram os que apresentaram maior capacidade antioxidante, com valor de 2501,5 \pm 74,5 $\mu\text{mol sulfato ferroso/L}$ (FRAP). A acerola e o puçá-preto também merecem destaque, pois depois do camu-camu apresentaram os maiores valores, 1995,8 \pm 47 e 908,9 \pm 28,4 $\mu\text{mol sulfato ferroso/L}$, respectivamente. Os frutos de jambolão (172,8 \pm 10,8 $\mu\text{mol sulfato ferroso/L}$) e uvaia (407,5 \pm 34,9 $\mu\text{mol sulfato ferroso/L}$) também apresentaram valores menores do que os da pitaya.

Apesar das diferenças nas atividades antioxidantes verificadas para um mesmo extrato ao ser analisado por diferentes métodos, os métodos para avaliação da atividade antioxidante utilizados (DPPH, FRAP e ORAC) tiveram uma forte correlação positiva entre si, demonstrando, portanto, que estas metodologias podem ser utilizadas de forma adequada para avaliação da capacidade antioxidante do extrato. Outros autores já haviam relatado a correlação positiva entre os diferentes métodos para determinação da capacidade antioxidante (SUCUPIRA et al, 2012).

A aplicação de pigmentos naturais e a sua correlação com a atividade antioxidante em alimentos é objeto de interesse tanto para a indústria como para os consumidores.

Estudos recentes relacionam a ingestão de frutas e vegetais com propriedades antioxidantes e a diminuição do risco e desenvolvimento de algumas doenças crônico-degenerativas (SCHIAVON et al, 2015). O uso desses pigmentos, como as antocianinas, em produtos alimentícios é um fator essencial para a funcionalidade, bem como para a agregação de valor à imagem final do produto. As antocianinas são flavonóides que se encontram largamente distribuídos na natureza e são responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e todas as tonalidades de vermelho que aparecem em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas. Neste estudo o extrato da polpa de pitaya apresentou maior teor de antocianinas, o que já era esperado, visto que, em estudos anteriores extratos de frutas apresentaram grande potencial antioxidante, quando comparados com as frutas frescas (ROESLER et al, 2007).

Sun et al. (2002) demonstraram que a maior contribuição para a atividade antioxidante total de frutos se deve à composição de compostos fitoquímicos. Kuskoski (2006) observou a influência dos compostos fitoquímicos na atividade antioxidante e, principalmente, a dos pigmentos antociânicos. As polpas de frutas que não os contêm, como o abacaxi, a graviola, o cupuaçu e o maracujá, apresentam valores menores de atividade antioxidante.

Para a avaliação do efeito anti-tumoral do extrato de pitaya foram utilizadas as linhagens derivadas de carcinoma de mama. A linhagem celular epitelial MCF-7 apresenta receptores de estrógeno e progesterona e baixo potencial metastático. Esta linhagem tem morfologia fusiforme e são consideradas luminais, além disso, são células com baixo grau de invasão em matrigel. A linhagem celular epitelial MDA-MB-435 não expressa receptores hormonais, apresenta alto potencial metastático e alta tumorigenicidade. Esta linhagem tem morfologia estrelada e é considerada célula epitelial mesenquimal (LACROIX et al, 2004).

De acordo com resultados obtidos pelo ensaio de MTT, na linhagem MCF-7 tratada com o extrato de pitaya, foi observado uma inibição na viabilidade celular desde as menores doses, com 48 horas de tratamento. Nas células MDA-MB-435 houve uma redução sobre a viabilidade deste grupo celular com 48 horas de tratamento, mas apenas nas duas maiores concentrações (500 e 1000 mcg/ml). Em nosso estudo, também avaliamos a viabilidade usando o azul de trypan, e foi possível observar que o extrato de pitaya apresentou potencial inibitório já nas primeiras 24 horas de tratamento na linhagem MCF-7. Entretanto, na linhagem MDA-MB-435 o extrato não modificou a viabilidade deste grupo celular. O mesmo também foi observado no ensaio de contagem

de unidades formadoras de colônias (UFC) após 18 dias de incubação com o extrato de pitaya. No qual foi observado somente inibição na linhagem MCF-7. Neste sentido, a diferença quanto à característica de agressividade das linhagens MCF-7 e MDA-MB-435, seja uma possível explicação para melhores resultados em relação à inibição da viabilidade celular alcançados em células MCF-7 incubadas com o extrato de pitaya. Esse dado está de acordo com a literatura, já que a linhagem MCF-7 apresenta receptores hormonais e é mais sensível a ação de drogas terapêuticas. De acordo com Ge et al (2013) a linhagem MDA-MB-435 apresenta resistência à drogas contra o câncer de mama in vitro, devido a presença de altos níveis de expressão de RNAm de *GSTP1*, quando comparado aos níveis expressos em MCF-7. Pacientes com câncer de mama com o alelo *GSTP1 105Val* são mais propensos a ter um tumor com grau histológico avançado, metástases linfáticas, e receptor de estrogênio negativo. O dano tóxico para o DNA genômico em células somáticas não só induz a carcinogênese, mas também faz com que haja o desenvolvimento de tumores com características mais agressivas, com má diferenciação, crescimento independente de hormônios e potencial metastático.

A desregulação no controle do ciclo celular é um aspecto fundamental no desenvolvimento do câncer. As células normais apenas proliferam em resposta ao desenvolvimento da célula ou a sinais presentes na mitose que indicam um requisito para o crescimento do tecido, enquanto que a proliferação das células cancerosas procede essencialmente sem controle. Isto indica que as células cancerosas proliferam devido à presença de defeitos de sinalização internos e/ou externos (NAKAYAMA; NAKAYAMA, 2006). Sabe-se que as células cancerosas perdem a capacidade de regular seu ciclo celular e, assim, controlar a sua taxa de proliferação. Um passo limitante no ciclo celular, que muitas vezes não é regulada no câncer, é a progressão de células na primeira fase (G1) do ciclo para a fase S (BOROJEVIC et al, 2010). Falhas no processo da regulação do ciclo celular podem levar uma proliferação maior de células cancerosas, enquanto que esforços realizados para corrigir este problema, levam a um retardo no crescimento e indução da morte celular (PALOZZA et al, 2009).

Estudos prévios indicaram que a pitaya vermelha é rica em polifenóis, boa fonte de antioxidantes e apresenta atividade antiproliferativa em células de melanoma (B16F10), adenocarcinoma gástrico (AGS) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama) (WU et al, 2006; KIM et al, 2011). Segundo QI et al (2014) o extrato metanólico de antocianinas, substâncias estas presentes na pitaya, suprimiu a proliferação, induziu a

parada do ciclo celular na fase G2/M e induziu a apoptose em células de câncer oral KB.

