UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência Dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Efeito de extratos ricos em antocianinas ou elagitaninos de amora silvestre (*Morus nigra L.*), amora preta (*Rubus spp*), e grumixama (*Eugenia brasiliensis Lam*) no crescimento e na expressão de genes e miRNAs de diferentes linhagens de células humanas de câncer de mama.

Gabriela Rezende Costa

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Thomas Prates Ong

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência Dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Efeito de extratos ricos em antocianinas ou elagitaninos de amora silvestre (*Morus nigra L.*), amora preta (*Rubus spp*), e grumixama (*Eugenia brasiliensis Lam*) no crescimento e na expressão de genes e miRNAs de diferentes linhagens de células humanas de câncer de mama.

Gabriela Rezende Costa

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018 O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Thomas Prates Ong

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

C837e Costa, Gabriela Rezende
Efeito de extratos ricos em antocianinas ou
elagitaninos de amora silvestre (*Morus nigra* L.),
amora preta (*Rubus* spp), e grumixama (*Eugenia
brasiliensis* Lam) no crescimento e na expressão de
genes e miRNAs de diferentes linhagens de células
humanas de câncer de mama. / Gabriela Rezende
Costa. - São Paulo, 2017.
100 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Ong, Thomas Prates

1. Câncer de Mama. 2. Compostos Bioativos. 3.
Elagitaninos. 4. Antocianinas. 5. Expressão Gênica.
I. T. II. Ong, Thomas Prates, orientador.

Gabriela Rezende Costa

Efeito de extratos ricos em antocianinas ou elagitaninos de amora silvestre (*Morus nigra* L.), amora preta (*Rubus spp*), e grumixama (*Eugenia brasiliensis* Lam) no crescimento e na expressão de genes e miRNAs de diferentes linhagens de células humanas de câncer de mama.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr.
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

5º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2017

RESUMO

COSTA, G.R. Efeito de extratos ricos em antocianinas ou elagitaninos de amora silvestre (*Morus nigra* L.), amora preta (*Rubus spp*) e grumixama (*Eugenia brasiliensis* Lam) no crescimento e na expressão de genes e miRNAs de diferentes linhagens de células humanas de câncer de mama. 2017. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2017.

O câncer de mama caracteriza-se globalmente como a neoplasia de maior incidência e mortalidade na população feminina. Antocianinas e elagitaninos presentes em frutas como as *berries* destacam-se por seu promissor efeito protetor em diferentes estágios do desenvolvimento do câncer de mama. Grumixama (G; *Eugenia brasiliensis* Lam) é uma espécie de cereja nativa do Brasil que assim como as amora-preta (AP; *Rubus spp*) e silvestre (AS; *Morus nigra* L.) contém alto teor de antocianinas e elagitaninos. Poucos estudos focaram na ação anticâncer destas *berries* no câncer de mama. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de extratos ricos em antocianinas ou elagitaninos de G, AP e AS no crescimento e na expressão de genes e miRNAs das linhagens de células humanas de câncer de mama MCF-7 (receptor de hormônio positiva) e MDA-MB 231 (receptor de hormônio negativa). Não se observou citotoxicidade após 72 e 96 horas de tratamento com os extratos (25-200µg/mL) ricos em antocianinas (ASANT, APANT e GANT) ou elagitaninos (APELA e GELA), em ambas as linhagens celulares. Após 72 horas de tratamento, GANT e APANT induziram parada de ciclo celular em G0/G1 (12,5 e 50µg/mL, $p < 0,05$) em células MCF-7. Após 96h, ASANT, APANT e GANT induziram parada de ciclo celular em G0/G1 (12,5 e 50µg/mL; $p < 0,05$) nessas mesmas células. Entretanto, na concentração de 200µg/mL apenas GANT induziu parada em G0/G1 (72 e 96h; $p < 0,05$). Em células MDA-MB 231, após 96h APANT e GANT induziram parada de ciclo celular em G0/G1 nas concentrações testadas (12,5, 50 e 200µg/mL, $p < 0,05$), assim como ASANT nas concentrações de 12,5 e 50µg/mL ($p < 0,05$). Em células MCF-7, após 72h APELA e GELA induziram aumento da proporção de células em subG0 (200µg/mL, $p < 0,05$). Em MDA-MB 231, após 72 e 96h, APELA e GELA (200µg/mL) induziram aumento da proporção de células em subG0 ($p < 0,05$) e parada em G0/G1 ($p < 0,05$). Em células MCF-7, GANT induziu morte celular por apoptose ($p < 0,05$) após 72 e 96h de tratamento. Entretanto, em MDA-MB 231 os extratos ricos em antocianinas não induziram morte celular. Em células MCF-7, após 96h GELA e APELA induziram principalmente necrose ($p < 0,05$). Em MDA-MB 231, APELA e GELA induziram apoptose ($p < 0,05$) após 72 e 96h. Em células MDA-MB 231, após 72h de tratamento foi observada inibição da proliferação celular por GELA, GANT e APELA (200µg/mL; $p < 0,05$). Em células MDA-MB 231, 48h de tratamento com GELA; GANT e APELA (200µg/mL) aumentaram a expressão 5 genes (ESR2, FOXA1, JUN, PTGS2, VEGFA) e inibiram a expressão de 10 genes (ADAM23, ATM, BCL2, CDH1, EGF, GLI1, ID1, MKI67, SNAI2 e THBS1) correlacionados ao câncer de mama. Adicionalmente, GELA; GANT e APELA (200µg/mL) induziram aumento da expressão de miR-210 ($p < 0,05$) e APELA (200µg/mL) reduziu a expressão de miRNA 19a/b ($p < 0,05$) em células MDA-MB 231. Coletivamente estes resultados sugerem que antocianinas de grumixama e elagitaninos de amora preta e grumixama apresentam potencial efeito protetor contra o câncer de mama. Adicionalmente, essa ação anticarcinogênica pode ser mediada por indução de morte celular, mais especificamente apoptose, redução de proliferação celular e modulação da expressão de genes e miRNAs relacionados ao câncer de mama.

Palavras Chaves: *berries*, antocianinas, elagitaninos, câncer de mama

ABSTRACT

COSTA, G.R. **Effects of extracts rich in anthocyanins or ellagitannins from mulberry (*Morus nigra* L.), blackberry (*Rubus spp*) and grumixama (*Eugenia brasiliensis* Lam) on cellular growth and gene and miRNAs expression from distinctive human breast cancer cell lines.** 2017. Thesis (PhD) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2017.

Breast cancer is characterized as the neoplasia with the highest incidence and mortality rates in women worldwide. Anthocyanins and ellagitannins present in certain fruits, such as berries, stand out for their promising protective effect at different stages of breast cancer development. Grumixama (G; *Eugenia brasiliensis* Lam), a cherry species from Brazil, as well as blackberry (AP; *Rubus spp*) and mulberry (AS; *Morus nigra* L.) contain elevated concentrations of anthocyanins and ellagitannins. Few studies focused on the anticarcinogenic action of these berries in breast cancer development. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effects of extracts rich in anthocyanins or ellagitannins from G, AP and AS on cellular growth and genes and miRNAs expression in human MCF-7 (hormone receptor positive) and MDA-MB 231 (hormone receptor negative) cell lines. No cytotoxicity was observed after 72 and 96 hours of treatment with extracts rich in anthocyanin (25-200 µg/mL) (ASANT, APANT and GANT) or ellagitannins (APELA and GELA) in both cell lines. After 72 hours of treatment, GANT and APANT induced cell cycle arrest at G0/G1 (12.5µg/mL and 50µg/mL, $p<0.05$) in MCF-7 cells. After 96h, ASANT, APANT and GANT induced cycle arrest at G0/G1 (12.5 and 50µg/mL; $p<0.05$) in MCF-7 cells. However, at 200µg/mL, only GANT induced G0/G1 (72 and 96h; $p<0.05$). In MDA-MB 231 cells, after 96h APANT and GANT induced cell cycle arrest at G0/G1 with the three tested concentrations (12.5, 50 and 200µg/mL, $p<0.05$), as well as ASANT at concentrations 12,5 and 50µg/mL ($p<0.05$). In MCF-7 cells, after 72h APELA and GELA induced an increase in the proportion of cells in subG0 (200µg/mL, $p<0.05$). In MDA-MB 231, after 72 and 96h, APELA and GELA (200µg/mL) induced an increase in the proportion of cells in subG0 ($p<0.05$) and cell cycle arrest in G0/G1 ($p<0.05$). In MCF-7 cells, GANT induced apoptosis ($p<0.05$) after 72 and 96h of treatment. However, in MDA-MB 231, extracts rich in anthocyanins did not induce cell death. In MCF-7 cells, after 96h GELA and APELA induced mainly necrosis ($p<0.05$). In MDA-MB 231, APELA and GELA induced apoptosis ($p<0.05$) after 72 and 96h. In MDA-MB 231 cells, inhibition of cell proliferation by GELA, GANT and APELA (200µg/mL; $p<0.05$) was observed after 72h of treatment. In MDA-MB 231 cells, treatment for 48h with GELA, GANT and APELA (200µg) increased expression of 5 genes (ESR2, FOXA1, JUN, PTGS2, VEGFA) and inhibited expression of 10 genes (ADAM23, ATM, BCL2, CDH1, EGF, GLI1, ID1, MKI67, SNAI2 and THBS1) correlated with breast cancer. In addition, GELA; GANT and APELA (200µg/mL) induced increased expression of miR-210 ($p<0.05$) and APELA (200µg/mL) reduced the expression of miRNA 19a/b ($p<0.05$) in MDA-MB cells 231. Collectively these results suggest that anthocyanins of grumixama and ellagitannins of blackberry and grumixama have potential protective effect against breast cancer. Additionally, this anticarcinogenic action can be mediated by induction of cell death, more specifically apoptosis, reduction of cell proliferation and modulation of the expression of genes and miRNAs related to breast cancer.

Keywords: berries; anthocyanins; ellagitannins; breast cancer

AGRADECIMENTOS

Primeiro gostaria de agradecer àqueles que estão comigo todos os dias, de corpo ou alma presentes, que torcem por mim, vibram por mim e iluminam minha caminhada.

Agradecer o meu companheiro Nobuiuki, que me apoia e me encoraja, que me perturba nos dias dele e me atura nos meus dias. Certamente sem a tua força eu não estaria aqui, não teria nem tentado, e você sabe disso. Obrigada meu amor.

Mas para chegar aqui foi preciso muito mais, o meu SER é resultado do que me construiu ao longo da vida, e a minha base é feita de família.

Agradeço à minha mãe MARIA, que me ensinou o que era empoderamento muito antes de se falar sobre isso. À minha irmã Fernanda, que como ela mesmo me diz “minhas chatices foram apenas para te preparar para o dia de hoje”. Ao meu pai Edmo, meu padrasto Roberto, meus irmãos Gustavo e Arthur, minha cunhada Juciele e meus sobrinhos Julia e Daniel por me fazerem sentir parte de algo maior e de muita força.

Agradeço à minha “Grande Família”. Meus avós que já se foram, mas me amaram e foram amados sobre todas as coisas. Aos meus tios e tias, primos e primas, vocês sabem que sem vocês nada disso faria sentido.

Agradeço aos meus professores, vocês foram o motivo de escolher essa carreira, de querer gerar conhecimento mas principalmente compartilhá-lo.

Agradeço em especial o meu orientador, Prof. Dr. Thomas Prates Ong, pela oportunidade, pela sutileza nas broncas ao abrir meus olhos de Poliana, e por enxergar meu potencial muitas vezes até mais que eu.

À Profa. Dra. Neuza Mariko Hassimotto por participar intensamente desse projeto, por sua disponibilidade em ensinar e oportunidade desta parceria admirável.

À Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler por sua total disponibilidade em colaborar, dividindo seu conhecimento e espaço. Agradeço ainda a todos do seu laboratório pela atenção e carinho com que me acolheram.

À Renata Albuquerque pela contribuição técnica, pelo sorriso no rosto e por tornar as tardes e até dias inteiros à frente do citômetro mais leves.

Agradeço os meus amigos e amigas, que deixei em terras distantes e que encontrei aqui

em SP, vocês me conhecem e sabem que são a parte mais complexa e maravilhosa de mim. E se por um acaso não estão citados aqui por nome é porque contrapondo meu coração enorme minha memória é digna da Dory (risos).

Agradeço Tatiana Pedrosa que me ensinou nos mínimos detalhes como trabalhar com cultura de células, mas da qual, o maior presente foi fortalecer a minha crença de que um bom profissional compartilha seu conhecimento. Obrigada por saber se doar sem ver nisso uma subtração mas sim uma soma.

À Van pelo exemplo de profissional, pela amizade e companheirismo mas, principalmente, por me fazer me sentir NORMAL (risos) rs.

À Lu pela parceria, que já gerou e espero gere ainda mais frutos, e por tentar me ensinar a ser mais eu.

Às minhas parceiras de laboratório Gabriela Novaes, Lívia Ribeiro, Luiza Guido, Natália Castro e Raquel Santana pelo apoio em diversos momentos. Sobretudo Camile Fontelles e Mariana Rosim pelo suporte cômico e ético.

Aos companheiros de trabalho, alunos, técnicos e professores, por compartilharem seus laboratórios e pensamentos, tornando ainda mais prazeroso o aprendizado.

Agradeço ao pessoal das secretarias pelo sorriso diário e a prontidão em nos ajudar.

À Lurdinha porque tudo foi mais fácil com seu café e sua companhia às 7 da manhã.

À Rose pelos inúmeros bons dias e pelo cheirinho de limpeza que eu tanto amo

Ao seguranças queridos que zelam por nós em noites e feriados de USP deserta.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

Ao Food Research Center (FoRC) pelo apoio financeiro

Por ultimo mas não menos importante, agradeço à todos os de fora da FBA pela resiliência, afinal, ser amigo de doutorando não é moleza.

Ps.: Agradeço ao Bob, que não sabe ler, mas com sabe me fazer sentir a pessoa mais amada do mundo. Você é o melhor filho canino que alguém poderia querer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação dos fenólicos de <i>berries</i> e polifenóis representativos de cada classe...	1
Figura 2: Representação da estrutura geral de antocianinas (forma flavílio).....	2
Figura 3: Exemplo de um elagitanino sanguin-6.	4
Figura 4: Hidrólise de elagitanino.....	4
Figura 5: Metabolismo de elagitaninos no trato gastrointestinal.	5
Figura 6: Potenciais mecanismos anticâncer dos polifenóis de plantas durante o desenvolvimento do câncer.	8
Figura 7: Modelo hipotético de progressão do tumor de mama.....	13
Figura 8: Representação esquemática dos alvos moleculares e eficiência de compostos fenólicos dietéticos naturais em múltiplos estágios da carcinogênese mamária.	16
Figura 9: Imagem dos frutos utilizados no presente trabalho. Grumixama (A); Amora Preta (B) e Amora Silvestre (C).	21
Figura 10: Histograma representativo da marcação com PI.	25
Figura 11: Histograma representativo da distribuição de células consideradas em morte e nas diferentes fases do ciclo celular após aquisição dos dados em citometria de fluxo.....	27
Figura 12: Histograma representativo da distribuição das células marcadas com 7AADe/ou Anexina V-PE.	28
Figura 13: Imagem representativa do decaimento de fluorescência das células marcadas com CFSE após proliferação.....	30
Figura 14: Viabilidade celular em linhagens de células MCF-7 e MDA- MB 231 tratadas com extratos ricos em antocianinas.....	34
Figura 15: Viabilidade celular em linhagem de células MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em elagitaninos.	35
Figura 16: Ciclo celular das linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em antocianinas no tempo de 72h.....	36
Figura 17: Ciclo celular das linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em antocianinas no tempo de 96h.....	37
Figura 18: Ciclo celular das linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em elagitaninos no tempo de 72h.	38
Figura 19: Ciclo celular das linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em elagitaninos no tempo de 96h.	39

Figura 20: Apoptose em linhagem de células MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em antocianinas.	40
Figura 21: Apoptose em linhagem de células MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em elagitaninos.	41
Figura 22: Apoptose em células MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em antocianinas ou elagitaninos.	41
Figura 23: Proliferação celular em células MDA-MB 231 marcadas com CFSE e tratadas com extratos ricos em elagitaninos e antocianinas.	42
Figura 24: Apoptose em células MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em antocianinas ou elagitaninos.	43
Figura 25: Genes relacionados ao câncer de mama regulados pelos tratamentos em células MDA-MB 231.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores do <i>fold-regulation</i> dos Genes com expressão alteradas após 48h de tratamento.....	44
Tabela 2: MicroRNAs com expressões aberrantes no tratamento em relação ao controle.	46
Tabela 3: Valores do <i>fold-change</i> , intervalo de confiança, <i>p-value</i> e <i>fold-regulation</i> nos miRNAs avaliados.	83
Tabela 4: Valores do <i>fold-change</i> , intervalo de confiança, <i>p-value</i> e <i>fold-regulation</i> nos miRNAs avaliados.	86
Tabela 5: Valores do <i>fold-change</i> , intervalo de confiança, <i>p-value</i> e <i>fold-regulation</i> nos miRNAs avaliados.	89

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Comparação dos <i>fold-change</i> de microRNAs com expressão relevante	46
---	----

LISTA DE ABREVIACÕES

ANT: extrato rico em antocianinas

AP: amora preta

AS: amora silvestre

BSA: *bovineserum albumin*; albumina de soro bovino

CBAs: compostos bioativos dos alimentos

CFSE: *carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester*; éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína

DNMT1: DNA metil-transferase 1

DNMT3a: DNA metil-transferase 3a

DNMT3b: DNA metil-transferase 3b

DMSO: dimetilsulfoxido

E2: estrógeno

EA: ácido elágico

ET: elagitaninos

ELA: extrato rico em elagitaninos

EMT: transição epitélio mesenquimal

ER: receptor de estrógeno

G: grumixama

HER2: receptor de fator de crescimento epidermal humano

HR: receptor de hormônio

PBS-A: *phosphate buffered Saline*; Ca-livre e Mg-livre)

PF: peso fresco

PI: *propidium iodide*; iodeto de propídeo

PR: receptor de progesterona

RR: risco relativo

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

TBS: *Tris-Buffered Saline*

TBS-T: *Tris-Buffered Saline* 0,1% Tween 20

Uro: urolitinas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Compostos bioativos de Berries	1
1.1.1	Antocianinas	1
1.1.2	Elagitaninos	3
1.2	Compostos Bioativos de Berries e Câncer	7
1.2.1	Mecanismos de Ação dos Compostos Fenólicos	8
1.2.1.1	Mecanismos Celulares	8
1.2.1.2	Mecanismos Moleculares	10
1.2.1.3	Regulação Epigenética	11
1.3	Câncer de Mama	12
1.4	Alimentação e câncer de mama	15
1.5	Mecanismos de Ação no Câncer de Mama	16
1.5.1	Mecanismos Celulares no Câncer de Mama	16
1.5.2	Mecanismos Moleculares no Câncer de Mama	17
1.5.3	Regulação Epigenética	20
1.6	Concentração de CBAs em Grumixama, Amora Preta e Amora Silvestre	20
2	OBJETIVO	23
2.1	Objetivos específicos	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Cultura Celular	24
3.2	Extratos de Amora Silvestre, Amora Preta e Grumixama	24
3.2.1	Extratos ricos em antocianinas	24
3.2.2	Extratos ricos em elagitaninos	24
3.2.3	Tratamentos e Controle	25
3.3	Ensaio de Viabilidade Celular	25
3.4	Ensaio de Ciclo Celular	26
3.5	Ensaio de Apoptose	28
3.6	Ensaio de Proliferação - CFSE	29
3.7	Avaliação de Expressão de Genes e miRNAs Relacionados ao Câncer de Mama	31
3.7.1	Ensaio de Expressão de mRNA Relacionados ao Câncer de Mama	31
3.7.2	Ensaio de Expressão de miRNAs Relacionados ao Câncer de Mama	32
4	RESULTADOS	34
4.1	Viabilidade Celular	34
4.2	Ciclo Celular	36

4.3	<i>Ensaio de Apoptose</i>	40
4.4	<i>Ensaio de Proliferação Celular -CFSE</i>	42
4.5	<i>Avaliação de Expressão de Genes e miRNAs Relacionados ao Câncer de Mama</i>	44
4.5.1	<i>Expressão de Genes Relacionados ao Câncer de Mama</i>	44
4.5.2	<i>Expressão de miRNA Relacionados ao Câncer de Mama</i>	45
5	<i>DISCUSSÃO</i>	47
6	<i>CONCLUSÕES</i>	58
7	<i>REFERÊNCIAS</i>	59
	<i>ANEXOS</i>	72
1	<i>Lista de GenesRelacionados ao Câncer de Mama</i>	73
2	<i>Layout da Placa de PCR- Genes</i>	76
3	<i>Layout de genes da Placa de PCR - Genes</i>	77
4	<i>Resultados Completos da Expressão Gênica</i>	78
5	<i>Lista de miRNAsRelacionados ao Câncer de Mama</i>	81
6	<i>Layout da Placa de PCR miRNA</i>	82
7	<i>Resultados Completos da Expressão de miRNAs</i>	83
8	<i>Ficha do Aluno</i>	92
9	<i>Curriculo Lattes</i>	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 Compostos bioativos de *Berries*

O consumo de frutas é particularmente recomendado devido a sua composição diversificada de compostos bioativos de alimentos (CBAs), como os polifenóis, aos quais importantes ações relacionadas à prevenção do câncer vêm sendo atribuídas (ADAMS et al., 2006; INCA, 2012). As *berries* são consideradas fontes importantes de CBAs, como algumas das principais classes de polifenóis (lignanas, estilbenóides, flavonóis, antocianidinas e taninos) (Figura 1) (ADAMS et al., 2006; AIYER et al., 2012a; AQIL et al., 2012; FOLMER et al., 2014).

Figura 1: Classificação dos fenólicos de *berries* e polifenóis representativos de cada classe.
Adaptada de: AIYER et al., 2012a.

1.1.1 Antocianinas

Antocianinas são flavonóides amplamente distribuídos e abundantes em frutas e vegetais que conferem a estes alimentos coloração vermelha, azul e roxa (COOKE et al., 2005; WANG; STONER, 2008). Reconhecidas por apresentarem atividade antioxidante, antiproliferativa e anti-inflamatória e são encontradas nos alimentos como glicosídeos de 6 antocianidinas agliconas: cianidina (Cyglc), delfinidina (Dp3glc), pelargonidina (Pg3glc), peonidina (Pn3glc), malvidina (Mv3glc), e petunidina (Pt3glc) (Figura 2) (AQIL et al., 2012; FERNANDES et al., 2014).

Antocianina	is	R ₁	R ₂
Pg3glc		H	H
Pn3glc		OCH ₃	H
Cy3glc		OH	H
Mv3glc		OCH ₃	OCH ₃
Pt3glc		OCH ₃	OH
Dp3glc		OH	OH

Figura 2: Representação da estrutura geral de antocianinas (forma flavílio).
R3 é um radical açúcar. Adaptada de: FERNANDES et al., 2012.

As antocianidinas, que estão na forma aglicona (sem glicosídeo), apresentam, de forma geral, capacidade de captar radicais livres superiores às das antocianinas (que contém radicais glicosídeos), competência essa que decai com o aumento do número de açúcares adicionados (WANG; STONER, 2008). Vale ressaltar que estes compostos estão disponíveis na natureza quase que exclusivamente na forma glicosilada (antocianinas) (COOKE et al., 2005). As antocianinas mais distribuídas nas frutas apresentam suas ramificações na posição 3-OH, são geralmente 3-OH monoglicosídeos e variam o açúcar da ramificação normalmente entre glicose, raminose, galactose e arabinose (FRANCIS, F.J., 1989 apud FERNANDES et al., 2014)

As antocianinas são moléculas altamente reativas e facilmente degradadas, o que implica em dificuldades na determinação da cinética e biodisponibilidade destes compostos (FERNANDES et al., 2014). Estudo recente realizado em humanos utilizou a técnica de marcação isotópica para melhor compreensão do metabolismo de antocianinas. Após administração oral de cianidina-3-glicosídeo¹³C (duas cápsulas contendo 250mg cada) foi possível recuperar nas fezes, urina e ar exalado aproximadamente 44% do total consumido e estimar a biodisponibilidade relativa em 12,4%. Observou-se ainda, que as antocianinas na forma não metabolizada são as primeiras a atingir a corrente sanguínea. Embora seus metabólitos sejam encontrados em maior quantidade na circulação, estes alcançam a corrente sanguínea muito tempo após o composto não metabolizado (CZANK et al., 2013).

No que diz respeito à biodisponibilidade em tecidos específicos, em estudo no qual porcos consumiram ração suplementada com mirtilo (1-4% m/m) por 4 semanas, foi possível quantificar antocianinas e seus metabólitos em diferentes órgãos como rins, olhos, córtex e

cerebelo. Esses resultados indicam que estes compostos se acumulam em certos tecidos corpóreos e podem inclusive transpor a barreira hemato-encefálica (KALT et al., 2008). Similarmente, ratos que consumiram ração enriquecida com extrato de amora preta (20mg de extrato/kg de dieta; rico em antocianinas) por 12 dias apresentaram acúmulo de antocianinas e seus metabólitos, na bexiga, próstata, testículo, coração e tecido adiposo. Mais especificamente, a bexiga continha os maiores níveis de antocianinas e derivados, seguida pela próstata, que continha principalmente cianidina-3-glicosídeo nativa. Vale destacar que os teores de CBAs quantificados no plasma foram inferiores aos encontrados em alguns tecidos, como bexiga e próstata (FELGINES et al., 2009). A limitação para se quantificar antocianinas e derivados em tecidos é reconhecida e as prováveis razões para a dificuldade na detecção destas são: a instabilidade de antocianinas, o metabolismo pela microflora do intestino, a alta velocidade de excreção e indisponibilidade de técnicas analíticas adequadas (AQIL et al., 2014).

Sabe-se que o consumo de algumas *berries* como mirtilo, amora preta e framboesa vermelha podem prover, em 100g do fruto, quantidades superiores à 500 mg de polifenóis e 200mg de antocianinas (MANACH et al., 2005; “PHENOL-EXPLORER”, [s.d.]; WANG et al., 2013). Frutos cultivados no Brasil como amora silvestre, amora preta e grumixama podem fornecer de 32 à 260mg de antocianinas por porção de 100g (HASSIMOTTO et al., 2008; HASSIMOTTO; GENOVESE; LAJOLO, 2007; TEIXEIRA et al., 2015). Embora a disponibilidade de dados sobre o teor de antocianinas nos alimentos venha crescendo, pouco se sabe sobre a real ingestão de antocianinas pela população global. Estimativas iniciais fizeram menção ao consumo diário de 1g de polifenóis totais (FERNANDES et al., 2014). O consumo de antocianinas na dieta por norte americanos foi estimado entre 180 e 215 mg por dia, enquanto outros flavonoides como genisteína, quercetina e apigenina apresentaram consumo estimado de apenas 20-25 mg por dia (WANG et al., 2013). No entanto, não estão disponíveis na literatura dados sobre o consumo de antocianinas pela população brasileira.

1.1.2 Elagitaninos

Os elagitaninos são ésteres de ácido hexahidroxidifênico e um poliol, normalmente glicose ou ácido quínico (Figura 3). São compostos de alto peso molecular, solúveis em água e que possuem a capacidade de precipitar proteínas e alcaloides (CLIFFORD; SCALBERT, 2000). O elevado tamanho das moléculas de elagitaninos e sua polaridade relativamente alta

são fatores que corroboram para a baixa biodisponibilidade do composto, evidenciada pela escassez de estudos que demonstrem a presença destas substâncias no sistema circulatório ou na urina (GARCIA-MUÑOZ; VAILLANT, 2014).

Figura 3: Exemplo de um elagitanino sanguin-6.

Fonte: CLIFFORD; SCALBERT, 2000.

Quando expostos a ácidos ou bases as ligações éster dos elagitaninos são hidrolisadas e o ácido hexahidroxidifênico se rearranja espontaneamente em ácido elágico (EA), que é insolúvel em água (Figura 4) (CLIFFORD; SCALBERT, 2000). Estudos demonstram que os elagitaninos (ET) são parcialmente hidrolisados a AE na parte superior do trato gastrointestinal. Diferentemente dos ETs, o AE podem ser absorvidos e encontrados na circulação de 1-5h após a ingestão. Todavia, o teor de AE encontrado na sangue e na urina é pequeno, o que pode ser justificado por sua baixa solubilidade, por sua afinidade às células da mucosa e pela formação de sais insolúveis com íons de Ca e Mg (GARCIA-MUÑOZ; VAILLANT, 2014).

Figura 4: Hidrólise de elagitanino.

Fonte: CLIFFORD; SCALBERT, 2000.

Posteriormente, quando ETs e seus metabólitos chegam ao intestino, as enzimas microbianas promovem a desidroxilação progressiva destes, produzindo urolitinas (Uro). Assim os ET convertidos a AE na parte superior do trato gastrointestinal são, após a ação de enzimas bacterianas, transformados em metabólitos diretos como as Uro na seguinte sequencia: Uro D, C, A e B (Figura 5) (LIPÍŃSKA; KLEWICKA; SÓJKA, 2014). Em humanos, a conversão ocorre provavelmente no intestino grosso, uma vez que não foi

possível observar a produção de Uro em pacientes com colostomia (GARCIA-MUÑOZ; VAILLANT, 2014).

Figura 5: Metabolismo de elagitaninos no trato gastrointestinal.

Adaptada de: GONZÁLEZ-BARRIO; EDWARDS; CROZIER, 2011; LIPÍŃSKA; KLEWICKA; SÓJKA, 2014.

O teor e perfil de Uro produzido varia entre indivíduos, sendo esta variação atribuída não só à genética mas sobretudo à composição da microflora intestinal. Neste sentido, os indivíduos poderiam ser classificados como *high e low* excretadores de Uro (GARCIA-MUÑOZ; VAILLANT, 2014). Este mecanismo de metabolização assemelha-se ao observado em isoflavonas, para as quais a transformação do composto original na espécie mais biodisponível (equol) é um fator limitante para alguns indivíduos alcançarem os benefícios à saúde atribuídos às moléculas bioativas (GARCIA-MUÑOZ; VAILLANT, 2014). Entretanto, não observou-se correlação entre a produção de metabolitos de elagitaninos e os de isoflavonas (Uro e equol, respectivamente) (ESPÍN et al., 2013).

No que diz respeito à biodisponibilidade de ET e derivados em tecidos, estudo em camundongos que receberam oralmente extrato de romã, apresentaram aumento dos níveis plasmáticos de EA, que não foi detectado na próstata. Por outro lado, a administração intraperitoneal de extrato induziu o aumento, de aproximadamente 10 vezes, de EA no plasma, bem como possibilitou a detecção de EA na próstata, intestino delgado e cólon, que eram superiores aos detectados em outros sistemas de órgãos. A detecção de EA na próstata após a administração intraperitoneal, mas não oral, ocorreu provavelmente devido a maiores níveis plasmáticos atingidos após a administração intraperitoneal. A administração oral e intraperitoneal de Uro-A levou ao incremento de Uro-A e seus conjugados na próstata, sendo

os níveis de Uro-A maiores na próstata, cólon, e tecidos intestinais, comparado a outros órgãos (SEERAM et al., 2007).

Cerdá e colaboradores avaliaram o metabolismo dos elagitaninos provenientes de morangos, framboesas, nozes e vinho do carvalho-idade, e propuseram a Uro-B como biomarcador de exposição aos elagitaninos dietéticos em humanos. Os autores observaram a, previamente relatada, diversidade entre indivíduos que podem ser classificados como *high e low* excretadores de derivados de ET. Neste estudo, novamente não foi possível quantificar ET e AE nas análises das urinas realizadas por LC-MS/MS (CERDÁ; TOMÁS-BARBERÁN; ESPÍN, 2005).

