

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO ANTITUMORAL INDUZIDO POR APOPTOSE E
AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO
EXTRATO AQUOSO DE *Punica granatum* Linn EM MODELO
MURINO**

TALITA SANTOS BASTOS

ARACAJU

Abril- 2014

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

TALITA SANTOS BASTOS

**EFEITO ANTITUMORAL INDUZIDO POR APOPTOSE E AVALIAÇÃO DE
EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO EXTRATO AQUOSO DE *Punica
granatum*Linn EM MODELO MURINO**

Dissertação de Mestrado submetida a banca examinadora para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente (PSA).

Orientador (es):

Prof^o Ricardo Luiz Cavalcanti Albuquerque Júnior, Ph. D

Prof^a Juliana Cordeiro Cardoso, Ph. D

ARACAJU

2014

**EFEITO ANTITUMORAL INDUZIDO POR APOPTOSE E
AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO
EXTRATO AQUOSO DE *Punica granatum* Linn EM MODELO
MURINO**

TALITA SANTOS BASTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE

Aprovado por:

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, Ph. D
Orientador

Juliana Cordeiro Cardoso, Ph. D
Orientador (a)

Isabel Lima-Verde, Ph. D
Examinador (a)

Rivadávio Fernandes Batista Amorim, Ph. D
Examinador

B327e Bastos, Talita Santos.
Efeito antitumoral induzido por apoptose e avaliação dos possíveis efeitos toxicológicos do extrato aquoso de *Punica granatum Linn* em modelo murino / Talita Santos Bastos; orientação [de] Dr^o Ricardo Luiz Calvacanti Albuquerque Júnior, Dr^a Juliana Cordeiro Cardoso. – Aracaju: UNIT, 2014.
140 f.: 23 cm

Ficha
Eliane Maria
Mendes

Inclui bibliografia.
Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente)

catalográfica:
Passos Gomes
CRB/5 1037

1. *Punica granatum Linn*. 2. Câncer. 3. Quimioterapia. Produtos naturais. I. Albuquerque Júnior, Ricardo Luiz Cavalcanti. II. Cardoso, Juliana Cordeiro. III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 615.28:615.322

ARACAJU

2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em primeiro lugar à Papai do Céu, que permitiu a concretização de um sonho por meio de suas benevolências, me suprimindo de saúde, energia, perseverança e fé pra concretizar meus ideais.

Aos meus pais, **Iêda Maria Machado Santos Bastos**, minha guerreira, batalhadora, desbravadora, meu amor incondicional que acompanha a minha trajetória de vida, sempre me dando coragem e forças pra seguir em frente e jamais me deixar abater pelos obstáculos, ao meu pai **Edésio Alves Bastos**, que sempre me apoiou em minhas decisões e me deu sábios conselhos nos momentos difíceis, trazendo-me ensinamentos de paz, equilíbrio e harmonia; ambos sempre lembrando dos ensinamentos de caráter e princípios para alcançar qualquer vitória.

Aos meus irmãos **Técio Santos Bastos** e **Tiago Santos Bastos**, que mesmo em silêncio, demonstram carinho, afeto e admiração.

A minha avó **Anita Machado Santos** sempre me enchendo de ânimo com o seu espírito jovem, determinado, guerreiro e sonhador.... Nossa, sua vitalidade é contagiante.

Ao meu companheiro **André Alves Franco** sempre paciente e carinhoso me acompanhando a cada trilha percorrida nessa jornada, me compreendendo, ajudando sempre que possível e me impulsionando a enfrentar qualquer batalha nessa vida, do seu lado me sinto imbatível.

AGRADECIMENTOS

Nossa é difícil agradecer a tanta gente que participou dessa minha jornada árdua na concretização de um sonho. Depois de tanto começo, desenvolvimento e recomeço fica difícil agradecer cada um merecidamente, mas vou tentar...

Em primeiro lugar, agradeço imensamente ao **Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior**, que desde de minha época de aluna de Iniciação Científica, acompanha meus passos na vida acadêmica e profissional e hoje, mais do que nunca agradeço profundamente à ele, que me motivou a adentrar de cabeça no meio acadêmico, confiando plenamente em mim desde a primeira vez. Foi e é um exemplo de profissional, o qual quero poder me espelhar, não somente pela sua competência, mas também pelo seu dom de ser um docente de corpo e alma, que dedica sua vida à academia e faz isso com um prazer indiscutível, além de deter uma bagagem de ensinamentos inesgotáveis. Obrigado professor, serei eternamente grata e me sinto honrada de poder ser sua aprendiz e poder fazer parte da sua rotina profissional, sei que tenho muito mais a aprender. Me sinto imensamente lisonjeada!

A **Prof. Dra. Juliana Cordeiro Cardoso**, que sempre esteve disposta, com um ânimo de revigorar qualquer energia, sempre muito dedicada, com um sorriso estampado e um olhar penetrante, mostrando que tudo é possível, iluminando a trilha para concluir essa jornada. Saiba que sempre te admirei profundamente pelo seu jeito simples de ser, sendo uma profissional de fibra, talento, mostrando que o meio acadêmico é realmente fascinante.

A minha “anja” **Grace Anne Dória Azevedo** que caiu do céu no momento de maior aflição e desespero, quando tudo parecia não ter mais solução, me norteando em uma jornada inesperada e fascinante que foi a realização desse projeto. Aprendi muito com ela, uma pessoa com uma sagacidade exímia, determinação e coragem. A **Ricardo Almeida Guimarães**, que juntamente com Grace auxiliou na efeticação desse projeto com carisma e atenção.

A **Gladston Luís Santos** que sempre esteve presente durante a execução do projeto no Biotério, sempre atencioso e com um sorriso contagiante, me auxiliando no que fosse necessário para o desenvolvimento experimental. Saiba que o biotério senti muito a sua falta e os acadêmicos mais ainda..rs!

A **Prof. Dra. Isabel Lima-Verde**, que sempre me atendeu prontamente e esteve presente nos momentos os quais eu a solicitava, mesmo com suas atribuições sempre estava disposta e motivada a ajudar. A **Prof. Dra. Margarete Zanardo Gomes** que, com o seu jeito meigo e harmonioso, transmite paz ao laboratório e incrivelmente demonstra, mesmo em silêncio, que no fim tudo dá certo. A **Prof. Dra. Francine Padilha** que sempre expôs seus argumentos em banca de maneira pertinente, contribuindo de fato para a evolução do trabalho, bem como na minha evolução na vida acadêmica.

Enfim, agradeço à todos que contribuíram na efetivação de etapas importantíssimas do trabalho, auxiliando de maneira construtiva para a coesão do mesmo.

Aos amigos acadêmicos **Marismar Fernandes Nascimento, Roberta Almeida Barbosa, Rodrigo Cavendish, Elber Ricardo, Igor Soares, Tatiana Torres, Ângela Valéria, Rosenelly Pereira Filho, Rafaela Oliveira,**... agradeço por fazer parte dessa história, cada um com sua contribuição peculiar significativa e memorável, em que nos momentos de dificuldades, apoiavam e até mesmo viraram motivo de muitas risadas.

Aos alunos de Iniciação Científica: **Rafael Valois**, sempre disposto a desempenhar o projeto, com muita simpatia, a **Genecy Calado e Cleveilton dos Santos**, que nesse momento se encontram fora do país, mas que acompanharam o nascimento do trabalho e **Danilo Barauna**, que compartilhou muitas horas no laboratório comigo, trabalhamos loucamente. Saiba que todos são pessoas fundamentais para o desenvolvimento do trabalho, cada uma teve sua participação mais que especial, além da amizade, que é algo mais que valioso a qual irei levar para o resto de minha vida. Obrigada!

E como esquecer de **Santo Expedito**, um Santo guerreiro, das causas justas e urgentes, muito obrigado por atender minhas preces, pois só eu sei o quanto me desesperei quando tudo parecia impossível diante de tantos obstáculos pelo caminho. Serei eternamente grata por toda a paciência e benfeitoria que me foi concedida. Amém!

SUMÁRIO

Introdução	1
Objetivo Geral	3
Objetivos Específicos	3
1. Fundamentação Teórica	5
1.1 Câncer	6
1.2 Incidência do Câncer	7
1.3 Ciclo Celular e o Câncer	8
1.3.1 Intérfase.....	9
1.3.2 Mitose	10
1.4 Carcinogênese.....	13
1.5 Crescimento tumoral.....	15
1.6 Imunidade e Câncer.....	16
1.6.1 Infiltração Tumoral e Células Imunes	18
1.7 Mecanismos de Controle das células tumorais	19
1.7.1 Autofagia.....	20
1.7.2 Necrose	21
1.7.3 Apoptose.....	22
1.7.4 TUNEL (<i>Terminal desoxinucleotidil uracil transferase nick end labeling</i>).....	26
1.8 Quimioterapia no Câncer e os Produtos Naturais	27
1.9 <i>Punica granatum</i> Linn	31
1.9.1 Constituintes químicos da <i>Punica granatum</i> Linn.....	32
1.9.1.2 Compostos Fenólicos.....	36
1.9.1. 3 Flavonóides.....	37
1.9.1. 4 Taninos	39
1.9.1.4.1 Taninos Hidrolisáveis	39
1.9.1.4.2 Taninos Condensados	40
1.9.1.5 Ácidos Fenólicos.....	41
1.9.15.1 Ácido Gálico.....	41

1.9.1.5.2	Ácido Elágico	42
1.9.1.6	Alcalóides	45
1.9.2	Atividades Biológicas já reportadas com os constituintes químicos presentes nos produtos naturais	46
1.9.3	Mecanismo Geral da Ação dos Polifenóis	49
1.9.4	Interferência das Funções Básicas pelos Compostos Fenólicos	50
1.9.5	Promoção da Apoptose por meio dos constituintes químicos presente nos produtos naturais	51
1.10	Detecção dos compostos químicos presentes nos produtos naturais através da Cromatografia	52
	2. Materiais e Métodos	53
2.1	Obtenção das amostras e do extrato aquoso de <i>Punica granatum</i> Linn.....	54
2.2	Triagem das amostras de <i>Punica granatum</i> Linn	54
2.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com espectrometria de Massa Acoplada (CLAE).....	56
2.4	Submissão do Projeto aos Protocolos de Ética com a Obtenção e Manutenção dos Animais Experimentais.....	56
2.5	Ensaio Biológico	56
2.6	Avaliação da Atividade Antitumoral em camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180	58
2.6.1	Princípio do Teste- Sarcoma 180	58
2.6.2	Obtenção das células tumorais do Sarcoma 180	59
2.7	Viabilidade Celular através do método de exclusão Azul de Tripán	59
2.8	Estudo da Atividade Antitumoral	60
2.9	Parâmetros avaliados	61
2.9.1	Avaliação da massa corpórea dos animais	61
2.9.2	Avaliação dos Parâmetros Hematológicos	62
2.9.3	Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos	62
2.9.4	Determinação do efeito do extrato aquoso de <i>Punica granatum</i> Linn na evolução da massa ponderal tumoral, volume e taxa de inibição de crescimento dos tumores.....	62
2.9.5	Avaliação anátomo-patológica e histomorfológica dos espécimes	63

2.10 Detecção de células apoptóticas através da técnica de TUNEL.....	63
2.11 Análise Estatística.....	64
3. Resultados.....	65
3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Espectrometria de Massa Acoplada (CLAE/ MS)	66
3.2 Análise da atividade antitumoral do extrato aquoso da casca de <i>Punica granatum</i> Linn (EAPG)	66
3.3 Análise dos efeitos adversos causados na administração do extrato aquoso da <i>Punica granatum</i> Linn (EAPG).....	70
4. Discussão	74
5. Conclusão.....	80
6. Referências.....	82
7. Anexos.....	108
7.1 Dados de submissão do artigo científico.....	109
7.1.2 Artigo Científico	110
7.2 Parecer consubstânciado do comitê de ética em experimentação animal (CEUA\UNIT).....	132

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Etapas da Intérfase celular: Ciclo Celular.....	10
Figura 2- Etapas da Mitose: Ciclo Celular	11
Figura 3- Ciclo Celular: Pontos de Checagem.....	13
Figura 4- Etapas da Carcinogênese.....	14
Figura 5- Crescimento tumoral primário	15
Figura 6- Principais tipos de morte celular	20
Figura 7- Vias da Apoptose.....	23
Figura 8- Esquema Sequencial do TUNEL.....	27
Figura 9- Estrutura química dos Compostos Fenólicos (Flavonóides, Ácidos Fenólicos e Taninos).....	37
Figura 10- Estrutura química dos Taninos Hidrolisáveis.....	40
Figura 11- Estrutura química do Ácido Gálico	41
Figura 12- Estrutura química do Ácido Elágico.....	42
Figura 13- Potencial anticâncer envolvendo os mecanismos de ação dos compostos fenólicos dos produtos naturais na carcinogênese.....	50
Figura 14- Registro Científico da amostra de <i>Punica granatum</i> Linn.....	54
Figura 15- Secagem das cascas de <i>Punica granatum</i> Linn (A) Casca <i>in natura</i> ; (B) Secagem das cascas em estufa de circulação; (C) e (D) Amostras das cascas obtidas após a secagem	55
Figura 16- Moinho de facas utilizado para a obtenção do granulado da casca de <i>Punica granatum</i> Linn.....	55
Figura 17- Acondicionamento e marcação dos animais experimentais	57
Figura 18- (A) Tumorsascítico em animal de manutenção; (B) Punção ascítica das células tumorais em animal de manutenção; (C) Contagem das células tumorais viáveis do Sarcoma 180 em microscopia óptica.....	60
Figura 19- Imobilização do animal para administração do extrato, bem como das substâncias relativas aos controles (positivo:5-FU\Negativo: Salina) via Intraperitoneal (ip)	61

Figura 20- Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (CLAE) do Extrato Aquoso da casca de *Punica Granatum* Linn. (1) Ácido Gálico; (2) Punicalagina α ; (3) Punicalagiana β e (4) Ácido Elágico 66

Figura 21- (A) Determinação da massa média e (B) do volume médio dos tumores nos diferentes grupos analisados. (C) Determinação da Taxa de Inibição do Crescimento Tumoral analisados nos grupos (em relação a massa tumoral do grupo tratado com salina). Os dados foram expressos como média \pm Erro padrão da média (EPM). *** Diferença significativamente estatística ($p < 0.001$) em comparação com o grupo tratado com salina; # Diferença significativamente estatística ($p < 0.05$) em comparação ao grupo tratado com 5-FU; * Diferença significativamente estatística ($p < 0.05$) em comparação com grupo tratado com 5-FU (ANOVA e Teste de Tukey).. 67

Figura 22- Fotomicrografias de seções histológicas do Sarcoma 180 coradas com Hematoxilina\Eosina. (A) Células tumorais de Sarcoma 180 (cs180) proliferação abaixo da epiderme (ep, seta dupla pontilhada), invadindo a derme subjacente (drm, seta dupla sólida). (B) Invasão e dissociação nos feixes de fibras musculares esqueléticas por células tumorais (msc). (C) Células tumorais (cs180) invadindo o tecido adiposo hipodérmico (d), e causando focos de necrose coagulativa tissular (ne). (D) Extensas áreas de necrose coagulativa (ne) limitada por células tumorais viáveis (*). (E) Detalhe do parênquima tumoral exibindo pleomorfismo celular e hiper cromatismo nuclear. (F1 e F2) Figuras de mitose típica e (F3E F4) e atípica (HE, A - D, x 100, E - F, x 800). 68

Figura 23- Marcação das células apoptóticas *in situ* através do método TUNEL em seções histológicas impregnadas em parafina de S-180 tratados com Salina, 5-FU e EAPG nas doses de 10, 25 e 50 mg/Kg. Células tumorais apoptóticas TUNEL-positivas apresentam coloração nuclear marrom escura. Observe a marcação bastante evidente nos grupos tratados com quimioterápico padrão 5-FU e com o EAPG em relação ao grupo tratado com salina (ampliação original de 800 x). 69

Figura 24- Avaliação do percentual médio de células tumorais marcadas positivamente pelo TUNEL. Os dados foram expressos em média \pm Erro Padrão da Média (EPM). Diferenças estatisticamente significativas entre os valores foram expressos como *($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) e *** ($p < 0.001$) em comparação com o grupo tratado com a salina (ANOVA e Teste de Tukey)..... 69

Figura 25- (A) Avaliação inicial e final da massa corpórea dos animais e (B) índice de perda de massa dos animais nos diferentes grupos ao longo do período experimental. Os dados foram expressos em média \pm Erro Padrão da Média (EPM). * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em comparação como o grupo tratado com Salina (ANOVA Teste de Tukey)..... 70

Figura 26- Fomicrografia do (A) fígado e (B) rins revelando a aparência arquitetural e citológica nos tecidos analisados sem maiores alterações em todos os grupos avaliados (HE, ampliação de 400 x)..... 73

Figura 27- Fotomicrografia de tecido esplênico. Polpa branca (pb) apresentando atrofia siginificativa no grupo tratado com 5-FU, mas mantendo o aspect arquitetural habitual nos demais grupos analisados (Salina, EAPG 10, 25 e 50 mg\Kg), Polpa vermelha (pv) se mostrou normal e semelhante em todos os grupos(HE, ampliação de 100 x). 73