Células neoplásicas apresentam-se em constante proliferação celular com grande proporção de células na fase S e G2/M (TYSON et al, 2011). A eficiência de um composto bioativo de alimento no controle do câncer pode ser avaliada através da sua capacidade de bloquear o ciclo celular nas fases G0/G1 e G2/M, reduzindo a proporção de células em fase S (YAO et al, 2011). Em nosso trabalho, nas células MCF-7, a análise ciclo celular revelou que o extrato de pitaya aumentou a proporção de células em fase G0/G1 e reduziu o total de células presentes em G2/M, em 24 e 48 horas pós-tratamento. Estes dados sugerem uma parada de ciclo celular em fase G0/G1, onde as células ficam impossibilitadas de chegarem à etapa de mitose e, se multiplicarem. Com a parada do ciclo na fase G0/G1, pressupõe-se que um menor número de células prossiga no ciclo e, alcance as fase S e G2/M, ocasionando, conseqüentemente, a redução no percentual de células observado nesta fase. Neste sentido, somado aos achados aqui apresentados de que o extrato de pitaya inibiu a proliferação e viabilidade de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7, verificou-se que estes compostos bioativos presentes na pitaya também interferiram na distribuição de fases do ciclo celular.

Uma sequência programada de acontecimentos leva à eliminação de células sem causar danos adjacentes aos tecidos, sendo o processo de apoptose o responsável por manter as células saudáveis, eliminando o excesso ou células anormais. Quando células anormais não conseguem sofrer apoptose, aumenta-se a probabilidade de ocorrer mutações, podendo tornar-se células carcinogênicas. Apesar da enorme variabilidade do câncer, evidências demonstram que a resistência à apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos. A apoptose na prática clínica é alvo para um potencial uso terapêutico da morte celular programada ou para a compreensão dos mecanismos de resistência à radioterapia e à quimioterapia (GRIVICICH et al, 2007). Em nosso estudo, os ensaios de apoptose demonstraram que o extrato de pitaya foi capaz de promover morte por apoptose em células de adenocarcinoma mamário MCF-7, quando comparado ao grupo controle. Nenhum efeito ficou evidenciado em células MDA-MB-435. Segundo Sreekanth (2007), o pigmento betacianina, extraído de *opuntia ficus-indica*, atua nas células K562 que levam a leucemia mielóide crônica humana alterando a integridade da membrana mitocondrial, levando à fuga de citocromo c, e a ativação das caspases e desintegração nuclear. Estas alterações

bioquímicas são refletidas em mudanças estruturais, típico de células em apoptose (morte celular programada).

De acordo com a literatura, as betacianinas são responsáveis pela coloração da casca e da polpa da pitaya vermelha (JAMILAH et al, 2011; TZE et al, 2012) e resultados de estudos prévios demonstram que os compostos fenólicos correspondentes a este pigmento e seus derivados na casca de pitaya e nos extratos contribuem significativamente para a atividade antioxidante (HYOENJI KIM et al, 2010). Foi documentado que os corantes dos alimentos naturais, como a betacianina podem inibir a proliferação celular de uma variedade de células tumorais humanas por serem agentes anti-radicais livres (ESQUIVEL et al, 2012).

A maioria dos autores mostra que existe uma associação positiva entre a presença de receptores hormonais e um prognóstico mais favorável. Cerca de dois terços dos carcinomas de mama apresentam expressão de receptores de estrogênio (RE) e são denominados receptor de estrogênio positivo ou simplesmente RE-positivos. A presença de RE permite que o estrogênio exerça suas funções dentro das células, como a proliferação celular e a síntese de várias moléculas, entre as quais outros receptores, como o da progesterona. A expressão de receptor de progesterona (RP) ocorre, em geral, em tumores RE-positivos, embora nem todos os carcinomas RE-positivos expressem o RP. A presença de ambos os receptores indica um estado funcional mais próximo da célula mamária normal, não tumoral. Em outras palavras, estes tumores têm morfologia e funções mais parecidas com as das células de origem e, portanto, são menos agressivos para o organismo. A falta de expressão do RP é um indicativo de menor diferenciação celular, sobretudo se esta negatividade estiver associada a altas taxas de proliferação celular. A ausência de ambos os receptores (RE e RP) já reflete um grau mais acentuado de perda de diferenciação e maior agressividade biológica. A expressão de RE por parte das células tumorais indica que pelo menos parte da proliferação celular depende da estimulação pelo estrogênio. Assim sendo, é possível frear o crescimento celular através de bloqueios hormonais. O tratamento endócrino precoce do câncer de mama com receptor de estrogênio (ER) positivo reduz a recorrência e as taxas de mortalidade, com ou sem quimioterapia (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP, 2011).

Em nosso estudo, na linhagem MCF-7 tratada com o extrato de pitaya, foi observado inibição na viabilidade celular, indução da parada do ciclo e promoção da morte por apoptose. Estes efeitos já não foram observados nas células MDA-MB-435.

Diante dos dados encontrados neste trabalho, este fato se deve, provavelmente, ao bloqueio do receptor de estrogênio na linhagem MCF-7. Estes receptores hormonais são proteínas especializadas, presentes em células mamárias, que ao se ligarem aos hormônios correspondentes desencadeiam uma série de eventos implicados com várias funções celulares, incluindo multiplicação celular e, conseqüentemente, o crescimento do tumor.

A atividade do extrato de pitaya foi avaliada neste trabalho para identificar possíveis vias de sinalização por análise de PCR em tempo real e, as observações indicam que o extrato de pitaya apresentou atividade anti-tumoral na linhagem MCF-7 por suprimir BRCA1, BRCA2, PRAB e ER α . Na linhagem MDA-MB-435 nenhuma alteração foi observada.