Em humanos, a administração de 2 cápsulas/dia de extrato concentrado de romã (cada cápsula equivalendo a 8 ± 240 ml de suco ou; contendo ao final 600 mg de polifenóis), por pelo menos duas semanas antes da prostatectomia radical, resultou na detecção de Uro-A na próstata de 64% dos pacientes avaliados (FREEDLAND et al., 2013). Em estudo semelhante, após o consumo de nozes (35 g) ou suco de romã (200 ml) por 3 dias, antes da prostatectomia, foi possível quantificar metabólitos de EA em 24% dos pacientes. Pacientes submetidos à menor quantidade de EA proporcionada pelo tratamento com nozes, apresentaram maior teor de Uro-A na próstata. O teor de Uro-A variou de 0,5 a 2 ng/g de tecido analisado (GONZÁLEZ-SARRÍAS et al., 2010). Os pacientes foram então classificados em *high e low* produtores de Uro, estando a Uro-A presente principalmente no tecido dos *high* produtores. Entretanto, identificou-se em alguns pacientes, inclusive entre pequenos excretadores de Uro, a presença de ácido elágico dimetilado. No entanto, segundo os autores, não foi possível quantificar este metabólito, provavelmente devido a limitações analíticas (GONZÁLEZ-SARRÍAS et al., 2010).

Estimativa inicial do consumo de elagitaninos era de 5 mg. Dados referentes ao consumo de elagitaninos em países tropicais estão atualmente indisponíveis na literatura. Entretanto, dados da população europeia sugerem um consumo de 12 mg/dia, possivelmente devido ao incremento do consumo de *berries* (GARCIA-MUÑOZ; VAILLANT, 2014). Embora estudos iniciais não apresentassem dados acerca do consumo de elagitaninos, estimava-se que estes não ultrapassariam 5 mg/dia (CLIFFORD; SCALBERT, 2000). Hoje, no entanto, estes valores podem ser questionados uma vez que um copo de suco de romã ou uma porção de framboesa podem fornecer 300 mg e uma porção de morangos 70 mg. Desta forma, o consumo de alimentos específicos levaria a uma ingestão muito mais elevada do que inicialmente proposto para esses compostos (LARROSA et al., 2012).

As frutas e nozes são as principais fontes de elagitaninos na dieta habitual ocidental. Os elagitaninos são incorporados principalmente pelo consumo de vinho envelhecido em tonéis de madeira (carvalho), nozes e nozes pecã, *berries*, romã e seus derivados (GARCIA-MUÑOZ; VAILLANT, 2014). A ocorrência dos elagitaninos, diferentemente das antocianinas, se limita a algumas famílias de dicotiledôneas, dentre elas *myrtaceae*, à qual pertencem a *grumixama* e *rosaceae* da qual a amora preta é uma representante (CLIFFORD; SCALBERT, 2000).

Atualmente os elagitaninos (ET) mais estudados são as punicalaginas ($C_{48}H_{28}O_{30}$) e punicalinas ($C_{34}H_{22}O_{22}$), principais ET encontrados na romã, seguidos pelas sanguina H6 ($C_{82}H_{54}O_{52}$), sanguina H10 ($C_{68}H_{48}O_{44}$), e lambertianina C ($C_{123}H_{80}O_{78}$) que são os ET predominantes nas *berries*. A pedunculagina ($C_{34}H_{24}O_{22}$) é o principal ET presente nas nozes, enquanto no vinho envelhecido em carvalho predominam os isômeros vescalagina ($C_{41}H_{26}O_{26}$) e castalagina ($C_{41}H_{26}O_{26}$). O EA livre e seus derivados diretos também são encontrados na maioria dos alimentos fontes de elagitaninos incluindo *berries* e nozes. (GARCIA-MUÑOZ; VAILLANT, 2014).

1.2 Compostos Bioativos de *Berries* e Câncer

O consumo de alimentos ricos em antocianinas e elagitaninos está associado a benefícios à saúde, como redução do risco de câncer. Estes CBAs exibem ações anticarcinogênicas tais como indução de modificações no ciclo celular e apoptose, assim como inibição de formação e crescimento de tumores em modelos animais de câncer de esôfago, colón, pele, próstata e mama (AIYER et al., 2012a, 2012b; AIYER; GUPTA, 2010; DING et al., 2006; JEYABALAN et al., 2014; MCDOUGALL et al., 2008; WANG et al., 2013; WANG; STONER, 2008). Os efeitos inibitórios de compostos fenólicos naturais na carcinogênese são ocasionadas devido a modificação do estado redox e regulação de funções celulares comumente alteradas na doença (ciclo celular, apoptose, inflamação, angiogênese, invasão e metástase) (DAI; MUMPER, 2010). Do ponto de vista molecular, os compostos bioativos de *berries* apresentam ainda potencial ação modulatória de mecanismos epigenéticos e/ou de vias de sinalização da carcinogênese (PAN et al., 2015).

1.2.1 Mecanismos de Ação dos Compostos Fenólicos

1.2.1.1 Mecanismos Celulares

O dano oxidativo é considerado um dos principais contribuintes para a carcinogênese e evolução do câncer (DAI; MUMPER, 2010). Quando a concentração celular de espécies oxidativas aumenta de forma a superar a capacidade endógena de defesa antioxidante, ocorre o estresse oxidativo que causa danos ao DNA, em lipídeos e proteínas. Compostos que reduzam estes danos são essenciais na prevenção do câncer (AIYER et al., 2008). Neste contexto, destaca-se a capacidade dos compostos fenólicos de eliminar e evitar a produção de radicais livres (Figura 6) (DAI; MUMPER, 2010; FOLMER et al., 2014).

Figura 6: Potenciais mecanismos anticâncer dos polifenóis de plantas durante o desenvolvimento do câncer.
Adaptada de: DAI; MUMPER, 2010.

Os efeitos benéficos à saúde humana, atribuídos ao consumo de alimentos ricos em antocianinas, são comumente associados à sua capacidade antioxidante. Estudo que comparou a atividade anti-inflamatória do extrato rico em antocianinas de três *berries* (mirtilo, amora preta e groselha preta) e correlacionou-a com a capacidade antioxidante destes frutos, demonstrou efeito semelhante entre os extratos, embora os frutos apresentassem composições diferenciadas de antocianinas. O efeito observado em macrófagos foi, ao menos em parte, mediado por inibição da translocação nuclear de NF- κ B. Os dados sugeriram que estas frações, ricas em antocianinas, reduzem os níveis de ROS (espécies reativas à oxigênio) através da ativação de NRF2, contudo em macrófagos LPS ativados, o efeito anti-inflamatório foi independente de NRF2 (LEE et al., 2014).

Estudo anterior avaliou a capacidade do composto bioativo isolado de EA e de três *berries* (mirtilo, morango e framboesa vermelha) contendo crescentes quantidades de EA em reduzir o dano oxidativo ao DNA. O EA foi selecionado por ter inibido *in vitro* mais de 95% do dano oxidativo induzido ao DNA, e *in vivo* observou-se que os camundongos suplementados com EA(400 ppm) e com framboesa vermelha (5% p/p) demonstraram significativa redução de dano endógeno ao DNA (AIYER et al., 2008). Vale ressaltar que a atividade antioxidante é relevante, sobretudo no início da carcinogênese, evitando danos ao DNA por estresse oxidativo e, por conseguinte, a progressão das alterações até o desenvolvimento do câncer (DAI; MUMPER, 2010)

A proliferação celular é também comumente desregulada na carcinogênese, reflexo da multiplicação independente de sinalização das células alteradas, bem como perda dos mecanismos de controle desta replicação (HANAHAN; WEINBERG; FRANCISCO, 2000). Considerando a capacidade de certos polifenóis de inibir a proliferação celular, observou-se que compostos isolados do morango (antocianinas, campeferol, quercetina, ácido coumárico e EA) foram capazes de inibir o crescimento de diferentes linhagens celulares tumorais humanas (oral, próstata e cólon) de maneira dose dependente (ZHANG et al., 2008). Estudo comparando a diversidade fitoquímica dos extratos de *berries* sugeriu que para a família RUBUS, à qual pertence a amora preta, assim como para os morangos os efeitos observados advinham de elagitaninos (DAI; MUMPER, 2010; MCDOUGALL et al., 2008).

Apoptose, também conhecida como morte celular programada, desempenha um papel importante no desenvolvimento e regulação do crescimento de células normais, entretanto, encontra-se desregulada em células neoplásicas (WANG; STONER, 2008). Em células de câncer oral, o tratamento com EA promoveu apoptose através da ativação de genes pró-apoptóticos como caspase 3, caspase 9 e Bax; e inibição de genes relacionados à sobrevivência como Bcl-XL, Akt e NF- κ B (BISEN; BUNDELA; SHARMA, 2012). Mistura equimolar de antocianidinas presentes em *berries* (cianidina, malvidina, peonidina, delphinidina, e petunidina), induziu apoptose em células de carcinoma de pulmão (H1299) após 24h e 48h de tratamento. Este achado foi acompanhado por parada de ciclo celular em G2/M (KAUSAR et al., 2012). De forma semelhante, o extrato de framboesa preta induziu apoptose em linhagem altamente tumorigênica (RE-149DHD – oriunda de esôfago de ratos). Entretanto, o mesmo não ocorreu para a linhagem com baixo potencial tumorigênico (RE-149) (WANG; STONER, 2008).

O ciclo celular é um evento estreitamente regulado, controlado em diversos pontos de checagem, com o objetivo de manter a integridade celular. Enzimas chaves dessa regulação

são as CDKs (quinases ciclina dependentes), as quais consistem em uma CDK catalítica que ativa uma subunidade de ciclina. Assim, as CDKs regulam a progressão das células através das fases do ciclo celular modulando a atividade dos substratos chaves (BISEN; BUNDELA; SHARMA, 2012).

Em linhagens celulares de câncer de próstata, após o tratamento com metabólitos do suco de romã, observou-se associação entre EA e redução da expressão de ciclina B1 e D1 com indução de parada do ciclo celular em S. As Uro, por sua vez, induziram parada de ciclo celular em G2/M sem promover alteração na expressão das ciclinas, mas elevando a expressão de cdc2 fosforilado no resíduo de tirosina 15 (Tyr.15) (VICINANZA et al., 2013). A ação das Uro foi mais pronunciada na linhagem que não expressa ER β (DU-145) do que naquela que apresenta uma pequena expressão deste receptor (PC-3)(SASAKI et al., 2002; VICINANZA et al., 2013). Assim, pode-se inferir que esta atividade pode estar relacionada à modulação de ER α pelo extrato (SREEJA et al., 2012). Em células de carcinoma de cólon humano (Caco-2, SW480 e HT-29), as Uro também induziram parada de ciclo em G2/M e em S. Embora a atividade mais importante observada tenha sido da Uro-A, quando glicosiladas, tanto a Uro-A como Uro-B não afetaram o ciclo celular (GONZÁLEZ-SARRÍAS et al., 2014).

1.2.1.2 Mecanismos Moleculares

O gene p21 é um inibidor de quinase ciclina-dependente, também denominado CDKN1A cujos alvos de inibição, as CDKs, atuam como catalisadores de progressão do ciclo celular, ocasionando parada do ciclo (RICE; WHITEHEAD, 2014). Em 1999, estudo demonstrou a capacidade de EA em inibir a proliferação celular por indução de parada de ciclo celular em G1 e apoptose em células de carcinoma cervical (CaSki). Esta atividade foi correlacionada à elevação na expressão da proteína e do mRNA de p21, entretanto não observou-se aumento significativo na expressão proteica de p53 (NARAYANAN et al., 1999). De forma semelhante, o EA foi capaz de potencializar os efeitos da quercetina em células de leucemia linfoblástica aguda (MOLT-4), promovendo sinergicamente aumento dos níveis proteicos de p21^{cip1/waf1} e fosforilação da serina 15 em p53, mas não da proteína de p53 (MERTENS-TALCOTT et al., 2005). Estas observações corroboram com a principal função de p53 fosforilado no resíduo de serina 15 de mediar os pontos de checagem/parada de ciclo celular por meio de p21(MIRZAYANS et al., 2012). Em linhagem celular T24 (de câncer humano de bexiga), o EA promoveu aumento da expressão gênica de p21, desta vez

acompanhada de p53, e diminuição de CDK2 o que pode levar a parada do ciclo em G0/G1 (LI et al., 2005).

Outras moléculas que desempenham papel importante na progressão do câncer são as metaloproteinases de matriz (MMPs), que pertencem a uma família de proteinases cujas atividades são dependentes da presença de um íon zinco e que atuam em determinados processos celulares, por exemplo angiogênese, invasão e metástase (HADLER-OLSEN; WINBERG; UHLIN-HANSEN, 2013; NORATTO et al., 2014; WANG; STONER, 2008). Antocianinas derivadas de amora silvestre, cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo, inibiram *in vitro* invasão celular e migração de células de carcinoma humano de pulmão (A549), esta ação foi atribuída à redução da expressão gênica de MMP-2 (CHEN et al., 2006). Também em células de carcinoma de pulmão (H1299), mix de antocianidinas regulou negativamente a expressão gênica de MMP-9 (KAUSAR et al., 2012). MMP-2 e MMP-9 exercem um papel importante na formação de metástases, facilitando a dispersão de células tumorais pelo corpo por meio da desestruturação da matriz extracelular e membrana basal, além de estimulação do crescimento de novos vasos sanguíneos (FOLMER et al., 2014).

1.2.1.3 Regulação Epigenética

Evidências indicam que CBAs têm a capacidade de modular a expressão gênica por meio de mecanismos epigenéticos (GERHÄUSER, 2012). Uma vez que estes compostos estão amplamente disponíveis nos alimentos e apresentam baixa toxicidade, sua eficácia em modular marcas epigenéticas e consequentemente a expressão gênica tanto na prevenção como no tratamento do câncer vem sendo testada (SHUKLA; MEERAN; KATIYAR, 2014). Estes aspectos são de particular interesse, visto que a carcinogênese envolve desregulação progressiva em processos epigenéticos, que são potencialmente reversíveis. Nesse contexto, marcas epigenéticas como metilação do DNA e modificações em histonas são apontadas como alvos promissores de CBAs no contexto da redução do risco do câncer (ANDRADE et al., 2012; SHUKLA; MEERAN; KATIYAR, 2014).

A manutenção do estado de metilação é garantida por uma família de enzimas também conhecidas como DNA metiltransferases (DNMTs). A DNMT1 atua como DNA-metiltransferase de manutenção em células de mamíferos e é responsável por replicar com precisão padrões de metilação genômico do DNA durante a fase S do ciclo celular (BESTOR, 2000; SHUKLA; MEERAN; KATIYAR, 2014). A metilação *de novo* do DNA, por sua vez, é potencialmente efetuada pela ação das enzimas DNMT3A e DNMT3B que possuem atividade

tanto de manutenção, como de nova metilação *de DNA* (OKANO, 1998; SHUKLA; MEERAN; KATIYAR, 2014). Antocianinas potencialmente modulam DNMTs. Em distintas linhagens celulares de câncer de cólon, o extrato rico neste CBA derivado de framboesa preta, suprimiu a atividade e a expressão proteica das DNMTs. Entretanto, divergindo do esperado, os autores observaram que as antocianinas e DNMTs encontravam-se diferencialmente localizadas nestas células (WANG et al., 2013).

O silenciamento epigenético de genes antagonistas da via Wnt, como os SFRPs (família da proteína segregada relacionada a frizzled), tem sido observado em vários tumores. Esta regulação exerce um papel importante no desenvolvimento do câncer, uma vez que a via Wnt é reconhecida por estimular a proliferação celular e participar da progressão do ciclo celular (DAVIDSON; NIEHRS, 2010).

Extrato rico em antocianinas, derivado de framboesa preta, promoveu em células de câncer de cólon desmetilação de promotores de CDKN2A, e SFRP2, SFRP5, e WIF1 (três inibidores da via da Wnt localizados na parte superior da via da Wnt). No mesmo estudo, observou-se redução na expressão de β -catenina e c-Myc na parte inferior da via Wnt e da proliferação celular diminuíram, além de aumento de células em apoptose (WANG et al., 2013). Em humanos, de forma semelhante, o consumo de framboesa preta liofilizada por paciente com câncer de cólon ou reto promoveu a reativação de SFRP2, SFRP5 e WIF1, bem como diminuição da expressão de DNMT1 (WANG et al., 2011).

Assim, a crescente associação entre dieta rica em compostos fenólicos e alterações epigenéticas reversíveis e/ou modulação de vias da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão) traz à tona a necessidade de compreensão dos mecanismos de ação destes compostos e dos frutos, que são fontes complexas de fenólicos, na prevenção e tratamento do câncer de mama (PAN et al., 2015; STEFANSKA et al., 2012).

1.3 Câncer de Mama

O câncer de mama é um problema de saúde global que destaca-se por ser o mais incidente entre as mulheres (AMERICAN CANCER SOCIETY., 2015). Em 2012, foram diagnosticados em todo o mundo 1,7 milhão de novos casos de câncer de mama, que representaram 11,9% do total de carcinomas diagnosticados (IARC/WHO, 2013). No Brasil, estimou-se para o ano de 2014 uma incidência de 57 mil novos casos, que representam 20,8% do total de novos casos de câncer (INCA, 2014). Nos EUA, o câncer de mama é a segunda causa de morte entre mulheres, ficando atrás apenas do câncer de pulmão (AMERICAN

CANCER SOCIETY., 2015). Estimou-se para 2015 que as mortes em consequência do câncer de mama representaram 15% das mortes por câncer na população feminina (AMERICAN CANCER SOCIETY., 2015). No Brasil, a maior taxa de mortalidade por câncer de mama é observada entre mulheres com mais de 50 anos, que em 2011 foi de aproximadamente 47 óbitos a cada 100 mil mulheres. Em contraste, para mulheres com até 50 anos, esta razão limitou-se a quatro óbitos a cada 100 mil (MARTINS et al., 2013).

A história natural do câncer de mama envolve progressão através de estágios clínicos e patológicos bem definidos, onde alterações genéticas e epigenéticas levam células luminais epiteliais a adquirir fenótipos que permitem uma rápida proliferação, com subsequente evolução para carcinoma *in situ* e invasivo, e por fim metástase (Figura 7) (HANAHAN; WEINBERG; FRANCISCO, 2000; PEROU et al., 2000; POLYAK, 2007). Estas células alteradas são caracterizadas por perda do controle de processos fisiológicos básicos, que levam a autossuficiência em relação à sinalização de crescimento, perda de sensibilidade a sinais de inibição do crescimento, evasão de morte celular programada (apoptose), perda dos limites do potencial de replicação, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase (HANAHAN; WEINBERG; FRANCISCO, 2000).

Figura 7: Modelo hipotético de progressão do tumor de mama.

Adaptado de (BISHOP; FERGUSON, 2015; POLYAK, 2007)

Nota: Modelo hipotético de progresso de tumor. Visão esquemática da progressão de um câncer, partindo do tecido normal progredindo para um carcinoma *in situ*, invasivo e metastático. O tecido normal é composto por membrana basal, uma camada luminal epitelial e células mioepiteliais. A composição de células do estroma incluem vários leucócitos, fibroblastos, miofibroblastos, e células endoteliais. No carcinoma *in situ* as células mioepiteliais são epigeneticamente e fenotipicamente alteradas e decaem em número, potencialmente devido a degradação da membrana basal. Ao mesmo tempo, o número de fibroblastos, miofibroblastos, linfócitos e células endoteliais aumentam no estroma. A perda de células mioepiteliais e da membrana basal resultam no carcinoma invasivo, no qual as células de tumor invadem os tecidos da região adjacente e pode migrar para órgãos distantes, levando eventualmente à metástase. Abaixo uma representação diagramática da extensão e do tipo de modificações epigenéticas na progressão do câncer

Embora a etiologia exata do câncer de mama permaneça desconhecida, alguns fatores vêm sendo associados à identificação de grupos de alto risco, incluindo maior idade, menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação, utilização de anticoncepcionais orais, menopausa tardia, terapias de reposição hormonal e histórico familiar (INCA, 2014; POLYAK, 2007). Outros fatores de riscos relacionados ao estilo de vida incluem ingestão de álcool, tabagismo, sedentarismo, obesidade e alimentação. Neste sentido, o hábito alimentar é um fator de destaque no desenvolvimento do câncer de mama (BALLARD-BARBASH et al., 2009; DAVIS; MILNER, 2007; INCA, 2014; MARTIN-MORENO; SOERJOMATARAM; MAGNUSSON, 2008; PAN et al., 2015).

O câncer de mama pode ser dividido em quatro subtipos, a fim de direcionar o tratamento e estimar prognóstico: 1) Luminal A: carcinomas receptor de hormônios positivos (HR+) e receptor de fator de crescimento epidermal humano negativos (HER2-), e representam 73% de todos os casos de câncer de mama, com melhor prognóstico; 2) Triplonegativo (HR-/HER2-): subtipo que corresponde a 13% dos casos e apresenta o pior prognóstico; 3) Luminal B (HR+/HER2+): o qual representa apenas 10% dos casos; e 4) HER2-enriquecido (HR-/HER2+): o menos incidente (5%) e que apresenta influência étnica (NIH, 2015).

No contexto do câncer de mama, merecem destaque entre os receptores de hormônio os receptores de estrógeno (ER), que compreendem o receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$) e o receptor de estrógeno beta ($ER\beta$). Em geral o $ER\alpha$ promove aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas e promovem progressão do ciclo celular. Por outro lado, $ER\beta$ possui ação dominante, reduzindo a expressão gênica mediada por $ER\alpha$, por conseguinte, afetando negativamente a proliferação celular (CAIAZZA et al., 2015). Cerca de 70% dos casos de câncer de mama apresentam expressão de $ER\alpha$, e expressão aumentada deste gene é comumente associada aos estágios iniciais da tumorigênese. Esta regulação positiva pode ser alcançada pela elevação dos níveis de estrógeno, que é frequentemente associada aos fatores de risco tradicionais para o câncer de mama como idade da menarca, obesidade pós menopausal e reposição hormonal (MUNAGALA et al., 2013).

Em contrapartida, poucos são os fatores de risco modificáveis associados aos casos de carcinoma de mama onde o receptor de estrógeno está ausente. Para estes casos, embora se tenha um pior prognóstico, destaca-se o potencial preventivo por parte da alimentação (FUNG et al., 2013; JUNG et al., 2013).

1.4 Alimentação e câncer de mama

Há 2500 anos, Hipócrates citava o alimento como instrumento da medicina, evidências que inicialmente sugeriam associação entre o padrão alimentar humano e o risco para câncer, hoje correlacionam a alimentação não apenas à incidência mas também à mortalidade nesta enfermidade (DAGLI et al., 2013). Diversos estudos demonstram atividades anticancerígenas que são atribuídas aos CBAs, entretanto, o mesmo composto pode atuar de forma diferenciada conforme o tipo de câncer estabelecido. Esta diferença se fundamenta tanto na singular biodisponibilidade dos compostos para cada órgão, quanto na ação de regulação de vias e genes que são órgão específicos.

Recente publicação reuniu 20 estudos produzidos pelo “The Pooling Project of Prospective Studies of Diet and Cancer”, um consórcio internacional bem estabelecido de estudos de coorte prospectivos, estes estudos acompanharam aproximadamente 1 milhão de mulheres ao longo de 11 à 20 anos. Não observou-se associação entre o consumo total de frutas e vegetais e as taxas globais de câncer de mama, nem entre o consumo destes alimentos e o risco para o carcinoma ER+ (positivo) (JUNG et al., 2013). Entretanto, observou-se uma associação inversa estatisticamente significativa entre o consumo destes grupos de frutas e vegetais e a susceptibilidade ao câncer de mama ER-(receptor de estrógeno negativo). O elevado consumo destes alimentos foi associado com redução de 32% a 50% do risco de câncer de mama ER-(JUNG et al., 2013).

Estudo coorte (1984-2006) que avaliou mulheres pós-menopausa, demonstrou associação entre o consumo de frutos/verduras específicos e o risco de câncer de mama ER-. O consumo de 2 porções/semana de *berries* reduziu de forma significativa o risco relativo (RR=0,82) para câncer de mama ER-. Avaliando-se separadamente o consumo dos frutos, a ingestão de 2 porções de morango ou de mirtilo (RR=0,69), pelo menos uma vez por semana, reduziu o risco relativo (RR=0,80 e 0,69, respectivamente) quando comparada a mulheres que não consumiam essas *berries* (FUNG et al., 2013).

No contexto do câncer de mama, diferentes compostos fenólicos demonstraram capacidade de regular tanto mecanismos celulares tradicionais quanto mecanismos moleculares. Parte destas ações foram alcançadas por modulação de vias de sinalização e de mecanismos epigenéticos (Figura 8) (PAN et al., 2015).

Figura 8: Representação esquemática dos alvos moleculares e eficiência de compostos fenólicos dietéticos naturais em múltiplos estágios da carcinogênese mamária.

Adaptado de (PAN et al., 2015).

Nota: A carcinogênese mamária é um processo complexo de múltiplas etapas de hiperplasia ductal atípica para carcinomas metastáticos. O epitélio normal da mama inclui células tumorais (rosa), células externas mioepiteliais (verde) e membrana basal. Na fase de iniciação, o epitélio normal está exposto a uma série de fatores de estresse (produtos químicos ambientais, dieta, estilo de vida e hormônio, como representados pelos círculos concêntricos), que causam um acúmulo de alterações epigenéticas e genéticas, bem como o estresse oxidativo e a inflamação crônica. A regulação epigenética pode contribuir para a tumorigênese da mama por indução da expressão de oncogenes ou genes que promovem câncer. Mas também pode ativar genes envolvidos na prevenção do câncer. Os mecanismos moleculares quimiopreventivos dos compostos fenólicos dietéticos naturais incluem (a) promoção da desintoxicação e atividade antioxidante (b) indução de apoptose, autofagia, parada do ciclo celular e senescência, (c) inibição de inflamação, proliferação, transformação, angiogênese, EMT, migração, invasão e processos de adesão. Ativar ou inibir caminhos de sinalização são mostrados com símbolos vermelhos.

1.5 Mecanismos de Ação no Câncer de Mama

1.5.1 Mecanismos Celulares no Câncer de Mama

Extrato de batata roxa rico em antocianinas reduziu a proliferação celular e promoveu parada no ciclo celular em células das linhagens MCF-7 e MDA-MB 231. Entretanto, as ações foram distintas para cada linhagem celular, sendo a redução de proliferação mais pronunciada para a linhagem MDA-MB 231 (BONTEMPO et al., 2013). O tratamento com extrato de mirtilo, também rico em antocianinas, causou inibição da proliferação em células de câncer de mama triplo negativas MDA-MB-231, possivelmente devido à redução da ativação de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/AKT e NFκβ. Em modelo xenográfico com camundongos (MDA-MB 231), foi observado aumento de apoptose associado à diminuição da ativação de AKT e p65 NFκβ, sem efeito na fosforilação de ERK (ADAMS et al., 2010a).

De forma semelhante, o tratamento de células WA4 (células progenitoras de tumor mamário de camundongos) com extrato de romã (rico em elagitaninos e EA) resultou em aumento dose/tempo dependente da atividade da caspase-3, indicando que o efeito citotóxico

do extrato foi devido à indução de apoptose (DAI et al., 2010). Em células MDA-MB 231, extrato de nozes e diferentes compostos isolados deste, dentre eles ET, foram capazes de promover morte celular. Entretanto, em contraste ao descrito na literatura, não observou-se morte associada ao tratamento com EA isolado (LE et al., 2014). Em células de carcinoma mamário (MCF-7), o extrato de romã inibiu o crescimento, induzindo parada do ciclo celular em G2/M seguida por apoptose, associada à redução da expressão do gene de reparo de DNA e indução da quebra da dupla fita. A parada do ciclo celular foi correlacionada ao aumento da apoptose, mas não à capacidade oxidante do extrato (SHIRODE et al., 2014a).

1.5.2 Mecanismos Moleculares no Câncer de Mama

O estrógeno contribui para o desenvolvimento e progressão do câncer em diferentes tipos de tecidos, principalmente os tecidos reprodutivos endócrino-relacionados. A influência da sinalização proliferativa mediada por ER α tem sido amplamente estudada no contexto do câncer de mama, onde estratégias farmacêuticas para inibir tais sinais tem sido um sucesso clínico nos últimos 20 anos, através do uso de moduladores seletivos de receptor de estrógeno ou inibição da síntese de estrógeno via inibidores da aromatase (CAIAZZA et al., 2015). Aromatase é uma enzima responsável pela conversão de androgênio em estrogênio, e o aumento de sua atividade é um dos principais mecanismos que promovem o aumento da produção de estrógeno no câncer de mama (TO et al., 2015). Assim, inibidores de aromatase vem sendo reconhecidos pela sua potencial ação de proteção contra o câncer de mama, por mecanismo independente do receptor de estrógeno (MOUITSATSOU, 2007)

Em células de câncer de mama receptor de estrógeno positivas (ER+), o tratamento com derivados de ET demonstrou ação antiaromatase. Embora EA não tenha causado alteração significativa para este ensaio específico, seis dos derivados testados (metil-urolitina B, urolitina B sulfato, urolitina B, urolitina B acetilada, urolitina A, e metil-urolitina A) apresentaram atividade antiaromatase significativa (ADAMS et al., 2010b). Outro estudo observou, em linhagens celulares humanas de câncer de cólon, redução da proliferação e alteração do ciclo celular por ação das Uro. Contudo, para as urolitinas glicosiladas esta atividade foi reduzida ou nula (GONZÁLEZ-SARRÍAS et al., 2014).

Administrado na dieta, na concentração de 400ppm (400mg/kg de dieta), o EA foi capaz de reverter os efeitos do estrogênio na expressão de miRNA oncogênicos e supressores de tumor na carcinogênese mamária de ratas induzida por estrógeno (MUNAGALA et al., 2013). Anteriormente, o tratamento com EA na mesma dose, também causou inibição dos

tumores mamários de ratas induzidos por estrógeno (E2), reduzindo o nível das enzimas que podem produzir metabólitos prejudiciais de E2. Os autores sugeriram que a inibição ocorre principalmente durante as etapas iniciais da carcinogênese (AIYER; GUPTA, 2010).

Revisão recente, focada na ação quimiopreventiva dos polifenóis dietéticos em alvos epigenéticos do câncer de mama, relatou o papel não hormonal da cianidina ao inibir a expressão de BCRP (proteína relacionada à resistência do câncer de mama). Por outro lado, o estudo evidenciou a ação antagonista de ER e antiproliferativa da quercetina, promovida por bloqueio da sinalização de ER (PAN et al., 2015). Outro estudo de revisão no entanto, observou que a cianidina foi capaz de aumentar a expressão de ambos os receptores (α e β), mais acentuada para ER β (AIYER et al., 2012a). Corroborando, dieta suplementada com mirtilo (fruto rico em antocianinas) protegeu ratas da tumorigênese induzida por 17 β -estradiol (E2), tanto quando ministrado de forma preventiva, quanto de forma terapêutica (JEYABALAN et al., 2014).

Outro alvo molecular dos polifenólicos são as metaloproteínas de matriz (MMPs). As MMPs exercem funções importantes no carcinoma de mama invasivo, por exemplo, degradação de componentes da matriz extracelular e consequentemente facilitação da difusão das células alteradas (NORATTO et al., 2014). Extrato de pêssego, contendo cianidina-3-glicosídeo, administrado *in vivo* foi capaz de inibir crescimento tumoral de células de câncer de mama (MDA-MB 435) e metástase de pulmão, associados à modulação por inibição da expressão gênica de metaloproteinases (MMP-2; MMP-3 e MMP-13). As doses utilizadas no estudo equivaleriam ao consumo de 2 a 3 frutos por dia, para um indivíduo de aproximadamente 60kg (NORATTO et al., 2014). Outro modelo de xenoenxerto utilizando células de câncer de mama (MDA-MB 231), observou que o tratamento com EA inibiu a atividade de MMP-2 e MMP-9 e esta inibição foi considerada coadjuvante dos efeitos antiangiogênicos observados (WANG et al., 2012a).