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1- Ação biológica dos produtos naturais e os fitoquímicos envolvidos	46
Quadro 2- Fitoconstituintes da <i>Punica granatum</i> Linn e o seu potencial efeito biológico Anti-inflamatório e Anticâncer	47
Tabela 1- Distribuição dos grupos experimentais para avaliação do extrato aquoso da casca de <i>Punica granatum</i> Linn	58
Tabela 2- Efeito do extrato aquoso da <i>Punica granatum</i> Linn (EAPG) sobre os parâmetros bioquímicos dos animais transplantados com o Sarcoma 180.	71
Tabela 3- Efeito do Extrato aquoso da <i>Punica granatum</i> Linn (EAPG) sobre os parâmetros eritrocitários dos animais transplantados com o Sarcoma 180.	71
Tabela 4- Efeito do extrato aquoso da <i>Punica granatum</i> Linn (EAPG) nos parâmetros hematológicos- Leucograma coletados via plexo orbital nos animais translocados com Sarcoma 180.	72
Tabela 5- Efeito do extrato aquoso da <i>Punica granatum</i> Linn (EAPG) sobre a massa média dos órgãos dos animais transplantado com Sarcoma 180.	72

AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DO EXTRATO AQUOSO DE *Punica granatum*Linn SOBRE A TRANSLOCAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE SARCOMA 180

A quimioterapia é uma forma de tratamento antineoplásico que, por não apresentar seletividade, tem ação em todas as células ciclantes do organismo, causando vários efeitos colaterais. Em vista disto, pesquisas envolvendo produtos naturais vêm sendo realizadas na busca de terapias adjuvantes alternativas aos quimioterápicos sintéticos. Tem sido demonstrado que extratos de *Punica granatum*L. apresentam importante atividade antitumoral. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar o efeito da administração do extrato aquoso da casca de *Punica granatum*Linn (EAPG) sobre o crescimento tumoral de células de Sarcoma 180 em camundongos. Para tanto, o EAPG foi submetido à análise cromatográfica (CLAE) para identificar e quantificar os compostos químicos majoritários. Para o ensaio biológico, células de s-180 foram transplantadas para 60 camundongos divididos em 05 grupos (n=12): (CTL-), tratados apenas com solução salina; (CTL+) tratados com 5-Fluoracil (5-FU); e os grupos tratados com 10, 25 e 50 mg/Kg de EAPG (PG10, PG25 E PG50, respectivamente). Após sete dias os tumores foram produzidos e posteriormente os animais foram eutanasiados, realizando concomitantemente a excisão dos tumores, bem como dos órgãos de interesse, tais como fígado, rins e baço, em que posteriormente estes foram pesados e processados histologicamente. Também foram avaliados o leucograma e indicadores bioquímicos de função renal e hepática dos animais. Os dados foram analisados por meio do teste ANOVA com extensão *post-hoc* de Tukey. Apenas o 5-FU induziu redução na massa corpórea dos animais experimentais ($p < 0,05$). Todos os tratamentos testados promoveram redução na massa tumoral em relação ao tratamento com solução salina ($p < 0,001$), sendo a taxa de inibição de crescimento das doses de 10 e 50 mg/kg estatisticamente comparáveis ao 5-FU ($p > 0,05$). O 5-FU promoveu atrofia esplênica e leucopenia, alterações não produzidas pelo EAPG. As doses de 25 e 50 mg/kg do EAPG, bem como o 5-FU, promoveu alterações bioquímicas compatíveis com distúrbios funcionais renais ($p < 0,05$). Concluiu-se que a administração intraperitoneal do EAPG nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg apresentou atividade antitumoral em modelo experimental murino com células de sarcoma 180 transplantado, sendo as doses de 10 e 50 mg/kg as mais eficazes. No entanto, os dados bioquímicos sugerem toxicidade renal nas duas doses mais altas testadas neste estudo.

Palavras-chaves: *Punica granatum*Linn, câncer, quimioterápico e produtos naturais

INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado pelo crescimento descontrolado de células que sofreram mutações de genes que controlam o crescimento e a mitose celular (Rosas *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2005). Constitui basicamente de uma enfermidade nas células que não apresentam mecanismos de desvios de controle responsáveis pela proliferação e diferenciação celular (Oliveira & Alves, 2002).

O câncer representa um conjunto de mais de 100 doenças e é qualificado por ser uma enfermidade complexa com potencial mutacional, proliferativo, com crescimento celular descontrolado e atípico, em que as células neoplásicas podem invadir tecidos e órgãos adjacentes, com capacidade migratória para regiões distantes do organismo definindo o conceito de metástase (Kumar *et al.*, 2004; INCA, 2010).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima cerca de 580 mil novos casos novos de câncer para o ano de 2014. De acordo com a World Health Organization (2011) estima-se que em 2020 o número de casos anuais novos seja de ordem de 15 milhões, estimando-se que cerca de 60% desses novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento (INCA, 2012). A Organização Mundial da Saúde (OMS - 2013) realizou uma projeção de 27 milhões de novos casos de câncer para o ano de 2030 em todo o mundo, com uma estimativa de 17 milhões de óbitos causados pela instalação de células tumorais. De acordo com a OMS, os países em estágio de desenvolvimento serão os mais afetados. Sendo assim, o controle das doenças malignas demanda o aprofundamento no conhecimento dos mecanismos complexos de regulação molecular intracelular, passando pela seleção de moléculas bioativas com propriedades antitumorais até a instalação de hábitos e estilo de vida individual, os quais poderão contribuir para a diminuição da instalação da doença.

O tratamento do câncer é usualmente realizado através de radioterapia e/ou quimioterapia. A quimioterapia é o método terapêutico mais utilizado, porém apresenta uma série de efeitos colaterais, muitas vezes necessitando de descontinuidade no tratamento até recuperação parcial do paciente (Oliveira *et al.*, 2009).

Com o aumento da incidência mundial do câncer, grandes esforços têm sido realizados na busca da cura ou controle desta enfermidade. Diversos produtos farmacêuticos são utilizados para o tratamento de neoplasias. As particularidades biológicas inerentes a cada tipo de tumor, assim como a resistência aos quimioterápicos é o que impulsiona a pesquisa de novos constituintes químicos potencialmente ativos contra as células tumorais (Cruz *et al.*, 2009). Neste sentido,

produtos naturais apresentam uma ampla variedade de constituintes químicos bioativos, com estrutura química altamente complexa, que podem ser capazes de atingir a eficácia antitumoral, com efeitos colaterais diminuídos.

De acordo com Atkins (2006) e Fischer *et al.* (2007) a identificação da progressão tumoral está possibilitando o desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas tendo como alvo células presentes no microambiente tumoral, enfatizando a importância da elaboração de novas estratégias com o restabelecimento do controle do ciclo celular por meio de agentes que atuem nos pontos de checagem, disponibilizando de estratégias viáveis na terapia anticâncer. Neste sentido, o modelo sarcoma 180 pode ser utilizado para avaliar a ação de componentes físicos, biológicos e químicos sobre o crescimento, patogênese, imunologia, cinética e terapia de células tumorais (Stewart *et al.*, 1959).

Apesar de várias drogas clássicas derivadas de plantas terem sido substituídas pelos fármacos sintéticos, alguns produtos naturais têm recebido atenção especial de acordo com os seus potenciais ativos biológicos. Diversos estudos têm reportado a ação antitumoral provenientes dos produtos naturais (Kähkönen *et al.*, 1999; Dorman *et al.*, 2003). De acordo com Kim *et al.* (2002) e Lansky *et al.* (2005), a *Punica granatum* Linn, conhecida como romã, contém componentes capazes de suprimir a invasão de células tumorais. Tem sido discutido que extratos de *Punica granatum* obtidos a partir de solventes polares, como metanol e etanol, tem apresentado atividade antitumoral em linhagens celulares malignas derivadas de adenocarcinomas de mama (Dikmen *et al.*, 2011) e próstata (Sepehr *et al.*, 2012), bem como de rabdomiossarcomas (Gany *et al.*, 2010). Além disso, também foi relatado que extratos etanólicos e aquosos da casca da romã apresentam atividade antitumoral contra células cancerígenas prostáticas (Malik *et al.*, 2005).

Diante do exposto, este trabalho apresenta como objetivo avaliar a atividade antitumoral do extrato aquoso da casca de *Punica granatum* Linn, por meio dos constituintes químicos presentes na mesma, frente ao Sarcoma 180 transplantados em modelo murino.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Avaliar a atividade antitumoral e efeitos adversos *in vivo* da administração do extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum Linn* frente a células tumorais viáveis de Sarcoma 180 transplantadas em modelo murino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Caracterizar o extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum Linn* por meio de técnicas cromatográficas.
- ✓ Analisar a atividade antitumoral do extrato aquoso da casca de *Punica granatum Linn* frente células tumorais de Sarcoma 180 transplantadas.
- ✓ Avaliar as características histopatológicas dos tumores induzidos pela transplantação das células viáveis do Sarcoma 180
- ✓ Analisar o efeito do extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum Linn* sobre a apoptose de células tumorais transplantadas.
- ✓ Avaliar o efeito do extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum Linn* sobre os parâmetros bioquímicos de função hepática e renal.
- ✓ Avaliar o efeito do extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum Linn* sobre os parâmetros hematológicos (série branca e série vermelha).
- ✓ Avaliar as características anatomopatológicas do fígado, rins e baço dos animais submetidos aos tratamentos com extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum Linn* e quimioterápico padrão.

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 CÂNCER

A etiologia do câncer aparece em alguns dos primeiros registros reportados em tumores ósseos fossilizados em múmias do Egito Antigo, havendo também registros em manuscritos antigos. Os registros mais antigos de seu aparecimento são atribuídos à Hipócrates (460 a.C.), enquanto a característica destruidora da doença foi citada por Galeno, médico grego, considerando o câncer como um mal incurável (Silva, 2005; Trincaus, 2005; Kummar *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2005).

A origem da palavra câncer vem do grego *Karkinos* e do latim *Câncer*, ambos significando caranguejo. Este termo tem sido utilizado universalmente devido sua analogia com a morfologia do crustáceo, uma vez que as neoplasias são caracterizadas por apresentarem crescimento celular infiltrativo (Chiattonne, 1996; Silva, 2005).

Para que as células tumorais sejam formadas, deve haver um processo denominado de oncogênese, também conhecido como carcinogênese. A oncogênese é caracterizada por alterações que ocorrem no DNA celular através de mutações de genes responsáveis por controlar o crescimento e a mitose celular. Esses genes mutantes são conceituados de oncogenes. De acordo com Carlo & Croce (2008), dois ou mais oncogenes devem estar presentes em uma célula para que ela possa ser considerada cancerosa. O surgimento de células que apresentam uma seqüência de mutações ou alterações genéticas pode ser resultante de uma variedade de fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos estão relacionados com mutações geneticamente herdadas ou erros aleatórios na replicação do DNA. Já os extrínsecos têm relação com danos e instabilidade genéticas induzidas por agentes externos, sendo eles: agentes físicos, como radiação, agentes químicos, tais como substâncias químicas capazes de alterar o material genético celular ou ainda por meio de agentes microbiológicos, como vírus e bactérias. É importante destacar que uma única mutação, dificilmente procede na formação de um tumor. Para que esse processo se instale são necessárias várias mutações efetivando a modificação genética celular, que progressivamente irá interferir nos mecanismos responsáveis pela proliferação, diferenciação celular (Mantovani *et al.*, 2009; Lodish *et al.*, 2004).

Defeitos nos mecanismos de proliferação celular normal são característicos de células tumorais. De acordo com Hanahan & Weinger (2000), uma das características marcantes das células cancerosas malignas estão atribuídas à auto-suficiência de sinalização de fatores de crescimento, apresentando insensibilidade aos inibidores do

crescimento, com capacidade de inibição do comando de morte celular, em especial a apoptose, além de um potencial replicativo ilimitado, com capacidade de formação de novos vasos podendo resultar em invasão e metastatização das células tumorais, implicando à crescente malignidade tumoral.

O evento de anormalidades metabólicas decorrentes do câncer, assim como os processos invasivos e metastáticos, culmina em enfermidade e possível morte do paciente, podendo ser minimizada apenas com o tratamento antineoplásico (Katzung, 2003; Bezerra, 2008).

As células tumorais adquirem características metabólicas e capacidades biológicas diferenciadas quando comparadas com as células não mutadas, como mencionados anteriormente. Tais características das células tumorais são dadas pela proliferação celular por meio da realização de mitoses desfiguradas. A imortalização celular ocorre devido à ativação de enzimas telomerasas, alterações cromossômicas, perdas das propriedades de adesão das células tumorais à membrana plasmática, perda de funcionalidade e conseqüentemente perda da especialização celular (Jain & Ward-Hartley, 1994; Dominique, 2003). Sendo assim, é importante salientar que todos os casos de neoplasias estão intimamente relacionados com vias de transmissão de sinais biológicos, envolvendo o controle positivo e negativo do ciclo celular e a morte celular programada denominada de apoptose (Liotta & Kohn, 2001; Pinto & Felzenszwalb, 2003; Nussbaum *et al.*, 2008).

A classificação das neoplasias encontra-se relacionadas com os tipos celulares que lhe deram origem, baseado no componente parenquimatoso e não com os tecidos em que as células tumorais se proliferaram (WHO, 1956; WHO, 1957; IARC WHO, 2004).

1.2 INCIDÊNCIA DO CÂNCER

Segundo KUMAR *et al.* (2004), as observações relativas à etiologia do câncer são relativas aos estudos epidemiológicos existentes que relacionam o ambiente, os fatores geneticamente herdados e as influências culturais com a incidência de neoplasias malignas. Desde 2003, o câncer tem sido considerado a segunda causa de morte com uma incidência anual extremamente elevada (Srivastava *et al.*, 2005).

Em 2012, esperava-se 257.870 casos voltados ao sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino em toda a população mundial. No Brasil, a estimativa para o ano de 2013 não foi diferente ao ano de 2012, apresentando este último um dos maiores picos de incidência já registrados até então, com uma ocorrência de 518.510 casos

novos de câncer. A exceção do câncer de pele não melanoma, os tipos mais incidentes de câncer serão os de próstata e pulmão acometendo mais ao sexo masculino e câncer de mama e colo do útero incidindo o sexo feminino, havendo um acompanhamento deste mesmo perfil para toda América Latina (INCA, 2012).

Segundo relatório da Agência Internacional para a pesquisa em Câncer (IARC)/ Organização Mundial da Saúde (OMS), a incidência do câncer mais que dobrou nos últimos 30 anos. Para o ano de 2015, estima-se que ocorra cerca de 60,8 milhões de óbitos em todo o mundo, em que 9,2 milhões (15,13%) estarão relacionados com neoplasias, já para 2030 a estimativa é de 11 milhões (17,5%) das causas de óbitos mundiais, em que estas estarão intimamente ligadas ao câncer (Flemming, 2003; Health Statistics And Informatics Department, 2008; Boyle & Levin, 2008; INCA, 2012).

De acordo com os dados supracitados fica evidente a necessidade continuada voltada ao investimento e ao desenvolvimento de ações pertinentes para minimizar a incidência do câncer, nos diferentes estágios de atuação, desde a profilaxia, com promoção de saúde e identificação precoce, até a assistência aos pacientes, incluindo a formação de recursos humanos, na gestão do Sistema Único de Saúde (SUS) e principalmente na pesquisa científica (INCA, 2012).

1.3 CICLO CELULAR E O CÂNCER

O surgimento celular está relacionado com a fusão ou divisão de duas células. Tal processo ocorre de forma ordenada e organizada. O processo de iniciação do ciclo celular ocorre por meio de replicação, envolvendo anteriormente um período de crescimento celular seguido pela divisão, caracterizando dessa forma o ciclo celular (Almeida *et al.*, 2005).

Entende-se por ciclo celular o processo em que uma célula somática duplica o seu material genético gerando em seguida duas células filhas geneticamente semelhante. O papel do ciclo celular é controlar o crescimento e a divisão das células do organismo, e, portanto trata-se de um processo evolutivo e concomitantemente conservativo. A estimulação para que haja o crescimento se inicia com a liberação de fatores de crescimento que se ligam às membranas celulares por meio de receptores dos fatores de crescimento desencadeando ativação de uma cascata de proteínas transdutoras de sinais. Após a ligação do fator de crescimento a um receptor específico, ocorre a ativação do mesmo por meio da proteína transmembrana responsável por ativar proteínas transdutoras de sinais presentes, tais proteínas ficam

localizadas no citoplasma e é efetivada através do domínio interno do receptor. Tem-se a transmissão do sinal propriamente dita através das proteínas transdutoras que enviam sinais até o núcleo, onde ocorre a ativação das proteínas regulatórias nucleares, culminando na iniciação e progressão do ciclo celular (Keith *et al.*, 2005).

O ciclo celular de uma célula não tumoral é dividido didaticamente em etapas compreendendo a **intérfase** com as fases G0, G1, S e G2 e a **mitose** denominada de fase M.