A suscetibilidade genética ao câncer da mama compreende dois extremos. Em um, encontram-se as enfermidades monogênicas de elevada penetrância, que são aquelas mutações herdadas dos genes BRCA1 e BRCA2, relacionados aos cânceres hereditários da mama. Nestes casos, os riscos acumulados ao longo da vida, entre os portadores das mutações, são muito altos (50- 90%), porém a prevalência de tais mutações são raras na população geral (2-5%), o que explica uma pequena fração dos cânceres da mama ser atribuída a caracteres hereditários. No outro extremo, encontram-se os polimorfismos; nestes casos encontramos mutações muito freqüentes, da ordem de 40 a 50% da população (como é o caso do polimorfismo nas enzimas da superfamília da glutathion S-transferase, presente em 50% dos caucasianos), com um aumento discreto do risco individual. Todavia, o número de cânceres atribuídos a estas características genéticas é muito alto (RUIZ; SANTOS, 2001). Neste trabalho o extrato regulou negativamente a expressão dos genes BRCA1 e BRCA2 em células de adenocarcinoma MCF-7. Segundo Linhares et al (2006), a atividade física regular aliada a hábitos dietéticos saudáveis parecem ser fatores de proteção contra o câncer de mama. Já que, indivíduos que herdam mutação nesses genes apresentam maior chance de desenvolvimento de neoplasias, porque necessitam de menor número de alterações somáticas para transformação celular neoplásica. Como esses indivíduos já possuem mutação germinativa em um dos alelos do gene, uma mutação ocorrida no outro alelo selvagem inativa a proteína e, por isso, esses indivíduos podem desenvolver o câncer (LAJUS, 2011). Daí a importância de minimizar ao máximo a influência dos fatores externos no processo de carcinogênese mamária e priorizar fatores que visam a prevenção.

As ações biológicas da progesterona são mediadas por duas isoformas de seu receptor, respectivamente "A" e "B". Em seres humanos, os dois RNA transcritos são gerados a partir de um único gene que tem, porém, regiões promotoras diferentes. Estruturalmente, as proteínas diferem apenas quanto à presença de 164 aminoácidos na região N-terminal do receptor "B". A isoforma "A" do RP é a proteína envolvida com o PROGINS, ocorrendo um decréscimo de sua estabilidade com perda da sua capacidade de inibir a ativação dos receptores estrogênicos. Isso pode causar um inadequado controle desses receptores com um aumento do risco de desenvolvimento de tumor. Os dados encontrados em nosso estudo mostram que o extrato de pitaya suprimiu a expressão do receptor de progesterona.

Kieback et al (1998) acreditam que a isoforma "A" sob ação do polimorfismo levaria também uma maior expressão da isoforma "B", contribuindo para aumento da ação oncogênica do PROGINS. Segundo Kieback et al. (1998), a presença do PROGINS na população germânica encontrava-se relacionada com um risco significativo de câncer da mama. Em 2003, um estudo sobre polimorfismo funcional do RP verificou acréscimo estatístico no risco de câncer da mama ao estudarem 990 casos, comparados a 1.364 controles. Garret et al (1995), ao estudarem 187 irlandesas com câncer da mama, constataram uma significativa associação ($p < 0,05$) do PROGINS com o risco de câncer da mama (ABBAS et al, 2004).

Para além do seu papel na fisiologia do tecido mamário, os estrogênios estão associados com o desenvolvimento e progressão do câncer da mama. Aproximadamente 75% dos casos de câncer da mama expressam receptores de estrogénio, ou seja, são RE-positivos. Foi demonstrado que existe uma relação entre a expressão de genes dependentes de estrogénio nos carcinomas RE positivos e os níveis basais de estradiol no plasma, sugerindo que diferenças nos níveis plasmáticos de estradiol entre doentes têm influência significativa no comportamento dos carcinomas da mama (KOK; LINN, 2010).

O presente trabalho mostrou que o extrato de pitaya suprimiu a expressão do receptor de estrogênio alfa. Os tumores que apresentam receptores hormonais positivos têm um prognóstico mais favorável e respondem melhor à terapia hormonal. Isso porque as estratégias de tratamento de um tumor maligno sensível a hormônios, envolvem, de um lado, a redução dos estrogênios produzidos normalmente pelo organismo, e de outro, a inibição das ligações entre os receptores e os hormônios. No primeiro grupo temos o uso de drogas que inibem a síntese do hormônio, como aquelas

que reduzem a atividade da enzima aromatase, responsável pela síntese de estrogênios em vários tecidos, como o tecido adiposo. Outra opção, mais drástica e para casos selecionados, seria a retirada cirúrgica dos ovários, responsáveis pela produção dos estrogênios em mulheres antes da menopausa. No segundo grupo estão as drogas que pretendem atrapalhar e /ou competir com os estrogênios na sua ligação com o receptor. Acreditamos que o extrato de pitaya por suprimir a expressão dos receptores de estrogênio e progesterona possa estar diminuindo a ligação do hormônio com o receptor e conseqüentemente inibindo o crescimento celular. Estudos realizados demonstram que polimorfismos no gene RE α (receptor de estrogênio alfa) estão relacionados com doenças como câncer da mama e da próstata, osteoporose, doença de Alzheimer e doenças cardiovasculares (JAKIMIUK et al, 2007).

Um dos caminhos para se diminuir a mortalidade por câncer de mama seria a procura de marcadores que poderiam ajudar o clínico a identificar pacientes com tumores potencialmente agressivos, para a instituição de terapia que poderia alterar o curso da doença.

A família dos receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFR) ou ERBB pertence à subclasse 1 da superfamília dos receptores de tirosina quinase. Esses receptores possuem uma porção extracelular (onde há o sítio de ligação), uma porção transmembrana e um domínio citoplasmático da tirosina quinase. A ligação à porção extracelular de EGFR, HER3 e HER4 induz à formação de homo e heterodímeros, com preferência de recrutamento de HER2 como parte do dímero1. Há como consequência a ativação do domínio intrínseco da quinase e a fosforilação de resíduos específicos de tirosina no citoplasma, levando à ativação de sinais intracelulares que promovem crescimento, proliferação, diferenciação e migração celular (REID et al, 2007).

Toda esta família de receptores está envolvida na carcinogênese, particularmente EGFR e HER2. Via de regra, tumores com alterações nesses receptores apresentam uma evolução mais agressiva, com pior evolução clínica para seus portadores (HYNES et al, 2005). Vários tipos de alterações são identificadas em tumores, como a amplificação gênica, a superexpressão dos receptores ou seus ligantes, mutações, ou perda dos controles regulatórios negativos (BASELGA; ARTEAGA, 2005).

A amplificação de HER2 no câncer de mama é observada em 25% a 30% dos casos e correlaciona-se com sobrevida livre de doença e sobrevida global reduzida. Essa superexpressão ocorre tanto no tumor primário como nas metástases, sugerindo um potencial benefício de uma terapêutica anti-HER2 para essa patologia (SANCHES;

SILVA, 2010). Neste estudo, o extrato de pitaya não alterou significativamente a atividade do gene ERBB2 em ambas as linhagens.