A sinalização Wnt/ β -catenina é conhecida por promover a progressão do ciclo celular e, desta forma, a proliferação através da regulação positiva de genes alvo, como os que codificam c-Myc e ciclina D. A ciclina D1 atua durante G1/S, fase na qual também atuam as CDKs 3, 4 e 6, contribuindo para a indução e ou progressão desta etapa do ciclo. Assim, considera-se que as CDKs são componentes chave na regulação do ciclo celular. (DAVIDSON; NIEHRS, 2010).

Extrato de romã, fruto rico em ET, inibiu a proliferação de células WA4 através da indução de parada do ciclo celular em G₀/G₁ (DAI et al., 2010). A linhagem WA4 é derivada

de tumor mamário de camundongos transgênicos MMTV-Wnt-1, modelo conhecido por ser iniciado por *stem cells*, bem como pelo desenvolvimento do tumor como consequência da ativação da sinalização por β -catenina que consequentemente ativa genes que promovem a proliferação (CHO et al., 2008; DAI et al., 2010).

No contexto da regulação do ciclo celular, o tratamento de células de carcinoma de mama humano (HS578T) com peonidina-3-glucosídeo ou cianidina-3-glucosídeo, resultou em potente inibição do crescimento por parada de ciclo em G2/M. O tratamento com peonidina diminuiu os níveis proteicos de CDK-1, CDK-2, ciclina B1 e ciclina E; enquanto o tratamento com cianidina reduziu CDK-1, CDK-2, ciclina B1 e ciclina D1. Ambos compostos induziram ativação de caspase-3, condensação de cromatina e morte celular (CHEN et al., 2005).

A quercetina, outro composto fenólico abundante em *berries*, induziu em células MDA-MB 231 parada de ciclo em G1 associada à apoptose. Esta observação foi concomitante com o aumento de p53 fosforilado e p21; e redução de Bcl-xl e ciclina B1. Não observou-se alteração na expressão de PTEN, ciclina D, p27, cdc2, e p-cdc2. Em células MCF-7, foi observada parada na fase S associada à redução de Bcl2, ciclina A, B, procaspase 8,12 e CDK2, e aumento de p53, p57 e caspases 6,8,9 (AIYER et al., 2012a).

Coquetel de fitoquímicos contendo quercetina promoveu significativa redução da expressão do gene mutado p53, a forma oncogênica de p53, em MDA-MB 231, e um aumento significativo (29 vezes) da variedade nativa de p53, supressor de tumor, em MCF-7 (OUHTIT et al., 2013). Adicionalmente foi observado decréscimo da expressão do marcador de proliferação celular PCNA, do regulador de ciclo celular Rb e da CDK4. Além de um significativo decréscimo da expressão das proteínas antiapoptóticas Bcl-2, SVV e proteína de motilidade celular CD44. Estas alterações moleculares foram associadas às alterações celulares como inibição do ciclo celular, proliferação, sobrevivência e metástase, além de indução de apoptose (OUHTIT et al., 2013).

PCNA é essencial para a atividade da DNMT1, sobretudo durante a replicação celular, quando ocorre a cópia do padrão de metilação do DNA da célula parental para as células filhas. No entanto, a atividade de DNMT1 pode ser comprometida na presença aumentada de p21, uma vez que ambos competem pelo mesmo sítio de ligação às PCNA. Assim, compostos que levam ao aumento da expressão de p21 podem também afetar a metilação do DNA (STEFANSKA et al., 2012).

Ainda no contexto dos mecanismos moleculares, o extrato metanólico de morango promoveu aumento da expressão de BAX e redução em Bcl-2, culminando em apoptose de células de câncer de mama (T47D). A ativação de p73 foi proposta como principal via de

ação, visto que esta linhagem possui mutação no gene supressor de tumor p53 (SOMASAGARA et al., 2012).

1.5.3 Regulação Epigenética

Como visto previamente as DNMTs são enzimas responsáveis pela manutenção do status de metilação do DNA e, portanto, exercem um importante papel na regulação epigenética do câncer de mama. Neste contexto, compostos polifenólicos inibiram, em extrato nuclear de células de câncer de mama MCF-7, a atividade das DNMTs. Dentre os compostos avaliados os ácidos elágico e rosmarínico promoveram maior inibição destas enzimas. Entretanto, a despeito da observada inibição da atividade das DNMTs, nenhum dos compostos estudados foram capazes de reverter a condição de metilação dos poucos genes investigados (PALUSZCZAK; KRAJKA-KUŹNIAK; BAER-DUBOWSKA, 2010).

Recentemente, foi documentado que o silenciamento de genes da família das SFRPs, frequentemente observado no câncer de mama, decorre da metilação da região promotora destes genes (SUZUKI et al., 2008). Estudos *in vitro* e clínico, no contexto do câncer de cólon, associaram o tratamento com antocianinas, derivadas de framboesa preta, com a desmetilação de promotores de SFRP2 e SFRP5, genes antagonistas da via Wnt (WANG et al., 2013, 2011). Neste sentido, as SFRPs poderiam ser consideradas como possíveis alvos epigenéticos das antocianinas.

1.6 Concentração de CBAs em Grumixama, Amora Preta e Amora Silvestre

A grumixama (*Eugenia brasiliensis* Lam), amora preta (*Rubus spp*) e amora silvestre (*Morus nigra* L.) são *berries* que podem ser cultivadas no Brasil e que apresentam perfil interessante de antocianinas e elagitaninos.

A grumixama, também conhecida como cereja-brasileira, é fruto de uma espécie de árvore que cresce em florestas costeiras no sul do Brasil (Figura 9A) (MORENO et al., 2007). A identificação e quantificação de antocianinas no fruto comestível indicam que a grumixama é uma importante fonte dietética de CBAs. Dentre os principais constituintes da fração rica em antocianinas estão a cianidina-3-galactosídeo e delfinidina-3-glucosídeo que correspondem respectivamente a 76,5% e 12,2% do teor total de antocianinas, seguidos por cianidina 6,1% e definidina 3,4% (FLORES et al., 2012). Em frutos coletados no Brasil, uma primeira avaliação observou um teor total de antocianinas de 169 mg/100g do fruto fresco (FF) (ABE; LAJOLO; GENOVESE, 2012). Recente estudo comparando a variedade roxa e a

amarela deste fruto observou na polpa do fruto roxo, mais rica nestes compostos, que o conteúdo de antocianinas e flavonoides variava, por região de colheita, de 32-180 mg/100g de massa fresca. O experimento destacou também que os principais flavonoides identificados foram cianidina 3-glicosídeo, delphinidina, cianidina e quercetina (principalmente na forma aglicona) (TEIXEIRA et al., 2015).

Figura 9: Imagem dos frutos utilizados no presente trabalho. Grumixama (A); Amora Preta (B) e Amora Silvestre (C).

Nota: Foto A; cedida por Neide Rigo; Fotos B e C: do presente autor.

A amora preta, embora não seja uma planta nativa, pode ser produzida em regiões brasileiras com período de inverno bem definido (Figura 9B) (ANTUNES, 2002). Hassimotto e colaboradores (2008) avaliaram cinco cultivares de amora preta colhidos no Brasil, demonstrando que o teor de antocianinas variou de 116 a 194 mg/100 g FF. As antocianinas foram os flavonóides observados em maior quantidade nestes frutos. Os derivados de cianidina representaram de 66-80% dos flavonóides, sendo a cianidina-3-O-glicosídeo identificada como o principal componente (HASSIMOTTO et al., 2008). Na fração rica em antocianinas de frutos cultivados no Brasil em 2013, foram observados teores semelhantes aos relatados anteriormente. Foi quantificado um total de $104,86 \pm 6,23$ mg de cianidinas por 100g FF ($96,10 \pm 5,16$ mg referentes à cianidina-3-glucosídeo), e observou-se ainda a presença de quercetina ($26,11 \pm 1,61$ mg) nesta fração (dados não publicados de Vanessa Cardoso Pires, 2015).

A amora silvestre é uma planta rústica que, embora não seja facilmente encontrada para comercialização *in natura* no Brasil, é comumente cultivada em jardins e utilizada na sericultura (Figura 9C). Por causa do seu elevado teor de antocianinas, apresenta atividade antioxidante superior às demais frutas brasileiras e caracteriza-se, portanto, como potencial fonte dietética destes compostos (CHEN et al., 2006; HASSIMOTTO; GENOVESE; LAJOLO, 2008). A amora silvestre fornece um total de 270 mg de antocianinas por 100g FF (PAWLOWSKA, OLESZEK, BRACA, 2008). O principal componente da fração de

antocianinas da amora silvestre é, assim como na amora preta, a cianidina 3-O-glicosídeo (66,3%), seguida por cianidina-3-O-rutinosídeo (27,8%), pelargonidina 3-O-glicosídeo (4,4%), e pelargonidina-3-O-rutinosídeo (1,5%) (PAWLOWSKA, OLESZEK, BRACA, 2008). Análise em frutos cultivados no Brasil relatou composição e distribuição da fração rica em antocianinas semelhante, sendo composta principalmente por cianidina-3-glucosídeo (71% do total de antocianinas) e cianidina-3-glicosilraminosídeo (19%). Entretanto, esta fração continha ainda outros polifenóis como a quercetina (14,1-15,3mg/100g p.f.) (HASSIMOTTO; GENOVESE; LAJOLO, 2007)

Foram quantificados na polpa do fruto roxo de grumixama (*Eugenia brasiliensis* Lam) altos níveis de elagitaninos (82-243 mg/100g de peso fresco (PF) em equivalente de EA e EA livre (3,97-13,76 mg/100g PF em equivalente de EA). Os principais elagitaninos identificados foram isômeros de pedunculagina, isômeros de strictinina, e ácido elágico galoil hexosídeo (TEIXEIRA et al., 2015). Estudo anterior, também com fruto cultivado no Brasil, observou teores semelhantes: um total de 270mg de EA (que representam ET+EA) e 8,5 mg de ácido elágico livre (ABE; LAJOLO; GENOVESE, 2012).

Em amora preta (*Rubus sp.*) cultivada da safra brasileira de 2013 foram quantificados elevados teores de ácido elágico totais (430,04±26,78 mg/100g FF; que incluem ET após quebra da molécula), sendo que deste total aproximadamente 6mg correspondem à quantidade de EA livre presente no fruto (dados não publicados de Vanessa Cardoso Pires, 2015). Outro trabalho com amoras pretas, também coletadas no Brasil, relatou teor de 140 mg de ácido elágico total e 1,38mg de ácido elágico livre (por 100g do fruto) (ABE; LAJOLO; GENOVESE, 2012). Estudo de caracterização de elagitaninos em amoras pretas observou que a maior parte dos elagitaninos presentes estavam nas sementes. Foram portanto identificados nesta fração os ET pedunculagina, casuarictina/potentilina, castalagina/vescalagina, lambertianina A/sanguina H-6, lambertianina C, e lambertianina D (HAGER et al., 2008).

Em variedade colhida no Brasil de amora silvestre (*Morus nigra* L.) não se observou quantidades detectáveis de EA (ABE; LAJOLO; GENOVESE, 2012). Este resultado confirma o esperado, uma vez que este fruto não pertence às famílias reconhecidas como principais fontes de ET (CLIFFORD; SCALBERT, 2000).

Considerando a potencial ação dos compostos bioativos de *berries* na regulação de vias alterados no câncer de mama. A hipótese do presente trabalho foi de que os compostos fenólicos, antocianinas e elagitaninos, presentes em amora silvestre, amora preta e grumixama, antocianinas e elagitaninos, podem modular o crescimento celular e expressão de genes e miRNAs alterados no câncer de mama.

2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos de extratos ricos em antocianinas ou elagitaninos de amora preta (*Rubus sp.*), amora silvestre (*Morus nigra L.*) e grumixama (*Eugenia brasiliensis Lam*) no crescimento e na expressão de genes e miRNAs de diferentes linhagens de células humanas de câncer de mama.

2.1 Objetivos específicos

Em células de adenocarcinoma mamário humano das linhagens MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com extrato rico em antocianinas e/ou elagitaninos de amora silvestre, amora preta e grumixama, avaliar:

- Citotoxicidade celular pela integridade de membrana plasmática;
- Distribuição das fases do ciclo celular;
- Apoptose por exposição de fosfatidilserina;
- Padrão de proliferação celular;
- Padrão de expressão de genes correlacionados ao câncer de mama;
- Padrão de expressão de miRNAs correlacionados ao câncer de mama.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura Celular

As células MCF-7 (ATCC, USA) e MDA-MB 231 (ATCC, USA) foram cultivadas como cultura monocamada em meio Dulbecco Eagle modificado (DMEM; GIBCO, USA) suplementado com soro fetal bovino (FBS 10%, v/v; GIBCO, USA). As células foram mantidas em incubadora umidificada com atmosfera modificada 5% de CO₂ a 37°C até a confluência de aproximadamente 80%.

3.2 Extratos de Amora Silvestre, Amora Preta e Grumixama

3.2.1 Extratos ricos em antocianinas

Os extratos ricos em antocianinas (ANT) foram produzidos a partir dos frutos amora silvestre (AS), amora preta (AP) e grumixama (G). A extração foi realizada de acordo com Hassimotto e colaboradores (HASSIMOTTO; GENOVESE; LAJOLO, 2008). Para cada 15 gramas do fruto foram realizadas três extrações utilizando 100 mL de metanol-água-ácido acético (70:30:5, v/v) (Brinkmann homogeneizador; Polytron-Kinematica GmbH) em banho de gelo. Todo o homogeneizado foi filtrado sob pressão reduzida através de papel de filtro (Whatman nº 06). O extrato foi concentrado até a eliminação de metanol (40mL) à vácuo em rota-evaporador (R-3 B'uchi) a 40°C, para posterior aplicação em uma coluna de extração em fase sólida. O extrato foi passado através de coluna de poliamida (CC 6; 10g/60mL; Macherey-Nagel, Germany) previamente condicionado com metanol (50mL) e água destilada (100mL). As impurezas foram lavadas com água destilada, e as antocianinas remanescentes foram eluídas com 0,1% de HCl em metanol (150mL). O eluato foi evaporado até secar sob pressão reduzida a 40°C, e posteriormente ressuspendido em pequeno volume de metanol e seco em CentriVap (LABCONCO) a 4°C. O extrato foi armazenado a -80°C até o momento do uso.

3.2.2 Extratos ricos em elagitaninos

Os extratos ricos em elagitaninos (ELA) foram produzidos a partir dos frutos amora preta (AP) e grumixama (G) por extração de acordo com Hassimotto e Lajolo (HASSIMOTTO; LAJOLO, 2011). Para cada 15 gramas do fruto foram realizadas duas

extrações utilizando acetona 80% (100mL cada), seguidas por filtragem da solução. O homogenato foi concentrado até a eliminação da acetona (aproximadamente 40mL) à vácuo em evaporador rotativo (R-3 B'üchi) a 40°C. Realizou-se a precipitação dos elagitaninos com acetato de itérbio (Sigma; 8mL de solução à 0,1 mol/L) e repouso overnight a 4°C. Foram realizadas duas lavagens com acetona 70%, seguidas por uma com acetona absoluta. Desconjugou-se então o acetato de itérbio dos elagitaninos utilizando-se solução de ácido oxálico (25mL de solução 0,1M). O sobrenadante rico em elagitaninos foi coletado e, então, submetido à rota evaporação a 40°C. O material seco foi então ressuspendido em pequeno volume de metanol e seco em CentriVap a 4°C (LABCONCO). O extrato foi armazenado a -80°C até o momento do uso.

3.2.3 Tratamentos e Controle

Antes do uso, os extratos foram diluídos em uma solução-mãe de 20mg/mL de DMSO (Sigma). As soluções-mãe foram preparadas imediatamente antes do tratamento a partir dos extratos secos armazenados em -80°C. As soluções-mãe foram então diluídas no meio de cultura padrão (DMEM com 10% SFB) nas concentrações definidas para os tratamentos. No grupo controle foi adicionado ao meio de cultura padrão apenas o DMSO na mesma concentração utilizada nos tratamentos.

3.3 Ensaio de Viabilidade Celular

As células viáveis são normalmente impermeáveis a corantes, como iodeto de propídeo (PI), azul de tripan, entre outros. A maioria dos testes de viabilidade baseia-se na avaliação de perda da integridade da membrana, medida pela absorção destes corantes, posto que células viáveis (com membrana íntegra) são normalmente impermeáveis (FRESHNEY, 2010). A Figura 10 representa esquematicamente a marcação com corante das células com a membrana celular rompida.

Figura 10: Histograma representativo da marcação com PI.

As células viáveis (com membrana íntegra) não permitem a incorporação do corante, enquanto as células com membrana celular rompida permitem a entrada deste na célula e mensuração por citometria de fluxo.

Para análise de viabilidade celular, foram plaqueadas 5×10^4 células por poço em placas de 24 poços. Após 24h do plaqueamento, as células foram tratadas com os extratos nas concentrações de 25, 50, 100 e 200µg de extrato por mL (1mL/poço). Como controle, as células foram tratadas com meio completo contendo DMSO na proporção utilizada para diluir os extratos. As células foram expostas aos tratamentos por 72h e 96h, e foram coletadas utilizando-se tripsina-EDTA (Sigma). Em seguida, as células foram lavadas com PBS-A (PBS Ca-livre e Mg-livre) contendo 3% SFB. As células foram centrifugadas à 1500rpm por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. Os *pellets* foram então ressuspensos em 0,2 mL de PBS-A 3%SFB, adicionando-se 1µL de solução de iodeto de propídeo (PI; 1mg/mL - Invitrogen, USA). As células foram então incubadas por 5 minutos em gelo e no escuro.

Foram analisados 10.000 eventos em Citômetro de Fluxo - FACS CANTO II (BD Biosciences, USA). A caracterização da viabilidade celular foi realizada conforme incorporação do fluoróforo (PI). Eventos sem incorporação de PI foram caracterizantes de células vivas e eventos com incorporação de PI de células mortas. O software Flowjo (Inc., Ashland, OR, USA) foi usado para determinar a quantidade relativa de eventos com incorporação de PI. Cada tratamento foi analisado em triplicata e o experimento repetido três vezes.

3.4 Ensaio de Ciclo Celular

O ciclo celular se divide em 4 fases. Na fase M (mitose) há compactação da cromatina e formação de duas cromátides individuais, que vão cada qual para uma célula filha. Na fase G1 (Gap1) inicia-se novamente o processo de síntese de DNA, nesta fase a célula está particularmente sensível ao controle de progressão do ciclo celular. Na fase seguinte, fase S, ocorre a síntese do DNA, sendo nesta fase que o DNA se duplica. Na Fase G2 (Gap2) a célula se prepara novamente para entrar em mitose. (FRESHNEY, 2010)

O presente método de análise de ciclo celular baseia-se na presença de diferentes quantidades de DNA em cada fase do processo de divisão celular. A quantificação é iniciada com a lise celular e posterior marcação do DNA com fluoróforo (PI) capaz de intercalar nas duplas-fitas de DNA. A quantificação é realizada por citometria de fluxo, na qual a emissão de fluorescência captada é proporcional ao conteúdo de DNA na célula (REGGETI; BIENZLE, 2011). A finalidade é determinar o percentual de células em cada fase do ciclo celular: subG0 (DNA fragmentado; <2N; indicio de apoptose/morte celular), G0/G1 (2N) e G2/M (4N), entre os dois picos de fluorescência (G0/G1 e G2/M) estariam os eventos na fase

S (entre 2N e 4N). A Figura 11 demonstra esquematicamente um histograma de distribuição das células avaliadas por etapa do ciclo celular.

Figura 11: Histograma representativo da distribuição de células consideradas em morte e nas diferentes fases do ciclo celular após aquisição dos dados em citometria de fluxo.

Fases do ciclo caracterizadas conforme teor de DNA: morte celular (<2N), G0/G1(2N), S (2N-4N) e G2/M (4N)

Para análise de ciclo celular foram plaqueadas 10×10^4 células por poço, em placa de 6 poços. Após 24h do plaqueamento, as células foram tratadas com os extratos nas concentrações de 12,5, 50 e 200 μg de extrato por mL (2mL/poço). Como controle, as células foram tratadas com meio completo contendo DMSO na proporção utilizada para diluir os extratos. As células foram expostas aos tratamentos por 72h e 96h e coletadas com tripsina-EDTA (Sigma).

Após coletadas, as células foram lavadas com PBS-A para remover as proteínas do soro. As células foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. Os *pellets* foram então ressuspensos em 1,25 mL de PBS-A, adicionando-se 2,85mL de etanol absoluto frio, vagarosamente, de modo a evitar agregação celular. A fixação das células foi conduzida em etanol 70%, a 4°C, por 30 minutos. As células foram então coletadas por centrifugação a 1500rpm por 10 minutos.

O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com 3mL de PBS-A. As células foram coletadas por centrifugação a 1500 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 0,2 mL de solução de lise (0,1% de triton e 0,1% de citrato de sódio), adicionando-se 10 μL de RNase (10 mg/mL) e 1 μL de solução iodeto de propídeo (PI; 1mg/mL - Invitrogen, USA). Em seguida, o RNA das amostras foi digerido a 37°C, durante 20 minutos.

Foram analisados 10.000 eventos em Citômetro de Fluxo - FACS CANTO II (BD Biosciences, USA). A caracterização da distribuição celular nas diferentes fases do ciclo foi realizada conforme emissão de fluorescência. Foram caracterizadas como em SubG0 os eventos com emissão de fluorescência inferior ao primeiro pico (DNA fragmentado; <2N),

em G0/G1 (2N) eventos no primeiro pico de intensidade de fluorescência, em G2/M (4N) eventos no segundo pico, e entre os dois picos de fluorescência estariam as eventos na fase S (entre 2N e 4N). O software Flowjo (Inc., Ashland, OR, USA) foi usado para determinar a quantidade relativa de DNA baseado no grau de fluorescência vermelha emitida. Cada tratamento foi analisado em triplicata e o experimento repetido três vezes.

3.5 Ensaio de Apoptose

A capacidade das células neoplásicas de escapar da morte celular programada é uma conhecida e importante marca do processo carcinogênico. O estudo da influência de um composto dietético na regulação de processos celulares que estão alterados no câncer, deve distinguir se a morte celular promovida pelo composto envolve mecanismos de apoptose ou necrose. Afim de discriminar o tipo de morte promovida pelos diferentes tratamentos, realizou-se ensaio de apoptose, no qual a proteína fosfatidilserina (FS) foi marcada com um fluoróforo Anexina-V-PE. A proteína FS está presente apenas na camada intracelular das células saudáveis, sendo externalizada durante a apoptose. Simultaneamente utilizou-se outro fluoróforo (ex: PI ou 7AAD; 7-amino-actinomicina D) que se ligou aos ácidos nucleicos (DNA e RNA) e assim pode-se discriminar as células em processo inicial de apoptose, em apoptose tardia, e em necrose das células sadias (REGGETI; BIENZLE, 2011). A Figura 12 demonstra esquematicamente um histograma de distribuição das células marcadas conforme tipo de morte celular.

Figura 12: Histograma representativo da distribuição das células marcadas com 7AADe/ou Anexina V-PE.

As siglas nos quadrantes indicam: (IE) inferior esquerdo, correspondem a quantidade de células viáveis (sem marcação); (ID) inferior direito, correspondem a quantidade de células em necrose (marcadas apenas com 7AAD); (SD) superior direito, correspondem a quantidade de células em apoptose tardia (marcadas com Anexina V-PE e 7AAD) e (SE) superior esquerdo, correspondem a quantidade de células em apoptose inicial (marcadas apenas com Anexina V-PE).

Para análise de morte celular por apoptose foram plaqueadas 5×10^4 células por poço, em placa de 24 poços. Após 24h do plaqueamento, as células foram tratadas com os extratos nas concentrações de 200 µg de extrato por mL (1mL/poço). Como controle, as células foram

tratadas com meio completo contendo DMSO na proporção utilizada para diluir os extratos. As células foram expostas aos tratamentos por 72h e 96h e coletadas utilizando-se tripsina-EDTA (Sigma).

As células coletadas foram lavadas com PBS-A 3% SFB. As células foram coletadas após centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. Os *pellets* foram então ressuspensos em tampão de ligação e às 1×10^5 células foram adicionados 5µL de solução 7AAD (7-amino-actinomicina D) e 5µL de solução de Anexina V-PE, conforme protocolo do kit (*PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I*, BD, E.U.A). Após incubação à temperatura ambiente durante 15 minutos, sob proteção da luz, as amostras foram analisadas em um intervalo menor de 1 hora após a incubação.

Foram analisados 10.000 eventos em Citômetro de Fluxo - FACS CANTO II (BD Biosciences, USA). A caracterização de cada tipo de morte celular foi realizada conforme emissão de duas fluorescências distintas. Eventos que emitiam dupla marcação foram contabilizados como apoptose tardia, os marcados apenas com o fluoróforo anexina-V como apoptose, os marcados apenas com o fluoróforo 7-AAD como necrose, e eventos não marcados como células vivas. O software Flowjo (Inc., Ashland, OR, USA) foi usado para determinar a quantidade relativa de fluorescência emitida. Cada tratamento foi analisado em triplicata em experimento único.

3.6 Ensaio de Proliferação - CFSE

O ensaio de proliferação celular por CFSE (éster de succinimidilo de carboxi-fluoresceína) baseia-se na capacidade do corante, que se forma nas células marcadas, de ficar retido nas células ao longo do desenvolvimento e da meiose, podendo assim ser utilizado para rastreio da proliferação (MOLECULAR-PROBES, 2005). As células contendo este fluorocromo ao se dividirem distribuem esse marcador para as células filhas, ou seja, células que passaram por vários ciclos de divisão celular perdem sua fluorescência progressivamente, fato que pode ser observado por citometria de fluxo (RIBEIRO, 2010). A Figura 13 demonstra esquematicamente o decaimento da marcação com CFSE conforme a proliferação celular.

Para análise de proliferação celular por CFSE foram plaqueadas 5×10^4 células (MDA-MB 231) por poço, em placa de 24 poços. Após 24h do plaqueamento, as células foram tratadas com os extratos (GELA, APELA e GANT) nas concentrações de 25, 50 e 200 µg de extrato por mL (1mL/poço). Como controle, as células foram tratadas com meio completo

contendo DMSO na proporção utilizada para diluir os extratos. As células foram expostas aos tratamentos por 24, 48 e 72h e coletadas utilizando-se tripsina-EDTA (Sigma).

Figura 13: Imagem representativa do decaimento de fluorescência das células marcadas com CFSE após proliferação.

Os ensaios de proliferação foram realizados utilizando o CellTrace™ (CFSE - *Cell Proliferation Kit* - Molecular Probes, Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Como indicado pelo fabricante a marcação das células foi realizada antes do plaqueamento. Resumidamente, para a coloração CFSE, as células foram colhidas e lavadas duas vezes em PBS-A, depois incubou-se com 5 μ M de CFSE durante 15 minutos a 37°C. O CFSE residual foi removido por lavagem com PBS-A, as células passaram então por repouso a 37°C por 30 minutos com meio fresco e nova lavagem com PBS-A. Aliquotas desta suspensão foram distribuídas nas placas de 24 poços (5x10⁴ células por poço, como indicado anteriormente). A fluorescência máxima foi medida por análise FACS para avaliar a fluorescência de células não divididas; para isso, uma alíquota de células foi coletada e analisada imediatamente antes do tratamento. A intensidade de fluorescência de CFSE foi medida a cada 24 horas durante os 3 dias de tratamento.

A fluorescência foi medida por citômetro de fluxo FACS Verso (BD Biosciences, EUA), e milhares de eventos sendo adquiridos para o procedimento de análise de dados executadas utilizando-se o programa FACSDiva (BD). Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da proliferação celular, considerando a fluorescência do grupo de controle (DMSO) como 100% de proliferação.

Após o tratamento proposto, a apoptose foi avaliada por marcação com PE (Phycoerythrin) e 7-AAD (7-Amino-Actinomicina), utilizando o Kit de detecção de apoptose CFSE compatível (PE Kit de Detecção de Apoptose da Anexina V I, BD). A coloração e a medição foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante (citômetro de fluxo com excitação de 488 nm para CFSE). Os dados estão apresentados como médias $\pm$ DP (desvio padrão).

3.7 Avaliação de Expressão de Genes e miRNAs Relacionados ao Câncer de Mama

Para as análises de biologia molecular (RNA e miRNAs) as células foram plaqueadas e tratadas (200µg/mL de GELA, APELA e GANT e o controle contendo apenas o meio completo e DMSO na proporção utilizada para diluir os extratos) por 48h. As células foram coletadas e divididas para os dois experimentos (extração de RNAs e miRNAs) na proporção de 2×10^6 células para cada.

3.7.1 Ensaio de Expressão de mRNA Relacionados ao Câncer de Mama

A análise da expressão de genes relevantes no câncer de mama foi conduzida utilizando a plataforma baseada em PCR tempo real RT² Profiler PCR Arrays (PAHS-131Z, Human Breast Cancer RT2 Profiler PCR Array, Qiagen) que permite a análise de diversos genes relacionados ao câncer de mama. A análise compreendia 84 genes chave no câncer de mama, comumente envolvidos na desregulação da transdução de sinal e em outros processos biológicos normais durante a carcinogênese da mama e em linhagens celulares de câncer de mama, conhecidos ou previstos por terem sua expressão alteradas. O ensaio inclui 5 genes de referência (*housekeeping*), 1 controle de contaminação por DNA genômico, 3 controles de transcrição reversa e 3 controles positivos de PCR ((Lista de Genes e Layout da Placa – Anexos (1 e 2).

A extração do RNA total e micro RNAs foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, utilizando kit miRNeasy (Qiagen), a partir de 2×10^6 células (previamente tratadas como descrito no item 3.7).

A concentração de RNA e pureza foram determinadas por espectrofotometria (Nanodrop1000, ThermoScientific). A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose (1,2%) corado com gel red, verificando-se a presença das bandas 28s e 18s, correspondentes ao RNA ribossômico que deveriam ser nítidas e intensas numa relação de 2:1.

A conversão do RNA para cDNA pela enzima transcriptase reversa foi realizada com o kit compatível (RT2 First Strand Kit - Qiagen), utilizando-se 1µg de RNA para a reação. O cDNA foi adicionado ao Mastermix para qPCR (RT2 SYBR® Green PCR Kit - Qiagen) que foi então aliquotado na plaquinha RT² Profiler PCR Array (Qiagen).

Para cada placa foi preparado um mix com 102µL de cDNA diluído, 1350µL de SYBR Green Mastermix (2X RT2 SYBR Green Mastermix, SABiosciences-Qiagen) e 1248µL de água livre de RNase, conforme as orientações do fabricante, que foi distribuído nos 96 poços

de cada placa de PCR array (volume de 25µL), sendo 2 placas para cada grupo de tratamento (GELA, GANT, APELA e Controle)

A reação foi realizada no equipamento de PCR em tempo real 7500 Applied Biosystems Real-Time PCR System (Life Technologies Corporation – Califórnia, EUA) segundo condições de ciclagem recomendada pelo fabricante: uma etapa de 10min a 95°C para a ativação da enzima Taq DNA polimerase e a segunda etapa de 40 ciclos de 15s a 95°C (desnaturação da dupla fita de DNA) e 1min a 60°C (extensão das novas fitas, quando os fluoróforos se ligam à nova fita de DNA - detecção da fluorescência).