1.3.1 INTÉRFASE:

A intérfase (**Figura 1**) apresenta a fase G0, em que a estrutura de DNA encontra-se enovelada e não apta para replicação celular. Em G1 as células são estimuladas a se multiplicar, respondendo a estímulos positivos ou negativos, promovendo crescimento, diferenciação, multiplicação ou apoptose, bem como a produção de enzimas e outras moléculas necessárias para as próximas fases do ciclo. No início de G1, ocorre a síntese de ciclina D, que se liga a CDK4 e CDK6, promovendo a síntese de ciclina E, que se liga a CDK2. Estes três complexos (CDK4-ciclina D, CDK6- ciclina D e CDK2-ciclina E) irão atuar na fosforilação da proteína pRb (proteína retinoblastoma) ativando a transcrição de vários genes, cujo os produtos são necessários para que as células progridam para a fase S. É importante ressaltar que, a proteína pRb não fosforilada permanece ligada ao E2F, impedindo que a célula saia do estágio G1 e entre na fase S, todavia uma vez fosforilada libera E2F permitindo a progressão do ciclo. As proteínas inibidoras de cinases dependente de ciclinas (CKIs) p21, p53 e p57 exercem um controle negativo sobre a proteína pRb bloqueando a atividade de cinase impedindo que a célula saia do estágio G1, sendo importantes por exercerem função de bloqueio na proliferação de células tumorais, sendo denominadas como genes supressores de tumor (Keith *et al.*, 2005).

No estágio S, ocorre a síntese de DNA, em que a ciclina ACDK-2 apresenta uma importante função, auxiliando na deseicoidização da estrutura de dupla fita a fim de que seja replicada, sendo destruídas em G2, impedindo nova duplicação. Em G2 ocorre a síntese de RNA e de proteínas, caracterizada pela condensação de cromatina e ativação do Fator Promotor de Mitose (MPF) dando continuidade do ciclo celular seguido pelo estágio M (mitose). Na fase M ocorre a divisão resultando em duas células filhas por meio da mitose (Brown & Gatter, 1990; Gerdes *et al.*, 1984; Keith *et al.*, 2005).

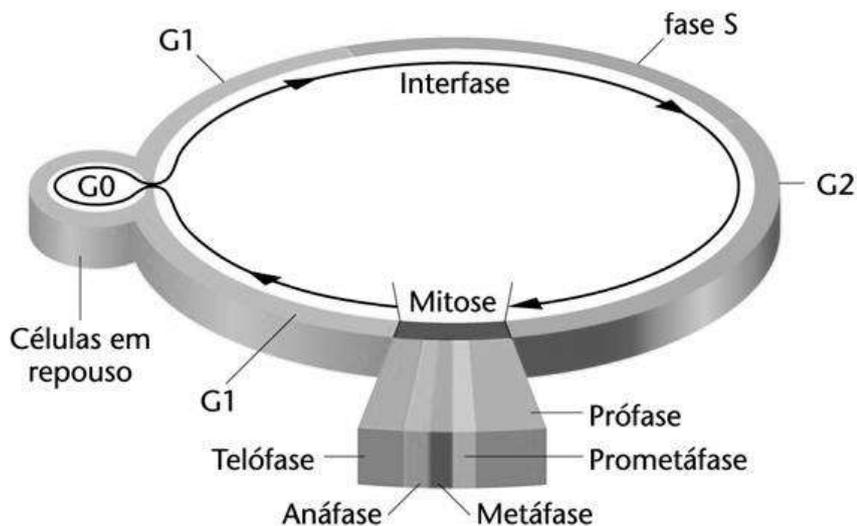


FIGURA 1: Etapas da Intérfase celular- Ciclo celular
FONTE: Carvalho, (2013)

1.3.2 MITOSE

Após o estágio de G2 termina a interfase e inicia-se a fase M (mitose) (**Figura 2**), em que ocorre a divisão celular propriamente dita. Esta fase é caracterizada por apresentar cinco estágios, sendo 1- Prófase: ocorrendo a condensação cromossômica; 2 - Prometáfase: desestruturação do envoltório nuclear; 3 - Metáfase: placa equatorial; 4 - Anáfase: separação das cromátides-irmãs; 5 - Telófase: cromossomos em pólos opostos (Keith *et al.*, 2005).

Todos os processos que envolvem o ciclo celular necessitam de um intenso controle por retroalimentação assegurando que todas as etapas moleculares sejam bem seqüenciadas e orientadas de forma correta. Tais mecanismos de ordem são mediados pelas ciclinas, quinases e ciclinas dependentes (CDK's) e por seus inibidores (Fischer *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2004).

Cada fase do ciclo possui os chamados checkpoints, que podem levar a parada da progressão do ciclo celular e a ativação de mecanismos de reparo (Malumbres *et al.*, 2007). Uma vez que as células progredam para a fase seguinte sem passar pelos checkpoints o dano ao DNA e/ou mal funcionamento das organelas e estruturas podem ativar a parada do ciclo e estas podem sofrer apoptose, uma vez que o dano não seja reparado (Foster, 2008). Os pontos de checagem, conhecidos como checkpoints voltados ao DNA operam na transição da fase G1 para S durante e depois da fase de síntese do DNA e antes das células entrarem em mitose (Fischer *et al.*, 2004).

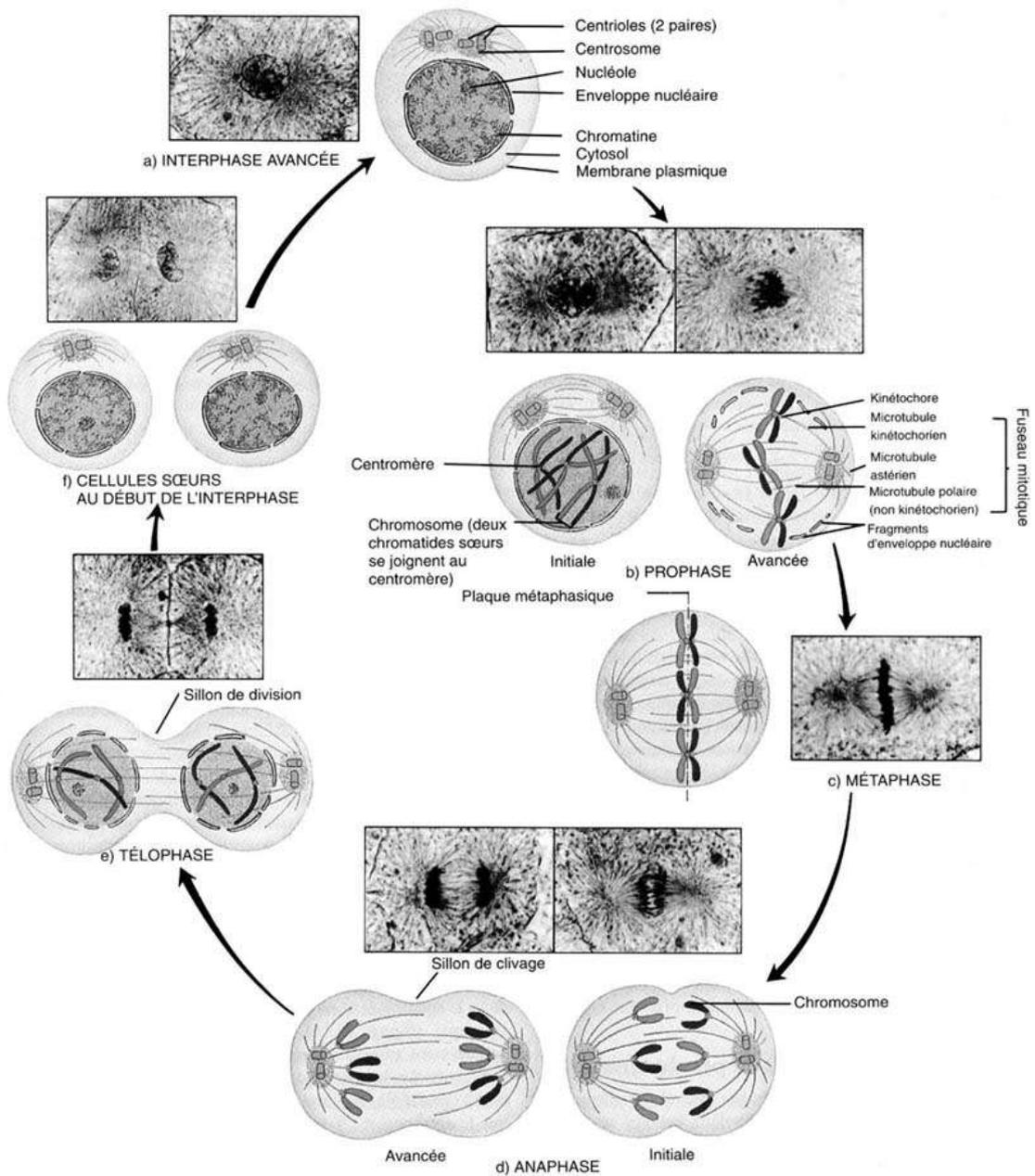


FIGURA 2: Etapas da Mitose -Ciclo Celular

FONTE: http://clq-les-sablons-buzancais.tice.ac-orleans-tours.fr/eva/sites/clq-les-sablons-buzancais/IMG/jpg/Mitose_NB.jpg

Nas células cancerosas, os pontos de checagem são geralmente ignorados gerando assim instabilidade genética e vantagem proliferativa das células neoplásicas quando comparadas com as células normais (Fischer *et al.*, 2004).

As ciclinas são proteínas chaves do ciclo celular, que em conjunto com as quinases dependentes de ciclina (CDK's) formam o complexo ciclina-CDK responsável

por coordenar a progressão do ciclo celular (Malumbres *et al.*, 2007). Tal complexo é constituído por uma subunidade reguladora (ciclina) e uma catalítica (CDK) (Bettencourt-Dias *et al.*, 2004). A atividade das ciclinas é modulada por modificações nos níveis de expressões de RNAm quanto nos níveis de proteínas. Dessa forma as ciclinas são sintetizadas em cada uma das fases que envolvem o ciclo celular (Foster, 2008).

A pRb, proteína retinoblastoma é responsável por controlar a expressão de genes que comprometem as ciclinas que estão nos pontos de checagem na intersecção G para S. No início da fase G ela se encontra hipofosforilada, reprimindo dessa forma o avanço do ciclo celular, uma vez que impede a atividade do fator de transcrição E2F. Já próximo ao ponto de restrição, os complexos ciclina D-CDK4 e 6 e o complexo ciclina E-CDK2 hiperfosforila pRb, liberando E2F, promovendo a entrada na fase S (Almeida *et al.*, 2005). Uma vez que ocorra mutação no gene pRb, há uma desregulação no ciclo e mesmo que a célula não se encontre preparada para entrar em fase S, o ciclo progride (Maddika *et al.*, 2007). Todo esse processo ocorre, devido ao fato que o gene pRb é reconhecido como um supressor de tumor, uma vez que é capaz de cessar o ciclo, auxiliando no reconhecimento dos erros gerados no ciclo celular. Devido a isso, mutações pertinentes a pRb são frequentemente encontradas em tumores (Almeida *et al.*, 2005).

As células tumorais são caracterizadas por apresentarem perdas no controle da proliferação celular, tornando-se independentes quanto aos sinais mitogênicos para a sua progressão por meio das fases do ciclo celular (Hanahan & Weinberg, 2000; Louro *et al.*, 2002). Tal perda no controle de proliferação celular envolve mutações em genes reguladores do ciclo, mais precisamente os protooncogenes e os genes supressores de tumores (Louro *et al.*, 2002; Foster, 2008). Sendo assim, alterações quanto às regulações do ciclo, tornam as células aptas em acumular uma série de mutações contribuindo significativamente para o surgimento de células neoplásicas, caracterizadas por serem auto-suficientes quanto a sinalização de fatores de crescimento, apresentando insensibilidade aos inibidores de crescimento, evasão dos mecanismos de apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese e invasão tecidual (Hanahan & Weinberg, 2000; Louro *et al.*, 2002; Foster, 2008).

Por conseguinte, as células neoplásicas diferem das células normais, pois apresentam a capacidade de continuarem crescendo e dividindo-se, não obedecendo ao controle biológico e fisiológico do organismo normal através dos pontos de checagem (Figura 3) (Hanahan & Weinberg, 2000).

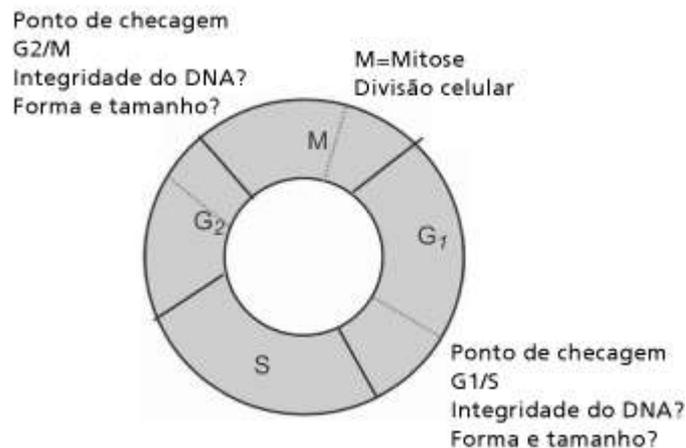


FIGURA 3: Ciclo Celular e Pontos de Checagem
FONTE: ALBERTS *et al.* (2001)

1.4 CARCINOGENESE

A carcinogênese, processo de formação das células neoplásicas, ocorre geralmente de forma lenta, podendo levar anos para que a célula cancerosa possa ser detectada. Pode se iniciar de forma espontânea ou ser provocada pela ação de agentes carcinogênicos (químicos, físicos ou biológicos). Em todos os casos, se observa o processo de indução de alterações mutagênicas e não-mutagênicas ou epigenéticas nas células afetadas.

É importante ressaltar que independentemente da exposição à carcinógenos, as células normalmente sofrem processos de mutações espontâneas, que não apresentam a capacidade de alterar o desenvolvimento normal da população celular como um todo, sendo esse um processo fisiológico que ocorre durante a longevidade vital. Tais fenômenos incluem danos oxidativos, erros de ação das polimerases e das recombinases, redução e reordenamento cromossômico. A vigilância imunológica, como mecanismo de correção ou exclusão das células mutagênicas, e fenômenos de mutações espontâneas podem condicionar uma maior ou menor instabilidade genômica e serem cruciais nos processos iniciais da carcinogênese, como consequência de aneuploidia e ampliações genéticas (Sawyer *et al.*, 2007).

O processo de carcinogênese (**Figura 4**) é dividido em três estágios: iniciação, promoção e progressão, que culminam na formação tumoral (Spandidos, 1985;

Chabner & Longo, 1996; Spence & Jonhston, 2001; Kummar *et al.*,2004; Spandidos, 2007).



FIGURA 4: Etapas da Carcinogênese
FONTE: Talita Santos Bastos, 2013(Fonte própria).

O primeiro estágio da carcinogênese é denominado de iniciação. Nesse momento as células sofrem ação dos agentes carcinogênicos também designados agentes oncoiniciadores, que apresentam a capacidade de provocar modificações em alguns genes celulares antes inalterados. Nesta fase as células sofrem alterações genéticas, no entanto, ainda não é possível se detectar um tumor clinicamente (Chabner & Longo, 1996; Spence & Jonhston, 2001; Kummar *et al.*,2004; Jung *et al.*, 2006).

Após o processo de iniciação ocorre o estágio conhecido como promoção, em que as células geneticamente modificadas, também denominadas de iniciadas sofrem efeito prolongado dos agentes oncopromotores induzindo, desta forma a expressão de proto-oncogenes. A célula iniciada é transformada em célula maligna, sendo este um processo que ocorre de forma lenta e gradual. A suspensão do contato com o agente oncopromotor pode, muitas vezes, interromper a continuidade da promoção tumoral (Spence & Jonhston, 2001; Kummar *et al.*,2004; Klauning & Kamendulis, 2008).

O terceiro e último estágio é denominado de progressão, consiste na multiplicação descontrolada, sendo caracterizado por ser um processo irreversível. Neste estágio, o tumor maligno já está em desenvolvimento no microambiente favorável com capacidade de evolução até o surgimento das primeiras manifestações

clínicas da doença. (Spence & Jonhston, 2001; Kummar *et al.*,2004; Jung *et al.*, 2006; Spandidos, 2007).

1.5 CRESCIMENTO TUMORAL

As células neoplásicas, bem com as células normais, se dividem mais rapidamente quando seus volumes são menores e mais lentamente quando os volumes teciduais ou tumorais são maiores. Tais eventos levam a um crescimento exponencial com pequenos tempos de duplicação em tumores de menor volume. A fração proliferativa tumoral decresce à proporção que o mesmo cresce, aumentando consequentemente o seu tempo de duplicação. De acordo com esses conhecimentos sobre a cinética celular (**Figura 5**), quanto menor o tumor, maior a sua fração proliferativa, portanto mais sensível aos medicamentos antineoplásicos, como ocorre na quimioterapia e às radiações ionizantes, que ocorrem na radioterapia. Outro ponto importante é que quanto mais precoce a aplicação da quimioterapia ou radioterapia após o tratamento cirúrgico do tumor, mais efetivo será o tratamento devido a grande quantidade de células na fase proliferativa. Todavia, os tecidos normais que apresentam alta fração de crescimento são os que sofrem à ação de quimioterápicos e radioterápicos concentrando, por conseguinte a ação dos efeitos colaterais agudos desses tipos terapêuticos. No entanto, quando um tumor maligno alcança até 1 cm de diâmetro, torna-se detectável através dos métodos diagnósticos, em que devem conter aproximadamente 10^9 células alteradas. Não se sabe ao certo, o período de tempo preciso para que o tumor atinja este tamanho, podendo levar anos para que tal evento aconteça (Macchetti *et al.*, 2007; INCA, 2012).