A glutathione S-transferase é uma família de enzimas intracelulares localizadas no citosol da célula que previne a ação de certas substâncias nas células, evitando dano ao DNA. Essas enzimas catalisam a conjugação de compostos eletrolíticos diversos, sendo que a glutathione, na maior parte, promove a formação de substâncias menos reativas e mais solúveis em água que são prontamente excretadas na urina, prevenindo possíveis mutações que essas substâncias podem vir a causar. Esse gene participa da via metabólica do estrogênio endógeno e exógeno, indicando indivíduos ou populações com diferenças genéticas capazes de modular a susceptibilidade ao câncer de mama (ANTON et al, 2010). Neste trabalho, o extrato de pitaya não alterou significativamente a atividade do gene GSTM1 em ambas as linhagens.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, o estudo produziu extrato de casca e polpa de pitaya e avaliou a atividade antioxidante da fruta e do extrato produzido; avaliou o efeito do extrato de pitaya sobre a proliferação das linhagens MCF-7 e MDA-MB-435 em diferentes tempos de incubação (24 e 48 horas); verificou-se modificações no ciclo celular das linhagens MCF-7 e MDA-MB-435 pela ação do extrato de pitaya; avaliou os efeitos do extrato de pitaya sobre o processo de morte celular em linhagens cancerosas humanas de mama; foi notado que o extrato de pitaya regula a expressão de receptores hormonais e de oncogenes em modelos *in vitro* de linhagens de câncer de mama.

O aprofundamento de estudos em modelos animais e clínicos, sobre a possível proteção do extrato no processo de tumorigênese, ajudará a entender outros mecanismos ainda não elucidados por este trabalho.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKHALAF, M.; EL-MOWAFY, A.M. Overexpression of wild-type p53 gene renders MCF-7 breast cancer cells more sensitive to the antiproliferative effect of progesterone. **Journal of Endocrinology**, v.179, p. 55-62, 2003.

ALLRED, D.C.; BROWN, P. The origins of estrogen receptor alphapositive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v. 6, p. 240–245, 2004.

ANTON, E. M. et al. Avaliação epidemiológica da influência dos genes GSTM1 e GSTT1 na susceptibilidade ao câncer de mama em mulheres atendidas em um hospital do Sul do Brasil: um estudo-piloto. **Revista da AMRIGS**, v. 54, n. 4, p. 411-415, 2010.

ARIFFIN, A. A. et al. Essential fatty acids of pitaya (dragon fruit) seed oil. **Food Chemistry**, v. 114, p.561–564, 2009.

ARTACHO-CORDÓN, F.; RÍOS-ARRABAL, S. Matrix metalloproteinases: Potential therapy to prevent the development of second malignancies after breast radiotherapy. **Surgical oncology**, p. 1-9, 2012.

ASMAH, R.; LAILI, M.N. Free radical scavenging activity of two *Hylocereus* species (Cactaceae) and their effect on the proliferation of HeLa and MDA-MB-231 cancer cell lines. **Planta medica**, v. 74, p. 5, 2008.

AXELROD, R.; AXELROD, D. E. Evolution of cooperation among tumor cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 103, n. 36, p. 13474-13479, 2006.

AZIZ, F.A; NOOR, M.M. Ethanol extract of dragon fruit and its effects on sperm quality and histology of the testes in mice. **Biomedical Research**, v. 21, n. 2, p. 126-130, 2010.

BÁNKFALVI, A. et al. Different proliferative activity of the glandular and myoepithelial lineages in benign proliferative and early malignant breast diseases. **Mod Pathol.**, v. 17, p.1051-1061, 2004.

BARGELLINI, A. et al. Trace elements, anxiety and immune parameters in patients affected by cancer. **Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)**, v.17, p. 3, 2003.

BASELGA, J.; ARTEAGA, C.L. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. **J Clin Oncol.**, v. 23, n. 11, p. 2445-59, 2005.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 53, p. 5, 2009.

- BASTOS, D.C. et al. Propagação da pitaya “vermelha” por estaquia. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1106-1109, 2006.
- BEECHER, G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **Journal of the Nutrition**, v. 133, n. 10, p. 3248-3254, 2003.
- BÉLIVEAU, R.; GINGRAS, D. Os alimentos contra o câncer: A prevenção e o tratamento do câncer pela alimentação. Petrópolis, **Voices**, p.214, 2007.
- BENSAAD, K. et al. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. **Cell**, v. 126, p. 107-120, 2006.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 239, p. 70-76, 1996.
- BOATRIGT, K.M.; SALVESEN, G.S. Mechanisms of caspase activation. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 15, p. 725-731, 2003.
- BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. Introdução à química de alimentos. 2ªed. São Paulo: **Varela**, 1995.
- BOMBONATI, A.; SGROI, D. C. The molecular pathology of breast cancer progression. **The Journal of pathology**, v. 223, n. 2, p. 307-17, 2011.
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRISKEN, C.; O’MALLEY, B. Hormone action in the mammary gland. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 12, p. 31-78, 2010.
- BUCCHIERI, F. et al. Asthmatic bronchial epithelium is more susceptible to oxidant-induced apoptosis. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 27, n. 2, p. 179-185, 2002.
- BURNS, J. et al. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **J Agric Food Chem.**, v. 49, n. 12, p. 5797-808, 2001.
- CAI, Y.Z.; SUN, M. Characterization and application of betalain pigments from plants of the *Amaranthaceae*. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 370-376, 2005.
- CANTO, A.R. et al. El cultivo de pitahaya em Yucatán. Yucatan: **Universidade Autónoma Chapingo**, p. 53, 1993.
- CARRATU, E.; SANZINI, E. “Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetable”. **Ann. Ist. Super Sanità**, v. 41, n. 1, p.7-16, 2005.
- CARTER, P. et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.89, n.10, p. 4285-9, 1992.