Para análise dos resultados, os valores de Ct do grupo controle e dos grupos de tratamento foram transferidos para o software SABiosciences (*Web-based PCR Array Data Analysis Software2*) para a análise dos dados.

3.7.2 Ensaio de Expressão de miRNAs Relacionados ao Câncer de Mama

Análise do perfil de expressão de miRNA relevantes no câncer de mama foi conduzida utilizando plataforma baseada em PCR tempo real miScriptTM miRNA PCR Array (MIHS-109ZA, Human Breast Cancer miRNA PCR Array, Qiagen) que analisa miRNAs relacionados ao câncer de mama. Foi examinado o perfil de expressão de 84 miRNAs chave no câncer de mama, que tem sua expressão conhecida ou presumidamente alterada durante o início ou progressão do câncer de mama. O ensaio inclui 2 controles de extração de miRNA, 6 *housekeeping* snRNAs, 2 controles de reação de transcrição reversa e 2 controles positivos de PCR. (Lista dos miRNAs e Layout da Placa – Anexos (4 e 6).

O experimento foi conduzido conforme recomendações do fornecedor, utilizando os materiais específicos compatíveis com as plataformas. Para identificar sequências de miRNA em células MDA-MB 231 (invasivas e triplo negativas), utilizou-se o material previamente extraído utilizando o kit miRNeasy (Qiagen)(item3.7.1; extração de RNA e miRNA).

A síntese de cDNA pela enzima transcriptase reversa foi realizada com o kit miScript II RT Kit - Qiagen.Utilizou-se 250 ng de RNA para a reação. O cDNA foi adicionado ao Mastermix para qPCR (miScript® SYBR® Green PCR Kit - Qiagen) e aliqotado na placa miScriptTM miRNA PCR Array.

Para cada placa foi preparado um mix com 25µL do cDNA diluído, 1375µL de SYBR Green Mastermix (2X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, SABiosciences-Qiagen), 275µL de miScript Universal Primer (primer reverso, 10X miScript Universal Primer, Qiagen) e 1248µL de água livre de RNase, conforme as orientações do fabricante, e

distribuído nos 96 poços de cada placa de PCR array (volume de 25µL), sendo 2 placas para cada grupo de tratamento (GELA, GANT, APELA e Controle).

A reação foi realizada no equipamento de PCR em tempo real 7500 Applied Biosystems Real-Time PCR System (Life Technologies Corporation – Califórnia, EUA) segundo condições de ciclagem recomendada pelo fabricante: uma etapa de 15min a 95°C para a ativação da enzima Taq DNA polimerase e a segunda etapa de 40 ciclos com três etapas definidas, a primeira de 15s a 94°C (desnaturação da dupla fita de DNA), a segunda de 30s a 35°C (anelamento) e a última de 30s a 70°C (extensão das novas fitas e detecção da fluorescência).

4 RESULTADOS

4.1 Viabilidade Celular

A Figura 14 apresenta dados referentes à viabilidade celular em linhagens de células MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em antocianinas (25, 50, 100 e 200µg/mL). Em comparação ao controle, observou-se em células MCF-7 e MDA-MB 231, nos tempos de 72h e 96h, que os extratos ricos em antocianinas de AS, AP e G (25, 50, 100 e 200µg) não reduziram a viabilidade celular em mais de 10%.

Figura 14: Viabilidade celular em linhagens de células MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em antocianinas.

Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos realizado em triplicata. Concentrações de tratamento 25, 50, 100 e 200µg nos tempos de 72h e 96h. a) amora silvestre (AS); b) amora preta (AP) e c) grumixama (G). (Valores de $p^* < 0,05$ -0,01; $** < 0,01$ -0,001; $*** < 0,001$ -0,0001; $**** p < 0,0001$). Extratos ricos em antocianinas (ANT).

A Figura 15 apresenta dados referentes à viabilidade celular em linhagem de células MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em elagitaninos (25, 50, 100 e

200µg/mL). Em comparação ao controle, observou-se em células MCF-7 e MDA-MB 231, nos tempos de 72h e 96h, que os extratos ricos em elagitaninos de AP e G (25, 50, 100 e 200µg) não reduziram a viabilidade celular em mais de 10%

Figura 15: Viabilidade celular em linhagem de células MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em elagitaninos.

Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos realizado em triplicata. Concentrações de tratamento 25, 50, 100 e 200µg nos tempos de 72h e 96h. a) amora preta (AP) e b) grumixama (G) (Valores de $p^* < 0,05-0,01$; $** < 0,01-0,001$; $*** < 0,001-0,0001$; $**** < 0,0001$). Extratos ricos em elagitaninos (ELA).

De forma geral, para ambas linhagens celulares, os extratos avaliados (ricos em antocianinas ou elagitaninos) das três frutas (AS, AP e G), nas concentrações testadas (25, 50, 100 e 200 µg), não foram considerados citotóxicos por não terem rompido a membrana celular em mais de 10% das células.

4.2 Ciclo Celular

A Figura 16 apresenta dados referentes ao ciclo celular das linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em antocianinas (12,5, 50 e 200µg/mL) no tempo de 72h. Em comparação ao grupo controle, observou-se indução de parada de ciclo celular ($p \leq 0,05$) na linhagem MCF-7 tratadas com extratos ricos em antocianinas de AP (12,5 e 50µg) G (12,5; 50 e 200µg) por 72h. Na linhagem MDA-MB231 não se observou efeito estatisticamente significativo em comparação ao controle.

Figura 16: Ciclo celular das linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em antocianinas no tempo de 72h.

Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos realizado em triplicata. (AS), amora silvestre; (AP), amora preta e (G), grumixama. Concentrações de tratamento 12,5, 50 e 200µg no tempo de 72h. a) amora silvestre b) amora preta c) grumixama. (Valores de $p^* < 0,05$; $0,01$; $0,001$; $0,0001$; $0,00001$). Extratos ricos em antocianinas (ANT).

A Figura 17 apresenta dados referentes ao ciclo celular das linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB 231, tratadas com extratos ricos em antocianinas (12,5, 50 e 200µg/mL) no tempo de 96h. Em comparação ao controle, observou-se em células MCF-7, no tempo de 96h, que os extratos ricos em antocianinas de AS (12,5 e 50µg), AP (12,5 e 50µg) e G (12,5; 50 e 200µg) induziram parada de ciclo celular em G0/G1. Em comparação ao controle, observou-se em células MDA-MB 231, que os extratos ricos em antocianinas de AS (12,5 e 50µg), AP (12,5, 50 e 200µg) e G (12,5, 50 e 200µg) induziram parada de ciclo celular em G0/G1 no tempo de 96h.

Figura 17: Ciclo celular das linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em antocianinas no tempo de 96h.

Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos realizado em triplicata. (AS), amora silvestre; (AP), amora preta e (G), grumixama. Concentrações de tratamento 12,5, 50 e 200µg no tempo de 96h. a) amora silvestre; b) amora preta e c) grumixama. (Valores de $p^* < 0,05$; $0,01$; $** < 0,01$; $0,001$; $*** < 0,001$; $0,0001$; $**** < 0,0001$). Extratos ricos em antocianinas (ANT).

A Figura 18 apresenta dados referentes ao ciclo celular das linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB 231, tratadas com extratos ricos em elagitaninos (12,5, 50 e 200µg/mL) no tempo de 72h. Em comparação ao controle, observou-se em células MCF-7, no tempo de 72h, que os extratos ricos em elagitaninos de APe G, na maior concentração testada (200µg), promoveram aumento de células em sub G0. Em comparação ao controle, observou-se em células MDA-MB 231, que os extratos ricos em elagitaninos de AP(200µg) e G (200µg) induziram parada de ciclo celular em G0/G1, e concomitante incremento de células em subG0 (AP e G; 200µg) no tempos de 72h.

Figura 18: Ciclo celular das linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em elagitaninos no tempo de 72h.

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão de três experimentos realizado em triplicata. (AP), amora preta e (G), grumixama. Concentrações de tratamento 12,5, 50 e 200µg no tempo de 72h. a) amora preta b) grumixama. (Valores de p * <0,05-0,01; ** <0,01-0,001; *** <0,001-0,0001; **** p<0,0001). Extratos ricos em elagitaninos (ELA).

A Figura 19 apresenta dados referentes ao ciclo celular das linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB 231, tratadas com extratos ricos em elagitaninos (12,5, 50 e 200µg/mL) no tempo de 96h. Em comparação ao controle, observou-se em células MCF-7, no tempo de 96h, que os extratos ricos em elagitaninos de AP e G não promoveram parada de ciclo celular. Em comparação ao controle, observou-se em células MDA-MB 231 que os extratos ricos em elagitaninos de AP (200µg) e G (200µg) induziram parada de ciclo celular em G0/G1, e concomitante incremento de células em subG0 no tempos de 72h.

Figura 19: Ciclo celular das linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em elagitaninos no tempo de 96h.

Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos realizado em triplicata. Concentração de 200 µg. (AP), amora preta e (G), grumixama. Concentrações de tratamento 12,5, 50 e 200µg no tempo de 96h. a) amora preta b) grumixama. (Valores de p * <0,05-0,01; ** <0,01-0,001; *** <0,001-0,0001; **** p<0,0001). Extratos ricos em elagitaninos (ELA).

De forma geral, observou-se que os extratos ricos em antocianinas promoveram aumento do percentual de células em G0/G1 em ambas linhagens (MCF-7 e MDA-MB 231). Os extratos ricos em elagitaninos, por sua vez, modularam o ciclo celular de forma diferenciada, promovendo parada de ciclo em G0/G1 em células MDA-MB 231 enquanto não alteraram a distribuição do ciclo celular em MCF-7.

Uma vez observado o aumento do percentual de células em subG0 promovido pelos extratos ricos em elagitaninos e a ação divergente que estes extratos promoveram entre as linhagens no contexto do ciclo celular, buscou-se, então, avaliar os diferentes mecanismos de morte celular induzidos pela maior concentração dos extratos de antocianinas (200µg) e elagitaninos (200µg) em ambas as linhagens de câncer de mama.

4.3 Ensaio de Apoptose

A Figura 20 apresenta dados referentes à apoptose em linhagem de células MCF-7 e MDA-MB 231, tratadas com extratos ricos em antocianinas de AS, AP e G(200µg/mL), nos tempos de 72h e 96h. Em comparação ao controle, observou-se em células MCF-7 que o extrato rico em antocianinas de G induziu morte celular por apoptose, enquanto que os extratos de AS e AP ricos em antocianinas não induziram morte nos tempos de 72h e 96h. Em comparação ao controle, observou-se em células MDA-MB 231 que os extratos ricos em antocianinas de AS, AP e G não induziram morte nos tempos de 72h e 96h.

Figura 20: Apoptose em linhagem de células MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em antocianinas.

Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio padrão de um experimento realizado em triplicata. (AS), amora silvestre; (AP), amora preta e (G), grumixama; Ant, antocianinas. Concentrações de tratamento de 200µg nos tempos de 72h (a) e 96h (b) (Valores de $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,0001$; $p < 0,0001$). Extratos ricos em antocianinas (ANT).

A Figura 21 apresenta dados referentes a apoptose em linhagem de células MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em elagitaninos de AP e G (200µg/mL) no tempo de 72h e 96h. Em comparação ao controle, observou-se em células MCF-7 no tempo de 96h, mas não em 72h, que os extratos ricos em elagitaninos de AP e G induziram morte celular por necrose. Em comparação ao controle, observou-se em células MDA-MB 231 que os extratos ricos em elagitaninos de AP e G induziram morte celular por apoptose em 72h e 96h.

De forma geral, observou-se que o extrato rico em antocianina de G promoveu aumento do percentual células em apoptose em células MCF-7 enquanto, em células MDA-MB 231 nenhum dos extratos ricos em antocianinas induziu morte celular. Para os extratos ricos em elagitaninos, observou-se que ambos os extratos (AP e G) induziram morte em células MCF-7 por necrose enquanto, em células MDA-MB 231 induziram morte por apoptose.

A Figura 22 resume os resultados obtidos no ensaio de apoptose em células MCF-7 e MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em antocianinas ou elagitaninos na concentração de 200 μ g/mL

4.4 Ensaio de Proliferação Celular -CFSE

Foi avaliado o percentual de proliferação celular em células MDA-MB 231, marcadas com CFSE, tratadas com extratos ricos em elagitaninos e antocianinas (50, 100 e 200µg/mL) durante 24, 48 e 72 horas de tratamento. Quando comparados ao controle apenas em 72h foi possível observar diferença estatisticamente significante entre os tratamentos.

A Figura 23 representa o percentual de proliferação celular em células MDA-MB 231 após 72h de tratamento com extratos ricos em elagitaninos e antocianinas (50, 100 e 200µg/mL). Após este período de tratamento, foi observado redução significativa da proliferação celular por todos os tratamentos testados (GELA; GANT e APELA), na maior concentração (200µg/mL).

Figura 23: Proliferação celular em células MDA-MB 231 marcadas com CFSE e tratadas com extratos ricos em elagitaninos e antocianinas.

Extratos oriundos de (AP), amora preta e (G), grumixama. Extratos ricos em antocianinas (ANT) ou elagitaninos (ELA). Células tratadas por 72h com diferentes concentração dos tratamentos (50, 100 e 200µg). Valores de p *<0,05-0,01; ** <0,01-0,001; *** <0,001-0,0001; **** p<0,0001 diferem estatisticamente do controle.

A Figura 24 sumariza os resultados obtidos no ensaio de apoptose em células MDA-MB 231 previamente marcadas com CFSE e tratadas com extratos ricos em elagitaninos e antocianinas (50, 100 e 200µg/mL) por 24, 48 e 72 horas de tratamento.

Figura 24: Apoptose em células MDA-MB 231 tratadas com extratos ricos em antocianinas ou elagitaninos.

Concentrações de tratamento de 50, 100 e 200µg nos tempos de 24h (a), 48h (b) e 72h. Os valores estão expressos em média de um experimento realizado em triplicata. Extratos ricos em antocianinas (ANT) ou elagitaninos são oriundos de (AP), amora preta e (G), grumixama.

4.5 Avaliação de Expressão de Genes e miRNAs Relacionados ao Câncer de Mama

4.5.1 Expressão de Genes Relacionados ao Câncer de Mama

Dos 86 genes relacionados ao câncer de mama presentes no ensaio de PCR array PAHS-131Z da SABiosciences/Qiagen, foram encontrados 5 genes com aumento da expressão e 10 genes com expressão inibida nas amostras de MDA-MB 231 tratadas com 200µg/mL dos extratos (GELA, GANT e APELA) em relação às amostras do grupo controle. A Tabela 1 mostra os valores de regulação de cada um destes genes comparando-se os tratamentos com o controle. Na Figura 25, pode se observar quantos genes foram regulados por cada tratamento, assim, concomitantemente, por mais de um tratamento.

Tabela 1: Valores do *fold-regulation* dos Genes com expressão alteradas após 48h de tratamento.

Genes	GELA Fold-Regulation	GANT Fold-Regulation	APELA Fold-Regulation
ADAM23	-1,05	-2,74	-3,31
ATM	-2,22	1,05	-1,23
BCL2	-2,39	-1,41	-1,97
CDH1	-4,53	-3,62	-3,73
EGF	-2,78	-1,47	-1,9
ESR2	2,69	3,45	2,7
FOXA1	3,73	1,43	1,95
GLI1	-1,87	-2,16	-2,17
ID1	-8,49	-4,68	-9,66
JUN	2,35	1,48	2,19
MKI67	-2,83	-1,33	-1,34
PTGS2	2,88	1,73	3,71
SNAI2	-1,63	1,11	-2,27
THBS1	-2,04	-1,27	-1,78
VEGFA	1,63	3,02	1,8

Grupos: GELA, GANT e APELA comparados ao Controle. Em vermelho, houve hiperexpressão e, em azul, hipoexpressão, considerando +2 <fold regulation < -2. Extratos oriundos de (AP), amora preta e (G), grumixama, ricos em antocianinas (ANT) ou elagitaninos (ELA).

Figura 25: Genes relacionados ao câncer de mama regulados pelos tratamentos em células MDA-MB 231.

Extratos oriundos de (AP), amora preta e (G), grumixama, ricos em antocianinas (ANT) ou elagitaninos (ELA).

Dois genes tiveram a expressão reduzida (hipo-expressão/*down-regulation*), em relação ao controle, pelos três tratamentos (GELA, GANT e APELA): ID1 (Inibidor de ligação ao DNA 1) e CDH1 (E-caderina (epitelial)). O gene GLI1 também teve a expressão reduzida, acima de 2 *fold-change*, nos tratamentos GANT e APELA e em GELA o *fold-change* foi de -1,87. É importante observar que no caso do gene CDH1 a expressão gênica nos tratamentos foi relativamente baixa (amplificação média próxima à 30 ciclos).

No que tange ao incremento de expressão, apenas o gene ESR2 (receptor de estrógeno Beta) teve sua expressão aumentada (acima de 2 *fold-change*; hiper-expressão/*up-regulation*) pelos três tratamentos (GELA; GANT e APELA). Os genes AR, JUN, PGR e PTGS2 foram regulados positivamente (>2 *fold-regulation*) pelos tratamentos ricos em elagitaninos (GELA e APELA).

4.5.2 Expressão de miRNA Relacionados ao Câncer de Mama

Das 84 sequências de miRNA, relacionados ao câncer de mama humano, analisadas no ensaio de miRNA PCR MIHS-109Z, foram encontrados 3 miRNAs que apresentaram diferença estatisticamente significativa na expressão quando comparados os grupos tratados (GELA, GANT e APELA; 200µg/mL) ao controle. Observamos 1 miRNA com aumento da expressão promovido pelos três tratamentos (GELA, GANT e APELA) e 2 miRNAs com redução da expressão promovido pelo tratamento APELA, 12 miRNAs com baixa expressão e

2 não amplificaram nas amostras de MDA-MB 231 tratadas em relação às amostras do grupo controle.

Tabela 2: MicroRNAs com expressões aberrantes no tratamento em relação ao controle.

Position	mi-RNA ID	GRUPOS	Fold-Change	P	Fold Regulation
D06	hsa-miR-19a-3p	GELA	1.07	0.650491	1.07
		GANT	1.05	0.703913	1.05
		APELA	0.47	0.017614	-2.13
D07	hsa-miR-19b-3p	GELA	1.12	0.554591	1.12
		GANT	1.00	0.961659	1.00
		APELA	0.45	0.025699	-2.22
E07	hsa-miR-210-3p	GELA	2.20	0.011649	2.20
		GANT	1.86	0.017104	1.86
		APELA	2.19	0.027504	2.19

Em vermelho, houve hiperexpressão e, em azul, hipoexpressão, considerando $+2 < \text{fold regulation} < -2$ e $p < 0,05$. Extratos oriundos de (AP), amora preta e (G), grumixama, ricos em antocianinas (ANT) ou elagitaninos (ELA).

Os valores do *fold-change*, intervalo de confiança, valor de *p* e *fold-regulation* dos miRNAs avaliados do Grupo 1 (GELA), Grupo 2 (GANT) e Grupo 3 (APELA) encontram-se no anexo 7 (Tabela 3, Tabela 4 e Tabela 5). O Gráfico 1 demonstra os microRNAs com expressões distintas nos tratamentos quando comparadas ao controle.

Gráfico 1: Comparação dos *fold-change* de microRNAs com expressão relevante

Extratos oriundos de (AP), amora preta e (G), grumixama, ricos em antocianinas (ANT) ou elagitaninos (ELA).

5 DISCUSSÃO

O câncer de mama destaca-se como problema de saúde global por ser o câncer mais prevalente em mulheres e por causar, anualmente, mais de meio milhão de mortes no mundo (AMERICAN CANCER SOCIETY., 2015; IARC AND CANCER RESEARCH UK, 2014). O envolvimento da alimentação na gênese e progressão do câncer, sobretudo de mama, ganha destaque nos últimos anos (MAYNE; PLAYDON; ROCK, 2016). Todavia, o impacto desta alimentação também é específico conforme o estágio e as características morfológicas do carcinoma. Por exemplo, observam-se respostas distintas à dieta quando comparados casos de câncer de mama receptor de estrógeno positivo e negativo (FUNG et al., 2013; JUNG et al., 2013). Neste sentido, o presente estudo foi realizado *in vitro* utilizando-se de células de linhagens de câncer de mama humano estabelecidas, oriundas do banco de células ATCC.

Para o presente estudo, foram escolhidas as linhagens celulares MCF7 e MDA-MB 231. A escolha baseou-se na frequência de estudos realizados com estas linhagens e em suas características complementares. As células MCF-7 são conhecidas como receptor de hormônios positivas (receptor de estrógeno e progesterona; ER+ e PR+) (LI et al., 2014b; SUBIK et al., 2010; XING et al., 2010). Esta linhagem é utilizada pelo seu comportamento semelhante aos carcinomas de mama hormônio dependentes, o tipo mais frequente embora menos agressivo da doença (NIH, 2015). De forma complementar, células MDA-MB 231 são conhecidas como triplo negativas (receptor de estrógeno, progesterona e HER2 negativos; ER-, PR- e HER2-) (XING et al., 2010). A linhagem MDA-MB 231 é utilizada pelo seu comportamento semelhante ao carcinoma de mama independente de hormônio, que, embora menos frequentes, são mais agressivos e com maior potencial metastático (AGGARWAL; SHISHODIA, 2006; LI et al., 2014b; NIH, 2015; OUHTIT et al., 2013; SUBIK et al., 2010; ZHANG et al., 2015).

Recentes estudos populacionais destacaram o consumo regular de frutas, sobretudo *berries*, como importante fator de proteção para o câncer de mama (FUNG et al., 2013; JUNG et al., 2013). Os compostos de *berries*, antocianinas e elagitaninos, vêm sendo reconhecidos por inibirem a carcinogênese via regulação do ciclo celular, indução de apoptose e inibição da proliferação celular, oncogenes e metástase (MAZZONI et al., 2015). Destaca-se nesse sentido a importância da interação entre estes compostos, visto que combinações de CBAs, extraídos ou simulando as encontradas nas fontes dietéticas, vêm sendo investigadas e demonstrando maior eficácia que os compostos isolados (KAUSAR et al., 2012). Entretanto,

estudos experimentais avaliando o impacto de *berries* no câncer de mama são escassos, sobretudo com frutos disponíveis para o consumo em regiões tropicais. No presente trabalho, investigou-se o efeito de extratos ricos em antocianinas (ANT) ou elagitaninos (ELA), das três *berries* disponíveis para o consumo no Brasil (AS, AP e G), em linhagens de câncer de mama humano. Avaliou-se para tanto o crescimento e expressão de genes e miRNAs nas linhagens celulares MFC-7 e MDA-MB 231.

Após o tratamento com os diferentes extratos, aproximadamente 90% das células de ambas as linhagens de carcinoma de mama humano (MCF-7 e MDA-MB 231) mantiveram-se viáveis (com a membrana íntegra). Assim, os extratos não foram considerados citotóxicos (ISMAIL et al., 2013).

O tratamento com CBAs de *berries*, antocianinas e elagitaninos, regulou o ciclo celular em diferentes tipos de câncer, incluindo câncer de mama (GONZÁLEZ-SARRÍAS et al., 2014; KAUSAR et al., 2012; VICINANZA et al., 2013). No presente estudo, observou-se que os extratos ricos em antocianinas, sobretudo o de grumixama, promoveram parada de ciclo celular em G0/G1 em MCF-7 e MDA-MB 231. Em células de carcinoma de mama humano (HS578T; ER- e PR-), o tratamento com cianidina-3-glucosídeo resultou em inibição do crescimento por parada do ciclo celular em G2/M (CHEN et al., 2005). Já o extrato de batata roxa, rico em antocianinas, promoveu parada de ciclo em G2/M em MCF-7 e em S em MDA-MB 231 (BONTEMPO et al., 2013). Esta divergência entre os estudos pode ter explicação na composição dos extratos. No extrato de batata roxa predominaram malvidina e petunidina, enquanto nos extratos de *berries* predominaram cianidina, delphinidina e derivados. Assim, a regulação do ciclo celular por extratos de antocianinas parece variar conforme sua composição de antocianinas.

Nesse sentido, a relevância da ação conjunta dos CBAs foi observada em células de pulmão (H1299). A combinação de cinco antocianidinas, em equimolaridade, promoveu parada de ciclo em G2/M acompanhada da redução na expressão de ciclinas que regulam a progressão do ciclo celular em G2/M (ciclina B) e em G0/G1 (ciclina D) (KAUSAR et al., 2012). Observou-se que a atividade do mix de antocianidinas foi mais intensa do que quando os compostos foram administrados individualmente (KAUSAR et al., 2012). Ressalta-se assim, a importância da combinação de diferentes antocianidinas, sobretudo devido à ação complementar entre elas, como uma importante ferramenta no combate ao câncer de mama.

A promoção de morte celular é outra importante ação dos bioativos de *berries* no câncer (BAK et al., 2016; HANAHAN; WEINBERG, 2011; PAN et al., 2015). No presente trabalho, dentre extratos ricos em antocianina apenas GANT induziu apoptose nas linhagens de câncer

de mama MCF-7 e MDA-MB 231. Esta observação pode ter explicação na composição diferenciada de cada extrato rico em antocianinas. Na fração fenólica de grumixama os derivados de delphinidina representam 25% e cianidina 58% (uma proporção aproximada de 1:2) (TEIXEIRA et al., 2015). Enquanto isso, em ambas as amoras (AS e AP) predominam derivados de cianidina podendo estes representar 90% da composição fenólica destes frutos (HASSIMOTTO et al., 2008; HASSIMOTTO; GENOVESE; LAJOLO, 2007). Adicionalmente, a delphinidina destacou-se quanto à capacidade de induzir apoptose, quando comparada à cianidina, em células de adenocarcinoma humano (HeLa e Caco-2) (LAZZE et al., 2004).

Apesar da composição diferenciada de antocianinas, os extratos ANT do presente estudo tinham em comum uma porção do composto fenólico quercetina. Em células MCF-7 e MDA-MB 231, o tratamento com coquetel de fitoquímicos (contendo quercetina) induziu comportamento semelhante ao observado em nosso estudo. Observou-se, assim como no presente estudo, parada de ciclo celular em G0/G1 e maior indução de apoptose em MCF-7 quando comparado à MDA-MB 231 (OUHTIT et al., 2013). Assim, sinaliza-se que a presença de quercetina nos extratos ricos em antocianinas pode ter contribuído com os resultados observados.

No contexto dos tratamentos com extratos rico em elagitaninos, observou-se no presente trabalho que os extratos de amora preta (APELA) e grumixama (GELA) promoveram aumento de células em subG0 e concomitante redução do percentual de células em G0/G1 em MCF-7. Estes resultados coincidem com o aumento de apoptose e redução de células em G0/G1, observado em células MCF-7 após tratamento de com extrato de romã (SHIRODE et al., 2014b). Em células MDA-MB 231, observou-se no presente estudo que os extratos ricos em elagitaninos induziram parada de ciclo celular em G0/G1. Em linhagem celular de câncer de mama de camundongo, que assim como MDA-MB 231 tem características de célula tronco, o extrato de romã também induziu parada de ciclo celular em G0/G1 (DAI et al., 2010). O EA isoladamente ou em conjunto com a quercetina foi capaz de modular sinalização por p53 e p21 que pode levar à parada de ciclo em G0/G1 em diferentes linhagens celulares (MOLT-4 e T24) (LI et al., 2005; MERTENS-TALCOTT et al., 2005). Ressalta-se aqui que, assim como MDA-MB 231 as linhagem MOLT-4 e T24 possuem mutação em p53 (BHATIA et al., 1995; KAWASAKI et al., 1996; LI et al., 2005).

No presente trabalho, os extratos APELA e GELA induziram morte celular de forma distinta em cada linhagem. Observou-se incremento de morte por necrose em MCF-7 em contraste ao destacado aumento de morte por apoptose em MDA-MB 231. Tratamentos

antineoplásicos induzem morte celular principalmente por apoptose, entretanto, a necrose destas células ocorre quando a apoptose é bloqueada por inibição de caspase ou super-expressão de proteínas antiapoptóticas da família de BCL-2 (PROSKURYAKOV; GABAI, 2010). Considerando que a principal via de promoção de apoptose por EA é a ativação de caspase-3, a ausência de caspase-3 em MCF-7 pode ter inviabilizado a indução de morte por apoptose nesta célula (BLANC et al., 2000; LI et al., 2005; MIRZAYANS et al., 2012; TURRINI; FERRUZZI; FIMOIGNARI, 2015).

Somando-se à indução de morte celular, a redução de proliferação é um dos principais mecanismos de ação dos CBAs na supressão de tumores (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; PAN et al., 2015). No presente estudo, os tratamentos GANT, GELA e APELA inibiram a proliferação celular na linhagem celular MDA-MB 231. Esse resultado condiz com o observado *in vitro e in vivo* em células de câncer de mama, onde romã e seus derivados inibiram proliferação celular (SHARMA; MCCLEES; AFAQ, 2017)

No presente trabalho, extratos de *berries* ricos em antocianinas e elagitaninos (amora preta, amora silvestre e grumixama) promoveram morte celular, inibiram a progressão do ciclo celular e a proliferação celular em células de câncer de mama. Destacam-se os tratamentos com extratos ricos em elagitaninos (GELA e APELA) e os ricos em antocianinas de grumixama (GANT) por culminarem em resultados mais proeminentes, sobretudo em células MDA-MB 231. Assim, estes extratos (GELA, APELA e GANT) foram selecionados para o tratamento de células MDA-MB 231 e posterior análise da expressão gênica e de miRNAs.

Para tanto, foi utilizada plataforma que possibilita avaliar simultaneamente a expressão de 84 genes relacionados ao câncer de mama (PAHS-131Z, *Human Breast Cancer RT2 Profiler PCR Array*, Qiagen). De forma geral, os extratos inibiram a expressão de 10 genes (ADAM23, ATM, BCL2, CDH1, EGF, GLI1, ID1, MKI67, SNAI2 e THBS1) e induziram a expressão de 5 genes (ESR2, FOXA1, JUN, PTGS2, VEGFA).

Destaca-se o gene ID-1 (*Inhibitor of DNA Binding 1*) pela maior taxa de inibição de expressão observada após o tratamentos de células MDA-MB 231 com GANT, GELA e APELA. O gene ID-1 é conhecido por seu papel na apoptose, diferenciação celular, transformação neoplásica, angiogenese tumoral, invasão e metástase (GUMIREDDY et al., 2014; ISMAIL et al., 2013; LEE et al., 2009; MCALLISTER et al., 2007; WANG et al., 2017). Adicionalmente, ID-1 vem sendo usado como marcador pró-invasivo e, inclusive, é cogitado como alvo para terapia coadjuvante em câncer altamente metastático (MCALLISTER et al., 2007). No câncer de mama, a expressão de ID1 foi associada à

capacidade metastática e à agressividade (MINN et al., 2005). Nesse contexto, a inibição deste gene reduziu o crescimento, metástase tumoral e transição epitélio mesenquimal (EMT) (ISMAIL et al., 2013; MCALLISTER et al., 2007; WANG et al., 2017). Sugere-se desta forma que a inibição de ID-1 induzida pelos extratos pode estar associada à apoptose observada no presente estudo.

Recentemente foi observado que aumento de ID-1 leva à redução de e-caderina, e estes resultados estariam diretamente relacionados à indução de EMT (LI et al., 2007). No câncer de mama é comum a baixa expressão de CDH-1 (e-caderina), sendo esse evento correlacionado a EMT em diferentes linhagens celulares (incluindo MDA-MB 231) (LOMBAERTS et al., 2006). Entretanto, no presente trabalho, os tratamentos com GELA, GANT e APELA inibiram a expressão de ID-1 e também de CDH-1 em células MDA-MB 231. Observou-se, ainda, a baixa expressão de CDH-1 mesmo no grupo controle.