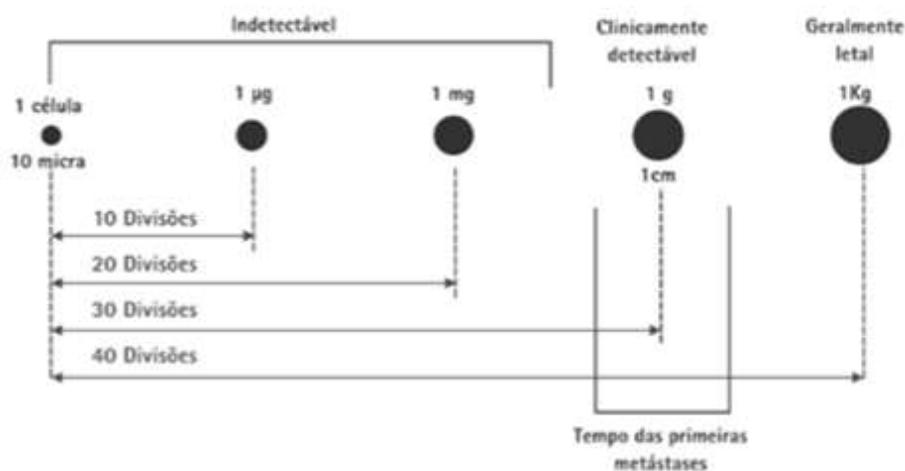


FIGURA 05: Crescimento Tumoral Primário
FONTE: www.inca.gov.br

1.6 IMUNIDADE E CÂNCER

O sistema imunológico é capaz de reconhecer, eliminar, neutralizar ou tolerar alterações da homeostase fisiológica, por meio de uma complexa rede de interações, envolvendo diversas populações celulares. Para tal finalidade, leucócitos passam por um processo de seleção e diferenciação, gerando respostas biológicas capazes de adaptar os organismos dentro dos seus limites de funcionamento orgânico quando expostos à eventuais alterações do metabolismo celular (Coussens & Werb, 2010; O'Byrne & Dalglish, 2010).

A capacidade de recuperação do DNA afetado por agentes cancerígenos e a ação de enzimas responsáveis pela transformação e eliminação de substâncias com capacidade carcinogênica são exemplos de mecanismos de defesa do organismo. Tais mecanismos são geralmente pré-determinados, havendo variabilidade de um indivíduo para o outro. O sistema imunológico é constituído por células distribuídas em uma rede complexa de órgãos, tais como fígado, baço, gânglios linfáticos, timo e medula óssea. Esses órgãos são denominados órgãos linfóides e estão relacionados ao crescimento, desenvolvimento e distribuição das células especializadas na defesa do corpo. Dentre essas células, os linfócitos desempenham um papel muito importante nas atividades do sistema imune, relacionado à produção de defesa no processo de carcinogênese. Os linfócitos têm como função atacar as células do corpo que apresentam transformação maligna, bem como secretar substâncias denominadas de linfocinas. As linfocinas regulam o crescimento e o amadurecimento de outras células e do próprio sistema imune. Acredita-se que distúrbios na produção ou na estrutura dos linfócitos estão relacionados com o câncer (Borges, 2012). Assim, as células cancerosas precisam contornar a vigilância do sistema imunológico que normalmente restringe o desenvolvimento de tumores. O papel da vigilância imunológica no câncer tem sido destacado por estudos experimentais e clínicos (Shankaran *et al.*, 2001). Alguns trabalhos vem apresentando a importância do sistema imune por desempenhar um papel no efeito antitumoral voltados às terapias convencionais contra o câncer (Zitvogel *et al.*, 2001).

Estudos demonstraram uma importância crescente da atuação de células do sistema imune e os produtos neoplásicos, uma vez que células presentes no infiltrado inflamatório adentram o tumor e interferem no desenvolvimento e progressão do mesmo. Desta forma, as pesquisas sugerem que o tumor não constitui um microambiente isolado, mas está inserido em um macroambiente, onde ocorre a síntese das células imunes que irão atuar na massa tumoral e passar a compor o

estroma, influenciando o seu curso (Chen *et al.*, 2007; Condeelis & Pollard, 2006; Correa *et al.*, 2005).

As células tumorigênicas inicialmente podem se sobrepor frente as células imunes que integram o microambiente tumoral, contribuindo para angiogênese e proliferação celular. As células tumorais por meio de vários mecanismos ativam as células imunes no microambiente tumoral. Os principais mecanismos envolvidos neste processo são:

- recrutamento das células imunes via produção de citocinas (proteína quimiotática de monócitos-1 [MCP-1] e interleucina-8 [IL-8]);

- secreção de citocinas que regulam diferenciação de células imunes no sentido de promover o tumor (interleucina-6 [IL-6], fator de necrose tumoral- α [TNF- α] e fator inibitório da migração de macrófagos [MIF]);

- resposta imune, em que células imunes diferenciadas geram citocinas, hormônios e fatores de crescimento, agentes promotores de proliferação tumoral e tolerância imune ao tumor (Chen *et al.*, 2007; Coussens & Werb, 2002; Whiteside, 2008).

Algumas vias de sinalização relacionadas à inflamação e envolvidas no desenvolvimento tumoral já foram bem descritas, tais como, a via do STAT3 (*signal transducer and activator of transcription*, ou transdutor de sinal e ativador de transcrição 3) e a via do NF- κ B (*nuclear factor- κ B*, ou complexo fator nuclear κ B). O STAT3 é um fator de transcrição que pode ser ativado por IL-6 (Interleucina-6), fator de crescimento epidérmico (EGF- *epidermal growth factor*) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF - *vascular endothelial growth factor*), entre outros. A atividade do STAT3 promove a sobrevivência de células tumorais pelo aumento da proteína anti-apoptótica Bcl-xL, descrito em células de mieloma múltiplo, além de promover a síntese de citocinas e fatores de crescimento que impedem a maturação de células dendríticas, comprometendo a atividade anti-tumoral de células T CD8 e células NK (Berasain *et al.*, 2009; Lin & Karin, 2007).

A indução dos sinais pró-inflamatórios pode aparecer na iniciação e progressão tumoral, por meio da indução de mutações em nível de DNA e mutações epigenéticas, aumentando a sensibilidade dos fatores de crescimento, com expressões de anormalidade e perda do controle da atividade de transcrição dos fatores responsáveis pelo controle do ciclo celular (Boik, 2001).

O primeiro a observar a relação entre inflamação e câncer foi o estudo de Virchow, em 1858, mostrando que a inflamação crônica é um dos fatores epigenéticos que mais contribui ao surgimento e progressão das células tumorais, em contrapartida o uso crônico de anti-inflamatórios não esteroidais reduz a carcinogênese (Brazilian *et al.*, 2009).

É notório que a imunidade celular é efetiva, todavia há relatos de casos em que portadores de câncer sintetizam anticorpos contra as células tumorais. Em contraposição não é evidente que os anticorpos possam desempenhar um papel efetivo protetor frente ao crescimento tumoral *in vivo*. Em compensação, o potencial para a destruição de células tumorais intermediado por anticorpos tem sido demonstrado *in vitro*, sendo o resultado satisfatório atribuído à ativação do sistema complemento ou à citotoxicidade celular dependente de anticorpo, onde os macrófagos e/ou as células *natural killer* se ligam ao antígeno promovendo a lise da célula tumoral (Devita *et al.*, 2005).

1.6.1 INFILTRAÇÃO TUMORAL E CÉLULAS IMUNES

As células *natural killers* (NK) estão envolvidas no controle do desenvolvimento do tumor, sendo responsável pelo desenvolvimento de uma resposta imunitária antitumoral eficaz (Krusch *et al.*, 2009).

NF-κB é o principal ativador da resposta imune e inflamação, e sua estimulação aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento, metaloproteinases, moléculas de adesão e proteínas anti-apoptóticas (Chen *et al.*, 2007).

Macrófagos são envolvidos em processos de inflamação crônica e parecem estar associados à progressão tumoral e metástase. Densidades elevadas de macrófagos no tecido neoplásico foram relacionadas ao mal prognóstico em mais de 80% de estudos publicados, e a superexpressão de CSF-1 (*colony-stimulating factor - 1*, um fator de crescimento de macrófagos), já encontrada em tumores de mama, útero, e ovário, está correlacionada a um alto grau neoplásico e pior prognóstico (Condeelis & Pollard, 2006; Lin *et al.*, 2001).

Monócitos são recrutados da circulação e adentram o tecido, onde se diferenciam em macrófagos com fenótipos distintos, de acordo com fatores presentes no local. Há classicamente dois grupos de macrófagos, diferenciados de acordo com seu modo de ativação, receptores e citocinas produzidas: M1 e M2. Os macrófagos do

tipo M1 são ativados por produtos microbianos ou IFN- γ , produzem citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IL-23, IFN- γ , IL-18, TNF- α e atuam na resposta contra patógenos (especialmente parasitas intracelulares) e células tumorais. Os macrófagos do tipo M2, por sua vez, são ativados por citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13, possuem receptores de manose e galactose, e produzem VEGF, IL-6, IL-10, PG (prostaglandina), iNOS, IDO, agindo no reparo tecidual, remodelação, e angiogênese, contribuindo potencialmente à progressão tumoral. O grupo M2 foi subdividido de acordo com seu modo de ativação em M2a, ativado por exposição a IL-4 e IL-13; M2b, induzido por exposição combinada a imunocomplexos e agonistas de TLR ou receptor de IL-1; e M2c, ativado por IL-10. Os dois primeiros estão mais relacionados a funções de regulação imune, enquanto o último age mais na supressão da resposta imunológica e na remodelação tecidual (Chen *et al.*, 2007; Hagemann *et al.*, 2009; Sinha *et al.*, 2005; Mantovani *et al.*, 2009).

1.7 MECANISMOS DE CONTROLE DAS CÉLULAS TUMORAIS

O número de células no organismo é controlado por meio da morte celular e proliferação celular. As características de cada tipo de morte celular (**Figura 6**) estão intimamente ligadas à cascata de eventos bioquímicos e fisiológicos que levam a mudança na produção de macromoléculas, na homeostase celular, na regulação do volume celular e por último na perda da viabilidade celular (Brasileiro-Filho, 2006; Tinari *et al.*, 2008).

Diversos tipos de morte celular vêm sendo descritos, tais como a apoptose, autofagia, necrose, excitotoxicidade, catástrofe mitótica e senescência com o propósito de pesquisar e compreender as patologias, em especial a tumorigênese (Krysko *et al.*, 2008).

De acordo com Armin *et al.* (2001), Okada & Mak (2004), Galuzzi *et al.* (2007) a morte celular pode ser classificada de acordo com a morfologia celular (apoptose, necrose, autofagia ou catástrofe mitótica), por meio de critérios enzimáticos (havendo ou não o envolvimento de nucleases ou de classes distintas de proteases - caspases, catepsinas e glutaminases) ou por aspectos funcionais (fisiológica ou patológica) e ainda por meio das características imunológicas.

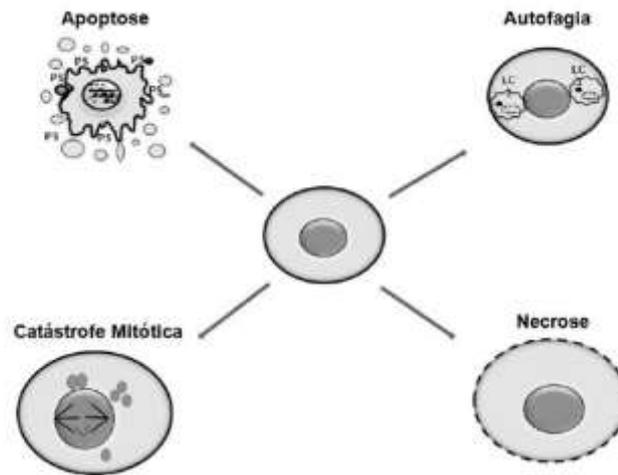


FIGURA 06: Principais Tipos de Morte Celular
FONTE: Bruin & Medena (2008)

1.7.1 AUTOFAGIA

Uma vez encontrado um ambiente que gere estresse metabólico, tais como falta de nutrientes, diferenciação e desenvolvimento, ocorre degradação de proteínas e organelas, sendo esse um processo adaptativo denominado autofagia (Ricci & Zong, 2006).

A formação de vesículas de membranas duplas é típica no processo de autofagia podendo ser observados em muitos tipos de tumores humanos, indicando que a autofagia é um processo que ocorre *in vivo* (González-Polo *et al.*, 2005). A autofagia tem sido proposta a desempenhar um papel de supressores de tumores nos primeiros estágios da carcinogênese. Um exemplo é a incidência de formação do tumor de células MCF-7 é menor quando Beclin-1 é altamente expresso, sendo responsável por promover autofagia nestas células afetadas (Liang *et al.*, 1999). Em muitos tumores humanos Beclin-1 e DRAM são encontrados em baixa expressão (Liang *et al.*, 1999; Yue *et al.*, 2003; Marino *et al.*, 2007; Crighton *et al.*, 2006). Além disso, tumores humanos, muitas vezes, exibem mutações na via PI-3 quinase levando a ativação de mTOR tendo como consequência supressão da autofagia (Fruta *et al.*, 2004; Shaw *et al.*, 2006). Tais mutações anti-autofágicas sugerem que as células neoplásicas precisam de mecanismos para contornar a autofagia a fim de formar o tumor. A autofagia pode impedir a conversão de células normais em malignas, por meio da degradação de organelas danificadas, reduzindo assim o estresse celular, ou destruindo proteínas específicas que auxiliem a formação de células tumorais (Edinger *et al.*, 2003; Jin & White, 2007). Uma vez que ocorra perda da Beclin-1, estando este

associado em ganhos ou perdas cromossômicas, a autofagia, por conseguinte pode também limitar a instabilidade cromossômica, limitando a progressão tumoral (Mathew *et al.*, 2007).

Alternativamente, a autofagia pode promover a morte de células pré-malignas impedindo a progressão da tumorigênese. Entretanto, o potencial de supressão tumoral nas fases iniciais da carcinogênese quando não bem exercidas pela ação fisiológica do organismo resulta em progressão tumoral, tornando a autofagia limitada, impedindo apenas a proteção contra condições estressantes às células. O processo de autofagia parece funcionar como um mecanismo de sobrevivência, uma vez que as células dependem do fator Bax/Bak. Estas células permitem a ativação dos fatores de crescimento, permitindo, por conseguinte a sobrevivência celular por várias semanas. A morte destas células ocorre quando a autofagia é inibida (Lum *et al.*, 2005). É importante ressaltar que experiências com linfoma induzido por MYC estabelecida mostram que a autofagia ocorre nas células sobreviventes, enquanto as outras células morrem por apoptose após a ativação de p53. A inibição da autofagia neste ambiente aumenta a apoptose de células de tumor e a regressão do tumor. Tais experimentos *in vivo* sugerem que a citoproteção para a autofagia estabiliza o crescimento tumoral (Amaravadi & Thompson, 2007).

A catástrofe mitótica não é considerada uma forma de morte celular, todavia é importante por sinalizar a morte celular (Ricci & Zong, 2006). É definida como um processo resultante de mitose aberrante durante a separação das cromátides irmãs (Brendesen, 2007). Estruturalmente apresentam-se como células grandes e multinucleadas, caracterizadas por apresentarem defeitos mitóticos, tais como condensação nuclear incompleta, defeito no alinhamento dos cromossomos e defeito no DNA (Bruin & Medena, 2008).

1.7.2 NECROSE

A necrose é caracterizada por apresentar depleção energética, danos à membrana lipídica e perda da função homeostática dos canais e bombas de íons, sendo evidente a vacuolização do citoplasma, perda da integridade da membrana e aumento do volume celular (Krysko *et al.*, 2008). A morte celular por necrose é ocasionada por inibição de energia celular, desequilíbrio no fluxo de cálcio, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação de proteases não apoptóticas, em que cada um destes eventos potencializa o outro (Brasileiro-Filho, 2006; Ricci & Zong, 2006).

A necrose é um fenômeno freqüente em tumores, podendo estar associado a uma intervenção terapêutica ou ao próprio crescimento da massa tumoral. Nos tecidos tumorais, por sua vez, ocorre uma quebra dos mecanismos homeostáticos, resultando num desbalanço entre proliferação e morte celular e conseqüentemente num aumento da população e tamanho tumoral. Chama-se “fração de crescimento” (*growth fraction*) a proporção de células dentro de um tumor que estão em atividade proliferativa. É importante reconhecer que uma considerável parte das células tumorais não está replicando, e também que a fração de crescimento não corresponde por si só ao crescimento tumoral. A taxa de crescimento de um tumor também depende de morte (e.g., necrose, apoptose) e perda (e.g., metástase ou disseminação local) celular, representando um balanço entre esses e a proliferação celular (Tannock, 2005).