- CHAN, W. S. et al. A Role for TAZ in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 68, p. 2592-2598, 2008.
- CHARAFE-JAUFFRET, E.; GINESTIER, C. et al. Breast cancer stem cells: tools and models to rely on. **BMC cancer**, v. 9, p. 202, 2009.
- CHEN, S.; ANDREASSON, E. "Update on glucosinolate metabolism and transport". **Plant Physiol. Biochem.**, v. 39, p.743-58, 2001.
- CHEN, T. et al. Caspase-and p53-dependent apoptosis in breast carcinoma cells induced by a synthetic selenadiazole derivative. **Chemico Biological Interaction**, v. 180, p. 54-60, 2009.
- CHEN, X.; HE, B. Oxygen free radical scavenging activity and anti-lipid peroxidation of tea polyphenol. **Zhong Yao Cai.**, v. 21, p. 141–145, 2007.
- CHEYNIER, V. Polyphenols in food are more complex than often thought. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 81, p. 223-229, 2005.
- CICHON, M. A. et al. Microenvironmental Influences that Drive Progression from Benign Breast Disease to Invasive Breast Cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 15, p. 389–397, 2010.
- CLARKE, M. F.; FULLER, M. Stem cells and cancer: two faces of eve. **Cell**, v. 124, n. 6, p.1111-1115, 2006.
- CONNOR, A. M. et al. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 893-898, 2002.
- COOPER, G. M. The cancer book. Boston: Jones & Bartlett, 1993.
- COS, P. et al. Proanthocyanidins in health are: current and new trends. **Current Med. Chem.**, v. 10, p. 1345–1359, 2004.
- COUTURIER, J. et al. Diagnosis of HER2 gene amplification in breast carcinoma. **Pathol Biol (Paris)**, v. 56, n. 6, p. 375-9, 2008.
- DAVIS, C. D.; MILNER, J. A. Biomarkers for diet and cancer prevention research: potentials and challenges. **Acta Pharmacologica Sinica**, United States, v. 28, n. 9, p. 1262-73, 2007.
- DE CASTRO BARRETO, R. et al. O Duplo Papel da Inflamação no Surgimento das Lesões Cancerígenas. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 107-114, 2011.
- DIEHL, J. A.; GLADDEN, A. B. Cell cycle progression without cyclin E/CDK2: breaking down the walls of dogma. **Cancer Cell**, v. 4, n. 3, p. 160-162, 2003.

DONADIO, L. C. Pitaya. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 3, p. 637-929, 2009.

DUARTE, M. H. **Armazenamento e qualidade de pitaya (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose, submetida à adubação orgânica**. 2013. 113f. Dissertação (Mestrado) Curso de Pós Graduação em Agroquímica - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

DUNNWARD, L. K.; ROSSING, M. A. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. **Breast Cancer Res.**, v. 9, n. 1, p. 6, 2007.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. **The Lancet**, v. 378, n. 9793, p. 771-784, 2011.

EHLERS, S.; SMITH, K. A. Differentiation of T cell lymphokine gene expression: the in vitro acquisition of T cell memory. **The Journal of experimental medicine**, v. 173, n. 1, p. 25-36, 1991.

ESHRE CAPRI WORKSHOP GROUP. Hormones and breast cancer. **Hum Reprod Update**, v. 10, p. 281-293, 2004.

ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Constituyentes bioactivos no-nutricionales de alimentos de origen vegetal y su aplicación em alimentos funcionales. **Alimentos funcionales**. Madrid: RUMAGRAF AS; p. 101-65, 2005.

ESQUIVEL, P.; AYARA QUESADA, Y. Características del fruto de la pitahaya (*Hylocereus* sp.) y su potencial de uso en la industria alimentaria. **Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v. 3, n. 1, p. 113-129, 2012.

ESQUIVELA, P.; STINTZING, A, F. C. et al. Phenolic compound profiles and their corresponding antioxidant capacity of purple pitaya (*Hylocereus* sp.) Genotypes. **Z Naturforsch**, v. 62, p. 636-44, 2007.

FABIAN, C. J.; KIMLER, B. F. Use of biomarkers for breast cancer risk assessment and prevention. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v. 106, n. 1-5, p. 31-9, 2007.

FDA, CDER. Guidance for industry: bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services. **Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CV)**, 2001.

FERGUSON, L. R. Nutrigenomics approaches to functional foods. **Journal of the American Dietetic Association**, United States, v. 109, p. 452-458, 2009.

FREITAS, D. G. C. **Efeito da adição de pectina e frutooligossacarídeo como ingredientes funcionais no suco misto de laranja e cenoura**. 2000. Dissertação (Mestrado) em Tecnologia de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2000.

- GALVÃO, E. R. C. G. N. Breast cancer proteomics: a review for clinicians. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 137, n. 6, p. 915-25, 2011.
- GARCÍA-CRUZ, L. et al. Physical, chemical, and antioxidant activity characterization of Pitaya (*Stenocereus pruinosus*) fruits. **Plant foods for human nutrition**, v. 68, n. 4, p. 403-410, 2013.
- GARNIS, C.; BUYS, T. P. et al. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. **Molecular Cancer**, v. 3, n. 9, 2004.
- GE, J. et al. The GSTP1 105Val Allele Increases Breast Cancer Risk and Aggressiveness but Enhances Response to Cyclophosphamide Chemotherapy in North China. **Plos one**, v. 8, n. 6, p. 675-89, 2013.
- GREENWALD, P.; CLIFFORD, C. K. et al. Diet of cancer prevention. **Eur J Cancer**, v. 37, n. 8, p. 959-962, 2001.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A. et al. Morte Celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. Claredon Press, **Oxford**, New York, 3 ed., p. 968, 2000.
- HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 52, p. 481-504, 2000.
- HARRIS, C. C. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinican abridged historical perspective. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p.1187-98, 1996.
- HENRY, N. L.; HAYES, D. F. Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring, and treatment of primary and metastatic breast cancer. **Oncologist**, v.11, n.6, p. 541-52, 2006.
- HILL, M. J. Nutrition and Human Cancer. **Annals New York Academy of Sciences**, United States, v. 833, p. 68-78, 1997.
- HOLLMAN, P. C. H.; ARTS, I. C. W. Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. **J Sci Food Agr.**, v. 80, p. 1081-93, 2000.
- HOLST, B.; WILLIAMSON, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. **Curr Opin Biotechnol.**, v. 19, n. 2, p. 73-82, 2008.
- HOU, D. X. et al. Molecular mechanisms behind the chemopreventive effect of anthocyanidins. **J Biomed Biotech.**, v. 5, p. 321–325, 2004.
- HRAZDINA, G.; BORZEL, A. J. et al. Studies on the stability of the anthocyanidin-3,5-diglucosides. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 21, n. 4, p. 201-204, 1970.
- HUANG, D.; OU, B. The Chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-56, 2005.

HUANG, S. Histone methyltransferases, diet nutrients and tumour suppressors. **Nature**, England, v. 2, p. 469:476, 2002.

HYNES, N.E.; LANE, H.A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 5, p. 341-54, 2005.

HYOENJI K. et al. Comparative antioxidant and antiproliferative activities of red and white pitayas and their correlation with flavonoid and polyphenol content. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 38-45, 2010.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2010. Incidência de Câncer no Brasil**. Ministério da Saúde. Brasil. Rio de Janeiro, 2011.

INCA - INTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2013. Incidência de câncer no Brasil**. Ministério da Saúde. Brasil. Rio de Janeiro, 2013.

JAAFAR, R. A. et al. Proximate Analysis of Dragon Fruit (*Hylecereus polyrhizus*). **American Journal of Applied Sciences**, v. 6, n. 7, p. 1341-1346, 2009.