Outro importante gene relacionado ao câncer de mama que teve sua expressão inibida foi EGF (Fator de crescimento epidérmico). No presente trabalho, os extratos ricos em elagitaninos (GELA e APELA) inibiram a expressão de EGF em linhagem celular MDA-MB 231. Considerando EGF como potente indutor de EMT, ressalta-se a importância desta observação em células conhecidas por seu perfil altamente metastático associado à EMT (MDA-MB 231). Em células de câncer de mama não metastáticas (MCF-7), EGF foi utilizado como tratamento indutor de EMT, promovendo aumento da expressão gênica de SNAIL e TWIST (ISMAIL et al., 2013). Todavia, o aumento da expressão de SNAIL e TWIST, promovido por EGF, foi inibido pelo tratamento das células com o composto fenólico derivado da casca de canela 2'-hidroxicinamaldeído (HCA) (ISMAIL et al., 2013).

Neste sentido, observou-se no presente trabalho que o tratamento de células MDA-MB 231 com APELA inibiu a expressão de SNAIL. SNAIL (*Snail Family Zinc Finger*, também conhecido como SNAI2) foi relacionado com a sinalização Shh-Gli (Shh-sonic hedgehog), estritamente associada com EMT e malignidade dos tumores (SINGH et al., 2016; SONG et al., 2016). *In vivo*, a supressão de SNAIL inibiu a capacidade de iniciar o tumor de células MDA-MB-231 (GUO et al., 2012). Em células de câncer de mama (incluindo MDA-MB 231), HCA induziu a reversão epitelial pelo bloqueio de uma série de sinalização programada na EMT (ISMAIL et al., 2013). Dentre outras vias, HCA suprimiu a expressão do SNAIL inibindo a sinalização Wnt (ISMAIL et al., 2013). Considerando o papel crítico da EMT na progressão do câncer, os genes envolvidos em sua regulação como EGF e SNAIL emergem como alvos terapêuticos, visando inibir a progressão metastática das células de câncer (ISMAIL et al., 2013).

Ainda no contexto de invasão celular, no presente trabalho, o tratamento das células MDA-MB 231 com GELA inibiu a expressão de THBS-1 (*Thrombospondin 1*). A proteína transcrita por THBS-1 é uma glicoproteína adesiva que medeia as interações célula-célula e célula-matriz, e está envolvida na agregação plaquetária, angiogênese e tumorigênese (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2016a). Em células derivadas da linhagem de câncer de mama MDA-MB-435 (triplo negativa e metastática como MDA-MB 231), demonstrou-se o papel crucial do gene THBS-1 na regulação da adesão celular e invasão de células tumorais, etapas cruciais no processo de metástase (ALBO et al., 2000). E em três linhagens celulares de câncer mama (MDA-MB-231, SKBR-3 e MCF-7), adição de THBS-1 ao meio de cultura promoveu aumento dose-dependente na invasão enquanto a redução de THBS-1 inibiu este mecanismo (WANG et al., 1996). Nesse sentido, a inibição de THBS-1 observada em nosso trabalho corrobora para a hipótese de ação anticarcinogênica dos extratos aqui testados.

Dentre os genes com expressão aumentada no presente trabalho, ESR2 merece destaque pois teve expressão induzida pelos três extratos testados (GELA, GANT e APELA) na linhagem celular MDA-MB 231. ESR2, também conhecido como receptor de estrógeno beta (ER β), pertence à família dos receptores de estrógeno (ER). No câncer de mama os papéis destes receptores são conhecidamente distintos (SREEJA et al., 2012). Enquanto ER α promove proliferação celular, ER β age como supressor de tumor (SREEJA et al., 2012). Sozinho, o ER β exerce efeito anti-proliferativo, e quando co-expresso com ER α inibe a expressão gênica do receptor oncogênico (CAIAZZA et al., 2015). Entretanto, a perda da expressão de ER β é comum na progressão de alguns tipos de câncer, inclusive no câncer de mama (CAIAZZA et al., 2015). Em células MDA-MB 231, a super-expressão de ER β inibiu a migração e invasão celular de forma dependente de ID-1 (ZHOU et al., 2015). Estes resultados corroboram com o observado no presente trabalho, onde a expressão de ER β foi inversamente associada à expressão de ID-1. Adicionalmente, o aumento da expressão ER β é considerado marcador de um melhor prognóstico ou clínico *outcome* (ZHOU et al., 2015).

O gene PTGS2 (*Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2*), também conhecido como COX-2, desenvolve um papel chave na produção de prostaglandina E2, estando também envolvido com a modulação da motilidade celular, proliferação e resistência à apoptose (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2016b). Em células de câncer de mama (MDA-MB-231), a redução da expressão de COX-2 pela combinação de DHA (ácido docosahexaenoico) e genisteína, foi acompanhada da redução da capacidade de invasão celular (HORIA; WATKINS, 2007). Entretanto, no presente trabalho, os tratamentos ricos em

elagitaninos (GELA e APELA) aumentaram a expressão COX-2, mas também modularam em células MDA-MB 231 a expressão genes envolvidos na atividade ação anti-metastática. De toda forma, o tratamento de células MDA-MB 231 com NAMI-A (droga anti-metastática) induziu a expressão de COX-2 (BERGAMO et al., 2015), sugerindo que o aumento de COX-2 pode também estar envolvido em um mecanismo anticarcinogênico.

Outro gene envolvido na aquisição de fenótipo metastático é ADAM 23 (ADAM *Metallopeptidase Domain* 23) (VERBISCK et al., 2009). Responsável por codificar uma proteína estruturalmente ancorada na membrana, ADAM23 participa da regulação de interações célula-célula e célula-matriz (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2016c). Em tumores mamários, o frequentemente silenciamento de ADAM23 é associado à progressão do tumor (VERBISCK et al., 2009). No presente trabalho, todavia, o tratamento com GANT e APELA inibiu a expressão de ADAM23 em MDA-MB 231.

No contexto de proliferação celular, observou-se no presente trabalho que o tratamento com GELA inibiu a expressão de MKI67 em células MDA-MB 231. MKI67 (marcador de proliferação Ki-67) é o gene responsável por codificar a conhecida proteína marcadora de proliferação celular KI67. Utilizando também MDA-MB 231, observou-se *in vitro* e *in vivo*, que o tratamento com extrato de mirtilo, rico em antocianinas, inibiu a expressão de KI67 (ADAMS et al., 2010a). E embora no presente trabalho o extrato rico em antocianinas não tenha modulado a expressão gênica de KI67, o extrato de grumixama rico em elagitaninos (GELA) o fez, reforçando a inibição da proliferação celular observada no presente trabalho.

Outro gene envolvido na proliferação celular que teve a expressão inibida por GELA foi ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated). ATM atua na regulação de vias como a de reparo de DNA e os pontos de controle do ciclo celular (SHILOH, 2003). Este gene é reconhecido por auxiliar na regulação de um variedade de proteínas supressoras de tumor, dentre elas p53 (SHILOH, 2003; WEI, 2016). Em células de câncer de mama MDA-MB 231, a falta de função normal de p53 (por mutação) influenciou a atividade das vias de sinalização após a ativação de ATM, culminando em proliferação celular (LI et al., 2017). Assim, a inibição de ATM em MDA-MB 231 pelo tratamento com GELA corrobora com a redução de proliferação observada no presente.

No contexto de morte celular, destaca-se no presente trabalho a inibição o oncogene BCL-2 pelos extratos ricos em elagitaninos (GELA e APELA). Membros da família BCL2 (B-Cell CLL/Lymphoma-2) são importantes reguladores da apoptose, e atuam sobretudo bloqueando esta via de morte celular (THOMADAKI; SCORILAS, 2008; WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2016d). Em ratos com carcinogenese mamária induzida por

DMBA, o tratamento com emulsão de romã reduziu a expressão proteica de BCL2 e aumentou a de caspase-3, induzindo assim apoptose e reduzindo a proliferação tumoral (BISHAYEE et al., 2016). *In vitro*, coquetel de fitoquímicos (dentre eles quercetina, curcumina e genisteína) foi capaz de inibir a expressão de BCL-2 (OUHTIT et al., 2013). Esta inibição foi concomitante à redução da expressão de p53 mutado em células MDA-MB 231 (OUHTIT et al., 2013). Em células MDA-MB-231, o aumento da proliferação e sobrevivência destas células foi associado ao aumento da expressão de BCL-2 na presença de superexpressão de GLI (SONG et al., 2016). De forma semelhante, no presente estudo a inibição de GLI parece acompanhar a inibição de BCL-2, redução de proliferação e morte celular.

No presente trabalho, os tratamentos com GELA, GANT e APELA inibiram a expressão de GLI-1 em células MDA-MB 231. O oncogene homólogo 1 glioma-associado (GLI-1) é um mediador crítico da cascata de sinalização hedgehog (Hh) e sua ativação atípica pode induzir proliferação e invasão (SINGH et al., 2016; SONG et al., 2016; WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2016e). A cascata de Hh é uma das vias mais desreguladas nos cânceres humanos e, uma vez que GLI-1 é frequentemente ativado no câncer de mama humano, ele vem emergindo como um potencial alvo para terapia nesta enfermidade (CAO et al., 2012; SINGH et al., 2016). Recentemente, uma nova conformação de GLI-1, denominada tGLI-1 (GLI-1 truncado), foi identificada em MDA-MB 231 (CAO et al., 2012). Esta forma truncada demonstrou distinta capacidade de se ligar ao promotor do gene VEGF-A, levando ao aumento da expressão deste gene e, conseqüentemente, maior secreção de VEGF-A pelas células (CAO et al., 2012). A inibição da via de sinalização Hedgehog-GLI1 pelo tratamento com genisteína, inibiu *in vitro* e *in vivo* o crescimento e a proliferação das células de câncer de mama MCF-7 (FAN et al., 2013).

Outro gene regulado no presente trabalho e que atua na regulação da morte celular é FOXA1 (Forkhead box A1) (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2016f). No presente estudo, os extratos ricos em elagitaninos (GELA e APELA), que promoveram aumento de expressão de FOXA1, também induziram apoptose e reduziram a expressão de BCL-2 em células MDA-MB 231. FOXA1 induz apoptose por inibição de BCL-2, esta ação que condiz com o observado no presente trabalho. Análises da expressão de FOXA1 em tecidos de mama revelaram uma maior expressão no carcinoma *in situ* quando comparado com o invasivo (WOLF et al., 2006). Em células de câncer de mama ER- (SkBr3 e MDA-MB 231), bisphenol A (BPA) inibiu FOXA1 promovendo migração e induzindo EMT (transição mesenquimal) (ZHANG et al., 2015). Adicionalmente, a hiperexpressão de FOXA1 anulou a EMT induzida

por BPA (ZHANG et al., 2015). Embora FOXA1 já tenha sido cogitado como alvo para tratamento de tumores luminais, esta abordagem pode promover transições para carcinomas mais agressivos (BERNARDO et al., 2013). Nesta conjuntura, o aumento da expressão de FOXA1 promovida pelos extratos ricos em elagitaninos em células de câncer de mama MDA-MB 231 corrobora com a ação anticarcinogenica observada.

Ainda no contexto da morte celular, no presente trabalho, os tratamentos com GELA e APELA induziram expressão de JUN (Jun Proto-Oncogene - c-JUN) em células MDA-MB 231 (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2016g). Embora considerado oncogene, em linhagens celulares que expressam p53 mutado, como MDA-MB 231, o tratamento com rapamicina induziu fosforilação de c-JUN culminando em apoptose (BJORNSTI; HOUGHTON, 2004). Adicionalmente, a ativação de JNK pelo resveratrol levou à ativação de c-JUN terminando em autofagia (HASIMA; OZPOLAT, 2014). Visto isto, a ativação de JUN pode ter contribuído para o aumento de apoptose induzido pelo tratamento com extratos ricos em elagitaninos no presente trabalho.

A angiogênese participa do crescimento, progressão e metástase tumoral, sendo consideradas um dos *Hallmarks* do câncer (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; SINGH et al., 2016). Nesse sentido, VEGFA (Fator de crescimento endotelial vascular A, também conhecido como VEGF) é um potencial alvo de regulação de tratamentos contra o câncer (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2016h). No presente trabalho, o tratamento com extrato rico em antocianinas (GANT) induziu a expressão gênica de VEGFA em células MDA-MB 231. Em camundongos, submetidos a xenoenxerto de células MDA-MB-231, observou-se que o tratamento com ácido elágico inibiu estímulos induzidos por EGF, como o crescimento tumoral e a expressão de P-VEGFR2 (WANG et al., 2012b). Em células de pulmão, mix de antocianidinas derivadas de *berries* inibiu VEGFA, entretanto, a ação individual de cada antocianidina diferiu da observada para o mix não sendo capazes de modular VEGFA (KAUSAR et al., 2012). Considerando o papel promotor de tumor de VEGFA, o aumento da expressão deste gene por GANT é inesperado. Visto que o observado no presente estudo sugere ação anticarcinogenica de GANT, sua influência na expressão de VEGFA merece ser melhor investigada.

No que tange a expressão de miRNAs, dentre os 84 miRNAs envolvidos no câncer de mama analisados no presente trabalho (MIHS-109ZA, *Human Breast Cancer miRNA PCR Array*, Qiagen), observou-se indução de 1 miRNA (hsa-miR-210-3p) e inibição de 2 miRNAs (hsa-miR-19a-3p e hsa-miR-19b-3p).

O tratamento de células de câncer de mama MDA-MB 231 com extratos ricos em elagitaninos e antocianinas (GELA, GANT e APELA), induziu aumento da expressão de hsa-miR-210-3p. Na literatura, miR-210 é descrito como oncogêneo mas também como supressor de tumor, e seu valor no diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer é sugerido por alguns autores (BIERSACK, 2016; DANG; MYERS, 2015; QIN; FURONG; BAOSHENG, 2014). O miR-210 é altamente expresso no câncer de mama, produzindo efeito anti-apoptótico e promovendo proliferação, metástase e invasão por modulação da expressão gênica (YAO et al., 2014). Em pacientes com câncer de mama, maior expressão de miR-210 associou-se à presença de metástase, proliferação de tumores, invasão e pior prognóstico (JUNG et al., 2012; KOSAKA et al., 2013; ROTHÉ et al., 2011). Corroborando, observou-se expressão aumentada de miR-210 no tecido e no soro de pacientes com câncer de mama triplo negativo (TNBC), mais agressivos, quando comparados aos pacientes com câncer de mama triplo positivo (THAKUR et al., 2016). E em linhagens celulares de mama humana (MCF-10, MCF-7 e MDA-MB 231), observou-se também aumento de miR-210 nas linhagens de câncer, sobretudo na TNBC (THAKUR et al., 2016). Adicionalmente, a superexpressão de miR-210 em células MCF7, não invasoras, levou a invasão e aumento de proliferação celular; enquanto, a repressão miR-210 em MDA-MB-231 levou a uma diminuição da migração e da taxa de proliferação celular (ROTHÉ et al., 2011). Não foram encontrados estudos avaliando o impacto de antocianinas e/ou elagitaninos na expressão de miR210 no câncer de mama. E embora os resultados do presente estudo pareçam contradizer a atividade oncogênica deste miRNA, a atividade supressora de tumor deste miRNA foi demonstrada em outros tipos de câncer. O miRNA 210 inibiu a proliferação celular e formação de tumor, e induziu parada de ciclo celular, apoptose e necrose (CHEN et al., 2014; CHIO et al., 2013; QIN; FURONG; BAOSHENG, 2014; TSUCHIYA et al., 2011). Ainda, observou-se esta atividade supressora de tumor do miR210 inclusive após expressão induzida por CBAs (PHUAH et al., 2012; WANG; BIAN; YANG, 2011). Assim, esses resultados merecem maiores esclarecimentos.

No presente trabalho, o tratamento de células de câncer de mama triplo negativas (MDA-MB 231) com extrato rico em elagitaninos de AP (APELA; 200µg/mL) levou a esta redução da expressão do microRNAs hsa-miR-19a-3p e hsa-miR-19b-3p. Os miRNAs miR-19a e miR-19b, são membros do cluster miR-17/92 conhecidos como oncogênicos, são excessivamente expressos em diferentes tipos de câncer, incluindo câncer de mama (MOGILYANSKY et al., 2016). Quando comparada a expressão miR-19a entre linhagens de câncer de mama, a expressão deste miRNA foi significativamente maior em MDA-MB231 (ER- e PR-) do que em MCF-7 (ER+ e PR+), mas menor que as duas linhagens de câncer de

mama do tipo inflamatório (ANFOSSI et al., 2014). Em linhagem celular e em pacientes de câncer de mama receptor de hormônio positivo (ER+ e PR+), a resistência quimioterápica foi correlacionada aos níveis elevados de expressão de miR-19a (LI et al., 2014a; LIANG et al., 2011). A inibição de miR-19a restaurou, *in vitro* e *in vivo*, a sensibilidade das células multidroga-resistentes (MDR) a agentes quimioterápicos (LIANG et al., 2011). Em células de câncer de mama (MCF-7), o tratamento com curcumina suprimiu a proliferação celular induzida por bisfenol A (BPA), modulando o sistema miR-19/PTEN/AKT/p53. BPA induziu expressão de miR-19a e miR-19b, que foi suprimida pelo tratamento com curcumina (LI et al., 2014c). Em células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, tratamento com CAP (*Cold atmospheric plasma*) silenciou epigeneticamente miR-19a-3p, e esta hiporegulação culminou em aumento de expressão de seus genes alvo, contribuindo assim para a inibição da proliferação celular (LEE et al., 2016). Maior indução

6 CONCLUSÕES

Considerando o crescimento celular (ciclo celular, apoptose e proliferação celular) os tratamentos com extratos ricos em elagitaninos (GELA e APELA) e o rico em antocianinas de grumixama (GANT) culminaram em resultados mais proeminentes, sobretudo em células MDA-MB 231.

Adicionalmente, os extratos (GELA, APELA e GANT) demonstraram influenciar em células MDA-MB 231 a expressão de genes e miRNAs relacionados a diferentes vias como: morte celular (BCL-2 FOXA1 c-JUN), proliferação celular (ER β , MKI67, ATM, GLI-1 miR19a/b), invasão e metástase (ID-1, CDH-1, EGF, SNAIL, THBS1, ER β , PTGS2 e ADAM 23), quimio-resistência (miR19a/b) e até angiogenese (VEGFA). Destacam-se entre os tratamentos os extratos ricos em elagitaninos, por sua ação mais acentuada inclusive na modulação gênica.

Coletivamente, estes resultados sugerem que antocianinas de grumixama e elagitaninos de amora preta e grumixama apresentam potencial efeito protetor contra o câncer de mama. Adicionalmente, essa ação anticarcinogênica pode ser mediada por indução de morte celular, mais especificamente apoptose, redução de proliferação celular e modulação da expressão de genes e miRNAs relacionados ao câncer de mama.

7 REFERÊNCIAS

ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 8, p. 1679–1687, 2012.

ADAMS, L. S. et al. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 980–985, 2006.

ADAMS, L. S. et al. Blueberry phytochemicals inhibit growth and metastatic potential of MDA-MB-231 breast cancer cells through modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Cancer Research**, v. 70, n. 9, p. 3594–3605, 2010a.

ADAMS, L. S. et al. Pomegranate Ellagitannin – Derived Compounds Exhibit Antiproliferative and Antiaromatase Activity in Breast Cancer Cells In vitro Pomegranate Ellagitannin – Derived Compounds Exhibit Antiproliferative and Antiaromatase Activity in Breast Cancer Cells In v. **Cancer Prevention Research**, 2010b.

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 10, p. 1397–1421, 2006.

AIYER, H. S. et al. Dietary berries and ellagic acid prevent oxidative DNA damage and modulate expression of DNA repair genes. **Int J Mol Sci**, v. 9, n. 3, p. 327–341, 2008.

AIYER, H. S. et al. Influence of Berry Polyphenols on Receptor Signaling and Cell-Death Pathways: Implications for Breast Cancer Prevention. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5693–5708, 2012a.

AIYER, H. S. et al. Interaction of dietary polyphenols with molecular signaling pathways of antiestrogen resistance: possible role in breast cancer recurrence. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 9, n. 2, p. 127–141, 2012b.

AIYER, H. S.; GUPTA, R. C. Berries and ellagic acid prevent estrogen-induced mammary tumorigenesis by modulating enzymes of estrogen metabolism. **Cancer Prevention Research**, v. 3, n. 6, p. 727–737, 2010.

ALBO, D. et al. Tumour cell thrombospondin-1 regulates tumour cell adhesion and invasion through the urokinase plasminogen activator receptor. **British journal of cancer**, v. 83, n. 3, p. 298–306, 2000.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2015**. Atlanta: [s.n.].

ANDRADE, F. O. et al. Efficacy of the dietary histone deacetylase inhibitor butyrate alone or in combination with vitamin A against proliferation of MCF-7 human breast cancer cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 9, p. 841–850, 2012.

ANFOSSI, S. et al. High serum miR-19a levels are associated with inflammatory breast

cancer and are predictive of favorable clinical outcome in patients with metastatic HER2+ inflammatory breast cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

AQIL, F. et al. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Anthocyanin/Ellagitannin-Enriched Extracts From *Syzygium cumini* L. (Jamun, the Indian Blackberry). **Nutrition and Cancer**, v. 64, n. 3, p. 428–438, 2012.

AQIL, F. et al. Detection of Anthocyanins / Anthocyanidins in Animal Tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 3912–3918, 2014.

BAK, M. J. et al. Role of dietary bioactive natural products in estrogen receptor-positive breast cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 40_41, p. 170–191, 2016.

BALLARD-BARBASH, R. et al. Physical activity, weight control, and breast cancer risk and survival: Clinical trial rationale and design considerations. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 9, p. 630–643, 2009.

BERGAMO, A. et al. RNA-seq analysis of the whole transcriptome of MDA-MB-231 mammary carcinoma cells exposed to the antimetastatic drug NAMI-A. **Metallomics**, v. 7, n. 10, p. 1439–1450, 2015.

BERNARDO, G. M. et al. FOXA1 represses the molecular phenotype of basal breast cancer cells. **Oncogene**, v. 32, n. 5, p. 554–563, 2013.

BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. **Human molecular genetics**, v. 9, n. 16, p. 2395–2402, 2000.

BHATIA, U. et al. Induction of p53 Nitrogen of Apoptosis in Normal and Cell Cycle-specific and Change Leukemic in Expression Cells by Lymphocytes. **Clinical Cancer Research**, v. 1, n. August, p. 873–880, 1995.

BIERSACK, B. Current state of phenolic and terpenoidal dietary factors and natural products as non-coding RNA/microRNA modulators for improved cancer therapy and prevention. **Non-coding RNA Research**, v. 1, n. 1, p. 12–34, 2016.

BISEN, P. S.; BUNDELA, S. S.; SHARMA, A. Ellagic Acid – Chemopreventive Role in Oral Cancer. **Journal of Cancer Science & Therapy**, v. 4, n. 2, p. 23–30, 2012.

BISHOP, K. S.; FERGUSON, L. R. The interaction between epigenetics, nutrition and the development of cancer. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 922–947, 2015.

BJORNSTI, M.-A.; HOUGHTON, P. J. The tor pathway: a target for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 5, p. 335–348, 2004.

BLANC, C. et al. Caspase-3 is essential for procaspase-9 processing and cisplatin-induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. **Cancer Res.**, v. 60, n. 16, p. 4386–4390, 2000.

BONTEMPO, P. et al. Antioxidant, antimicrobial and anti-proliferative activities of *Solanum tuberosum* L. var. Vitelotte. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 55, p. 304–12, 2013.

CAIAZZA, F. et al. Estrogen Receptors and Their Implications in Colorectal Carcinogenesis. **Frontiers in Oncology**, v. 5, n. February, p. 1–9, 2015.

CAO, X. et al. Upregulation of VEGF-A and CD24 gene expression by the tGLI1 transcription factor contributes to the aggressive behavior of breast cancer cells. **Oncogene**, v. 31, n. 1, p. 104–115, 2012.

CERDÁ, B.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J. C. Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: Identification of biomarkers and individual variability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 227–235, 2005.

CHEN, P.-N. et al. Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis in vitro and suppress tumor growth in vivo. **Nutrition and cancer**, v. 53, n. 2, p. 232–243, 2005.

CHEN, P. N. et al. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. **Cancer Letters**, v. 235, p. 248–259, 2006.

CHEN, X. et al. MiR-210 expression reverses radioresistance of stem-like cells of oesophageal squamous cell carcinoma. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 5, p. 1068, 2014.

CHIO, C. C. et al. MicroRNA-210 targets antiapoptotic Bcl-2 expression and mediates hypoxia-induced apoptosis of neuroblastoma cells. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 3, p. 459–468, 2013.

CHO, R. W. et al. Isolation and molecular characterization of cancer stem cells in MMTV-Wnt-1 murine breast tumors. **Stem cells**, v. 26, n. 2, p. 364–371, 2008.

CLIFFORD, M. N.; SCALBERT, A. Review Ellagitannins – nature , occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. November 1999, p. 1118–1125, 2000.

COOKE, D. et al. Anthocyanins from fruits and vegetables - Does bright colour signal cancer chemopreventive activity? **European Journal of Cancer**, v. 41, n. 13, p. 1931–1940, 2005.

CZANK, C. et al. Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: A ¹³C-tracer study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 97, n. 5, p. 995–1003, 2013.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313–7352, 2010.

DAI, Z. et al. Pomegranate extract inhibits the proliferation and viability of MMTV-Wnt-1 mouse mammary cancer stem cells in vitro. **Oncology reports**, v. 24, n. 1, p. 1087–1091, 2010.

DANG, K.; MYERS, K. A. The role of hypoxia-induced miR-210 in cancer progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 6353–6372, 2015.

DAVIDSON, G.; NIEHRS, C. Emerging links between CDK cell cycle regulators and Wnt signaling. **Trends in Cell Biology**, v. 20, n. 8, p. 453–460, 2010.

DAVIS, C. D.; MILNER, J. A. Biomarkers for diet and cancer prevention research: Potentials and challenges. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, n. 9, p. 1262–1273, 2007.

DING, M. et al. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 25, p. 17359–17368, 2006.

ESPÍN, J. C. et al. Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic acid-derived metabolites: The evidence so far. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–15, 2013.

FAN, P. et al. Genistein decreases the breast cancer stem-like cell population through Hedgehog pathway. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 6, p. 146, 2013.

FELGINES, C. et al. Tissue distribution of anthocyanins in rats fed a blackberry anthocyanin-enriched diet. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, n. 9, p. 1098–1103, 2009.

FERNANDES, I. et al. On the bioavailability of flavanols and anthocyanins: Flavanol-anthocyanin dimers. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 812–818, 2012.

FERNANDES, I. et al. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 54–66, 2014.

FLORES, G. et al. Anthocyanins from *Eugenia brasiliensis* edible fruits as potential therapeutics for COPD treatment. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1256–1262, 2012.

FOLMER, F. et al. Anticancer effects of bioactive berry compounds. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 1, p. 295–322, 2014.

FREEDLAND, S. J. et al. A double-blind, randomized, neoadjuvant study of the tissue effects of POMx pills in men with prostate cancer before radical prostatectomy. **Cancer Prevention Research**, v. 6, n. 10, p. 1120–1127, 2013.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized application**. 6th. ed. [s.l: s.n.].

FUNG, T. T. et al. Intake of specific fruits and vegetables in relation to risk of estrogen receptor-negative breast cancer among postmenopausal women. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 138, n. 3, p. 925–930, 2013.

GARCIA-MUÑOZ, C.; VAILLANT, F. Metabolic fate of ellagitannins: implications for health, and research perspectives for innovative functional foods. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 54, n. 12, p. 1584–98, 2014.

GERHÄUSER, C. Cancer cell metabolism, epigenetics and the potential influence of dietary components-A perspective. **Biomedical Res**, v. 23, n. 1, 2012.

GONZÁLEZ-BARRIO, R.; EDWARDS, C. A.; CROZIER, A. Colonic Catabolism of

Ellagitannins, Ellagic Acid, and Raspberry Anthocyanins: In Vivo and In Vitro Studies. **DRUG METABOLISM AND DISPOSITION**, v. 39, n. 9, p. 1680–1688, 2011.

GONZÁLEZ-SARRÍAS, A. et al. Occurrence of urolithins, gut microbiota ellagic acid metabolites and proliferation markers expression response in the human prostate gland upon consumption of walnuts and pomegranate juice. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 54, n. 3, p. 311–322, 2010.

GONZÁLEZ-SARRÍAS, A. et al. Phase-II metabolism limits the antiproliferative activity of urolithins in human colon cancer cells. **European journal of nutrition**, v. 53, n. 3, p. 853–64, 2014.

GUMIREDDY, K. et al. ID1 promotes breast cancer metastasis by S100A9 regulation. **Mol Cancer Res.**, v. 12, n. 9, p. 1334–1343, 2014.

GUO, W. et al. Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. **Cell**, v. 148, n. 5, p. 1015–1028, 2012.

HADLER-OLSEN, E.; WINBERG, J. O.; UHLIN-HANSEN, L. Matrix metalloproteinases in cancer: Their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. **Tumor Biology**, v. 34, n. 4, p. 2041–2051, 2013.

HAGER, T. J. et al. Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 661–669, 2008.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A.; FRANCISCO, S. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.

HASIMA, N.; OZPOLAT, B. Regulation of autophagy by polyphenolic compounds as a potential therapeutic strategy for cancer. **Cell Death and Disease**, v. 5, n. 11, p. e1509, 2014.

HASSIMOTTO, N. M. A. et al. Physico-chemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus* sp.) grown in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 702–708, 2008.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Identification and Characterisation of Anthocyanins from Wild Mulberry (*Morus Nigra* L.) Growing in Brazil. **Food Science and Technology International**, v. 13, n. 1, p. 17–25, 2007.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats. **Nutrition Research**, v. 28, n. 3, p. 198–207, 2008.

HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M. Antioxidant status in rats after long-term intake of anthocyanins and ellagitannins from blackberries. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 3, p. 523–531, 2011.

HORIA, E.; WATKINS, B. A. Complementary actions of docosaheptaenoic acid and genistein on COX-2, PGE2 and invasiveness in MDA-MB-231 breast cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 4, p. 809–815, 2007.

IARC/WHO. **Latest world cancer statistics Global cancer burden rises to 14 . 1 million new cases in 2012 : Marked increase in breast cancers must be addressed.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223_E.pdf>.

IARC AND CANCER RESEARCH UK. **World cancer factsheetWorld Cancer Factsheet.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.cruk.org/cancerstats>.

INCA. **10 Dicas para se proteger do câncer - Câncer: a informação pode salvar vidas.** Brasil: [s.n.].

INCA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: [s.n.].

ISMAIL, I. A. et al. 2-Hydroxycinnamaldehyde inhibits the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 137, n. 3, p. 697–708, 2013.

JEYABALAN, J. et al. Chemopreventive and therapeutic activity of dietary blueberry against estrogen-mediated breast cancer. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, p. 3963–3971, 2014.

JUNG, E. J. et al. Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients. **Cancer**, v. 118, n. 10, p. 2603–2614, 2012.

JUNG, S. et al. Fruit and vegetable intake and risk of breast cancer by hormone receptor status. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 3, p. 219–236, 2013.

KALT, W. et al. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 705–712, 2008.

KAUSAR, H. et al. Berry anthocyanidins synergistically suppress growth and invasive potential of human non-small-cell lung cancer cells. **Cancer Letters**, v. 325, n. 1, p. 54–62, 2012.

KAWASAKI, T. et al. Abrogation of apoptosis induced. **Int. J. Cancer**, v. 68, p. 501–505, 1996.

KOSAKA, N. et al. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic micrornas regulate cancer cell metastasis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 15, p. 10849–10859, 2013.