Taxas de replicação celular são bastante heterogêneas em diferentes regiões do tumor, em que diferentes taxas de diferenciação celular encontram-se inversamente relacionadas à taxa de proliferação. Outro fator corresponde à existência de diferentes subpopulações celulares dentro do mesmo tumor, resultado de alterações genéticas adicionais ao longo da progressão tumoral. Também é importante ressaltar que a taxa de oxigênio e demais nutrientes são distintas nas regiões tumorais (Tannock, 2005).

1.7.3 APOPTOSE

A apoptose é uma via de morte celular induzida por um programa de suicídio estritamente regulado, fenômeno em que a célula é estimulada a acionar mecanismos que resultam na morte celular (Brasileiro-Filho, 2006). Morfologicamente é caracterizada pela retração celular e perda da aderência com a matriz extracelular e com as células adjacentes, havendo condensação de cromatina. A membrana plasmática forma prolongamentos denominados *blebs* que aumentam de tamanho e se rompem, formando os corpos apoptóticos que são rapidamente fagocitados pelos macrófagos e removidos sem gerar inflamação (Ziegler; Groscurth, 2004).

De acordo com Kim *et al.* (2002) e Madika *et al.* (2007), a apoptose é um evento importante, bem caracterizado na citotoxicidade induzida por fármacos anticâncer, auxiliando no controle da população celular do tecido (Vermees *et al.*, 2000), sendo também um processo seletivo de deleção celular fisiológica (Hengartner, 2000), dentre outros processos fisiológicos e patológicos.

O processo apoptótico (**Figura 7**) pode ser ativado por duas vias: intrínseca e extrínseca.

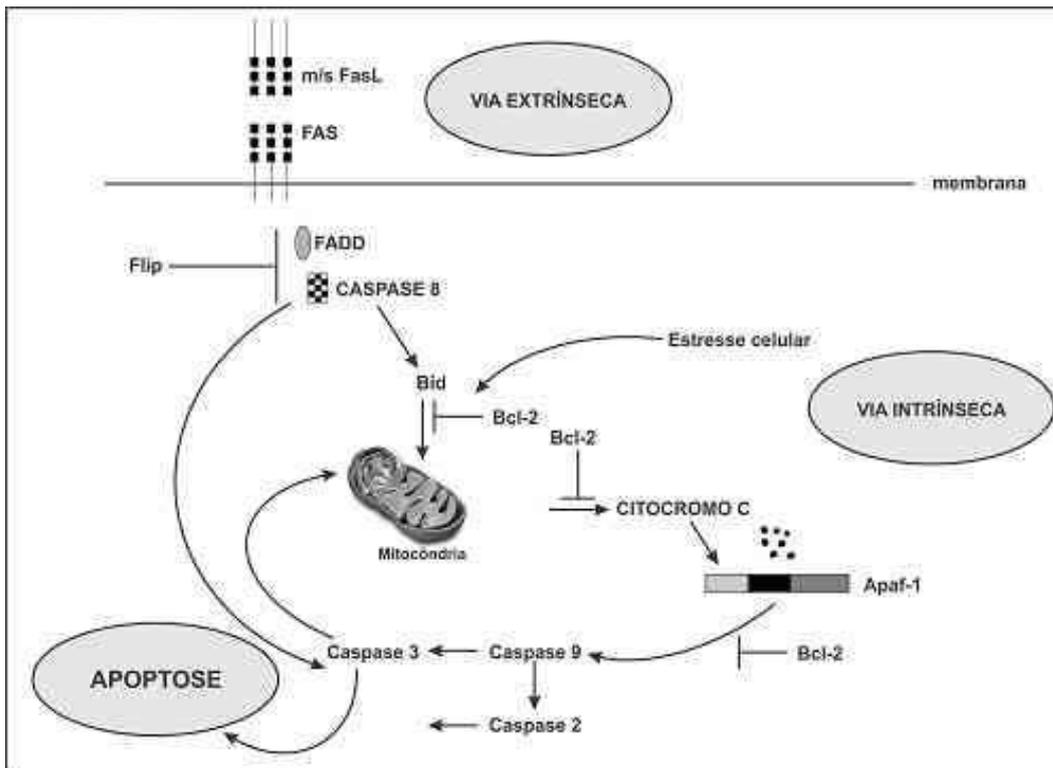


FIGURA 7: Vias da Apoptose
FONTE: Bruin & Medena (2008)

A via intrínseca da apoptose é derivada do aumento da permeabilidade mitocondrial com liberação de moléculas pró-apoptóticas no interior do citoplasma. As mitocôndrias são organelas que contêm proteínas, fator de indução da apoptose, Smac/ DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/ direct IAP Binding Protein with Low Propidium iodidel), em especial o citocromo c. Todavia a liberação do citocromo no citosol celular ativa o programa de suicídio da célula por apoptose. O citocromo se liga ao Apaf-1 (Fator de Ativação peptidase apoptótico 1) formando um complexo multicatalítico denominado apoptossomo. Tal complexo ativa a caspase 9 clivando as caspases efetoras (3, 6) ativando-as para realizar a destruição do DNA alterado (Kumar *et al.*, 2004; Ziegler & Groscurth, 2004; Brasileiro-Filho, 2006).

Embora permaneça dúvida como o citocromo c é liberado da mitocôndria, o processo é firmemente regulado pela família de proteínas Bcl-2, a qual consiste em proteínas pró e anti-apoptóticas. As proteínas pró-apoptóticas de vários domínios Bax e Bak são essenciais, uma vez que as mitocôndrias deficientes para Bax e Bak não conseguem liberar citocromo c (Wei *et al.*, 2001). Bax e Bak são responsáveis por induzir a permeabilização através da formação de poros sobre oligomerização (Kuwana *et al.*, 2002).

As proteínas pró-apoptóticas BH-3 e membros da família (Bid, Bim, Bad, Noxa e Puma) ativam Bax e/ou de Bak. Vários estudos sugerem que peptídeo podem ativar através de ligação do anticorpo anti-apoptóticos Bcl-2 (tais como as proteínas Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w e Mcl-1), aliviando assim a função inibidora destas proteínas anti-apoptóticas. Outros, ainda propõem que um subconjunto de BH3-proteínas apenas podem se ligar diretamente e ativar Bax e/ou Bak (Letai *et al.*, 2002; Kuwana *et al.*, 2005; Certo *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2005).

A via extrínseca é iniciada pelo envolvimento de receptores de morte da membrana plasmática em uma variedade de células (Funk, 2001; Miller, 2006; Khanapure *et al.*, 2007). Os receptores de morte são membros da superfamília da necrose tumoral (Receptor de fator de necrose tumoral- rTNF) e estão incluídos nesta família os receptores de membrana rTNF-1, FAZ (CD95), TRAIL (TNF- ligante induzido por apoptose) entre outros. Tais receptores possuem um domínio distinto dentro do citoplasma conhecido como domínio de morte (DD) apresentando uma seqüência de 65 aminoácidos. Após a associação do receptor de membrana ao DD ocorre uma mudança conformacional nos receptores, promovendo o recrutamento da FAS, uma molécula adaptadora que associará com o domínio de morte formando o FADD. Tal complexo é responsável por iniciar a cascata de caspases, em que o FADD se liga a procaspase 8, ativando a caspase 8 e por conseguinte esta ativa as caspases efetoras 3, 6 (Strasser *et al.*, 2000; Ziegler & Groscurth, 2004).

A apoptose é uma grande barreira impedindo que as células tumorais sobrevivam e proliferem no organismo. Para que as células normais se transformem em células tumorais, é necessária uma série de etapas. Uma das alterações é a evasão da morte celular pela via apoptótica (Hanahan & Weinberg, 2000). Consideravelmente a evasão de apoptose é um mecanismo bem evidenciado, uma vez que resultam na resistência ao tratamento anticâncer (Johnstone & Lapadati, 2002).

Muitas investigações tem concentrado esforços para encontrar maneiras de contornar a resistência à apoptose, a fim de melhorar o tratamento de pacientes com câncer. No entanto, a contribuição de resistência à apoptose para o sucesso do tratamento continua a ser uma questão de debate (Brown & Attardi, 2005). As células tumorais adquirem resistência à apoptose por meio de várias estratégias. Pequenas mutações nas proteínas supressoras de tumores, p53 são frequentemente observadas. Uma vez que a p53 é capaz de promover apoptose ativando a transcrição das proteínas pró-apoptótica Bcl-2, a presença de células tumorais criam estratégias para que os erros no DNA celular tornem persistentes (Vousden & Lane, 2007), não

funcionais podendo ser ativamente associada a uma falha para induzir apoptose, como ocorre geralmente em situações que haja estresse celular intenso e prolongado (Donehower, *et al.*, 1992; Harper *et al.*, 1993; Schmitt *et al.*, 1999).

Outras proteínas pró-apoptóticas observadas em células neoplásicas humanas envolvem a família de proteínas Bcl-2, envolvendo a perda de função da Bax e Bak (Rampino *et al.*, 1997; Kondo *et al.*, 2000), também pode ser observada uma alta expressão de proteínas anti-apoptóticas. Uma vez que ocorra uma resistência à apoptose há um favorecimento à formação do tumor (McDonnell *et al.*, 1989). Além disso, modificações nos receptores de morte celular podem desempenhar resistência à apoptose, um exemplo é a expressão do receptor Fas na mucosa do cólon normal, em que este é reduzido ou até mesmo perdido em carcinomas de cólon (Moller *et al.*, 1994). A ausência da Fas permite que as células tumorais invadam e destruam a via imunológica mediada por linfócitos citotóxicos (Medema *et al.*, 1991; ZHOU, 2005). A resistência à apoptose é o resultado comum de todas modificações anti-apoptóticas encontradas em tumores humanos (Johnstone *et al.*, 2002).

Diferentes modificações anti-apoptóticas são encontradas em células tumorais humanas, e a resistência à apoptose é comumente associada à sobrevivência das células neoplásicas. A resistência pode estar associada ao baixo prognóstico do câncer no paciente. Todavia a evolução do prognóstico tem apresentado em vários estudos, a marcação da expressão de proteínas tais como p53, Bcl-2 e/ou Bax, como nos estudos realizados por BROW & WILSON (2003), embora estudos em tumores sólidos apresentam conflitos na correlação significativa do prognóstico. A expressão de Bcl-2 ou p53 nem sempre está relacionado com o número de apoptoses celulares (Sugao *et al.*, 2000; Schwandner *et al.*, 2000; Hilska *et al.*, 2005).

A apoptose pode ser mais adequadamente determinada pela avaliação do número exato de morte celular programada através da realização do traçador molecular universal de apoptose, *TUNEL- Terminal desoxynucleotidil transferase nick end labeling* em células tumorais, detectando a fragmentação do DNA, ou por meio de coloração do anticorpo M30, capaz de reconhecer citoqueratina-18 clivada pela caspase. Na ausência de um traçador molecular universal de apoptose, alterações estruturais em DNA fornecem bases para identificar a fragmentação na molécula de DNA das células tumorais (Modak & Bollum, 1970; Gavrieli *et al.*, 1992). Este método permite limitar a especificação de alguns dos estágios da apoptose importantes na carcinogênese.

1.7.4 TUNEL – Terminal desoxynucleotidyl transferase nick and labeling

A visualização específica da morte celular por meio de técnicas não invasivas de imagem é altamente relevante no âmbito da pesquisa. Tem sido demonstrado que técnicas de imagem visando especificidade às células mortas podem ser utilizadas para monitorar a resposta ao tratamento do câncer (Blankenberg, 2008).

Sendo assim, ensaios de apoptose celular são frequentemente empregados para avaliar agentes potencialmente tóxicos capazes de gerar danos ao DNA celular através da fragmentação do mesmo durante a apoptose. A transferase terminal desoxynucleotidyl dUTP nick end labeling (TUNEL) é um ensaio utilizado para detectar e quantificar as células em apoptose através da fragmentação no DNA nos tecidos incorporados em parafina (Tornusciolo *et al.*, 1995; Garrity *et al.*, 2003).

O TUNEL é amplamente utilizado devido ao auxílio significativo na compreensão da formação das células neoplásicas e por ser relativamente simples. Tem sido muito utilizado mesmo apresentando limitações e baixa especificidade e sensibilidade (Ansari *et al.* 1993; Grasl-Kraupp *et al.*, 1995; Mundle & Raza, 1995; Sasano 1995; Yasuda *et al.*, 1995; Cervos-Navarro & Schubert, 1996, Vigal *et al.*, 2010). Nesta técnica, o baixo peso molecular do DNA celular, bem como a quebra de fita única no DNA, denominada nick podem ser identificados através da marcação de terminais livres de 3`OH apresentando nucleotídios modificados por meio de uma reação enzimática. O Terminal desoxinucleoditil transferase (TdT) é responsável por catalisar a polimerização de nucleotídios de DNA livre contendo 3`OH conseguindo assim identificar erros com fragmentação do material genético celular. Nucleotídios secundários são identificados pela ação de anticorpos secundários conjugados com peroxidase. Após a reação do substrato as células coradas podem ser detectadas em microscopia de luz (Kurasaki *et al.*, 2012).

Durante a fase de execução de apoptose extremidades de 3`OH são abertas sendo geradas devido a fragmentação do DNA (Willinghan, 1999; Taatjes *et al.*, 2008), em que estas frações geradas na apoptose é explorada no método TUNEL (**Figura 8**), detectando assim as células apoptóticas (Gavrieli *et al.*, 1992).

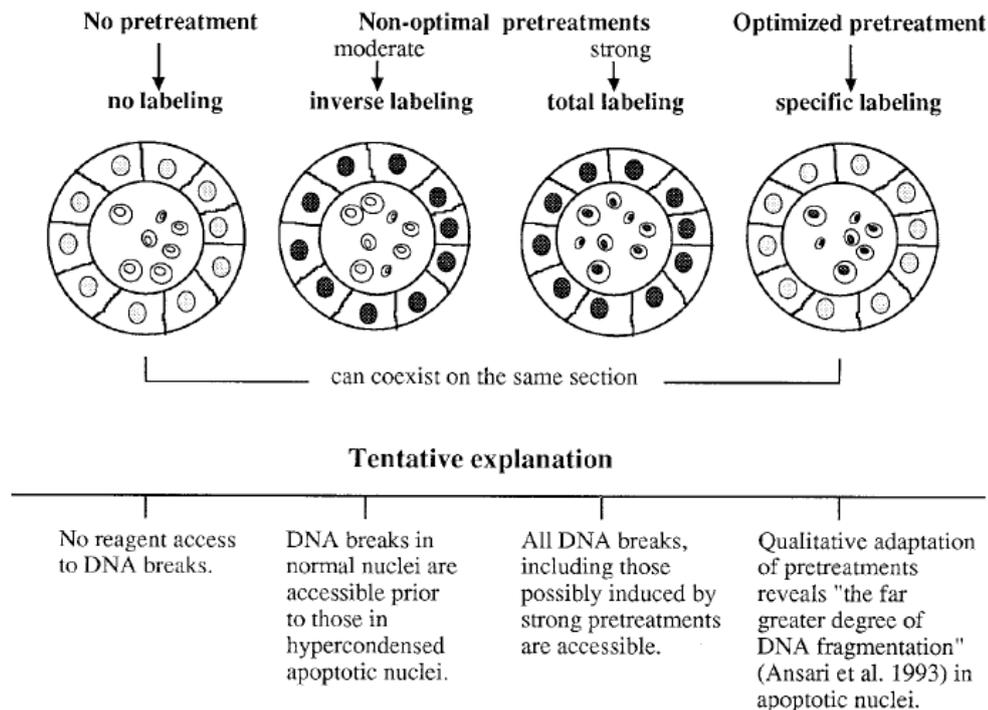


FIGURA 8: Esquema Sequencial Do TUNEL

FONTE: Bruin & Medena (2008)

1.8 QUIMIOTERAPIA NO CÂNCER E OS PRODUTOS NATURAIS

No tratamento do cancer, a morte celular é um importante fator que influencia o número de células e a susceptibilidade na transformação neoplásica, bem como a sensibilidade dos agentes quimioterápicos. Iste é bem documentado, uma vez que a morte celular pode ser bioquimicamente e morfológicamente distintas em dois tipos de morte, denominadas de necrose e apoptose (Wyllie *et al.*, 1980).

A terapêutica do câncer baseia-se, de forma geral, na associação da ressecção cirúrgica dos tumores, bem como ao tratamento radioterápico, e a quimioterapia (Costa-Lotoufo *et al.*, 2010). De acordo com Bonassa & Santana (2005) a quimioterapia antineoplásica é um método que utiliza compostos químicos com a finalidade de eliminar os tumores malignos. Esses agentes podem ser usados de forma isolada ou em combinação. Por não possuírem especificidade, esses compostos podem agredir tanto as células neoplásicas quanto as normais (Silva, 2002). Nas células malignas, esse tratamento impede a formação de um novo DNA alterado (ácido desoxirribonucléico), bloqueando funções essenciais da célula ou induzindo apoptose (Dias *et al.*, 2006).

O tratamento do câncer é um sistema moderno na medicina em que se faz uso de drogas sintéticas, sendo assim pesquisas envolvendo compostos naturais vem

sendo amplamente estudado por apresentarem baixo risco de complicações pertinentes, como injúria celular, depleção da medula óssea, crescimento descontrolado, esterilidade e perda de cabelo o que frequentemente acontece com o uso dos fármacos sintéticos antineoplásicos (Rang *et al.*, 2003).