JACOBS, D. R.; TAPSELL, L. C. Food, not nutrients, is the fundamental unit in nutrition. **Nutr Rev.**, v. 65, n. 10, p. 439-50, 2007.

JAKIMIUK, A.J. et al. Prevalence of estrogen receptor PvuII and XbaI polymorphism in population of Polish postmenopausal women. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 45, n. 4, p. 331-338, 2007.

JAMILAH, B. et al. Physico-chemical characteristics of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel. **International Food Research Journal**, Selangor, v. 18, n. 1, p. 279-286, 2011.

JOSEPH, A.; MOKBEL, K. Male breast cancer. **International Journal of Fertility and Womens Medicine**, v. 49, p. 198-199, 2004.

JUNQUEIRA, K. P. et al. Diversidade genética de Pitayas nativas do cerrado com base em marcadores RAPD. In: 4º CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2007, São Lourenço- MG.

JUNQUEIRA, K. P. et al. Informações preliminares sobre uma espécie de pitaya do Cerrado. Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**. 18p. (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN, v. 62, p.1517-5111), 2002.

KANG, S. S. et al. Synthesis and biological evaluation of a library of resveratrol analogues as inhibitors of COX-1, COX-2 and NF-kappa B. **Bioorg Med Chem.**, v. 17, p. 1044-54, 2009.

KATSUBE, N. et al. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. **J Agric Food Chem.**, v. 51, p. 68-75, 2003.

KENNEDY, A. et al. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. **J Nutr.**, v. 139, p. 1-4, 2009.

KHALILI, M. Z. R. et al. Hypocholesterolemic effect of red pitaya (*Hylocereus* sp.) on hypercholesterolemia induced rats. *International Food Research Journal*, v. 16, p. 431-440, 2009.

KIEBACK, D.G. et al. A genetic mutation in progesterone receptor (PROGINS) leads to an increased risk of non-familial breast and ovarian cancer causing inadequate control of estrogen receptor driven proliferation. *J Soc Gynecol Investig.*, v. 5, n. 1, p. 40, 1998.

KIM, H. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of mango (*Mangifera indica* L.) flesh and peel. *Food Chemistry*, v. 121, n. 2, p. 429-436, 2010.

KIM, H. et al. Comparative antioxidant and antiproliferative activities of red and white pitayas and their correlation with flavonoid and polyphenol content. *Journal of food science*, v. 76, n. 1, p.38-45, 2011.

KISS, J. **Estranhas no ninho**. Globo Rural, ed. 210, abr. 2003. Disponível em: <http://www.revistagloborural.globo.com/EditoraGlobo/componentes/article/edg_articloe_print/...>. Acesso em: 20 mai. 2013.

KOK, M.; LINN, S. C. Gene expression profiles of the oestrogen receptor in breast cancer. *The Netherlands Journal of Medicine*, v. 68, n. 10, p. 291-302, 2010.

KOK, T. M.; VAN BREDA, S. G. et al. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds. *European Journal of Nutrition. Germany*, v. 47, p. 51-59, 2008.

KONOPKA, K. et al. Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1312, n. 3, p. 186-196, 1996.

KRIS-ETHERTON, P. M. et al. Bioactive compounds in food: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.*, v. 113, p. 71-88, 2002.

KUSKOSKI, E. M. et al. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciência Rural*, v. 36, n.4, p.1283-1287, 2006.

LACROIX, M.; LECLERCQ, G. Relevance of breast cancer cells lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat.*, v. 83, n. 3, p. 249-89, 2004.

LAJUS, T. B. P. A utilização de inibidores de PARP na profilaxia e no tratamento do câncer de mama deficiente no gene BRCA1. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 9, n. 3, p. 252-256, 2011.

LARSEN, C. S. Animal source foods and human health during evolution. *J Nutr.*, v. 133, n. 11, p. 3893-7, 2003.

- LAZZE, M. C. et al. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. **Carcinogenesis**, v. 25, p. 1427–1433, 2004.
- LE BELLEC, F.; VAILLANT, F. et al. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a new fruit crop, a market with a future. **Fruits**, Paris, v. 61, n. 4, p. 237-250, July/Aug. 2006.
- LEES, D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of pigment analyses in cranberries. **HortScience**, v. 7, n. 1, p. 83-84, 1972.
- LEWIS, J. E. et al. Intake of Plant Foods and Associated Nutrients in Prostate Cancer Risk. **Nutrition and Cancer**, England, v. 61, n. 2, p. 216-224, 2009.
- LI, S. F. et al. The development of pitaya. **Sci. Tech. Food Industry**, v. 7, p. 88–90, 2003.
- LINDBERG, K. et al. Expression of Estrogen Receptor β Increases Integrin $\alpha 1$ and Integrin $\beta 1$ Levels and Enhances Adhesion of Breast Cancer Cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 222, p. 156-167, 2010.
- LINHARES, J. J. et al. Polimorfismo em gene do receptor da progesterona (PROGINS) e da glutathiona S-transferase (GST) e risco de câncer da mama: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 4, p. 387-393, 2006.
- LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **J Nutr.**, v. 134, n. 12, p. 3479-3485, 2004.
- LIU, Z. J. Progesterone receptor gene inactivation and CpG island hypermethylation in human leukemia cancer cells. **FEBS Lett.**, v. 567, n. 2-3, p. 327-32, 2004.
- LUDERS, L.; MCMAHON, G. The pitaya or dragon fruit (*Hylocereus unbatu*). Darwin: **Agnote**, v. 778, p. 1 – 4, 2004.
- LUO, H. et al. Chemical composition and in vitro evaluation of the cytotoxic and antioxidant activities of supercritical carbon dioxide extracts of pitaya (dragon fruit) peel. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n.1, p.1, 2014.
- MANACH, C. et al. “Polyphenols: food sources and bioavailability”. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.
- MARÇO, P.H; POPPI, R.J; SCARMINIO, I.S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.
- MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed. Viçosa: UFV. 486 p., 2011.
- MARQUES, V. B. Germinação, fenologia e estimativa do custo de produção da pitaita [*Hylocereus undatus*(Haw.) Britton & Rose]. 2010. 141 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