LARROSA, M. et al. Bioavailability and Metabolism of Ellagic Acid and Ellagitannins. In: SPENCER, J. P. ; CROZIER, A. (Eds.). **Flavonoids and Related Compounds: Bioavailability and Function.** USA: CRC Press, 2012. p. 183–199.

LAZZE, M. C. et al. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 8, p. 1427–1433, 2004.

LE, V. et al. Cytotoxic Effects of Ellagitannins Isolated from Walnuts in Human Cancer Cells. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 8, p. 1304–1314, 2014.

LEE, J.-Y. et al. Id-1 activates Akt-mediated Wnt signaling and p27Kip1 phosphorylation through PTEN inhibition. **Oncogene**, v. 28, n. 6, p. 824–831, 2009.

LEE, S. et al. Epigenetic silencing of miR-19a-3p by cold atmospheric plasma contributes to proliferation inhibition of the MCF-7 breast cancer cell. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 30005, 2016.

LEE, S. G. et al. Berry anthocyanins suppress the expression and secretion of proinflammatory mediators in macrophages by inhibiting nuclear translocation of NF- κ B independent of NRF2-mediated mechanism. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 4, p. 404–411, 2014.

LI, Q. et al. Circulating miR-19a and miR-205 in serum may predict the sensitivity of luminal a subtype of breast cancer patients to neoadjuvant chemotherapy with epirubicin plus paclitaxel. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014a.

LI, S.-J. et al. Low-dose irradiation promotes proliferation of the human breast cancer MDA-MB-231 cells through accumulation of mutant p53. **International Journal of Oncology**, v. 50, n. 1, p. 290–296, 2017.

LI, T. et al. Ellagic acid induced p53/p21 expression, G1 arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells. **Anticancer Research**, v. 25, n. 91, p. 971–980, 2005.

LI, X. et al. Curcumin Modulates miR-19 / PTEN / AKT / p53 Axis to Suppress Bisphenol A-induced MCF-7 Breast Cancer Cell Proliferation. v. 1560, n. April, p. 1553–1560, 2014b.

LI, X. et al. Curcumin Modulates miR-19 / PTEN / AKT / p53 Axis to Suppress Bisphenol A-induced MCF-7 Breast Cancer Cell Proliferation. **Phytotherapy Research**, v. 1560, n. April, p. 1553–1560, 2014c.

LI, Y. et al. Tubular Epithelial Cell Dedifferentiation Is Driven by the Helix-Loop-Helix Transcriptional Inhibitor Id1. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 18, n. 2, p. 449–460, 2007.

LIANG, Z. et al. Regulation of miR-19 to breast cancer chemoresistance through targeting PTEN. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 12, p. 3091–3100, 2011.

LIPÍŃSKA, L.; KLEWICKA, E.; SÓJKA, M. Structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: A general review. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 13, n. 3, p. 289–299, 2014.

LOMBAERTS, M. et al. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. **British Journal of Cancer**, v. 1, p. 661–671, 2006.

MANACH, C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans.II.Review of 93 intervention studies. **Am J Clin Nutr**, v. 81, p. 230S–242S, 2005.

MARTIN-MORENO, J. M.; SOERJOMATARAM, I.; MAGNUSSON, G. Cancer causes and prevention: A condensed appraisal in Europe in 2008. **European Journal of Cancer**, v. 44, n. 10, p. 1390–1403, 2008.

MARTINS, C. A. et al. Evolução da Mortalidade por Câncer de Mama em Mulheres Jovens: Desafios para uma Política de Atenção Oncológica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 59, n. 3, p. 341–349, 2013.

MAYNE, S. T.; PLAYDON, M. C.; ROCK, C. L. Diet, nutrition, and cancer: past, present and future. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, 2016.

MAZZONI, L. et al. The genetic aspects of berries: from field to health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. April, p. n/a-n/a, 2015.

MCALLISTER, S. D. et al. Cannabidiol as a novel inhibitor of Id-1 gene expression in aggressive breast cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 6, n. 11, p. 2921–2927, 2007.

MCDUGALL, G. J. et al. Berry extracts exert different antiproliferative effects against cervical and colon cancer cells grown in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 3016–3023, 2008.

MERTENS-TALCOTT, S. U. et al. MAP-Kinases without Affecting Intracellular Generation of Reactive Oxygen. **The journal of nutrition**, v. 135, n. December 2004, p. 609–614, 2005.

MINN, A. J. et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. **Nature**, v. 436, n. 7050, p. 518–524, 2005.

MIRZAYANS, R. et al. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: Implications for cancer therapy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

MOGILYANSKY, E. et al. Post-transcriptional regulation of BRCA2 through interactions with miR-19a and miR-19b. **Frontiers in Genetics**, v. 7, n. AUG, p. 1–16, 2016.

MOLECULAR-PROBES. **CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (C34554)**, 2005.

MORENO, P. R. H. et al. Essential oil composition of fruit colour varieties of *Eugenia brasiliensis* Lam. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 4, p. 428–432, 2007.

MOUTSATSOU, P. The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. **Hormones (Athens, Greece)**, v. 6, n. 3, p. 173–193, 2007.

MUNAGALA, R. et al. MicroRNA “signature” during estrogen-mediated mammary carcinogenesis and its reversal by ellagic acid intervention. **Cancer Letters**, v. 339, n. 2, p. 175–184, 2013.

NARAYANAN, B. A et al. p53 / p21 (WAF1 / CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. **Cancer Letters**, v. 136, p. 215–221, 1999.

NIH. **Annual Report to the Nation on the Status of Cancer ,Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/research/progress/annual-report-nation>>.

NORATTO, G. et al. Polyphenolics from peach (*Prunus persica* var. Rich Lady) inhibit tumor growth and metastasis of MDA-MB-435 breast cancer cells in vivo. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, p. 796–800, 2014.

OKANO, M. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases Non-invasive sexing of preimplantation stage mammalian embryos. **Nature America Inc.**, v. 19, n. july, p. 219–220, 1998.

OUHTIT, A. et al. Simultaneous inhibition of cell-cycle, proliferation, survival, metastatic pathways and induction of apoptosis in breast cancer cells by a phytochemical super-cocktail: Genes that underpin its mode of action. **Journal of Cancer**, v. 4, n. 9, p. 703–715, 2013.

PALUSZCZAK, J.; KRAJKA-KUŹNIAK, V.; BAER-DUBOWSKA, W. The effect of dietary polyphenols on the epigenetic regulation of gene expression in MCF7 breast cancer cells. **Toxicology Letters**, v. 192, n. 2, p. 119–125, 2010.

PAN, M.-H. et al. Breast cancer chemoprevention by dietary natural phenolic compounds: Specific epigenetic related molecular targets. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 59, n. 1, p. 21–35, 2015.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000.

PHENOL-EXPLORER. Disponível em: <<http://phenol-explorer.eu/>>.

PHUAH, N. H. et al. Alterations of MicroRNA Expression Patterns in Human Cervical Carcinoma Cells (Ca Ski) toward 1'S-1'-Acetoxychavicol Acetate and Cisplatin. **Reproductive Sciences**, v. 20, n. 5, p. 567–578, 2012.

POLYAK, K. Science in medicine Breast cancer : origins and evolution. **Cell**, v. 117, n. 11, p. 3155–63, 2007.

PROSKURYAKOV, S. Y.; GABAI, V. L. Mechanisms of tumor cell necrosis. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 1, p. 56–68, 2010.

QIN, Q.; FURONG, W.; BAOSHENG, L. Multiple functions of hypoxia-regulated miR-210 in cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 33, n. 1, p. 50, 2014.

REGGETI, F.; BIENZLE, D. Flow Cytometry in Veterinary Oncology. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 223–235, 2011.

RICE, S.; WHITEHEAD, S. A. Targets for the action of phytoestrogens in breast cancer - Focus on isoflavones and resveratrol. **Current Breast Cancer Reports**, v. 6, n. 2, p. 88–95, 2014.

ROTHÉ, F. et al. Global microRNA expression profiling identifies MiR-210 associated

with tumor proliferation, invasion and poor clinical outcome in breast cancer. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011.

SASAKI, M. et al. Methylation and inactivation of estrogen, progesterone, and androgen receptors in prostate cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 5, p. 384–390, 2002.

SEERAM, N. P. et al. Pomegranate ellagitannin-derived metabolites inhibit prostate cancer growth and localize to the mouse prostate gland. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 7732–7737, 2007.

SHARMA, P.; MCCLEES, S.; AFAQ, F. Pomegranate for Prevention and Treatment of Cancer: An Update. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 177, 2017.

SHILOH, Y. ATM AND RELATED PROTEIN KINASES: SAFEGUARDING GENOME. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 155–168, 2003.

SHIRODE, A. B. et al. Antiproliferative effects of pomegranate extract in MCF-7 breast cancer cells are associated with reduced DNA repair gene expression and induction of double strand breaks. **Molecular Carcinogenesis**, v. 53, n. 6, p. 458–470, 2014a.

SHIRODE, A. B. et al. Antiproliferative effects of pomegranate extract in MCF-7 breast cancer cells are associated with reduced DNA repair gene expression and induction of double strand breaks. **Molecular Carcinogenesis**, v. 53, n. 6, p. 458–470, 2014b.

SHUKLA, S.; MEERAN, S. M.; KATIYAR, S. K. Epigenetic regulation by selected dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. **Cancer Letters**, v. 355, n. 1, p. 9–17, 2014.

SINGH, A. K. et al. **Emerging Importance of Dietary Phytochemicals in Fight against Cancer : Role in Targeting Cancer Stem Cells**. [s.l: s.n.]. v. 8398

SOMASAGARA, R. R. et al. Extracts of Strawberry Fruits Induce Intrinsic Pathway of Apoptosis in Breast Cancer Cells and Inhibits Tumor Progression in Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–11, 2012.

SONG, L. et al. Targeting of sonic hedgehog-Gli signaling: A potential therapeutic target for patients with breast cancer. **Oncology Letters**, v. 12, n. 2, p. 1027–1033, 2016.

SREEJA, S. et al. Pomegranate extract demonstrate a selective estrogen receptor modulator profile in human tumor cell lines and in vivo models of estrogen deprivation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 7, p. 725–732, 2012.

STEFANSKA, B. et al. Epigenetic mechanisms in anti-cancer actions of bioactive food components--the implications in cancer prevention. **British journal of pharmacology**, v. 167, n. 2, p. 279–97, 2012.

SUBIK, K. et al. Breast Cancer : Basic and Clinical Research The Expression Patterns of ER , PR , HER2 , CK5 / 6 , EGFR , Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 4, p. 35–41, 2010.

SUZUKI, H. et al. Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. **British journal of cancer**, v. 98, n. 6, p. 1147–1156, 2008.

TEIXEIRA, L. L. et al. Identification of Ellagitannins and Flavonoids from *Eugenia brasiliensis* Lam. (Grumixama) by HPLC-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 150520055053003, 2015.

THAKUR, S. et al. Identification of specific miRNA signature in paired sera and tissue samples of Indian women with triple negative breast cancer. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–21, 2016.

THOMADAKI, H.; SCORILAS, A. Molecular profile of the BCL2 family of the apoptosis related genes in breast cancer cells after treatment with cytotoxic/cytostatic drugs. **Connective tissue research**, v. 49, n. 3, p. 261–4, 2008.

TO, S. Q. et al. Transcriptional control of local estrogen formation by aromatase in the breast. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 145, p. 179–186, 2015.

TSUCHIYA, S. et al. MicroRNA-210 regulates cancer cell proliferation through targeting fibroblast growth factor receptor-like 1 (FGFRL1). **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 1, p. 420–428, 2011.

TURRINI, E.; FERRUZZI, L.; FIMOIGNARI, C. Potential Effects of Pomegranate Polyphenols in Cancer Prevention and Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, n. ID 938475, 2015.

VERBISCK, N. V. et al. ADAM23 negatively modulates $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin activation during metastasis. **Cancer Research**, v. 69, n. 13, p. 5546–5552, 2009.

VICINANZA, R. et al. Pomegranate juice metabolites, ellagic acid and urolithin a, synergistically inhibit androgen-independent prostate cancer cell growth via distinct effects on cell cycle control and apoptosis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

WANG, H.; BIAN, S.; YANG, C. S. Green tea polyphenol EGCG suppresses lung cancer cell growth through upregulating miR-210 expression caused by stabilizing HIF-1?? **Carcinogenesis**, v. 32, n. 12, p. 1881–1889, 2011.

WANG, K. et al. DNALK2 inhibits the proliferation and invasiveness of breast cancer MDA-MB-231 cells through the Smad-dependent pathway. **Oncology Reports**, v. 37, n. 2, p. 879–886, 2017.

WANG, L.-S. et al. Black raspberry-derived anthocyanins demethylate tumor suppressor genes through the inhibition of DNMT1 and DNMT3B in colon cancer cells. **Nutrition and cancer**, v. 65, n. April, p. 118–25, 2013.

WANG, L.-S.; STONER, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. **Cancer Lett.**, v. 269, n. 2, p. 281–290, 2008.

WANG, L. S. et al. Modulation of genetic and epigenetic biomarkers of colorectal cancer in humans by black raspberries: A phase I pilot study. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 3, p. 598–610, 2011.

WANG, N. et al. Ellagic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenesis effects via VEGFR-2 signaling pathway in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 134, p. 943–955, 2012a.

WANG, N. et al. Ellagic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenesis effects via VEGFR-2 signaling pathway in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 134, n. 3, p. 943–955, 2012b.

WANG, T. N. et al. Thrombospondin-1 (TSP-1) Promotes the Invasive Properties of Human Breast Cancer. **JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH**, v. 63, p. 39–43, 1996.

WEI. **ATM Gene**, 2016. Disponível em: <<http://www.genecards.org>>

WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE. **THBS1 Gene**, 2016a. Disponível em: <<http://www.genecards.org>>

WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE. **PTGS2 Gene**, 2016b. Disponível em: <<http://www.genecards.org>>

WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE. **ADAM23 Gene**, 2016c. Disponível em: <<http://www.genecards.org>>

WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE. **BCL2 Gene**, 2016d. Disponível em: <<http://www.genecards.org>>

WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE. **GLI1 Gene**, 2016e. Disponível em: <<http://www.genecards.org>>

WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE. **FOXA1 gene**, 2016f. Disponível em: <<http://www.genecards.org>>

WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE. **JUN Gene**, 2016g. Disponível em: <<http://www.genecards.org>>

WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE. **VEGFA Gene**, 2016h. Disponível em: <<http://www.genecards.org>>

WOLF, I. et al. FOXA1: Growth inhibitor and a favorable prognostic factor in human breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 5, p. 1013–1022, 2006.

XING, L. et al. Breast Cancer : Basic and Clinical Research The Expression Patterns of ER , PR , HER2 , CK5 / 6 , EGFR , Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 4, p. 35–41, 2010.

YAO, Y. et al. 5-FU and ixabepilone modify the microRNA expression profiles in MDA-MB-453 triple-negative breast cancer cells. **Oncology Letters**, v. 7, n. 2, p. 541–547, 2014.

ZHANG, X. L. et al. Bisphenol A stimulates the epithelial mesenchymal transition of estrogen negative breast cancer cells via FOXA1 signals. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 585, p. 10–16, 2015.

ZHANG, Y. J. et al. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell anti proliferative properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 670–675, 2008.

ZHOU, Y. et al. ER β 1 inhibits the migration and invasion of breast cancer cells through upregulation of E-cadherin in a Id1-dependent manner. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 457, n. 2, p. 141–147, 2015.

ANEXOS

1 Lista de Genes Relacionados ao Câncer de Mama

PCR tempo real - RT2 Profiler PCR Arrays

Human Breast Cancer RT2 Profiler PCR Array, PAHS-131Z, Qiagen

A01	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1
A02	ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2
A03	ADAM23	ADAM metalloproteinase domain 23
A04	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
A05	APC	Adenomatous polyposis coli
A06	AR	Androgen receptor
A07	ATM	Ataxia telangiectasia mutated
A08	BAD	BCL2-associated agonist of cell death
A09	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
A10	BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5
A11	BRCA1	Breast cancer 1, early onset
A12	BRCA2	Breast cancer 2, early onset
B01	CCNA1	Cyclin A1
B02	CCND1	Cyclin D1
B03	CCND2	Cyclin D2
B04	CCNE1	Cyclin E1
B05	CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
B06	CDH13	Cadherin 13, H-cadherin (heart)
B07	CDK2	Cyclin-dependent kinase 2
B08	CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
B09	CDKN1C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)
B10	CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)
B11	CSF1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)
B12	CST6	Cystatin E/M
C01	CTNNA1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
C02	CTSD	Cathepsin D
C03	EGF	Epidermal growth factor
C04	EGFR	Epidermal growth factor receptor
C05	ERBB2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
C06	ESR1	Estrogen receptor 1
C07	ESR2	Estrogen receptor 2 (ER beta)
C08	FOXA1	Forkhead box A1
C09	GATA3	GATA binding protein 3
C10	GLI1	GLI family zinc finger 1
C11	GRB7	Growth factor receptor-bound protein 7
C12	GSTP1	Glutathione S-transferase pi 1
D01	HIC1	Hypermethylated in cancer 1
D02	ID1	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein

D03	IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
D04	IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
D05	IGFBP3	Insulin-like growth factor binding protein 3
D06	IL6 I	interleukin 6 (interferon, beta 2)
D07	JUN	Jun proto-oncogene
D08	KRT18	Keratin 18
D09	KRT19	Keratin 19
D10	KRT5	Keratin 5
D11	KRT8	Keratin 8
D12	MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1
E01	MAPK3	Mitogen-activated protein kinase 3
E02	MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8
E03	MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
E04	MKI67	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
E05	MLH1	MutL homolog 1, colon cancer, non polyposis type 2 (E. coli)
E06	MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)
E07	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
E08	MUC1	Mucin 1, cell surface associated
E09	MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
E10	NME1	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in
E11	NOTCH 1	Notch 1
E12	NR3C1	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)
F01	PGR	Progesterone receptor
F02	PLAU	Plasminogen activator, urokinase
F03	PRDM2	PR domain containing 2, with ZNF domain
F04	PTEN	Phosphatase and tensin homolog
F05	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
F06	PYCARD	PYD and CARD domain containing
F07	RARB	Retinoic acid receptor, beta
F08	RASSF1	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1
F09	RB1	Retinoblastoma 1
F10	SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
F11	SFN	Stratifin
F12	SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1
G01	SLC39A6	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6
G02	SLIT2	Slit homolog 2 (Drosophila)
G03	SNAI2	Snail homolog 2 (Drosophila)
G04	SRC	V-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)
G05	TFF3	Trefoil factor 3 (intestinal)
G06	TGFB1	Transforming growth factor, beta1
G07	THBS1	Thrombospondin 1
G08	TP53	Tumor protein p53
G09	TP73	Tumor protein p73

G10	TWIST 1	Twist homolog 1 (Drosophila)
G11	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
G12	XPB1	X-box binding protein 1
H01	ACTB	Actin, beta
H02	B2M	Beta-2-microglobulin
H03	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
H06	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
H07	RTC	Reverse Transcription Control
H08	RTC	Reverse Transcription Control
H09	RTC	Reverse Transcription Control
H10	PPC	Positive PCR Control
H11	PPC	Positive PCR Control
H12	PPC	Positive PCR Control

2 Layout da Placa de PCR- Genes

PCR tempo real - RT2 Profiler PCR Arrays

Human Breast Cancer RT2 Profiler PCR Array, PAHS-131Z, Qiagen

RT² Profiler PCR Array plate layout

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	HK1	HK2	HK3	HK4	HK5	GDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Housekeeping genes Genomic DNA control Reverse transcription controls Positive PCR controls

3 Layout de genes da Placa de PCR - Genes

PCR tempo real - RT2 Profiler PCR Arrays

Human Breast Cancer RT2 Profiler PCR Array, PAHS-131Z, Qiagen

For 384-well 4 x 96 PCR arrays, genes are present in a staggered format. Refer to the *RT² Profiler PCR Array Handbook* for layout.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ABCB1	ABCG2	ADAM23	AKT1	APC	AR	ATM	BAD	BCL2	BIRC5	BRCA1	BRCA2
B	CCNA1	CCND1	CCND2	CCNE1	CDH1	CDH13	CDK2	CDKN1A	CDKN1C	CDKN2A	CSF1	CST6
C	CTNNB1	CTSD	EGF	EGFR	ERBB2	ESR1	ESR2	FOXA1	GATA3	GLI1	GRB7	GSTP1
D	HIC1	ID1	IGF1	IGF1R	IGFBP3	IL6	JUN	KRT18	KRT19	KRT5	KRT8	MAPK1
E	MAPK3	MAPK8	MGMT	MKI67	MLH1	MMP2	MMP9	MUC1	MYC	NME1	NOTCH1	NR3C1
F	PGR	PLAU	PRDM2	PTEN	PTGS2	PYCARD	RARB	RASSF1	RB1	SERPINE1	SFN	SFRP1
G	SLC39A6	SLIT2	SNAI2	SRC	TFF3	TGFB1	THBS1	TP53	TP73	TWIST1	VEGFA	XBP1
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

4 Resultados Completos da Expressão Gênica

Heat Map: Grupo de Tratamento GELA *versus* Grupo Controle

Treated Group	Control Group
Group 1	Control Group

Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ABCB1 2.27	ABCG2 -1.23	ADAM23 -1.05	AKT1 -1.00	APC -1.22	AR 3.54	ATM -2.22	BAD 1.05	BCL2 -2.39	BIRC5 -1.41	BRCA1 -1.93	BRCA2 -1.28
B	CCNA1 1.38	CCND1 -1.06	CCND2 1.54	CCNE1 -1.31	CDH1 -4.53 A	CDH13 1.10	CDK2 -1.61	CDKN1A 1.09	CDKN1C 1.24	CDKN2A 2.27 C	CSF1 1.17	CST6 -1.08
C	CTNNB1 -1.48	CTSD 1.16	EGF -2.78	EGFR 1.41	ERBB2 -1.02	ESR1 1.42	ESR2 2.69	FOXA1 3.73	GATA3 -1.79	GLI1 -1.87	GRB7 -1.64	GSTP1 1.03
D	HIC1 -1.37	ID1 -8.49	IGF1 -1.80	IGF1R 1.43	IGFBP3 1.36	IL6 -1.54	JUN 2.35	KRT18 -1.44	KRT19 1.88	KRT5 1.32	KRT8 -1.35	MAPK1 -1.13
E	MAPK3 1.23	MAPK8 -1.26	MGMT 1.21	MKI67 -2.83	MLH1 -1.72	MMP2 1.11	MMP9 1.96 A	MUC1 1.28	MYC -1.20	NME1 -1.19	NOTCH1 -1.08	NR3C1 1.19
F	PGR 2.54	PLAU -1.00	PRDM2 1.16	PTEN -1.17	PTGS2 2.88	PYCARD -1.02	RARB 1.36	RASSF1 -1.25	RB1 -1.40	SERPINE1 1.93	SFN 1.32	SFRP1 1.43
G	SLC39A6 -1.11	SLIT2 1.08	SNAI2 -1.63	SRC 1.09	TFF3 -1.76	TGFB1 1.54	THBS1 -2.04	TP53 -1.31	TP73 -1.28 A	TWIST1 2.27 C	VEGFA 1.63	XBP1 1.00

Comentários

A: A média de CT (*threshold cycle*) deste gene é relativamente alta (> 30) no controle ou na amostra de teste, e é razoavelmente baixo na outra amostra (< 30). Esses dados significam que a expressão do gene é relativamente baixa em uma amostra e razoavelmente detectado na outra amostra, sugerindo que o real valor de *fold-change* é pelo menos tão grande quanto o calculado e relatado nos resultado. Este resultado de mudança de dobra também pode ter variações maiores se p valor $> 0,05$; Portanto, é importante ter um número suficiente de repetições biológicas para validar o resultado desse gene.

B: A média de CT (*threshold cycle*) deste gene é relativamente alto (> 30), o que significa que seu nível de expressão relativa é baixo, tanto nas amostras de controle como de teste, e o valor de p para a mudança de dobra não está disponível ou é relativamente alto ($p > 0,05$). Este resultado de mudança de dobra também pode ter variações maiores. Portanto, é importante ter um número suficiente de repetições biológicas para validar o resultado desse gene.

C: A média de CT (*threshold cycle*) deste gene não é determinado ou maior do que o corte definido (padrão 35), em ambas as amostras, o que significa que sua expressão não foi detectada, tornando esse resultado de *fold-change* errado e não interpretável.

Heat Map: Grupo de Tratamento GANT *versus* Grupo Controle

Treated Group	Control Group
Group 2	Control Group

Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ABCB1 1.14 C	ABCG2 1.32	ADAM23 -2.74	AKT1 -1.05	APC 1.19	AR 1.14 C	ATM 1.05	BAD -1.14	BCL2 -1.41	BIRC5 -1.34	BRCA1 -1.36	BRCA2 -1.17
B	CCNA1 1.18	CCND1 1.22	CCND2 1.89	CCNE1 -1.08	CDH1 -3.62	CDH13 -1.82	CDK2 -1.20	CDKN1A 1.03	CDKN1C 1.58	CDKN2A 1.14 C	CSF1 -1.13	CST6 -1.40
C	CTNNB1 -1.12	CTSD 1.07	EGF -1.47	EGFR 1.19	ERBB2 -1.02	ESR1 -1.35	ESR2 3.45	FOXA1 1.43	GATA3 -1.14	GLI1 -2.16	GRB7 -1.32	GSTP1 -1.08
D	HIC1 -1.47	ID1 -4.68	IGF1 -1.64	IGF1R 1.03	IGFBP3 1.14	IL6 1.50	JUN 1.48	KRT18 -1.49	KRT19 1.27	KRT5 -1.61	KRT8 -1.63	MAPK1 -1.10
E	MAPK3 1.14	MAPK8 -1.02	MGMT -1.28	MKI67 -1.33	MLH1 -1.35	MMP2 1.03	MMP9 -1.21 A	MUC1 1.35	MYC 1.46	NME1 -1.32	NOTCH1 -1.04	NR3C1 1.05
F	PGR -1.46	PLAU 1.04	PRDM2 -1.17	PTEN -1.15	PTGS2 1.73	PYCARD -1.04	RARB -1.45	RASSF1 -1.03	RB1 -1.21	SERPINE1 1.21	SFN 1.56	SFRP1 1.16
G	SLC39A6 1.02	SLIT2 -1.14	SNAI2 1.11	SRC -1.15	TFF3 -1.01	TGFB1 -1.04	THBS1 -1.27	TP53 -1.28	TP73 -1.36	TWIST1 1.14 C	VEGFA 3.02	XBP1 -1.11

Comentários

A: A média de CT (*threshold cycle*) deste gene é relativamente alta (> 30) no controle ou na amostra de teste, e é razoavelmente baixo na outra amostra (< 30). Esses dados significam que a expressão do gene é relativamente baixa em uma amostra e razoavelmente detectada na outra amostra, sugerindo que o real valor de *fold-change* é pelo menos tão grande quanto o calculado e relatado nos resultado. Este resultado de mudança de dobra também pode ter variações maiores se p valor $> 0,05$; Portanto, é importante ter um número suficiente de repetições biológicas para validar o resultado desse gene.

B: A média de CT (*threshold cycle*) deste gene é relativamente alto (> 30), o que significa que seu nível de expressão relativa é baixo, tanto nas amostras de controle como de teste, e o valor de p para a mudança de dobra não está disponível ou é relativamente alto ($p > 0,05$). Este resultado de mudança de dobra também pode ter variações maiores. Portanto, é importante ter um número suficiente de repetições biológicas para validar o resultado desse gene.

C: A média de CT (*threshold cycle*) deste gene não é determinado ou maior do que o corte definido (padrão 35), em ambas as amostras, o que significa que sua expressão não foi detectada, tornando esse resultado de *fold-change* errado e não interpretável.

Heat Map: Grupo de Tratamento APELA versus Grupo Controle

Treated Group	Control Group
Group 3	Control Group

Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ABCB1	ABCG2	ADAM23	AKT1	APC	AR	ATM	BAD	BCL2	BIRC5	BRCA1	BRCA2
	1.91	-1.19	-3.31	1.02	1.02	2.13	-1.23	-1.01	-1.97	-1.25	-1.35	-1.22
	C											
B	CCNA1	CCND1	CCND2	CCNE1	CDH1	CDH13	CDK2	CDKN1A	CDKN1C	CDKN2A	CSF1	CST6
	1.44	1.01	1.60	-1.27	-3.73	1.13	-1.28	1.18	1.29	1.91	1.06	-1.27
C	CTNNB1	CTSD	EGF	EGFR	ERBB2	ESR1	ESR2	FOXA1	GATA3	GLI1	GRB7	GSTP1
	-1.24	1.13	-1.90	1.27	1.02	1.19	2.70	1.95	-1.65	-2.17	-1.50	-1.16
D	HIC1	ID1	IGF1	IGF1R	IGFBP3	IL6	JUN	KRT18	KRT19	KRT5	KRT8	MAPK1
	-1.67	-9.66	1.01	1.43	1.22	-1.28	2.19	-1.40	1.96	-1.41	-1.28	-1.05
E	MAPK3	MAPK8	MGMT	MKI67	MLH1	MMP2	MMP9	MUC1	MYC	NME1	NOTCH1	NR3C1
	1.18	-1.05	-1.20	-1.34	-1.43	1.94	1.14	1.48	-1.45	-1.38	1.03	1.23
F	PGR	PLAU	PRDM2	PTEN	PTGS2	PYCARD	RARB	RASSF1	RB1	SERPINE1	SFN	SFRP1
	6.24	1.06	1.11	-1.12	3.71	-1.08	1.28	1.13	-1.21	1.51	1.35	1.32
G	SLC39A6	SLIT2	SNAI2	SRC	TFF3	TGFB1	THBS1	TP53	TP73	TWIST1	VEGFA	XBP1
	-1.09	-1.05	-2.27	1.02	-1.87	1.36	-1.78	-1.22	-1.17	1.91	1.80	1.00

Comentários

A: A média de CT (*threshold cycle*) deste gene é relativamente alta (> 30) no controle ou na amostra de teste, e é razoavelmente baixo na outra amostra (< 30). Esses dados significam que a expressão do gene é relativamente baixa em uma amostra e razoavelmente detectado na outra amostra, sugerindo que o real valor de *fold-change* é pelo menos tão grande quanto o calculado e relatado nos resultados. Este resultado de mudança de dobra também pode ter variações maiores se p valor $> 0,05$; Portanto, é importante ter um número suficiente de repetições biológicas para validar o resultado desse gene.

B: A média de CT (*threshold cycle*) deste gene é relativamente alto (> 30), o que significa que seu nível de expressão relativa é baixo, tanto nas amostras de controle como de teste, e o valor de p para a mudança de dobra não está disponível ou é relativamente alto ($p > 0,05$). Este resultado de mudança de dobra também pode ter variações maiores. Portanto, é importante ter um número suficiente de repetições biológicas para validar o resultado desse gene.

C: A média de CT (*threshold cycle*) deste gene não é determinado ou maior do que o corte definido (padrão 35), em ambas as amostras, o que significa que sua expressão não foi detectada, tornando esse resultado de *fold-change* errado e não interpretável.