Ainda assim, a quimioterapia é um dos métodos mais importantes para o tratamento de processos neoplásicos. Entretanto, é necessário descobrir os mecanismos dos agentes quimioterapêuticos capazes de destruir as células tumorais, uma vez que esse processo não é seletivo lesando também as células íntegras normais do organismo, sendo necessário reorganizar uma nova estratégia na identificação de drogas anticâncer (Costa-Lotoufo *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de drogas antineoplásicas está intimamente relacionado aos fatores etiológicos e patogênicos que contribuem para o desenvolvimento das células cancerosas capazes de gerar tumores malignos. A descoberta de novas substâncias naturais capazes de interferir em eventos celulares específicos das células tumorais malignas tem propulsionado a investigação dos produtos naturais que apresentem ação quimiopreventiva e quimioterapêutica (Mousinho, 2010).

Dentre os quimioterápicos sintéticos utilizados, encontra-se o 5-Fluoracil (5-FU) é uma substância análoga da base nitrogenada pirimidina uracila pertencente a classe de quimioterápico antimetabólitos, tendo sido o primeiro composto fluoropirimidínico sintetizado em 1957 (Chu, 2007). Os metabólitos ativos do 5FU exercem inibição da enzima timidilato sintetase (TS), responsável pela síntese de timidilato necessário para a replicação do ácido desoxiribonucleico (DNA). Tal mecanismo ocorre através da reação de metilação reduzida do monofosfato de deioxiuridina (dUMP) em monofosfato de deoxitimidina (dTMP) e tendo o folato (5,10 metilenetetrahidrofolato) como doador de metil (Santi *et al.*, 1974). O FdUMP liga-se ao timidilato sintetase no sítio do nucleotídeo, formando um complexo com o folato, todavia devido a estabilidade da ligação do flúor-carbono no FdUMP, gera-se uma inibição da enzima, bloqueando a síntese de dTMP (Longley; Harkin; Johnstone, 2003).

Na prática clínica oncológica o 5-FU tem sido amplamente utilizado frente a uma série de tumores, proporcionando a melhoria de sobrevida do paciente apresentando taxas de resposta de 10 a 15% quando em monoterapia e 40% quando associado com irinotecan e oxaliplatina (Impact, 1995; Falcone *et al.*, 2007; Ramanathan *et al.*, 2008).

A principal restrição para o uso do 5-FU como quimioterápico é a margem de segurança devido aos efeitos colaterais, tais como toxicidade gastrointestinal,

apresentando como quadro clínico náuseas, diarreia e mucosite; toxicidade hematológica com mielosupressão (Hind *et al.*, 2008); toxicidade neurológica e cardíaca (Kosmas *et al.*, 2008). De acordo com Barasch *et al.* (2003) e Trotti *et al.* (2003) a mucosite associada ao 5FU pode atingir mais de 40% dos pacientes como parte do protocolo quimioterápico.

O câncer é uma enfermidade multifatorial estando incorporada ao ambiente, por meio de fatores físicos, químicos e biológicos e fatores genéticos que desempenham um papel direto ou indireto na indução e agravamento da doença. Evidências epidemiológicas mostram que uma dieta rica em antioxidantes reduz significativamente o risco de muitos cânceres, sugerindo que certos dietéticos antioxidantes podem ser agentes eficazes na prevenção, incidência e mortalidade por câncer (Fresco *et al.*, 2006). Tais agentes presentes na dieta são grupos formados por compostos muito promissores devido a segurança, baixa toxicidade e aceitação geral. Conseqüentemente a identificação e desenvolvimento destes agentes tornou-se uma importante área de pesquisa sobre o câncer experimental (Dai & Mumper, 2010).

Estudos realizados por Cragg & Newman (2005) revelaram que 63% das substâncias antineoplásicas utilizadas, são pertencentes aos produtos naturais ou derivados dos mesmos. Outra pesquisa importante concerne à Butler (2004) em que este lista 79 agentes anticâncer derivados dos produtos naturais ou análogos dos mesmos, que iniciaram seus estudos clínicos de 2005 a 2007.

De acordo Gopalakrishnan & Kong (2008) a grande maioria dos fitoquímicos apresenta a capacidade de cessar o ciclo celular, sendo eles: o isotiocianatos, os polifenóis, os estilbenos, as antocianidinas, e as procianidinas, causando a estagnação da fase G2/M em numerosas linhagens celulares.

Por meio da supervisão do *Dr. Jonathan L. Hartwell* um programa de triagem voltado à pesquisa de produtos naturais provindos de plantas com ação antitumoral foi realizado no Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos em parceria com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), em que mais de 600 espécies de plantas foram coletadas, incluindo seus constituintes como casca, galhos, flores e frutos na Califórnia, Washington e Oregon (Pazdur *et al.*, 1993; Wall & Wani, 1996; Santos, 1998; Cragg & Newman, 2005; Srivastava *et al.*, 2005).

No Brasil a condição ambiental favorável, a biodiversidade estrutural de substâncias orgânicas naturais e a possibilidade de descobertas de princípios ativos entre os inúmeros constituintes químicos permitem diagnosticar e destacar as plantas

brasileiras como um fonte rica para o surgimento e desenvolvimento de novos fármacos (Filho-Braz, 2010).

Apesar de várias drogas clássicas utilizadas serem derivadas de plantas, há uma perda de espaço para os fármacos sintéticos. Todavia é importante salientar que alguns dos produtos naturais têm recebido atenção especial de acordo com os seus potenciais ativos biológicos (De Smett, 1997). Sabendo-se que há uma imensa diversidade botânica na natureza, apresentando compostos farmacologicamente ativos podendo conter substâncias químicas que possam contribuir significativamente em várias enfermidades, além da diversidade biológica presente nos recursos naturais do meio ambiente, ainda há uma série de compostos químicos com ação biológica a serem estudados no meio científico (Rocha *et al.*, 2001).

Clardy & Walsh (2004) elucida bem os dados que permite evidenciar o quão importante se faz a investigação dos produtos naturais, em que estes relatam que em 1981 a 2002, 5% das 1.031 dos novos compostos químicos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) eram relativos aos produtos naturais e os outros 23% eram moléculas derivadas dos mesmos.

Entende-se como produto natural metabólitos secundários, sintetizados por plantas, animais e microrganismos, tais como bactérias, fungos, protozoários em respostas a estímulos externos. Alguns desses compostos já foram devidamente isolados, em que os compostos com atividades biológicas apresentam relevância quanto ao potencial terapêutico frente a diversas enfermidades (Chin *et al.*, 2006; Pessoa *et al.*, 2006).

Sendo assim os produtos naturais vem mostrando ser uma fonte garantida e eficiente de novos agentes antineoplásicos. De acordo com Kingston (2009) os estudos com produtos naturais não fornecem apenas novos fármacos eficazes, mas também um entendimento sobre novos mecanismos no tratamento do câncer.

Dentre os diferentes produtos naturais com atividade antitumoral, destaca-se a *Punica granatum Linn*, popularmente conhecida como romãzeira, cujos frutos têm sido usados ao longo da história como produto natural medicinal em muitas culturas (Longtin, 2003). Todas as partes da planta têm sido utilizadas no intuito de melhorar algum quadro clínico patológico (Ross *et al.*, 2001).

1.9 *Punica granatum* Linn

A *Punica granatum* L. pertence á família *Punicaceae*, se apresentando como um arbusto ramoso ou arvoreta podendo atingir até 3 metros de altura, constando de folhas simples, cartáceas, dispostas em grupos de 2 ou 3 folhas, de 4 a 8 cm de comprimento, sendo rijas, brilhantes e membranáceas. Suas flores são solitárias, de coloração vermelho-alaranjado e um cálice esverdeado, de consistência firme e coriácea. Os frutos são globóides, medindo até 12 cm, contendo várias sementes envolvidas por arilo róseo preenchido por líquido adocicado. É originário da Ásia com abrangência em toda região do Mediterrâneo, sendo cultivado em quase todo o mundo, em especial no Brasil (Lorenzi & Souza, 2001; Lorenzi & Matos, 2002; Ferreira, 2004).

A romã é um importante fruto comercial amplamente cultivado em várias partes do mundo (Sarkhosh *et al.*, 2006). Além do uso medicinal dos produtos secos da planta, o fruto é consumido diretamente com os arilos frescos ou sucos, sendo manipulados pela indústria alimentícia, na produção de geléias, concentrados, aromatizantes e corantes. Em particular, tem-se observado um interesse global aos benefícios funcionais e nutracêuticos da mesma (Sumner *et al.*, 2005).

Os produtos naturais representam uma fonte importante para a eliminação de radicais livres no organismo humano. A ingestão de tais produtos naturais contendo compostos antioxidantes tem sido associada à redução da incidência de câncer, além da diminuição de doenças cardiovasculares, diabetes e outras doenças relacionadas ao envelhecimento celular (Rajan *et al.*, 2011). Sendo assim a *Punica granatum* (*Punicaceae*), é um importante produto natural rica em antioxidantes, por conter classes de polifenóis, incluindo taninos (De Nigris *et al.*, 2007) e flavonoides (Sudheesh *et al.*, 1997).

De acordo com os estudos de Rajan *et al.* (2010) os extratos aquosos e hidroalcoólicos da casca do fruto de *Punica granatum* L. contém grande quantidade de compostos fenólicos exibindo alta atividade antioxidante, com eliminação ativa dos radicais livres. Ensaio *in vitro* confirmaram que as cascas do fruto de *Punica granatum* são potentes antioxidantes naturais, entretanto os mesmos não identificaram os componentes específicos responsáveis por tal feito.

Extratos aquosos e hidroalcoólicos das cascas de *Punica granatum* têm sido estudados por suas propriedades antioxidantes usando diferentes métodos *in vitro*. Flavonóides, ácidos fenólicos, taninos, esteroides são encontrados nos extratos da

casca do fruto da *Punica granatum Linn*. Estes compostos presentes na casa dos frutos mostraram bons efeitos antioxidantes, enfatizando a avaliação química e biológica dos seus fitoconstituintes. Em especial, os compostos polifenólicos comumente encontrados em plantas têm mostrado múltiplos efeitos biológicos, tais como o anticâncer e atividade antiproliferativa (Seeram *et al.*, 2005), capacidade antimicrobiana (Supayang *et al.*, 2004) incluindo as atividades antioxidantes (Seeram *et al.*, 2005; Gil *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2000).

De acordo com Lansky & Newman (2007) tem sido indexados artigos sobre a *Punica granatum Linn*, havendo um vasto interesse quanto às propriedades nutricionais e medicinais deste produto natural. A árvore de *Punica granatum*, especialmente o fruto possui um vasto histórico etnomedicamentoso representando um reservatório fitoquímico de grande valor medicinal. O suco e a casca dos frutos possuem propriedades antioxidantes bem definidas. A utilização do suco, da casca do fruto e óleo tem mostrado possuir atividades anticancerígenas, atuando na proliferação da linhagem celular tumoral, ciclo celular, invasão e angiogênese.

A ação fitoquímica e farmacológica de todos os constituintes da *Punica granatum* sugere uma aplicação clínica ampla relacionada ao tratamento e prevenção da carcinogênese, assim como em outras doenças, como na inflamação crônica, acreditando que a romã desempenhe um papel etiológico fundamental frente á células tumorais (Lansky & Newman, 2007).

Segundo Lansky & Newman (2007) pesquisas sobre os efeitos da romã e seus derivados na saúde humana ainda encontra-se em um estágio muito precoce, em que poucos ensaios clínicos bem controlados foram concluídos e a toxicologia das frações de romã, em particular o seu potencial mutagênico somente agora esta começando a ser abordadas.

Diante do exposto a atividade antioxidante, bem como a supressão da inflamação pode contribuir significativamente para a quimioterapia e utilidade quimiopreventiva contra o câncer (Lansky & Newman, 2007).

1.9.1 CONSTITUINTES QUÍMICOS DA *Punica granatum Linn*

De acordo com Wang *et al.* (2010) muitos efeitos tem sido atribuídos aos constituintes da romã, a partir do isolamento e caracterização estrutural de muitos compostos, os quais são categorizados os polifenóis, incluindo taninos, flavonoides, alcalóides, ácidos orgânicos entre outros.

As atividades fitoquímicas e farmacológicas dos componentes da *Punica granatum* sugerem uma alta empregabilidade na aplicação clínica voltada a quimioterapia do câncer. Recentes pesquisas revelaram que os polifenóis, incluindo a punicalagina mostraram seletividade *in vitro* e citotoxicidade em altas concentrações contra linhagem de células tumorais (Kulkarni et al., 2007).

Os compostos químicos presentes nos frutos de romã, dos quais se destacam os polifenóis, incluindo os taninos hidrolisáveis (elagitaninos [ET] e galotaninos [GT]) e taninos condensados (proantocianidinas), antocianinas e outros flavonóides são encontrados em grande proporção (Santos-Buelga & Scalbert, 2000; Clifford & Scalbert, 2000; Gu et al., 2004).

A presença de flavonóides (Caltagirone et al., 2000; Yang et al., 2000) bem como a de taninos (Koide et al., 1999; Wang et al., 1999; Yang et al., 2000a; Yang et al., 2000b) encontrados na *P. granatum* mostraram capacidade de inibição de crescimento de células tumorais tanto *in vitro* como *in vivo*.

Tanto os flavonóides como os taninos são abundantes nas cascas de frutos da romã, variando apenas com o tipo de cultivo (Ozcal & Dinc, 1993). Polissacarídeos complexos também têm sido reportados em cascas de romã (Jahfar et al., 2003). A presença de alcaloides foi também observada nos estudos de *Dragendford*, todavia foi negativa nos estudos de *Mayer* (Vidal et al., 2003).

De acordo com Lansky & Newman (2007) a casca de romã é rica em polifenóis, incluindo os elagitaninos, galotaninos, ácidos elágicos, ácidos gálicos e flavonóides, tais como catequinas, antocianinas, ácido ferúlico e quercetina. Estes polifenóis exibem várias atividades biológicas, tais como eliminação dos radicais livres e inibição da oxidação.

Segundo Pendey & Madhuri (2008) o fruto de *Punica granatum Linn* contém alcalóides, flavonóides (antocianidinas) e vitamíca C atuando contra tumores sólidos e ascíticos em camundongos albinos, reforçando assim o seu efeito antineoplásico.

As cascas e folhas possuem em sua composição química elagitaninos, punicalagina, punicalin e ácido elágico (Nadkarni, 2002). Navindra et al. (2010) relataram que notadamente os elagitaninos encontrados na romã inibem o câncer prostático.

Os compostos com ação anti-inflamatória da romã foram investigados nas sementes e os resultados mostraram presença de polifenóis e ácidos graxos como sendo os compostos químicos majoritários quanto à ação anti-inflamatória (Schubert et al., 1999).

Os principais compostos químicos, tais como os ácidos graxos, ácido púrico, tem ação bem conhecida em relação as reações anti-inflamatórias, os quais inibem o desenvolvimento da inflamação por meio da supressão de biosíntese de prostaglandinas (Nugteren *et al.*, 1987). Os estudos de Adams *et al.* (2006) mostraram que o pré-tratamento com o suco de romã inibe a atividade de AKT, ativação da NFκB e expressão da COX-2 em células de HT-29 (linhagem celular cancerosa do cólon). O controle de expressão da COX-2 é relatado em estudos envolvendo extratos de frutos ricos em polifenóis, mas precisamente estudos contendo polifenóis derivados de romãs ainda são limitados (Adams *et al.*, 2006). A inibição da COX-2, AKT e NFκB fornecem mecanismos na atividade anticâncer exercida pela romã nas células neoplásicas de cólon e corroborando para estudos futuros no que concerne à prevenção e tratamento do câncer (Adams *et al.*, 2006).

Estudos realizados por Toi *et al.* (2003) mostraram que constituintes químicos encontrados no suco e o óleo de semente de romãs mostraram efeitos de ação adversa à formação de novos vasos em modelos experimentais *in vivo*, através de baixa regulação de fatores de crescimento pró angiogênico vascular endotelial (VEGF) em estrogênio MCF-7 dependentes de células tumorais de pulmão e alta regulação de fator migratório de macrófagos (MIF) em células MDA-MB 231.

O mecanismo de ação quimiopreventiva também é ressaltado, uma vez que pode haver inibição das substâncias bioativas carcinogênicas ou bloqueio da ligação do carcinógeno ao DNA e por último a possibilidade de inibição da fase de promoção carcinogênica (Whitley *et al.*, 2003).

Segundo Lansky & Newman (2007) o suco, a casca e o óleo de semente da romã tem demonstrado capacidade antineoplásica por apresentar inibição da proliferação celular, bem como do ciclo celular e também da angiogênese.

Estudos demonstraram que o fruto, suco, a semente e o óleo de semente são efetivos contra a carcinogênese de próstata, mama, pele, pulmão, cavidade oral e leucemias (Amin *et al.*, 2009) devido a suas propriedades antioxidantes e antiproliferativas (inibição de crescimento celular, destruição do ciclo celular e apoptose) (Adhami *et al.*, 2009). De acordo com os estudos de Konho *et al.* (2004) o óleo de semente de romã quando incorporados na dieta reduziram consideravelmente a incidência e a multiplicação de carcinoma (mensuração do número de tumor/ rato) induzida por azoximetano. Neste experimento foi possível notar que o óleo de semente de romã não exibiu dose responsiva, porém os efeitos anticarcinogênicos foram observados em todas as doses presentes no estudo (concentração de 0,01%, 0,1% e 1% w/w).