- MARTIN-MORENO, J. M.; SOERJOMATARAM, I. et al. Cancer causes and prevention: A condensed appraisal in Europe in 2008. **European Journal of Cancer**, England, v. 44, n. 10, p. 1390-1403, 2008.
- MAZUREK, S.; MICHEL, A. Effect of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 4941–4952, 1997.
- MEDINA, D. The mammary gland: A unique organ for the study of development and tumorigenesis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 1, n. 1, p. 5-19, 1996.
- MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos . **Bol. SBCTA**. Campinas, v. 36, n. 1-11, 2002.
- MENON, L. G.; KUTTAN, R. et al. Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds. **Cancer Letters**, v. 95, n. 1, p. 221–225, 1995.
- MENSOR, L. L. et al. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.
- MIGNONE, L. I. et al. Dietary carotenoids and the risk of invasive breast cancer. **Internacional Journal of Cancer**. United States, v. 124, n. 12, p. 2929-2937, 2009.
- MINICH, D. M.; BLAND, J. S. Dietary management of the metabolic syndrome beyond macronutrients. **Nutr Rev.**, v. 66, n. 8, p. 429-44, 2008.
- MIRZA, S. et al. Clinical significance of Stratifin, ERalpha and PR promoter methylation in tumor and serum DNA in Indian breast cancer patients. **Clin Biochem.**, v. 43, n. 4-5, p. 380-386, 2009.
- MIZRAHI, Y.; NERD, A. et al. Cacti as crops. **Horticultural Review**, New York, v. 18, p. 291–320, 1997.
- MOKBEL, M. S.; HASHINAGA, F. Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. **Food Chem.**, v. 94, p. 529–34, 2006.
- MONROE, D. G. et al. Estrogen receptor α and β heterodimers exert unique effects on estrogen- and tamoxifen-dependent gene expression in human U2OS osteosarcoma cells. **Molecular Endocrinology**, v. 19, p. 1555-1568, 2005.
- MOREIRA, R. A. et al. Produção e qualidade de frutos de pitaiá vermelha com adubação orgânica e granulada bioclástica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, p. 762-766, out. 2011. Volume especial.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

- NAKAYAMA, K. I.; NAKAYAMA, K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 5, p. 369-81, 2006.
- NANDI, S.; GUZMAN, R. C. et al. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: A unifying hypothesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, p. 3650-3657, 1995.
- NAZARIAN, R. et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF (V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. **Nature**, v. 468, n. 7326, p. 973-977, 2010.
- NERD, A.; MIZRAHI, Y. Effect of ripening stage on fruit quality after storage of yellow pitaiá. **Postharvest Biology and Technology**, v. 15, n. 2, p. 99-105, 1999.
- NERD, A.; TEL-ZUR, N. et al. Fruit of vine and columnar cacti. In: NOBEL, P. S. (Ed.). **Cacti: biology and uses**. Los Angeles: UCLA, 2002.
- NETZEL, M. et al. Renal excretion of antioxidative constituents from red beet in humans. **Food Research International**, v. 38, p. 1051-1058, 2005.
- NIGRO, J. M. et al. Mutations in the p53 gene occurs in diverse human tumour types. **Nature**, v. 342, p. 705-708, 1989.
- NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418-425, 2001.
- OLIVEIRA, A. L. et al. Elemental contents in exotic Brazilian tropical fruits evaluated by energy dispersive X-ray fluorescence. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 1, p. 82-84, 2006.
- OLIVEIRA, L. A. et al. Composição química da pitaiá vermelha (*Hylocereus polyrhizus*) e branca (*Hylocereus undatus*). In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 19. 2010, Lavras. Anais...Lavras: UFLA.
- OMS: **Organização Mundial De Saúde**. Disponível em <<http://www.who.int/en/>> Acesso em: fevereiro de 2013.
- ORTIZ-HERNANDEZ, Y. D. Hacia El conocimiento y conservación de la Pitahaya (*Hylocereus* sp.), **IPN-SIBEJ-Conacyt-FMCN**, Oaxaca, México, 124 pp, 2000.
- OSAWA, E.; NAKAJIMA, A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress colon carcinogenesis induced by azoxymethane in mice. **Gastroenterology**, v. 124, p. 361-367, 2003.
- OU, B.; HAMPCH-WOODILL, M. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619- 4626, 2001.
- PALOZZA, P. et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human colon adenocarcinoma cell lines by beta-carotene through down-regulation of cyclin A and Bcl-2 family proteins. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 1, p. 11-18, 2002.

- PANIGRAHY, D. et al. PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. **J Clin Invest.** v. 110, n. 7, p. 923-932, 2002.
- PEDERSEN, P. L. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells, **Prog. Exp. Tumor Res.**, v. 22, p. 190–274, 1978.
- PEREIRA, M. C. **Avaliação dos compostos bioativos em frutos nativos do Rio Grande do Sul.** Dissertação (mestrado) – Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- PETÉN, J. et al. Biology and natural history of breast cancer. **International Journal of Cancer Supplement**, v. 5, p. 5-21, 1990.
- POYRAZOGLU, E.; GOKMEN, V. et al. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum L.*) grown in Turkey. **J Food Comp Anal.**, v. 15, p. 567-75, 2002.
- POZO-GUISADO, E. et al. The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 9, p. 1375-1386, 2002.
- QI, C. et al. Blueberry anthocyanins induce G2/M cell cycle arrest and apoptosis of oral cancer KB cells through down-regulation methylation of p53. **Yi chuan= Hereditas/Zhongguo yi chuan xue hui bian ji**, v. 36, n.6, p. 566-573, 2014.
- RAMOS, E. A. et al. Simultaneous CXCL12 and ESR1 CpG island hypermethylation correlates with poor prognosis in sporadic breast cancer. **BMC Cancer**, v. 10, n. 1, p. 23, 2010.
- RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacol. Res.**, v. 55, n. 3, p. 207-216, 2007.
- REID, A. et al. Dual inhibition of ErbB1 (EGFR/HER1) and ErbB2 (HER2/neu). **Eur J Cancer**, v. 43, p. 481-9, 2007.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J. et al. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.
- ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n.1, p.53-60, 2007.
- ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. **Phis. Res.**, v. 50, p. 529-35, 2001.
- SABATE, J. The contribution of vegetarian diets to health and disease: a paradigm shift? **Am J Clin Nutr.**, v. 78, p. 502-7, 2003.

SANCHES, S. M.; SILVA, J. M. A. Interação entre especialidades: miocardiopatia dilatada e neoplasia de mama HER2 positiva. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n.1, p.11-15, 2010.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Res.**, v. 45, p. 528-37, 2000.

SCALBERT, A.; JOHNSON, I. T. et al. Polyphenols: antioxidants and beyond. **Am J Clin Nutr.**, v. 81, p. 215-7, 2005.

SCHIAVON, C. C. et al. Nutrition Education Intervention for Women With Breast Cancer: Effect on Nutritional Factors and Oxidative Stress. **Journal of nutrition education and behavior**, v. 47, n.1, p. 2-9, 2015.