5 Lista de miRNAs Relacionados ao Câncer de Mama

PCR tempo real - miScript™ miRNA PCR Array

Human Breast Cancer miRNA PCR Array, MIHS-109ZA, Qiagen

Position	Mature ID
A01	hsa-let-7a-5p
A02	hsa-let-7b-5p
A03	hsa-let-7c-5p
A04	hsa-let-7d-5p
A05	hsa-let-7e-5p
A06	hsa-let-7f-5p
A07	hsa-let-7g-5p
A08	hsa-let-7i-5p
A09	hsa-miR-1-3p
A10	hsa-miR-100-5p
A11	hsa-miR-107
A12	hsa-miR-10a-5p
B01	hsa-miR-10b-5p
B02	hsa-miR-125b-5p
B03	hsa-miR-125b-1-3p
B04	hsa-miR-128-3p
B05	hsa-miR-129-5p
B06	hsa-miR-130a-3p
B07	hsa-miR-130b-3p
B08	hsa-miR-132-3p
B09	hsa-miR-140-5p
B10	hsa-miR-141-3p
B11	hsa-miR-145-5p
B12	hsa-miR-148a-3p
C01	hsa-miR-152-3p
C02	hsa-miR-155-5p
C03	hsa-miR-15a-5p
C04	hsa-miR-15b-5p
C05	hsa-miR-16-5p
C06	hsa-miR-17-5p
C07	hsa-miR-181a-5p
C08	hsa-miR-181b-5p
C09	hsa-miR-181c-5p
C10	hsa-miR-181d-5p
C11	hsa-miR-182-5p
C12	hsa-miR-186-5p
D01	hsa-miR-18a-5p
D02	hsa-miR-193b-3p
D03	hsa-miR-195-5p
D04	hsa-miR-199b-3p
D05	hsa-miR-199a-5p
D06	hsa-miR-19a-3p
D07	hsa-miR-19b-3p
D08	hsa-miR-200a-3p
D09	hsa-miR-200b-3p
D10	hsa-miR-200c-3p
D11	hsa-miR-202-3p
D12	hsa-miR-203a-3p

Position	Mature ID
E01	hsa-miR-204-5p
E02	hsa-miR-205-5p
E03	hsa-miR-206
E04	hsa-miR-20a-5p
E05	hsa-miR-20b-5p
E06	hsa-miR-21-5p
E07	hsa-miR-210-3p
E08	hsa-miR-212-3p
E09	hsa-miR-214-3p
E10	hsa-miR-22-3p
E11	hsa-miR-222-3p
E12	hsa-miR-223-3p
F01	hsa-miR-25-3p
F02	hsa-miR-26a-5p
F03	hsa-miR-26b-5p
F04	hsa-miR-27a-3p
F05	hsa-miR-27b-3p
F06	hsa-miR-29a-3p
F07	hsa-miR-29b-3p
F08	hsa-miR-29c-3p
F09	hsa-miR-31-5p
F10	hsa-miR-328-3p
F11	hsa-miR-340-5p
F12	hsa-miR-424-5p
G01	hsa-miR-429
G02	hsa-miR-485-5p
G03	hsa-miR-489-3p
G04	hsa-miR-495-3p
G05	hsa-miR-497-5p
G06	hsa-miR-548c-3p
G07	hsa-miR-607
G08	hsa-miR-613
G09	hsa-miR-7-5p
G10	hsa-miR-93-5p
G11	hsa-miR-96-5p
G12	hsa-miR-98-5p
H01	cel-miR-39-3p
H02	cel-miR-39-3p
H03	SNORD61
H04	SNORD68
H05	SNORD72
H06	SNORD95
H07	SNORD96A
H08	RNU6-6P
H09	miRTC
H10	miRTC
H11	PPC
H12	PPC

6 Layout da Placa de PCR miRNA

PCR tempo real - miScript™ miRNA PCR Array
Human Breast Cancer miRNA PCR Array, MIHS-109ZA, Qiagen

7 Resultados Completos da Expressão de miRNAs

Tabela 3: Valores do *fold-change*, intervalo de confiança, *p-value* e *fold-regulation* nos miRNAs avaliados.

Grupo 1 (Tratamento com extrato de grumixama rico em elagitaninos – GELA; 200µg/ml por 48h). Resultados da comparação grupo GELA e grupo Controle.

mi-RNA	Fold-Change	95% CI	p-value	Fold-Regulation	Comments
hsa-let-7a-5p	1,8417	(0.88, 2.81)	0,090277	1,8417	
hsa-let-7b-5p	1,4795	(1.04, 1.92)	0,056201	1,4795	
hsa-let-7c-5p	1,6218	(1.06, 2.19)	0,045812	1,6218	
hsa-let-7d-5p	1,6332	(0.80, 2.47)	0,108957	1,6332	
hsa-let-7e-5p	1,5771	(0.91, 2.24)	0,07477	1,5771	
hsa-let-7f-5p	1,6051	(0.66, 2.55)	0,202245	1,6051	
hsa-let-7g-5p	1,5915	(0.76, 2.42)	0,167163	1,5915	
hsa-let-7i-5p	1,5132	(0.91, 2.11)	0,093329	1,5132	
hsa-miR-1-3p	1,4933	(0.66, 2.33)	0,240653	1,4933	B
hsa-miR-100-5p	1,6211	(0.91, 2.33)	0,089303	1,6211	
hsa-miR-107	1,4896	(0.79, 2.19)	0,176467	1,4896	
hsa-miR-10a-5p	1,5467	(0.71, 2.38)	0,197151	1,5467	
hsa-miR-10b-5p	1,5901	(0.53, 2.65)	0,255119	1,5901	
hsa-miR-125b-5p	1,5264	(0.82, 2.23)	0,145294	1,5264	
hsa-miR-125b-1-3p	1,5512	(0.94, 2.17)	0,096177	1,5512	
hsa-miR-128-3p	1,7649	(0.53, 3.00)	0,211629	1,7649	
hsa-miR-129-5p	0,8028	(0.33, 1.27)	0,554714	-1,2456	B
hsa-miR-130a-3p	1,1881	(0.79, 1.58)	0,379391	1,1881	
hsa-miR-130b-3p	1,3111	(0.85, 1.77)	0,2137	1,3111	
hsa-miR-132-3p	1,9023	(0.77, 3.04)	0,113666	1,9023	
hsa-miR-140-5p	1,3342	(0.78, 1.89)	0,263633	1,3342	
hsa-miR-141-3p	0,8211	(0.09, 1.56)	0,92407	-1,2179	B
hsa-miR-145-5p	1,3477	(0.76, 1.93)	0,263743	1,3477	B
hsa-miR-148a-3p	1,541	(0.64, 2.44)	0,263958	1,541	
hsa-miR-152-3p	1,2596	(0.69, 1.82)	0,423776	1,2596	
hsa-miR-155-5p	1,1378	(0.75, 1.52)	0,509405	1,1378	C
hsa-miR-15a-5p	1,0647	(0.53, 1.60)	0,684396	1,0647	
hsa-miR-15b-5p	1,7243	(0.70, 2.75)	0,16669	1,7243	
hsa-miR-16-5p	1,3037	(0.73, 1.87)	0,293488	1,3037	
hsa-miR-17-5p	1,1848	(0.66, 1.71)	0,524947	1,1848	
hsa-miR-181a-5p	1,4494	(0.89, 2.01)	0,135929	1,4494	
hsa-miR-181b-5p	1,6831	(0.94, 2.43)	0,076304	1,6831	
hsa-miR-181c-5p	1,4606	(0.94, 1.98)	0,108123	1,4606	
hsa-miR-181d-5p	1,494	(0.86, 2.13)	0,146834	1,494	
hsa-miR-182-5p	1,5763	(0.74, 2.41)	0,175155	1,5763	
hsa-miR-186-5p	1,2998	(0.69, 1.91)	0,363878	1,2998	

hsa-miR-18a-5p	1,2803	(0.70, 1.86)	0,344465	1,2803	
hsa-miR-193b-3p	1,5538	(1.14, 1.96)	0,025514	1,5538	
hsa-miR-195-5p	1,3588	(0.85, 1.86)	0,170383	1,3588	
hsa-miR-199b-3p	1,7488	(0.72, 2.78)	0,157439	1,7488	B
hsa-miR-199a-5p	0,7524	(0.28, 1.22)	0,38079	-1,3291	B
hsa-miR-19a-3p	1,0659	(0.76, 1.38)	0,650491	1,0659	
hsa-miR-19b-3p	1,1201	(0.66, 1.58)	0,554591	1,1201	
hsa-miR-200a-3p	1,1068	(0.54, 1.67)	0,622138	1,1068	
hsa-miR-200b-3p	1,6193	(0.87, 2.37)	0,114525	1,6193	
hsa-miR-200c-3p	1,353	(0.68, 2.03)	0,368428	1,353	
hsa-miR-202-3p	1,227	(0.67, 1.78)	0,458483	1,227	B
hsa-miR-203a-3p	1,3364	(0.21, 2.46)	0,463984	1,3364	B
hsa-miR-204-5p	1,6842	(0.77, 2.60)	0,130705	1,6842	
hsa-miR-205-5p	0,6385	(0.00001, 1.38)	0,636342	-1,5663	A
hsa-miR-206	1,0773	(0.00001, 2.24)	0,972863	1,0773	B
hsa-miR-20a-5p	1,1129	(0.68, 1.55)	0,683993	1,1129	
hsa-miR-20b-5p	1,1556	(0.73, 1.58)	0,543866	1,1556	
hsa-miR-21-5p	2,1111	(0.97, 3.25)	0,092354	2,1111	
hsa-miR-210-3p	2,1975	(1.54, 2.86)	0,011649	2,1975	
hsa-miR-212-3p	1,3434	(0.81, 1.88)	0,24059	1,3434	
hsa-miR-214-3p	1,0245	(0.60, 1.44)	0,927784	1,0245	B
hsa-miR-22-3p	2,0183	(0.00001, 4.38)	0,286213	2,0183	
hsa-miR-222-3p	2,1327	(0.20, 4.07)	0,229584	2,1327	
hsa-miR-223-3p	1,0245	(0.00001, 2.31)	0,840735	1,0245	B
hsa-miR-25-3p	1,5849	(0.78, 2.39)	0,152061	1,5849	
hsa-miR-26a-5p	1,6117	(0.78, 2.44)	0,141266	1,6117	
hsa-miR-26b-5p	2,1619	(0.80, 3.52)	0,106979	2,1619	
hsa-miR-27a-3p	1,3761	(0.88, 1.88)	0,167179	1,3761	
hsa-miR-27b-3p	1,5063	(0.73, 2.29)	0,225904	1,5063	
hsa-miR-29a-3p	1,4366	(0.91, 1.96)	0,126974	1,4366	
hsa-miR-29b-3p	0,9323	(0.74, 1.13)	0,559984	-1,0726	
hsa-miR-29c-3p	1,5041	(0.91, 2.10)	0,113668	1,5041	
hsa-miR-31-5p	1,2132	(0.50, 1.92)	0,630082	1,2132	B
hsa-miR-328-3p	1,3783	(0.88, 1.88)	0,1388	1,3783	
hsa-miR-340-5p	1,7683	(0.72, 2.82)	0,138401	1,7683	
hsa-miR-424-5p	1,4174	(0.69, 2.14)	0,268401	1,4174	
hsa-miR-429	1,4692	(1.19, 1.75)	0,02399	1,4692	
hsa-miR-485-5p	1,5816	(0.00001, 3.43)	0,457388	1,5816	B
hsa-miR-489-3p	1,1932	(0.81, 1.58)	0,341577	1,1932	
hsa-miR-495-3p	0,9339	(0.14, 1.73)	0,652282	-1,0708	B
hsa-miR-497-5p	1,1753	(0.90, 1.45)	0,245996	1,1753	
hsa-miR-548c-3p	1,907	(0.01, 3.80)	0,27786	1,907	B
hsa-miR-607	1,1378	(0.75, 1.52)	0,509405	1,1378	C
hsa-miR-613	1,0689	(0.65, 1.48)	0,78565	1,0689	B
hsa-miR-7-5p	1,0875	(0.46, 1.72)	0,89282	1,0875	
hsa-miR-93-5p	1,3902	(0.62, 2.16)	0,343869	1,3902	

hsa-miR-96-5p	1,1437	(0.84, 1.45)	0,383367	1,1437	
hsa-miR-98-5p	1,5634	(0.79, 2.34)	0,125969	1,5634	
cel-miR-39-3p	1,1378	(0.75, 1.52)	0,509405	1,1378	C
cel-miR-39-3p	1,1956	(0.72, 1.67)	0,426756	1,1956	B
SNORD61	0,9676	(0.89, 1.05)	0,480161	-1,0335	
SNORD68	1,318	(0.72, 1.92)	0,330135	1,318	
SNORD72	0,6522	(0.37, 0.94)	0,132867	-1,5333	
SNORD95	1,3483	(1.07, 1.63)	0,039368	1,3483	
SNORD96A	0,9281	(0.69, 1.17)	0,622493	-1,0775	
RNU6-6P	0,9608	(0.69, 1.23)	0,729984	-1,0408	
miRTC	0,8311	(0.64, 1.03)	0,194146	-1,2032	
miRTC	0,9773	(0.82, 1.13)	0,770069	-1,0232	
PPC	1,1196	(0.68, 1.56)	0,619661	1,1196	
PPC	1,1098	(0.72, 1.50)	0,602045	1,1098	

Tabela 4: Valores do *fold-change*, intervalo de confiança, *p-value* e *fold-regulation* nos miRNAs avaliados.

Grupo 2 (Tratamento com extrato de grumixama rico em antocianinas – GANT; 200µg/ml por 48h). Resultados da comparação grupo GANT e grupo Controle.

mi-RNA	Fold-Change	95% CI	p-value	Fold-Regulation	Comments
hsa-let-7a-5p	0,8683	(0.46, 1.28)	0,525651	-1,1517	
hsa-let-7b-5p	0,9488	(0.51, 1.39)	0,889574	-1,054	
hsa-let-7c-5p	0,9211	(0.55, 1.30)	0,69646	-1,0857	
hsa-let-7d-5p	0,9839	(0.51, 1.46)	0,807193	-1,0163	
hsa-let-7e-5p	0,9726	(0.43, 1.52)	0,899223	-1,0282	
hsa-let-7f-5p	1,015	(0.38, 1.65)	0,861735	1,015	
hsa-let-7g-5p	0,9868	(0.48, 1.49)	0,811738	-1,0134	
hsa-let-7i-5p	0,958	(0.57, 1.35)	0,742881	-1,0439	
hsa-miR-1-3p	1,2036	(0.55, 1.86)	0,647268	1,2036	B
hsa-miR-100-5p	0,9372	(0.51, 1.37)	0,707441	-1,067	
hsa-miR-107	1,0035	(0.56, 1.44)	0,91114	1,0035	
hsa-miR-10a-5p	0,9784	(0.45, 1.50)	0,78075	-1,022	
hsa-miR-10b-5p	0,9984	(0.35, 1.65)	0,807224	-1,0016	
hsa-miR-125b-5p	1,1051	(0.60, 1.61)	0,80416	1,1051	
hsa-miR-125b-1-3p	1,0076	(0.65, 1.37)	0,94058	1,0076	
hsa-miR-128-3p	0,9176	(0.30, 1.54)	0,634149	-1,0898	
hsa-miR-129-5p	0,91	(0.46, 1.36)	0,761487	-1,0989	B
hsa-miR-130a-3p	0,9912	(0.59, 1.40)	0,972594	-1,0089	
hsa-miR-130b-3p	0,9724	(0.59, 1.35)	0,891678	-1,0284	
hsa-miR-132-3p	0,8789	(0.41, 1.35)	0,573919	-1,1378	
hsa-miR-140-5p	0,9648	(0.60, 1.33)	0,8249	-1,0365	
hsa-miR-141-3p	1,1294	(0.79, 1.47)	0,504618	1,1294	B
hsa-miR-145-5p	0,8712	(0.61, 1.13)	0,370176	-1,1479	B
hsa-miR-148a-3p	0,9582	(0.46, 1.46)	0,726952	-1,0436	
hsa-miR-152-3p	0,7616	(0.44, 1.08)	0,293829	-1,3131	
hsa-miR-155-5p	1,3757	(0.74, 2.01)	0,266119	1,3757	B
hsa-miR-15a-5p	1,0087	(0.67, 1.35)	0,856441	1,0087	
hsa-miR-15b-5p	0,7916	(0.38, 1.21)	0,409791	-1,2632	
hsa-miR-16-5p	0,9033	(0.51, 1.30)	0,686076	-1,107	
hsa-miR-17-5p	0,8337	(0.49, 1.18)	0,434651	-1,1995	
hsa-miR-181a-5p	1,3385	(0.85, 1.82)	0,20185	1,3385	
hsa-miR-181b-5p	1,1775	(0.68, 1.68)	0,574106	1,1775	
hsa-miR-181c-5p	1,4242	(0.88, 1.97)	0,154252	1,4242	
hsa-miR-181d-5p	1,1002	(0.64, 1.56)	0,817113	1,1002	
hsa-miR-182-5p	0,95	(0.49, 1.41)	0,728828	-1,0526	
hsa-miR-186-5p	0,9853	(0.60, 1.37)	0,8446	-1,0149	
hsa-miR-18a-5p	0,8569	(0.50, 1.21)	0,495289	-1,167	
hsa-miR-193b-3p	1,3457	(0.90, 1.79)	0,162494	1,3457	
hsa-miR-195-5p	0,8388	(0.55, 1.13)	0,36833	-1,1922	

hsa-miR-199b-3p	0,8265	(0.43, 1.22)	0,3974	-1,2099	B
hsa-miR-199a-5p	1,0165	(0.22, 1.81)	0,897517	1,0165	B
hsa-miR-19a-3p	1,0529	(0.71, 1.40)	0,703913	1,0529	
hsa-miR-19b-3p	1,0006	(0.70, 1.30)	0,961659	1,0006	
hsa-miR-200a-3p	1,2072	(0.86, 1.55)	0,255553	1,2072	
hsa-miR-200b-3p	1,0544	(0.56, 1.55)	0,950371	1,0544	
hsa-miR-200c-3p	0,9947	(0.49, 1.50)	0,827613	-1,0053	
hsa-miR-202-3p	0,8268	(0.40, 1.25)	0,504911	-1,2094	B
hsa-miR-203a-3p	1,6563	(0.54, 2.77)	0,199469	1,6563	B
hsa-miR-204-5p	0,8807	(0.39, 1.37)	0,57099	-1,1355	
hsa-miR-205-5p	1,6014	(0.38, 2.83)	0,313397	1,6014	
hsa-miR-206	0,6298	(0.09, 1.17)	0,23349	-1,5877	B
hsa-miR-20a-5p	0,813	(0.52, 1.11)	0,325259	-1,23	
hsa-miR-20b-5p	0,8745	(0.59, 1.16)	0,440393	-1,1434	
hsa-miR-21-5p	1,1728	(0.73, 1.62)	0,49058	1,1728	
hsa-miR-210-3p	1,8594	(1.33, 2.39)	0,017104	1,8594	
hsa-miR-212-3p	1,0892	(0.48, 1.70)	0,727984	1,0892	
hsa-miR-214-3p	0,7618	(0.16, 1.37)	0,627938	-1,3127	B
hsa-miR-22-3p	1,8844	(0.00001, 4.36)	0,442203	1,8844	
hsa-miR-222-3p	0,878	(0.10, 1.66)	0,594538	-1,139	
hsa-miR-223-3p	0,7914	(0.00001, 1.65)	0,509929	-1,2637	B
hsa-miR-25-3p	0,822	(0.45, 1.19)	0,387029	-1,2166	
hsa-miR-26a-5p	0,8932	(0.44, 1.34)	0,57519	-1,1195	
hsa-miR-26b-5p	0,968	(0.49, 1.44)	0,769548	-1,0331	
hsa-miR-27a-3p	1,0512	(0.68, 1.42)	0,886011	1,0512	
hsa-miR-27b-3p	0,7978	(0.43, 1.16)	0,381702	-1,2535	
hsa-miR-29a-3p	1,1018	(0.73, 1.48)	0,703486	1,1018	
hsa-miR-29b-3p	1,4114	(0.88, 1.94)	0,156351	1,4114	
hsa-miR-29c-3p	0,886	(0.49, 1.29)	0,618726	-1,1286	
hsa-miR-31-5p	1,1728	(0.30, 2.05)	0,673168	1,1728	B
hsa-miR-328-3p	1,8019	(0.66, 2.94)	0,177483	1,8019	
hsa-miR-340-5p	0,9789	(0.43, 1.53)	0,760498	-1,0216	
hsa-miR-424-5p	0,8712	(0.46, 1.28)	0,51138	-1,1478	
hsa-miR-429	1,0272	(0.86, 1.20)	0,758539	1,0272	
hsa-miR-485-5p	1,2391	(0.10, 2.37)	0,707588	1,2391	B
hsa-miR-489-3p	0,9114	(0.58, 1.24)	0,565265	-1,0973	
hsa-miR-495-3p	0,9219	(0.08, 1.77)	0,702993	-1,0847	B
hsa-miR-497-5p	0,7187	(0.50, 0.93)	0,09913	-1,3915	A
hsa-miR-548c-3p	1,3616	(0.06, 2.67)	0,735392	1,3616	B
hsa-miR-607	1,1142	(0.79, 1.44)	0,544775	1,1142	C
hsa-miR-613	1,1667	(0.64, 1.69)	0,52988	1,1667	B
hsa-miR-7-5p	0,6758	(0.34, 1.02)	0,221724	-1,4798	
hsa-miR-93-5p	0,8333	(0.43, 1.23)	0,45096	-1,2001	
hsa-miR-96-5p	1,2167	(0.88, 1.55)	0,251247	1,2167	
hsa-miR-98-5p	0,8533	(0.44, 1.27)	0,45632	-1,1719	
cel-miR-39-3p	1,1142	(0.79, 1.44)	0,544775	1,1142	C

cel-miR-39-3p	1,1142	(0.79, 1.44)	0,544775	1,1142	C
SNORD61	0,8661	(0.79, 0.94)	0,03032	-1,1546	
SNORD68	0,9324	(0.59, 1.28)	0,666779	-1,0725	
SNORD72	1,108	(0.71, 1.51)	0,678995	1,108	
SNORD95	0,9313	(0.76, 1.11)	0,45399	-1,0737	
SNORD96A	1,0231	(0.83, 1.21)	0,830975	1,0231	
RNU6-6P	1,1729	(0.84, 1.51)	0,370728	1,1729	
miRTC	1,2136	(0.93, 1.50)	0,17475	1,2136	
miRTC	1,2767	(0.99, 1.56)	0,098057	1,2767	
PPC	1,1473	(0.78, 1.52)	0,46871	1,1473	
PPC	1,1163	(0.79, 1.44)	0,523595	1,1163	

Tabela 5: Valores do *fold-change*, intervalo de confiança, *p-value* e *fold-regulation* nos miRNAs avaliados.

Grupo 3 (Tratamento com extrato de amora preta rico em elagitaninos – APELA; 200µg/ml por 48h). Resultados da comparação grupo APELA e grupo Controle.

mi-RNA	Fold-Change	95% CI	p-value	Fold-Regulation	Com ment
hsa-let-7a-5p	0,7812	(0.31, 1.25)	0,477986	-1,2801	
hsa-let-7b-5p	1,1351	(0.81, 1.46)	0,454778	1,1351	
hsa-let-7c-5p	0,6424	(0.29, 0.99)	0,203001	-1,5565	
hsa-let-7d-5p	0,9362	(0.48, 1.40)	0,676167	-1,0682	
hsa-let-7e-5p	0,6809	(0.30, 1.06)	0,261638	-1,4686	
hsa-let-7f-5p	0,6859	(0.16, 1.21)	0,405597	-1,4578	
hsa-let-7g-5p	0,8531	(0.38, 1.33)	0,552269	-1,1721	
hsa-let-7i-5p	1,0031	(0.62, 1.39)	0,871664	1,0031	
hsa-miR-1-3p	1,1164	(0.38, 1.85)	0,7982	1,1164	B
hsa-miR-100-5p	0,6191	(0.29, 0.95)	0,191538	-1,6153	
hsa-miR-107	0,7862	(0.44, 1.13)	0,343005	-1,272	
hsa-miR-10a-5p	0,5623	(0.17, 0.95)	0,215801	-1,7784	
hsa-miR-10b-5p	0,6026	(0.06, 1.14)	0,353475	-1,6594	
hsa-miR-125b-5p	0,6412	(0.30, 0.98)	0,203298	-1,5596	
hsa-miR-125b-1-3p	0,7124	(0.41, 1.02)	0,227638	-1,4038	
hsa-miR-128-3p	0,6356	(0.17, 1.10)	0,309795	-1,5733	
hsa-miR-129-5p	0,7367	(0.47, 1.01)	0,207166	-1,3574	B
hsa-miR-130a-3p	0,893	(0.61, 1.18)	0,481632	-1,1198	
hsa-miR-130b-3p	0,8095	(0.54, 1.08)	0,299328	-1,2353	
hsa-miR-132-3p	0,6211	(0.26, 0.98)	0,23895	-1,6102	
hsa-miR-140-5p	0,6393	(0.38, 0.90)	0,119815	-1,5641	
hsa-miR-141-3p	0,3186	(0.00001, 0.68)	0,058719	-3,1386	B
hsa-miR-145-5p	1,1622	(0.51, 1.81)	0,527081	1,1622	B
hsa-miR-148a-3p	0,5465	(0.14, 0.95)	0,236637	-1,8297	
hsa-miR-152-3p	0,6219	(0.27, 0.97)	0,212708	-1,608	
hsa-miR-155-5p	1,5195	(0.73, 2.31)	0,227364	1,5195	B
hsa-miR-15a-5p	0,725	(0.33, 1.12)	0,407936	-1,3794	
hsa-miR-15b-5p	0,5815	(0.19, 0.97)	0,235863	-1,7196	
hsa-miR-16-5p	0,6301	(0.41, 0.85)	0,082524	-1,587	
hsa-miR-17-5p	0,5698	(0.36, 0.78)	0,078744	-1,755	
hsa-miR-181a-5p	0,7782	(0.50, 1.06)	0,261358	-1,285	
hsa-miR-181b-5p	0,8317	(0.44, 1.22)	0,478098	-1,2024	
hsa-miR-181c-5p	0,7736	(0.49, 1.06)	0,260692	-1,2926	
hsa-miR-181d-5p	0,88	(0.45, 1.31)	0,609386	-1,1363	
hsa-miR-182-5p	0,8135	(0.35, 1.27)	0,495928	-1,2292	
hsa-miR-186-5p	0,7356	(0.45, 1.03)	0,235605	-1,3594	
hsa-miR-18a-5p	0,5987	(0.38, 0.81)	0,084549	-1,6703	
hsa-miR-193b-3p	1,1338	(0.59, 1.68)	0,529551	1,1338	
hsa-miR-195-5p	0,6661	(0.37, 0.97)	0,135481	-1,5012	
hsa-miR-199b-3p	0,5716	(0.09, 1.06)	0,31474	-1,7495	B

hsa-miR-199a-5p	0,7772	(0.37, 1.18)	0,313422	-1,2867	B
hsa-miR-19a-3p	0,4691	(0.27, 0.67)	0,017614	-2,1318	
hsa-miR-19b-3p	0,4501	(0.22, 0.68)	0,025699	-2,2219	
hsa-miR-200a-3p	0,6409	(0.19, 1.09)	0,293844	-1,5602	
hsa-miR-200b-3p	0,6788	(0.27, 1.09)	0,314459	-1,4731	
hsa-miR-200c-3p	0,5666	(0.18, 0.95)	0,215403	-1,765	
hsa-miR-202-3p	0,645	(0.24, 1.05)	0,24482	-1,5503	B
hsa-miR-203a-3p	0,9456	(0.49, 1.40)	0,904558	-1,0575	B
hsa-miR-204-5p	0,5767	(0.14, 1.02)	0,270741	-1,7339	
hsa-miR-205-5p	2,3285	(0.41, 4.24)	0,152168	2,3285	
hsa-miR-206	0,9115	(0.00001, 1.97)	0,821211	-1,0971	B
hsa-miR-20a-5p	0,5651	(0.36, 0.77)	0,069249	-1,7694	
hsa-miR-20b-5p	0,5492	(0.34, 0.76)	0,06338	-1,8208	
hsa-miR-21-5p	0,9164	(0.48, 1.36)	0,742252	-1,0912	
hsa-miR-210-3p	2,1946	(1.40, 2.99)	0,027504	2,1946	
hsa-miR-212-3p	0,7993	(0.53, 1.07)	0,280741	-1,2511	
hsa-miR-214-3p	0,7626	(0.51, 1.01)	0,172521	-1,3113	B
hsa-miR-22-3p	0,4843	(0.00001, 1.33)	0,461986	-2,0647	
hsa-miR-222-3p	0,6461	(0.01, 1.28)	0,417284	-1,5476	
hsa-miR-223-3p	0,621	(0.00001, 1.28)	0,388782	-1,6102	B
hsa-miR-25-3p	0,6894	(0.27, 1.11)	0,306875	-1,4505	
hsa-miR-26a-5p	0,7613	(0.29, 1.23)	0,438606	-1,3135	
hsa-miR-26b-5p	0,7672	(0.21, 1.32)	0,570679	-1,3034	
hsa-miR-27a-3p	0,6902	(0.37, 1.01)	0,204424	-1,4488	
hsa-miR-27b-3p	0,5716	(0.24, 0.90)	0,179744	-1,7494	
hsa-miR-29a-3p	0,6855	(0.39, 0.98)	0,178423	-1,4588	
hsa-miR-29b-3p	1,1235	(0.48, 1.76)	0,560393	1,1235	
hsa-miR-29c-3p	0,723	(0.45, 0.99)	0,190923	-1,3831	
hsa-miR-31-5p	1,5588	(0.44, 2.68)	0,308783	1,5588	B
hsa-miR-328-3p	8,1121	(0.00001, 27.68)	0,228821	8,1121	
hsa-miR-340-5p	0,5706	(0.21, 0.93)	0,215579	-1,7525	
hsa-miR-424-5p	0,6274	(0.31, 0.94)	0,180027	-1,5938	
hsa-miR-429	0,5881	(0.34, 0.84)	0,036664	-1,7003	A
hsa-miR-485-5p	0,7806	(0.21, 1.35)	0,466256	-1,2811	B
hsa-miR-489-3p	0,6295	(0.27, 0.98)	0,18513	-1,5886	
hsa-miR-495-3p	1,0668	(0.21, 1.92)	0,845324	1,0668	B
hsa-miR-497-5p	0,5277	(0.38, 0.68)	0,017908	-1,8951	A
hsa-miR-548c-3p	1,0109	(0.09, 1.93)	0,702381	1,0109	B
hsa-miR-607	0,9113	(0.56, 1.26)	0,643729	-1,0974	C
hsa-miR-613	0,8729	(0.44, 1.30)	0,662105	-1,1457	B
hsa-miR-7-5p	0,6244	(0.22, 1.03)	0,235355	-1,6014	
hsa-miR-93-5p	0,7357	(0.38, 1.09)	0,300059	-1,3593	
hsa-miR-96-5p	0,6876	(0.29, 1.08)	0,354207	-1,4544	
hsa-miR-98-5p	0,833	(0.41, 1.26)	0,439128	-1,2005	
cel-miR-39-3p	3,5295	(0.00001, 7.52)	0,115159	3,5295	B
cel-miR-39-3p	1,5141	(0.60, 2.42)	0,284352	1,5141	B

SNORD61	0,9328	(0.80, 1.07)	0,419146	-1,0721
SNORD68	1,0092	(0.53, 1.49)	0,974126	1,0092
SNORD72	1,144	(0.62, 1.67)	0,605998	1,144
SNORD95	1,0425	(0.80, 1.29)	0,75374	1,0425
SNORD96A	1,1842	(0.93, 1.43)	0,206579	1,1842
RNU6-6P	0,7522	(0.53, 0.97)	0,159706	-1,3295
miRTC	0,6775	(0.47, 0.88)	0,064155	-1,4759
miRTC	0,7195	(0.51, 0.93)	0,093423	-1,3898
PPC	0,9058	(0.53, 1.28)	0,627321	-1,104
PPC	0,8844	(0.51, 1.26)	0,607276	-1,1307

8 Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9132 - 8728483/1 - Gabriela Rezende Costa