Outro estudo evidenciado a ação antineoplásica concerne ao de Toi *et al.* (2003) que evidencia que o óleo de semente de romã e o suco fermentado rico em polifenóis inibem a proliferação celular de câncer de mama, invasão com promoção de apoptose contra as células tumorais de mama.

Kim *et al.* (2002) também reportou que o suco fermentado de romã rico em polifenóis apresentou potencial dobrado quanto a ação antiproliferativa uma vez comparado com o suco de romã fresco.

Pesquisas envolvendo câncer de pulmão revelaram que o extrato da fruta de romã é efetivo no tratamento do câncer de pulmão (Khan *et al.*, 2007).

Albrecht *et al.* (2004) em seus estudos demonstraram os efeitos do óleo de semente de romã e do suco fermentado, rico em polifenóis e o pericarpo frente ao câncer de próstata humano com crescimento de células *in vivo* encontraram uma significativa atividade antitumoral iniciada contra o câncer prostático humano.

Ainda dentro desse contexto Lansky *et al.* (2005) utilizaram extratos do fruto de romã mostrando que o crescimento celular foi inibido, havendo também a constatação de apoptose contra células prostáticas humanas extremamente agressivas (células de carcinoma PC-3).

De acordo Suresh *et al.*, (2011) extrato da raiz de *Punica granatum L.* exercem atividade antiproliferativa significativa frente às linhagens de células tumorais MDA-MB-435. O extrato etanólico mediou atividade antiproliferativa mais considerável em linhagens celulares tumorais raras do que em linhagens tumorais convencionais.

Culturas de células mamárias em ratos (MMOC) foram desenvolvidas por meio de exposição à agentes químicos carcinogênicos 7,12 dimetil benzentraceno (DMBA) em que o extrato de óleo demonstrou reduzir 46% da ocorrência tumoral (Kim *et al.*, 2002), enquanto que a Otimização de Enxame de Partículas (PSO), prensada a frio ou em HPLC resultou em uma redução de até 87% da ocorrência tumoral. Notavelmente 1g/mL de PSO resultou em maior supressão do que a dose de 10g/mL do extrato aquoso de romã (Metha & Lansky, 2004) sugerindo que a dose biológica ideal é mais importante e relevante do que a dose máxima tolerada. De acordo com os estudos de HORA *et al.* (2003) realizados em ratas fêmeas CD-1, por meio da indução de tumores epiteliais induzidos por DMBA, posteriormente promovido por 12 Otetradecanoylphorbol 13-acetato (TPA) evidenciou que o tratamento tópico com PSO 5% produziu reduções significativas tanto na incidência de tumores quanto na proliferação ($P < 0,05$).

Foram evidenciadas também mudanças no ciclo celular de linhagens humanas de Linfoma de Burkitt quando administrados extrato de casca do fruto de romã

(Settheetham & Ishida, 1995) e leucemia monocítica humana com extrato de óleo de semente de romã (Suzuki *et al.*, 2001).

Segundo Kawaii & Lansky (2004) a diferenciação da linhagem celular HL-6 de leucemia promielocítica humana foram detectadas em reações de reduções do azul nitro tetrazólio, não específica esterase e esterase específica e atividades fagocíticas foram potencialmente promovidas pela casca dos frutos, enquanto que extratos de acetato de etila de produtos fresco do suco de romã não fermentado apresentaram baixa atividade anticancerígena observados em extratos de romã frente a outras linhagens celulares tumorais, a exemplo de mama e próstata.

1.9.1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos constituem um dos grupos mais numerosos e onipresentes de metabólitos de produtos naturais e fazem parte integrante da dieta humana(Dai & Mumper, 2010).

Os compostos fenólicos (**Figura 9**) possuem um mais anéis aromáticos apresentando um ou mais grupos hidroxilas. São amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo os metabólitos secundários mais abundantes das plantas, apresentando mais de 8000 estruturas fenólicas atualmente conhecidas, que variam a partir de moléculas simples, tais como os ácidos fenólicos ou ainda como moléculas altamente polimerizadas como os taninos. As plantas fenólicas incluem os ácidos fenólicos, os flavonóides e os taninos (Dai & Mumper, 2010).

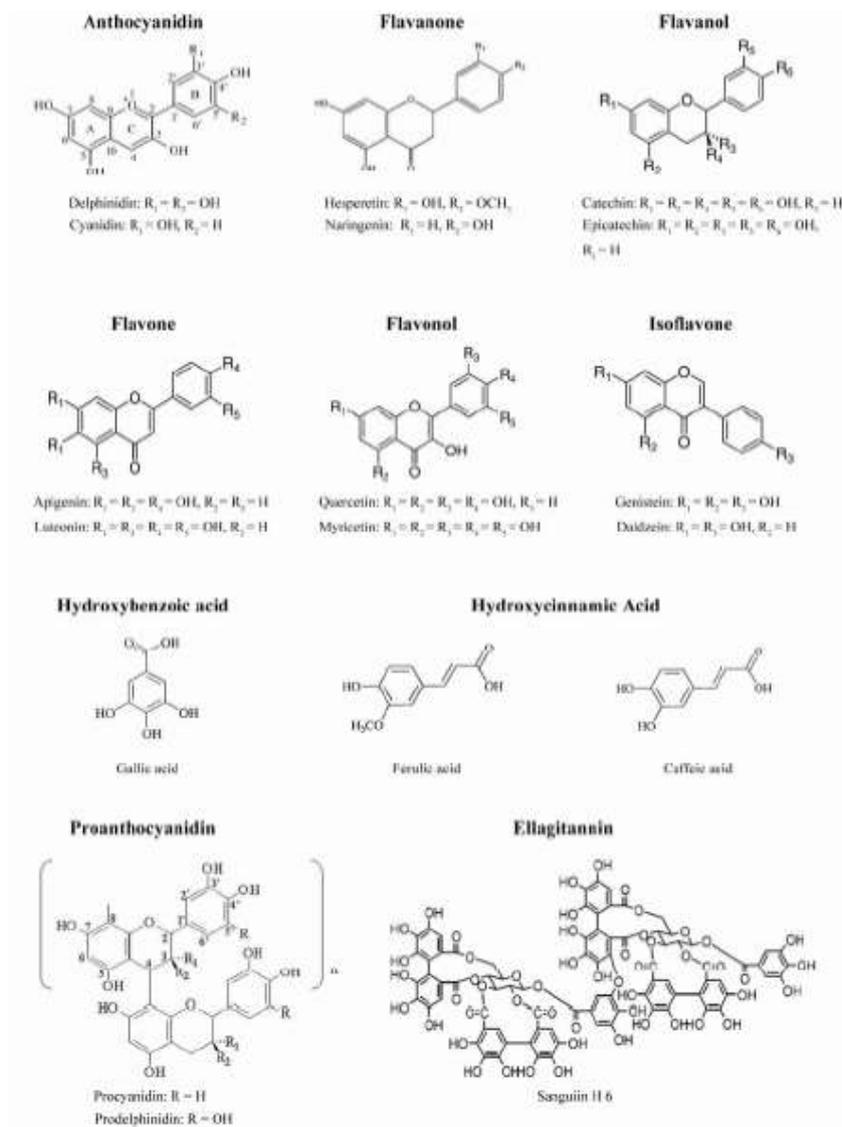


FIGURA 9 : Estrutura Química dos Compotos Fenólicos (Flavonóides, Ácido Fenólicos e Taninos).
FONTE: Dai & Mumper (2010)

1.9.1.3 FLAVONÓIDES

Dentre os compostos fenólicos os flavonóides são os mais comuns, em que a estrutura química básica é composta de núcleo flavan, contendo 15 átomos de carbono arranjados em três anéis (C6-C3-C6). Os flavonóides são divididos em seis subgrupos: flavans, flavonas, flavonols, flavonóis, isoflavonas e antocianinas, classificados de acordo com a oxidação do anél de carbono. Sua variação estrutural em cada subgrupo é em parte devido ao grau e padrão hidroxilação, metilação, prenilação ou glicosilação (D'Archivio *et al.*, 2007).

Flavonoides isolados de romãs incluem as flavonas, flavonóis, antocianinas e flavan-3-óis (Wang *et al.*, 2010) De acordo com Aherne & O'Brien (2002) a estrutura

química dos flavonóides de maneira geral, esta baseada no núcleo flavilium, o qual consiste de três anéis fenólicos. O benzeno do primeiro anel é condensado com o sexto carbono do terceiro anel, onde na posição dois carrega um grupo fenila como substituinte. O terceiro anel pode ser um pirano heterocíclico, gerando as estruturas básicas das leucoantocianinas e das antocianidinas, sendo denominado de núcleo flavana. Uma vez que o terceiro anel apresenta-se como uma pirona, ocorre a formação das flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, chalconas e auronas, sendo denominado de 4-oxo-flavonóide (Yokozawa *et al.*, 1997; Lopes *et al.*, 2000). Segundo Marchand (2002) e Yang *et al.* (2001) mais de 6000 diferentes flavonoides já foram descritos, sendo os mais estudados referente as classes maiores: flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas, diidroflavonóis e chalconas (Cook & Samman, 1996). As atividades bioquímicas dos flavonóides, bem como a de seus metabólitos estão diretamente relacionadas com sua estrutura química, podendo haver variações quanto a substituições, incluindo hidrogenação, hidroxilação, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações. Comumente os flavonóides e isoflavonóides ocorrem como ésteres ou derivados glicosídicos, ou ainda como uma mistura deles (Birt *et al.*, 2001).

De acordo com Birt *et al.*, (2001) a proliferação celular desregulada funciona como marcador de aumento de susceptibilidade à neoplasia. O processo de prevenção carcinogênica está associado, geralmente a inibição, reversão ou retardamento da hiperproliferação celular. Já é bem conhecido que os flavonoides dietéticos e isoflavonóides apresentam inibição quanto à proliferação de linhagens de células cancerígenas humanas.

Marchand (2002) descreveu em modelos *in vitro* que os flavonoides presentes em vegetais, em especial na *Punica granatum* têm mostrado eficácia na sinalização celular e a progressão do ciclo. Genesteína e quercetina apresentam capacidade de inibir a proteína tirosina quinase, uma vez que esta também se encontra envolvida na proliferação celular. A apigenina, luteolina e quercetina, presente na romã mostraram-se eficazes no processo de morte celular, impedindo a progressão do ciclo do mecanismo dependente de p-53.

Segundo Reddy *et al.*, (2003) os flavonoides e isoflavonóides encontrados nos vegetais podem inibir o ciclo celular, induzindo a apoptose de linhagens celulares cancerosas, em que as células se encontram no processo de divisão e uma vez tratadas com flavonoides e isoflavonoides, tais células tumorais apresentaram uma desestruturação nos “check-points” G1/S e G2/M. Mas precisamente o flavonóide

quercetina apresenta ação no bloqueio do ciclo celular na fase G1/S das células cancerosas estudadas em cólon, induzindo também a apoptose apresentando como resultado a fragmentação nuclear e condensação da cromatina.

1.9.1.4 TANINOS

Os taninos são outro grande grupo de polifenóis, subdividido em dois grupos: (1) Taninos hidrolisáveis e (2) Taninos condensados (Khanbabaee *et al.*, 2001).

1.9.1.4.1 TANINOS HIDROLISÁVEIS:

Os taninos hidrolisáveis são compostos que contêm um núcleo central de glicose ou outro poliol esterificado com ácido gálico, também conhecido como galotaninos ou com ácido hexahidroxi-difenico, também denominado elagitaninos. A grande variabilidade na estrutura destes compostos é devido a muitas possibilidades na formação de ligação oxidativa e oxidação intramolecular. Sendo assim, as reações dão origem a muitos compostos oligoméricos com peso molecular entre 2.000 a 5.000 Daltons (Khanbabaee *et al.*, 2001).

Taninos hidrolisados (**Figura 10**) de diversas estruturas incluindo elagitaninos e galotaninos constituem os mais prevalentes compostos presentes em várias partes da romã, com destaque especial na casca do fruto. Taninos condensados, entretanto são mais raros de ser encontrados na planta. Elagitaninos são frequentemente encontrados no pericarpo, casca, semente e flores (Tanaka *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006). A punicalin e a punicalagina são os compostos majoritários do pericarpo e também encontrados na casca, entretanto são praticamente difíceis de serem detectados nas folhas. Estes tipos de compostos são derivados do ácido elágico, os quais são abundantes em todas as partes da planta e pode conter altos teores, tais como 0,1% nas flores e acima de 0,2% no pericarpo e folhas (Wang *et al.*, 2006).

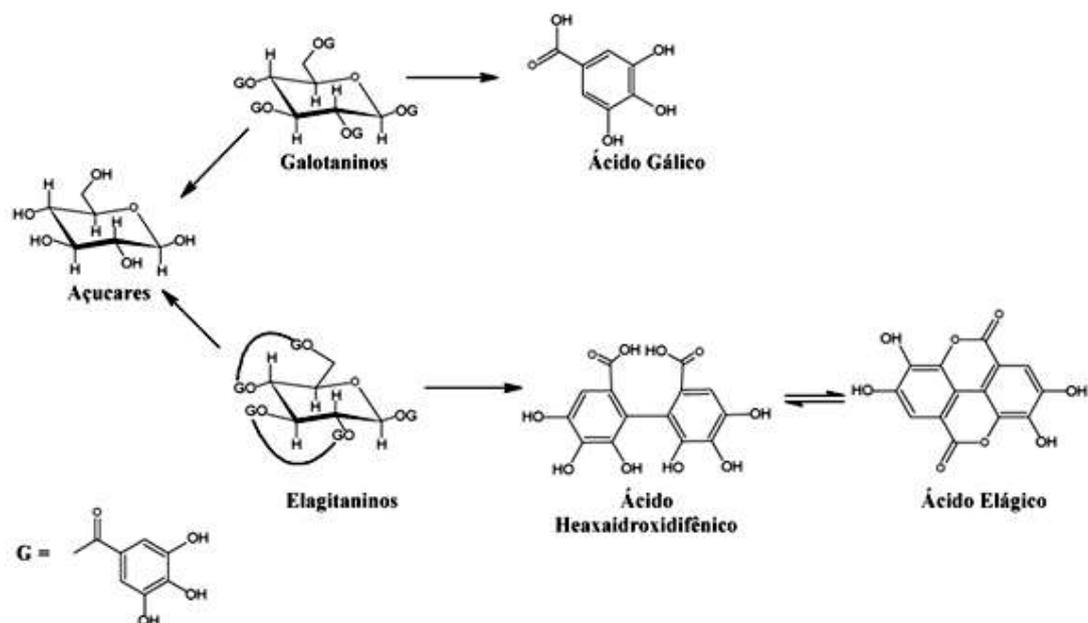


FIGURA10: Estrutura Química dos Taninos Hidrolizados
FONTE: Queiroz *et al.* (2002)

1.9.1.4.2 TANINOS CONDENSADOS:

Os taninos condensados são oligômeros ou polímeros de flavan-3-ol ligados através de um vínculo de carbono interflavan. São também denominados como proantocianidinas devido ao fato de serem decompostos das antocianidinas através da reação de oxidação catalisada por ácido através do aquecimento em soluções de álcool ácidas. A diversidade na estrutura é devido a variação no padrão de hidroxilação nos três centros quirais, assim como o local e tipo de ligação interflavan, bem como o grau e o padrão de metoxilação e glicosilação (Koleckar *et al.*, 2008).

Taninos hidrolisáveis e condensados tem demonstrado propriedades anticancer *in vivo* e *in vitro* (Castonguay *et al.*, 1997; Gali-Muhtasib *et al.*, 2001) e propriedades anti-aterosclerótica *in vivo* (Aviram *et al.*, 2000; Kaplan *et al.*, 2001; Aviram *et al.*, 2004). Em adição os taninos hidrolisáveis e o ácido elágico tem reportado atividade anticancer (Boukharta *et al.*, 1992; Gali-Muhtasib *et al.*; 2001; Castonguay *et al.*, 1997).

Os galotanninos os quais são frequentemente encontrados nas folhas e raramente reportados em outras partes da romã, habitualmente consistem em pares de grupos galloil e pode ser considerados como derivados do ácido gálico (Li *et al.*, 2002).

1.9.1.5 ÁCIDOS FENÓLICOS

1.9.1.5.1 ÁCIDO GÁLICO

O ácido gálico (**Figura 11**) (GA: 3,4,5- ácido trihidroxidroxibenzóico/ 2,3,7,8 tetrahidroxi[1]benzopirano[5,4,3,-cde][1]benzopiran-5,10-dione) é um composto polihidroxifenólico, o qual pode ser encontrado em vários produtos naturais, tais como sumagre, folhas de chá, casca de carvalho, chá verde, casca de maçã, uvas, morangos, abacaxis, bananas, limões, vinho branco, vinho vermelho, bem como nas romãs (Sun *et al.*, 2002; Beer *et al.*, 2003; Wolfe *et al.*, 2003). O ácido gálico pode estar presente como molécula livre ou como parte de moléculas dos taninos (Madlener *et al.*, 2007).