SCHMITT, F.; GOBBI, H. Mama. In: BRASILEIRO-FILHO, G. et al. (Ed.). Bogliolo: patologia. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. p. 613-643, 2006.

SILVA, C. R. M.; NAVES, M. M. V. Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 135-143, 2001.

SILVA, F. O.; MARTINS, M. I. E. et al. Custo de implantação de lichia em dois espaçamentos, Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, XXVII, 2002, Belém, PA. Anais... Belém: UFPEL, 2002. Disponível em:<http://www.ufpel.tche.br/spfruti/anais_xvii_cbf/fitotecnia/300.htm>. Acesso em: 20 mai. 2013.

SINGH, V. N.; GABY, S. K. Premalignant lesions: role of antioxidant vitamins and beta-carotene in risk reduction and prevention of malignant transformation. **Am J Clin Nutr.**, v. 53, p. 386-90S, 1991.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SIQUEIRA, J. O. et al. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 10, n. 1, p. 63-121, 1991.

SLEE, E. A. Executioner caspase-3,-6 and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phases of apoptosis. **J Biol Chem.**, v. 276, p. 7230–7236, 2001.

SOMEKAWA, Y. et al. “Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women”. **Obstet. Gynecol.**, v. 97, n. 1, p.109-15, 2001.

SOOBRAATTEE, M. A. et al. Phenolics as potencial antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research**, v. 579, p. 200-213, 2005.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **PNAS**, v. 98, n. 1, p.10869-10874, 2001.

SREEKANTH, D. et al. Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia Cell line-K562. **Phytochemistry**, v. 14, n. 11, p. 739-746, 2007.

STINTZING, F. C. et al. Structural investigations on betacyanin pigments by LC NMR and 2D NMR spectroscopy. **Phytochemistry**, v. 65, p. 415–22, 2004.

STINTZING, F. C.; SCHIEBER, A. et al. Betacyanins in fruits from red-purple pitaya, *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose. **Food Chemistry**. v. 77, p. 101–106, 2002.

STRACK, D.; VOGT, T. et al. Recent advances in betalain research. **Phytochemistry**, v. 62, p. 247-269, 2003.

SUCUPIRA, N.R. et al. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. Unopar **Cient Ciênc Biol Saúde**, v.14, n.4, p.263-269, 2012.

SUH, D. H. et al. Metabolite Profiling of Red and White Pitayas (*Hylocereus polyrhizus* and *Hylocereus undatus*) for Comparing Betalain Biosynthesis and Antioxidant Activity. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 34, p. 8764-8771, 2014.

SUN, J. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **J Agric Food Chem.**, v.50, p.7449–7454, 2002.

SUN, J.; HAN, F. et al. Cranberry phytochemical extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. **Cancer Lett.**, v. 241, n. 1, p.124-34, 2006.

TESORIERE, L. et al. Absorption, excretion, and distribution o dietary antioxidant betalains in LDLs: potencial health effects of betalains in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, p. 941-945, 2004.

TLSTY, T. D. et al. Genetic and Epigenetic Changes in Mammary Epithelial Cells May Mimic Early Events in Carcinogenesis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 9, n. 3, p. 263-274, 2004.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Los polifenoles de los alimentos y la salud. **Alim. Nutr. Salud.**, v. 10, p. 41-53, 2003.

TORRES, L. B. V.; SILVA, S. M. et al. Fruit characterization of a *Selenicereus C.F. setaceus* native from brejo micro region. Paraíba, State, Brasil. In: VI

INTERNATIONAL CONGRESS ON CACTUS PEAR AND COCHINEAL, 811, 2007, p. 149-154.

TRICHOPOULOS, D. et al. Early life events and conditions and breast cancer risk: from epidemiology to etiology. **International journal of cancer**, v. 122, n. 3, p. 481–485, 2008.

TZE, N. L. et al. Physicochemical and nutritional properties of spray-dried pitaya fruit powder as natural colorant. **Food and Science Biotechnology**, New York, v. 21, n. 3, p. 675-682, 2012.

UPADHYAYA, K. R.; RADHA, K. S. et al. Cell cycle regulation and induction of apoptosis by beta-carotene in U937 and HL-60 leukemia cells. **J Biochem Mol Biol.**, v. 40, p. 1009-1015, 2007.

VAILLANT, F. et al. Colorant and antioxidant properties of red pitahaya (*Hylocereus* sp.). **Fruits**, v. 60, p. 1-7, 2005.

VARGAS, P. N.; HOEZEL, S. C. et al. Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n.1, p. 11-15, 2008.

VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J. M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews**, v. 7, n. 9, p. 659-72, 2007.

VISVADER, J. E. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. **Genes & Development**, v. 23, p. 2563-2577, 2009.

VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. P. **Caracterização das propriedades funcionais do jambolão**. Embrapa clima temperado, 2008.

WANG, S. Y.; LIN, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 140-146, 2000.

WEIGEL, M. T.; DOWSETT, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. **Endocrine-related cancer**, v. 17, n. 4, p. 245–62, 2010.

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L. et al. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature reviews/Cancer**, v. 5, n. 8, p. 591-602, 2005.

WEINBERG, R. A. A biologia do câncer. **Editora Ateneu**, p. 1- 864, 2008.

WICHIENTHOT, S.; JATUPORNPIPAT, M. et al. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. **Food chemistry**, v. 120, n. 3, p. 850-857, 2010.

WILLIAMSON, G., HOLST, B. Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: are we heading in the right direction? **Br J Nutr.** v. 99, p. 55-8, 2008.

- WU, L. C. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. **Food Chemistry**, v. 95, n. 2, p. 319-327, 2006.
- WU, L. C. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. **Food Chemistry**, v. 95, n. 2, p. 319-327, 2006.
- WYBRANICE, S.; MIZRAHI, Y. Fruit flesh betacyanin pigments in *Hylocereus Cacti*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6086–6089, 2002.
- WYBRANIEC, S. et al. Minor betalains in fruits of *Hylocereus* species. **Phytochemistry**, v. 68, n. 2, p. 251-259, 2007.
- YEN, G. C.; LAI, H. H. et al. Nutric oxide scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinite* root. **Food Chemistry**, v. 74, p. 471-478, 2001.
- YONG, C. D.; ANDERSON, S. M. Sugar and fat- that's where it's at: metabolic changes in tumors. **Breast Cancers Research**, v. 202, p. 1-9, 2008.
- YOON, J. H.; BAEK, S. J. "Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties". **Yosei Med. J.**, v. 46, n. 5, p. 585-96, 2005.
- ZU, X. L.; GUPPY, M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 313, p. 459–465, 2004.