Email: costa.gr@usp.br
Data de Nascimento: 26/05/1983
Cédula de Identidade: RG - MG-12.085.262 - MG
Local de Nascimento: Estado de Minas Gerais
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Nutricionista - Universidade Federal de Viçosa - Minas Gerais - Brasil - 2007
Mestrado: Mestre em Ciência de Alimentos (1) - Universidade Federal de Minas Gerais - Minas Gerais - Brasil - 2013

Curso: Doutorado
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Nutrição Experimental
Data de Matrícula: 01/07/2013
Início da Contagem de Prazo: 01/07/2013
Data Limite para o Depósito: 03/07/2017
Orientador: Prof(a). Dr(a). Thomas Prates Ong - 01/07/2013 até o presente. Email: tong@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 01/07/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 21/08/2015
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 01/07/2013

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 02/02/2017

Impresso em: 26/06/2017 12:20:13

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9132 - 8728483/1 - Gabriela Rezende Costa

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
MCM5906-1/1	Princípios da Experimentação em Oncologia Básica (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	06/08/2013	16/09/2013	60	4	90	A	N	Concluída
MCM5851-4/1	Adesão Celular e Câncer (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	15/10/2013	16/12/2013	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBA5753-1/1	Nutrigenômica e Programação das Doenças Crônicas Não-Transmissíveis	29/10/2013	04/11/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5734-2/2	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	09/12/2013	15/12/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5899-2/3	Biodisponibilidade de Nutrientes e de Substâncias Bioativas em Alimentos e Dietas	10/03/2014	20/04/2014	90	6	100	A	N	Concluída
FBA5728-3/9	Aprimoramento Didático	25/03/2014	21/04/2014	60	4	87	A	N	Concluída
FBA5712-6/1	Fisiologia da Nutrição I	19/05/2014	29/06/2014	90	6	90	A	N	Concluída
HNT5759-2/2	Nutrigenômica no Contexto das Doenças Crônicas não Transmissíveis (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	03/03/2015	06/04/2015	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBA5897-2/2	Nutrigenômica do Câncer	03/08/2015	09/08/2015	30	2	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBA0436 Nutrigenômica, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (2)	02/07/2016	30/11/2016	-	3	-	-	-	-

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	29
Estágios:			
Total:	0	20	29

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

- 1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria nº 524, de 29.04.2008..
- 2) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 12/04/2017.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 02/02/2017

Impresso em: 26/06/2017 12:20:13

9 Currículo Lattes

Gabriela Rezende Costa

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/9308267513457840>

Última atualização do currículo em 26/06/2017

Resumo informado pelo autor

Doutoranda em Ciência dos Alimentos, campo Nutrição Experimental, pela Universidade de São Paulo. Mestre em Ciência de Alimentos pela Universidade Federal de Minas Gerais em Março de 2013. Graduada em Nutrição pela Universidade Federal de Viçosa em Agosto de 2007. Atuou como Responsável Técnica pela Merenda Escolar do Município de Santos Dumont de Março de 2009 a Setembro de 2010. Suas participações recentes envolvem compostos bioativos, nutrigenômica e nutrigenética no contexto do câncer de mama. Trabalhos anteriores compreendem: alimentos geneticamente modificados, consumo de alimentação escolar, crescimento e anemia de lactentes, e adequação de alimentação para pacientes submetidos a transplante de medula óssea autólogo.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome	Gabriela Rezende Costa
Nome em citações bibliográficas	COSTA, G. R.; REZENDE COSTA, GABRIELA
Sexo	Feminino
Cor ou Raça	Branca
Filiação	Edmo Ribeiro da Costa e Maria Aparecida de Rezende Costa
Nascimento	26/05/1983 - Cataguases/MG - Brasil
Carteira de identidade	12085262 ssp - MG - 09/08/2004
CPF	012.971.706-10
Passaporte	FH742426
Endereço residencial	Rua Monte Caseros Vila Gomes - São Paulo 05590130, SP - Brasil Telefone: 11 37216510 Celular 11 941331990
Endereço eletrônico	E-mail para contato : gabrielarcosta@yahoo.com.br E-mail alternativo gabinut03@hotmail.com.br

Formação acadêmica/titulação

- 2013** Doutorado em Ciências dos Alimentos.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Efeito de extratos ricos em antocianinas e/ou elagitaninos de amora preta, amora silvestre e grumixama no crescimento e em marcas epigenéticas de diferentes linhagens de células humanas de câncer de mama.
Orientador: Thomas Prates Ong
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Palavras-chave: câncer de mama, in vitro, elagitaninos, antocianinas
Áreas do conhecimento : Nutrição Experimental, Ciência e Tecnologia de Alimentos
- 2011 - 2013** Mestrado em Ciências de Alimentos.
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
Título: ANÁLISE DOS TEORES DE ISOFLAVONAS E MINERAIS EM CULTIVARES DE SOJA TRANSGÊNICAS E COMERCIAIS. Ano de obtenção: 2013
Orientador: Renata Adriana Labanca
Co-orientador: Roberto Gonçalves Junqueira
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Setores de atividade : Alimentação
- 2003 - 2007** Graduação em Nutrição.
Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, Brasil

Formação complementar

- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Course for Reading Skills - Para Ler em Inglês. (Carga horária: 72h).
Number One, NUMBER ONE, Brasil

Atuação profissional

1. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP - FCF/USP

**Vínculo
institucional**

- 2015 - 2015** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Monitor Programa de Aperfeiçoamento de Ensino , Carga horária: 6, Regime: Parcial
Outras informações:
Monitora da Disciplina FBA0436-2- Nutrigenômica • Participação em reuniões que antecederam o início das aulas; • Auxílio na seleção do material bibliográfico a ser discutido; • Auxílio na elaboração das questões que servirão de roteiro de estudo para os alunos • Auxílio na mediação em aulas de discussão em grupo; • Acompanhamento de aulas teóricas e seminários apresentados pelos alunos de graduação; • Auxílio na correção dos exercícios e dossiês sob supervisão do professor responsável; • Auxílio no controle de faltas e envio de notificações aos alunos; • Auxílio na solução de dúvidas dos alunos na elaboração de relatórios e seminários.
- 2014 - 2014** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Monitor Programa de Aperfeiçoamento de Ensino , Carga horária: 6, Regime: Parcial
Outras informações:
Monitora da disciplina FBA0304 - Compostos Fenólicos Bioativos em Alimentos • Participação em reuniões que antecederam o início das aulas; • Auxílio na seleção do material bibliográfico a ser discutido; • Auxílio na elaboração das questões que servirão de roteiro de estudo para os alunos • Auxílio na mediação em aulas de discussão em grupo; • Acompanhamento de aulas teóricas e seminários apresentados pelos alunos de graduação; • Auxílio na correção dos exercícios e dossiês sob supervisão do professor responsável; • Auxílio no controle de faltas e envio de notificações aos alunos; • Auxílio na solução de dúvidas dos alunos na elaboração de relatórios e seminários.
- 2013 - Atual** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Aluna de Doutorado , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva
Outras informações:
Pesquisa e desenvolvimento , Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

2. Prefeitura Municipal de Santos Dumont / MG - PREF SANT DUMONT

**Vínculo
institucional**

- 2009 - 2010** Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Nutricionista Responsável - Merenda Escolar , Carga horária: 30, Regime: Parcial

3. DaimlerChrysler do Brasil Ltda. - DAIMLERCHRYSLER

**Vínculo
institucional**

- 2007 - 2007** Vínculo: Estagiária , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 43, Regime: Dedicção exclusiva
Outras informações:
Área de Atuação: Alimentação Institucional

4. Casa de Caridade de Viçosa - Hospital São Sebastião - HSS

**Vínculo
institucional**

- 2006 - 2007** Vínculo: Estagiária , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 4, Regime: Parcial
Outras informações:
Atuação : Realização de estágio na área de nutrição clínica, na Equipe de Terapia Nutricional (ETENUT) do Hospital São Sebastião, perfazendo uma total de 60 horas

Atividades

- 10/2006 - 03/2007** Extensão Universitária, ETENUT

*Especificação:
Realizou atividades na área de nutrição vinculada à Equipe de Terapia Nutricional (ETENUT)*

5. Universidade Federal de Viçosa - UFV

**Vínculo
institucional**

- 2007 - 2007** Vínculo: Estagiária , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 12, Regime: Parcial
Outras informações:
Atividades desenvolvidas: Auxílio no preparo de reagentes; Auxílio na lavagem, secagem de vidrarias; Auxílio no desenvolvimento da análise de fibras pelo método enzimático; Além de leitura e discussão de materiais científicos sobre assuntos relacionados ao estudo.
- 2007 - 2007** Vínculo: Estagiária , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 24, Regime: Parcial
Outras informações:
Atividades desenvolvidas: Realização de orientações nutricionais direcionadas aos participantes do estudo baseadas no diagnóstico nutricional previamente realizado; Aplicação de Inquérito de Frequência Alimentar específico; Análise dos dados coletados; Leitura e discussão de materiais científicos sobre assuntos relacionados ao estudo.
- 2006 - 2007** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Monitor I , Carga horária: 12, Regime: Parcial
Outras informações:
Ementa: Bio 244 Genética Humana Aspectos gerais da genética humana. As leis de Mendel na genética humana. Herança e sexo. Herança de caracteres complexos. Citogenética humana. Mutação gênica. Análise gênica de populações. Origem e evolução humana. Genética da imunidade e do câncer. Tecnologia genética e benefício humano.
- 2006 - 2006** Vínculo: Estagiária , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 2, Regime: Parcial
Outras informações:
Atividade Desenvolvidas: Avaliação e orientação nutricional específica conforme necessidade individual de cada adolescente.
- 2006 - 2006** Vínculo: Estagiária , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 10, Regime: Parcial
Outras informações:
Atividade desenvolvidas: Realização de visitas domiciliares às crianças no primeiro ano de vida,

residentes no município de Viçosa-MG. Aferição de peso e comprimento. Acompanhamento da avaliação do estado nutricional e das orientações nutricionais. Leitura e discussão de materiais científicos sobre assuntos relacionados ao estudo. Digitação de banco de dados no Programa Epi Info. Perfazendo carga horária total de: 280 horas

2005 - 2006 Vínculo: Estágio Extracurricular, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 8, Regime: Parcial
Outras informações:
Atuação: Revisão Bibliográfica em Alimentação Escolar; Colaboração na coleta de dados na área de Alimentação Escolar; Ajuda na análise de dados; Elaboração de material educativo. Perfazendo carga horária total de: 400 horas

2005 - 2005 Vínculo: Estagiária, Enquadramento funcional: Voluntária, Carga horária: 4, Regime: Parcial
Outras informações:
Participação em "Mutirão de avaliação antropométrica e diagnóstico de anemia em crianças menores de 2 anos residentes no bairro Amoras – Viçosa/MG" Atuação: Avaliação antropométrica e bioquímica das crianças.

2005 - 2005 Vínculo: Estagiária, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 12, Regime: Dedicção exclusiva
Outras informações:
Estágio Vinculado ao Projeto de Pesquisa: "Estado nutricional de ferro e vitamina A em crianças de 18 a 24 meses do município de Viçosa-MG" Atuação: Avaliação antropométrica de lactentes

Projetos

Projetos de pesquisa

2013 - Atual Efeito de extratos ricos em antocianinas ou elagitaninos de amora preta (*Rubus spp.*), amora silvestre (*Morus nigra L.*) e grumixama (*Eugenia brasiliensis Lam.*) no crescimento e em marcas epigenéticas de diferentes linhagens de células humanas de câncer de mama

Descrição: Este projeto teve como objetivo avaliar "in vitro" a ação dos extrato rico em antocianina e elagitaninos oriundo de amora preta, amora silvestre e grumixama em linhagens celulares humanas de câncer de mama.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Doutorado (1);

Integrantes: Gabriela Rezende Costa (Responsável); ; Thomas Prates Ong

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

Áreas de atuação

1. Bioquímica da Nutrição
2. Nutrição Experimental
3. Biologia Molecular

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Espanhol Compreende Razoavelmente, Lê Razoavelmente

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **TEIXEIRA, L. L.; COSTA, G. R.; DORR, F. A.; ONG, T.P.; PINTO, E.; LAJOLO, F. M.; HASSIMOTTO, N. M. A.**
Potential antiproliferative activity of polyphenol metabolites against human breast cancer cells and their urine excretion pattern in healthy subjects following acute intake of a polyphenol-rich juice of grumixama (*Eugenia brasiliensis Lam.*). *Food & Function*, **10**, v.8, p.2266 - 2274, 2017.
Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital
2. **REZENDE COSTA, GABRIELA; COUTO E SILVA, NILTON DE OLIVEIRA; GONTIJO MANDARINO, JOSÉ MARCOS; LEITE, RODRIGO SANTOS; CASTANHEIRA GUIMARÃES, NILSON CÉSAR; JUNQUEIRA, ROBERTO GONÇALVES; ADRIANA LABANCA, RENATA**
Isoflavone and Mineral Content in Conventional and Transgenic Soybean Cultivars. *American Journal of Plant Sciences*, v.06, p.2051 - 2059, 2015.
Palavras-chave: Glycine max, Genetically Modified Organism, Bioactive Compounds, ICP-OES, HPLC
Referências adicionais : Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [http://www.scrip.org/journal/ajps]

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. **LABANCA, R.A.; COSTA, G. R.; SILVA, N. O. C. E.; GUIMARÃES, N.C.C.; MANDARINO, J.M.G.; JUNQUEIRA, R.G.**
Isoflavone and mineral content in conventional commercial soybean cultivars and transgenic soybean planted in Minas Gerais, Brazil. In: ICWMEE 2014: XII International Conference on Waste Management and Environmental Engineering, 2014, Estocolmo.
ICWMEE 2014: XII International Conference on Waste Management and Environmental Engineering, 2014.., 2014. v.v. 1..
Referências adicionais : Suécia/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **COSTA, G. R.; PEDROSA, T.; ALBUQUERQUE, R.; MARIA-ENGLER, S.; LAJOLO, F.; HASSIMOTTO, N.; ONG, T.**
BLACKBERRY (*RUBUS SPP*) AND GRUMIXAMA (*EUGENIA BRASILIENSIS LAM*) ELLAGITANNINS-ENRICHED EXTRACTS INDUCE CELL DEATH IN HUMAN BREAST CANCER CELL LINES. In: 11 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2015, Campinas.
CIência de Alimentos: Qualidade de Vida e Envelhecimento Saudável., 2015.
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

2. COSTA, G. R.; CAMOES, J. G. S. A.; SILVA, N. O. C. E.; FERREIRA, A.N.M.; JUNQUEIRA, R.G. ; LABANCA, R.A.
"ANÁLISE DE MINERAIS EM SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA E COMERCIAL." In: XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos: 45 anos de Ciência e Tecnologia de Alimentos no Brasil, 2012, Campinas.
XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos ., 2012.
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
3. COSTA, G. R.; LABANCA, R.A.; GUIMARÃES, N.C.C.; SOUSA, T.C.
MODIFICATION GENICA: CONCORDANCE BETWEEN DECLARATION AND PRESENCE OF THIS IN SOYBEANS MARKETED IN THE CITY OF BELO HORIZONTE, BRAZIL. In: 16th IUFOST - 16th World Congress of Food Science and Technology : "Addressing Global Food Security and Wellness through Food Science and Technology", 2012, Foz do Iguaçu.
IUFOST - 16th World Congress of Food Science and Technology : "Addressing Global Food Security and Wellness through Food Science and Technology" ., 2012.
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital
4. COSTA, G. R.; LABANCA, R.A.; MANDARINO, J.M.G.; LEITE, R.S.; SOUSA, T.C.
PROFILE OF ISOFLAVONES IN GENETICALLY MODIFIED SOY In: 16th IUFOST - 16th World Congress of Food Science and Technology : "Addressing Global Food Security and Wellness through Food Science and Technology", 2012, Foz do Iguaçu.
IUFOST - 16th World Congress of Food Science and Technology : "Addressing Global Food Security and Wellness through Food Science and Technology" ., 2012.
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital
5. MARIA AMÉLIA RIBEIRO ELIAS; Fabiana de Faria Ghatti; COSTA, G. R.; Lidiane Aparecida Prata de Faria
" INGESTÃO DE GLUTAMINA E OCORRÊNCIA DE MUCOSITE EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA AUTÓLOGO, NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE JUIZ DE FORA, MINAS GERAIS " In: XVII Congresso Brasileiro de Nutrição Parenteral e Enteral / V Congresso Brasileiro de Nutrição Clínica, 2007, Florianópolis - SC.
CD: XVII Congresso Brasileiro de Nutrição Parenteral e Enteral / V Congresso Brasileiro de Nutrição Clínica ., 2007.
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
Número: 3886
6. Denise Félix Quintão; Maria do Carmo Fonstes de Oliveira; Nataly Lopes Viana; Elisa Zandonade; Gisele Kulmann Duarte Rodrigues; Clarissa Matos Nascimento; **COSTA, G. R.**
"ADEQUAÇÃO, ACEITABILIDADE E PREFERÊNCIAS DA ALIMENTAÇÃO ESCOLAR NA REDE MUNICIPAL DE ENSINO DE VIÇOSA-MG." In: XVI SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, VI SIMPÓSIO – MOSTRA CIENTÍFICA DA PÓS-GRADUAÇÃO E IV SIMPÓSIO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA, 2007, Viçosa.
CD: XVI Simpósio de Iniciação Científica, VI Simpós – Mostra Científica da Pós-Graduação e IV Simpósio de Extensão Universitária: Os rumos da universidade pública – Ciência , Sociedade e Cultura.. ., 2007.
Palavras-chave: Aceitabilidade e preferências
Áreas do conhecimento : Nutrição e Saúde
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
Setor CCB (Centro de Ciências Biológicas) Número do trabalho 630
7. MARIA AMÉLIA RIBEIRO ELIAS; Fabiana de Faria Ghatti; COSTA, G. R.; Lidiane Aparecida Prata de Faria
"ANÁLISE DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE PACIENTES ANTES E APÓS TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA AUTÓLOGO NO HOSPITAL UNIVERSITARIO DE JUIZ DE FORA" In: XVII Congresso Brasileiro de Nutrição Parenteral e Enteral / V Congresso Brasileiro de Nutrição Clínica, 2007
CD: XVII Congresso Brasileiro de Nutrição Parenteral e Enteral / V Congresso Brasileiro de Nutrição Clínica ., 2007.
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
Número: 3885
8. MARIA AMÉLIA RIBEIRO ELIAS; Fabiana de Faria Ghatti; COSTA, G. R.; Lidiane Aparecida Prata de Faria
"DIAGNÓSTICO NUTRICIONAL DE PACIENTES ANTES E APÓS TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA AUTÓLOGO, NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE JUIZ DE FORA, MINAS GERAIS " In: XVII Congresso Brasileiro de Nutrição Parenteral e Enteral / V Congresso Brasileiro de Nutrição Clínica, 2007
CD: XVII Congresso Brasileiro de Nutrição Parenteral e Enteral / V Congresso Brasileiro de Nutrição Clínica ., 2007.
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
Número: 3888
9. Marília Lelis Ribeiro; COSTA, G. R.; Amanda Gomes Ribeiro; Dayelle Sesana; SILVIA ELOIZA PRIORE
"INFLUÊNCIA DO DISTANCIAMENTO DA FAMÍLIA E DO EXAME VESTIBULAR NO COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE ESTUDANTES DE UM CURSO PRÉ-VESTIBULAR." In: II Congresso Mineiro de Alimentação e Nutrição – Alimentação e estilo de vida saudáveis.., 2007, Ouro Preto
CD: Anais II Congresso Mineiro de Alimentação e Nutrição – Alimentação e estilo de vida saudáveis.. ., 2007.
Palavras-chave: Comportamento Alimentar
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
Área: S Nome do Arquivo: S_254253
10. COSTA, G. R.; Flávia de Andrade Oliveira; Mariana Gonçalves; Clarissa M.Nascimento; Camila Gomes Canzian; Paulo Fernando do Glória Leal
"Análise sanitária de edificações, manipuladores, equipamentos, armazenamento e características de produtos frios e congelados em supermercados." In: XIX Congresso Brasileiro de Nutrição, 2006, São Paulo.
CD: CONBRANN 2006 – XIX Congresso Brasileiro de Nutrição - Temas Livres "Pôsteres" ., 2006.
Palavras-chave: Análise sanitária de edificações
Áreas do conhecimento : Nutrição e Epidemiologia e Ciência e Tecnologia dos Alimentos.
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
Código 1328
11. Nataly Lopes Viana; Sara Aparecida Vieira; Gisele Kulmann Duarte Rodrigues; Maria do Carmo Fonstes de Oliveira; COSTA, G. R.; Aline Eliane dos Santos; Tais Cristina Araújo Magalhães; Elisa Zandonade; Denise Félix Quintão; Clarissa Matos Nascimento; Karine Rodrigues da Silva; Rosa Maria Araújo; Aline Costa e Silva
"Avaliação do nível de adesão e razões para o consumo de Alimentação Escolar por crianças de primeira série do ensino fundamental de escolas municipais de Viçosa." In: XIX Congresso Brasileiro de Nutrição, 2006, São Paulo.
CD: CONBRANN 2006 – XIX Congresso Brasileiro de Nutrição - Temas Livres "Pôsteres" ., 2006.
Palavras-chave: Consumo de alimentação escolar
Áreas do conhecimento : Saúde Pública e Ensino
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
Código 774
12. DANIELLE G SILVA; ISABELA ROCHA DE OLIVEIRA; COSTA, G. R.; GREICY K C SILVA; SILVIA ELOIZA PRIORE; SYLVIA DO CARMO CASTROFANCESCHINI; DIRCE MARIASIULEM
"COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO E ANEMIA DE LACTENTES COM DOSES PROFILÁTICAS E TERAPÊUTICAS DE FERRO." In: 14º Congresso Latino-Americano de Nutrição, 2006, Florianópolis.
14º Congresso Latino-Americano de Nutrição ., 2006.
Palavras-chave: Crescimento e anemia de lactentes
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
Nome do arquivo: NS 0087
13. ALICE MARIA CARDOSO BARRETO; ISABELA ROCHA DE OLIVEIRA; **COSTA, G. R.**
"FATORES DETERMINANTES DOS NÍVEIS DE HEMOGLOBINA DE CRIANÇAS NÃO ANÊMICAS DE 5 A 6 MESES, VIÇOSA, MG." In: 8º Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva e 11º Congresso Mundial de Saúde Pública, 2006, Rio de Janeiro.
CD: Anais: Saúde Coletiva em um Mundo Globalizado: Rompendo barreiras sociais, econômicas e políticas ., 2006.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

Apresentação de trabalho e palestra

1. COSTA, G. R.; CAMOES, J. G. S. A.; SILVA, N. O. C. E.; FERREIRA, A.N.M.; JUNQUEIRA, R.G. ; SANTOS, R.A.L.A.
ANÁLISE DE MINERAIS EM SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA E COMERCIAL, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Centro de Convenções da UNICAMP; Cidade: Campinas - SP; Evento: XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos
2. COSTA, G. R.; SOUSA, T.C.; GUIMARÃES, N.C.C.; LABANCA, R.A.
MODIFICATION GENICA: CONCORDANCE BETWEEN DECLARATION AND PRESENCE OF THIS IN SOYBEANS MARKETING IN THE CITY OF BELO HORIZONTE, BRAZIL., 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Rafain Palace Hotel & Convention Center. Av. Olimpio Rafagnin, 2357 – P. Imperatriz; Cidade: Foz do Iguaçu - Paraná; Evento: 16th World Congress of Food Science and Techonology – IUFOST
3. COSTA, G. R.; SOUSA, T.C.; MANDARINO, J.M.G.; LEITE, R.S.; LABANCA, R.A.
PROFILE OF ISOFLAVONES IN GENETICALLY MODIFIED SOY, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Rafain Palace Hotel & Convention Center. Av. Olimpio Rafagnin, 2357 – P. Imperatriz; Cidade: Foz do Iguaçu - Paraná; Evento: 16th World Congress of Food Science and Techonology – IUFOST

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. COSTA, G. R.
Palestra: "Alimentação Saudável para Alunos de 3º, 4º e 5º ano do Ensino Fundamental", 2009. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
Referências adicionais : Brasil/Português. 3 horas.
2. COSTA, G. R.
Palestra: "Noções de Controle de Estoque e Porcionamento no Ambiente de Merenda Escolar", 2009. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
Referências adicionais : Brasil/Português. 3 horas.
3. COSTA, G. R.
Palestra: "Noções de Higiene e Grupos Alimentares", 2009. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
Referências adicionais : Brasil/Português. 3 horas.
Curso Ministrado aos responsáveis pela produção da Merenda Escolar
4. COSTA, G. R.
Palestra: "Alimentação Saudável para alunos de 1º e 2º anos do Ensino Fundamental", 2009. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
Referências adicionais : Brasil/Português. 3 horas.

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação Oral no(a) **Compostos Bioativos dos Alimentos**, 2016. (Simpósio)
Efeito de extratos ricos em antocianinas e/ou elagitannins de amora preta, amora silvestre e grumixama no crescimento e em marcas epigenéticas de células de câncer de mama.
2. **Compostos Bioativos dos Alimentos**, 2016. (Simpósio)
.
3. Apresentação (Outras Formas) no(a) **Nutrigenetics, Nutrigenomics and Precision Nutrition short-course**, 2016. (Outra)
Precision Nutrition.
4. Apresentação Oral no(a) **11 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos: "Ciência de Alimentos: Qualidade de Vida e Envelhecimento Saudável**, 2015. (Congresso)
BLACKBERRY (RUBUS SPP) AND GRUMIXAMA (EUGENIA BRASILIENSIS LAM) ELLAGITANNINS-ENRICHED EXTRACTS INDUCE CELL DEATH IN HUMAN BREAST CANCER CELL LINES..
5. **11 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos: "Ciência de Alimentos: Qualidade de Vida e Envelhecimento Saudável**, 2015. (Congresso)
.
6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **13o Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN**, 2015. (Congresso)
EFEITOS DO CONSUMO MATERNO E/OU PATERNO DE EXTRATO DE AMORA-PRETA (RUBUS SPP.) NA SUSCETIBILIDADE DA PROLE FEMININA À CARCINOGENESE MAMÁRIA QUIMICAMENTE INDUZIDA.
7. **13o Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN**, 2015. (Congresso)
.
8. **CURSO GENÔMICA NUTRICIONAL - 13o Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN**, 2015. (Congresso)
CURSO GENÔMICA NUTRICIONAL.
9. **FAESP Week US DAVIS in Brazil**, 2015. (Outra)
.
10. Apresentação de Poster / Painel no(a) **I FoRC Symposium: Advances in Food Science and Nutrition**, 2015. (Simpósio)
"Blackberry (rubus spp) and grumixama (eugenia brasiliensis lam) ellagitannins-enriched extracts induce cell death in human breast cancer cell lines..".
11. **I FoRC Symposium: Advances in Food Science and Nutrition**, 2015. (Simpósio)
.
12. **Mechanisms underlying developmental programming in metabolic diseases – insight into preventive strategies**, 2015. (Outra)
.

13. Palestra "Intestinal microbiota in Synthesis and Activation of Vitamin B12", 2015. (Outra)
14. Palestra "Prebiotics, Probiotics and Synbiotics and their Impact on Nutrients, Vitamins and Minerals, Vitamins and Minerals, 2015. (Outra)
15. Palestra "Mechanistic studies in an "in vitro" model of the colon to study the role of the gut microbiota in obesity", 2015. (Outra)
16. Protein Day 2013 | CEFAP USP, 2013. (Outra)
17. Simpósio "Aplicações da Metabolômica na Pesquisa em Alimentos, Nutrição e Agricultura", 2013. (Simpósio)
18. Apresentação de Poster / Painel no(a) 16th World Congress of Food Science and Technology – IUFOST, 2012. (Congresso)
Profile of isoflavones in genetically modified soy.
19. Apresentação de Poster / Painel no(a) 16th World Congress of Food Science and Technology – IUFOST, 2012. (Congresso)
Modification genica: concordance between declaration and presence of this in soybeans marketed in the city of Belo Horizonte, Brazil.
20. 16th World Congress of Food Science and Technology – IUFOST, 2012. (Congresso)
21. 6th Congress of the International Society of Nutrigenetics / Nutrigenomics, 2012. (Congresso)
22. Nutritional Genomics Introductory Workshop, 2012. (Oficina)
23. Curso/Programa: "Cozinha Brasil - Alimentação Inteligente", 2009. (Outra)
24. III Congresso Mineiro de Alimentação e Nutrição, 2009. (Congresso)
25. Minicurso: "Cortes Tradicionais e Artísticos de Vegetais", 2009. (Outra)
26. Minicurso: "Embalagem de Alimentos: Tipos, Aplicações e Meio Ambiente", 2009. (Outra)
27. Curso: Bioética, Educação e Saúde Pública, 2008. (Outra)
28. II Simpósio Internacional sobre Alimentos Funcionais, 2008. (Simpósio)
29. IX Semana Acadêmica de Nutrição – Saúde e Nutrição: Uma nova perspectiva., 2008. (Outra)
30. Mini Curso: "Softwares de auxílio aos profissionais de nutrição - Teknisa e Avanutri", 2008. (Outra)
31. Mini Curso: "Preparações Dietéticas", 2008. (Outra)
32. Mini Curso: "Primeiros Socorros em Situações Adversas", 2008. (Outra)
33. Mini Curso: "Queijos maturados por fungos", 2008. (Outra)
34. XVIII SIC / VIII SIMPÓS / VI SEU / II SEN - Universidade Federal de Viçosa., 2008. (Encontro)
35. Ciclo de Palestras : "Diferentes Abordagens Metodológicas na Compreensão da Gestante Adolescente", 2006. (Outra)
36. Ciclo de Palestras: Instrumentos de pesquisa em Nutrição e Saúde, 2006. (Outra)
37. Curso: Nutrição na Atividade Física, 2006. (Outra)
38. Evento: Elaboração e Implementação de Boas Práticas em Unidade de Alimentação e Nutrição, 2006. (Outra)
39. Oficina: "Gerenciamento de Unidades de Alimentação e Nutrição: nova exigência do mercado de trabalho e sistemas de gestão de qualidade." Realizada no XIX Congresso Brasileiro de Nutrição, 2006. (Oficina)
40. XIX Congresso Brasileiro de Nutrição, 2006. (Congresso)
41. Apresentação de Poster / Painel no(a) XIX Congresso Brasileiro de Nutrição, 2006. (Congresso)
"Análise sanitária de edificações, manipuladores, equipamentos, armazenamento e características de produtos frios e congelados em supermercados."
42. Palestra: Educação Nutricional do Paciente Diabético com Ênfase na Contagem de Carboidratos: Uma Visão Norte-Americana, 2005. (Outra)
43. XVIII Congresso Brasileiro de Nutrição, 2004. (Congresso)
44. VII Semana Acadêmica do Curso de Nutrição - Segurança Alimentar e Nutricional - Soberania, 2003. (Outra)

Organização de evento

1. COSTA, G. R.
Mechanisms underlying developmental programming in metabolic diseases – insight into preventive strategies, 2015. (Outro, Organização de evento)
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico	2
Trabalhos publicados em anais de eventos	14
Apresentações de trabalhos (Congresso)	3

Produção técnica

Curso de curta duração ministrado (outro)	4
---	---

Eventos

Participações em eventos (congresso)	13
Participações em eventos (simpósio)	6
Participações em eventos (oficina)	2
Participações em eventos (encontro)	1
Participações em eventos (outra)	22
Organização de evento (outro)	1

Outras informações relevantes

- 1 Cursou Disciplina de "Bioética Aplicada a Nutrição" do curso de Pós-Graduação Strictu Sensu em Ciência da Nutrição da Universidade Federal de Viçosa como aluna não vinculada.

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 26/06/2017 às 13:58:46.