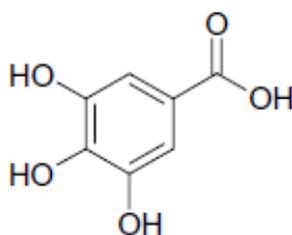


FIGURA 11: Estrutura Química Do Ácido Gálico

FONTE: Madlener *et al.* (2007)

De acordo Sridhar *et al.* (2005) e Liu *et al.* (2005) extratos de frutas contendo ácido gálico apresentam benefícios à saúde, tais como efeito antidiabético e antiangiogênico, exibe também atividade antiapoptótico perante as células linfocíticas humanas (Sohi *et al.*, 2003).

O ácido gálico tem sido descrito por apresentar-se como um potente anti-oxidante, uma vez que elimina as espécies reativas de oxigênio (ROS) (Sohi *et al.*, 2003; Wolfe *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005, Lu *et al.*, 2006; Abdelwahed *et al.*, 2007; Kim, 2007). O ácido gálico como agente anti-oxidante tem sido considerado um importante fitoquímico quimiopreventivo (Suhr, 2003; Giftson *et al.*, 2009). Pode apresentar também ação pró-oxidante dependendo da concentração do mesmo e o método de avaliação da referida atividade (Sakagami & Satoh, 1997; Strlic *et al.*, 2002).

De acordo com Inoue *et al.*(1994), Isuzugawa *et al.* (2001), Kawada *et al.*(2001), Salucci *et al.* (2002), Sohi *et al.*(2003) e o ácido gálico é descrito como um excelente redutor de radicais livres e indutor na morte celular programada frente a várias linhas de células tumorais, sendo também importante por apresentar a prevenção da conversão de malignidade de células e na prevenção do câncer.

O interesse majoritário do ácido gálico é relativo à atividade antitumoral. De fato, a atividade anti-cancer pelo ácido gálico tem sido reportada em várias células tumorais, tais como na leucemia (Inoue *et al.*, 2000), células cancerosas prostáticas (Argawal *et al.*, 2006; Veluri *et al.*, 2006; Kaur *et al.*, 2009), câncer de pulmão (Ohno *et al.*, 1999; Kawada *et al.*, 2001), câncer gástrico, cólon, peito, cervical e esofágico (Faried *et al.*, 2007).

De acordo com Madlener *et al.* (2007) relata que o ácido gálico exerce efeitos bioquímicos, podendo conter propriedades quimiopreventivas e antitumoral importantes.

A indução da apoptose pelo ácido gálico está associado com o estresse oxidativo derivado da reação de espécies reativas de oxigênio (ROS), disfunção mitocondrial e influxo de níveis de Cálcio intracelular (Serrano *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 2000). Entretanto o ácido gálico tem demonstrado citotoxicidade em células normais fibroblásticas e endoteliais (Inoue *et al.*, 1994; Inoue, 1995). Tem sido demonstrado que o ácido gálico e seus derivados induzem a apoptose dependente de Cálcio em células leucêmicas (Sakaguchi *et al.*, 1998, Isuzugawa *et al.*, 2001).

O ácido gálico induz a apoptose em células cancerosas HeLa sendo evidenciadas pela coloração anexina-V ativando a caspase (You *et al.*, 2010).

1.9.1.5.2 ÁCIDO ELÁGICO

O ácido elágico (4,4',5,5'-6,6' ácido hidroxidifenico-2,6,2'-6'- dilactone) (**Figura 12**), é um dímero derivado do ácido gálico de plantas amadeiradas, bagas, uvas e sementes (Talcott & Lee, 2002).

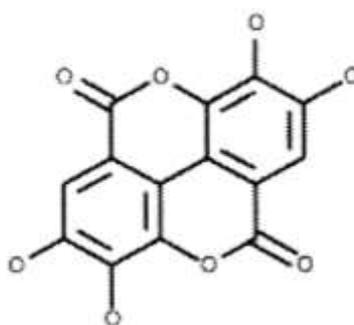


FIGURA 12: Estrutura Química Do Ácido Elágico

FONTE: Losso *et al.* (2004)

O ácido elágico é um composto fenólico presente nos vegetais e frutos, tais como as romãs, tendo apresentado propriedades antioxidante, antifibrótica,

anticarcinogênica e quimiopreventiva(Hagiwara *et al.*, 2010). Tem demonstrado que o ácido elágico tem a capacidade de inibir o crescimento tumoral através da carcinogênese promovida em modelo animal (Bate-Smith, 1972; Perchellet *et al.*, 1992; Dow *et al.*, 1994; Barch *et al.*, 1996; Stoner & Morse, 1997). Tal propriedade do ácido elágico é evidenciada pela inibição da indução da atividade de TPA ornitina descarboxilase, atividade de N-acetiltransferase, produção de hidroperóxido e síntese de DNA (Das *et al.*, 1885; Teel, 1986; Ahn *et al.*, 1996; Thresiamma *et al.*, 1996; Chung, 1998; Lin *et al.*, 2001).

De acordo com Narayanan *et al.* (1999) o ácido elágico tem demonstrado induzir o bloqueio da transição da fase G0\G1 e indução de apoptose em carcinoma cervical humano de células de pele. Ainda assim, tem sido corroborado, segundo Narayanan *et al.* (2001) que o ácido elágico induz o bloqueio do ciclo celular em células cancerosas do cólon humano resultando na baixa regulação de IGF-II.

Segundo os estudos de Teo-Mao *et al.* (2005) o ácido elágico foi capaz de inibir o ciclo celular e realizar apoptose em células cancerosas de bexiga de linhagem T24, em que através vde citometria o ciclo celular resultou em aumento do número de células na transição de G0\G1 e decréscimo do percentual de células de G2\M. Em complemento, através do ensaio de PCR o ácido elágico demonstrou promover a expressão de gene p53 e p21 e inibir a expressão de CDK2 (ciclina dependente de quinase 2) , impedindo a continuação do ciclo celular em G0\G1. Sendo assim a atividade antineoplásica desempenhada pelo ácido elágico está diretamente relacionada a capacidade de cessar o ciclo celular e induzir a apoptose (Teo-Mao *et al.*, 2005).

Sendo assim o ácido elágico apresenta várias propriedades biológicas, tais como atividade anti-oxidante (Privadarsini *et al.*, 2002), anti-inflamatória (Lino *et al.*, 2002), anti-fibrose (Thesiamma *et al.*, 1996) e propriedades anti-câncer(Narayanan *et al.*, 1999; Khanduja *et al.*, 1999).

O ácido elágico tem prevalecido exibindo ação anticarcinogênica, tais como indução do bloqueio do ciclo celular e induzindo a apoptose, bem como a inibição da formação e do crescimento tumoral em modelo animal (Narayanan *et al.*, 1999; Khanduja *et al.*, 1999; Mertes-Talcott *et al.*, 2003).

Um dos marcadores de redutase ribonucleotídica (RR, EC 1.17.4.1), o qual esta enzima esta intimamente limitado a síntese de DNA relativa a baixa atividade em células normais e significativamente elevada na presença de células tumorais malignas (Elford *et al.*, 1970; Takeda *et al.*, 1981). A enzima é considerada um

importante marcador na quimioterapia do câncer (Tsimberidou *et al.*, 2002). Mostrando que compostos como didox (3,4 ácido dihidroxibenzohidroxamico) ou trimidox (3,4,5 trihidroxibenzamidoxime), o qual tem uma estrutura química relativa ao ácido gálico apresentando também ação redutora de radicais livres, sendo enzimas inibidoras efetivas (Szekeres *et al.*, 1994). O RR é um bloqueador de radicais livres através da inibição de subunidade de ferro não-hemoglobínico requerendo a ativação da tirosinase livre. Ambos didox e trimidox promove o efeito antitumoral e antiviral in vivo e in vitro (Tihan *et al.*, 1991; Sumpter *et al.*, 2004).

O ácido elágico apresenta propriedades anti-câncer relacionada a capacidade de bloquear o ciclo celular, bem como induzir a apoptose e inibir a formação do crescimento tumoral in vivo (Narayanan *et al.*, 1999), todavia o mecanismo molecular responsáveis por estes efeitos ainda não são largamente conhecidos (Masamune *et al.*, 2005).

Segundo Masamune *et al.* (2003) o fator de crescimento promovido pelo ácido elágico (PDGF-BB) aumentou significativamente a proliferação de células pancreáticas. A proliferação induzida de PDGF foi inativada pelo ácido elágico em dose dependente, revelando que a inibição do PDGF-BB induziu das células pancreáticas em dose dependente. De acordo com os estudos de Li *et al.* (2005) o ácido elágico é capaz de induzir, de maneira dose dependente, o bloqueio da fase G1 e o estímulo da apoptose em linhagens de células T24, em que tais achados foram confirmados por meio de análise através da citometria de fluxo de hidrofiploidia nuclear, em que o bloqueio da ciclo celular em G1 e a apoptose parece estar estatisticamente significante nas doses de 10, 25 e 50 µM. Foi reportado que o ácido elágico bloqueia a progressão da fase G0/G1 e estimula a apoptose em carcinoma epidermóide de pele (Narayana *et al.*, 1999).

De acordo com Chang *et al.* (2002) e Han *et al.* (2002) evidências indicam que concentrações subapoptóticas de drogas citotóxicas podem induzir o cessamento do crescimento com recursos senescentes de p53 e p21, os quais são extremamente importante neste processo. Corroborando desta forma os achados de Li *et al.* (2005), em que o ácido elágico se apresenta capaz de induzir a morte celular de linhagens tumorais, principalmente por meio de mecanismos de caspase dependente. A inibição da caspase ativa por z-VAD-fmk reduz significativamente a indução de apoptose pelo ácido elágico. Em adição, a regulação do ciclo celular, auxiliado pela p21 waf-1/CIP-1 prevenindo a apoptose, mediando a sobrevivência dos fosfotidilinositol através da fosforilação de AKT (Zhou *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2002). De acordo com Li *et al.* (2005) a possibilidade que a p21 WAF-1/CIP-1 protege os danos celulares

relacionados com a estrutura do DNA iniciando a apoptose, enquanto a p53 media a reparação do DNA durante o dano.

A apoptose desencadeada pelo ácido elágico pode ser induzida em algumas etapas do ciclo celular envolvendo G0/G1, as quais são comprometidas pelo bloqueio. Tal fato é concebível pela alta expressão de wtp53 que não sobrevive in vivo devido o bloqueio de G1 induzido pela p53 (Li *et al.*, 1999; Hsiao *et al.*, 1997). Isto também pode ser reportado na apoptose de células tumorais ocasionadas pela hipóxia (Yu *et al.*, 2002). A apoptose foi completamente inibida no pré-tratamento com a caspase inibidora z-VAD-fmk. Este fenômeno também demonstra que o declínio da caspase-3 efetora levou ao início da viabilidade das células T24 quando tratadas com ácido elágico. Aparentemente o ácido elágico induz a apoptose e a ativação da caspase-3 efetora. Entretanto o ácido elágico não afeta a atividade da caspase-1 e 8. Isto é bem conhecido na radio entre a determinação de proteínas pró e anti-apoptóticas, em parte a suscetibilidade da sinalização de morte celular na apoptose (Gross *et al.*, 1999; Vander *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000).

Nos estudos de Li *et al* (2005) o ensaio por PCR demonstra que o ácido elágico promove a expressão dos genes p53 e p 21 inibindo a expressão do gene CDK2, podendo conduzir o bloqueio da fase G0/G1 no ciclo celular. Sendo assim, ácido elágico tem apresentado exibir atividade antineoplásica, através da indução da apoptose e do bloqueio da progressão do ciclo celular.

Muitos estudos têm reportado que a ciclina dependente de quinase 2(CDK-2) e a ciclina E estão envolvidas no ciclo celular entre a fase G1 para S, em que os ensaios por PCR revelaram que o ácido elágico inibe a CDK-2, em que tal processo pode estar intimamente relacionado ao bloqueio da transição da fase G1/M no ciclo celular das células T24, induzindo a apoptose pela ativação da caspase 3 efetora (Ibrado *et al.*, 1996).

1.9.1.6 ALCALÓIDES

Os alcalóides são frequentemente encontrados nas cascas, haste e raiz das plantas de romãs, bem como em seu suco. Há normalmente dois tipos de alcalóides incluindo as piperidinas, apresentando um esqueleto contendo seis anéis aromáticos e pirrolidinas apresentando cinco anéis aromáticos em sua estrutura molecular. As piperidinas são reportadas em casca, hastes e raízes da romã, assim como a isopeletierina, pseudopeletierina, e N-metilisopeletierina são os alcaloides majoritários encontrados na haste e em sua casca (Neuhofer *et al.*, 1993).

1.9.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS JÁ REPORTADAS ATRAVÉS DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS PRESENTES NOS PRODUTOS NATURAIS

QUADRO 1. Ação biológica dos produtos naturais e os fitoquímicos envolvidos

PRODUTO NATURAL	COMPOSTO QUÍMICO (FITOQUÍMICO)	AÇÃO BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
Bagas	Polifenóis (extrato etanólico)	Atividade antiproliferativa HL-60 (células leucêmicas humanas)	KATSUBE <i>et al.</i> , 2003
Framboesa	Elagitaninos	Atividade antiproliferativa (HeLa)	ROSS <i>et al.</i> , 2007
Baga	Procianidinas	Baixo grau antiproliferativo	McDougall <i>et al.</i> , 2008
Vinho	Polifenóis (resveratrol, quercetina, catequina, epicatequina)	Atividade antiproliferativa	Damianianaki <i>et al.</i> , 2000; Kampa <i>et al.</i> , 2000
Chá verde	Polifenóis (epicatequina, epigalocatequina, epigalocatequina-3-galato, epigalocatequina-galato)	Atividade antiproliferativa	Zhang <i>et al.</i> , 1999; Weisburg <i>et al.</i> , 2004; Nichenametla <i>et al.</i> , 2006
Soja	Isoflavona Genisteína	Inibição do crescimento de células tumorais (leucemia\ linfoma\ próstata\ pulmão\ cabeça e pescoço)	Sakar & Li, 2002
Maçã	Composto fenólico	HT-29 estabilizou a genitoxicidade e potencial metastásico → influenciou os 03 estágios da carcinogênese	McCann <i>et al.</i> , 2007
Mirtilo, Uva e Peixe	Extratos ricos em antocianinas (ARES)	Atividade quimioprotetora	Lala <i>et al.</i> , 2006
Amora Silvestre	Cianidina-3-glicosídeo (C3G)	Inibição do crescimento de células tumorais no câncer de pele e pulmão Atividade quimiopreventiva\ quimioterapêutica com inibição de metástase	Ding <i>et al.</i> , 2006
Chá	Polifenol epigalocatequina-galato (EGCG) e teaflavina	Inibição da tumorigênese	Huang <i>et al.</i> , 1997
Chá verde e preto	Cafeína e Nonfenol	Induziu completamente a carcinogênese	Huang <i>et al.</i> , 1997

QUADRO 2. Fitoconstituintes da *Punica Granatum* Linn e o seu potencial efeito biológico Anti-Inflamatório e Anticâncer

COMPONENTES DA PLANTA	COMPONENTES OU CLASSES DE COMPOSTOS	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
SEMENTES	α-Tocofenol	Inibição da síntese de esfingolipídeos; Inibição da atividade da COX-2 na PC; Ativação da apoptose nas células cancerosas e nas células normais	JIUNG <i>et al.</i> (2004) JIUNG <i>et al.</i> (2000) CAMPBEL <i>et al.</i> (2006) VRAKA <i>et al.</i> (2006)
	Ác. Ursólico	Apoptose na via MCF-7 na via p53; Apoptose nas células epiteliais via caspase 3;	ZHANG <i>et al.</i> (2005) ACHIVA <i>et al.</i> (2005)
	Esteróides (deucosterol, campesterol, stigmasterol, beta-sisterol)	Apoptose em células melanoma via intrínseca por meio de ativação de caspase 3; Inibição de citocinas pró-inflamatórias em camundongos apoptose PC-3 Ciclo celular de arraste via ROS e lançamento de prostaglandinas; Reversão prejudicada de glutatil/oxidação de glutatiose via estrógeno/ fosfatidiolinosol via 3 kinase;	HARMAND <i>et al.</i> (2005); NASHED <i>et al.</i> (2005); AWAD & FINK (2000); AWAD <i>et al.</i> (2005); VIVANCOS & MORENO (2005)
	Ác. Púnico	Inibição de Invasão PC-3; Aumento da função de células B in vivo; Citotoxicidade em células leucêmicas via peroxidação lipídica	LANSKY <i>et al.</i> (2005) YAMASAKI <i>et al.</i> (2006) SUZUKI <i>et al.</i> (2001)

	<p>Ác. Hidroxibenzóico (Ác. Gálico e Elágica)</p>	<p>Indução de expressão p53/ p21; Apoptose em células cancerosas de bexiga; Inibição de crescimento e morte apoptótica em células cancerosas de próstata DU-145; Redução de células inflamatórias pancreáticas; Promoção de apoptose, alteração nas fases G0/G1 para S e COX nas células leucêmicas HL 60</p>	<p>LI <i>et al.</i> (2005); VELURI <i>et al.</i> (2006) MASAMUNE <i>et al.</i>(2005); MADLENER <i>et al.</i> (2006); HAWANG <i>et al.</i> (2005)</p>
SUCO E CASCA	<p>Ác. Hidroxicinamico (e. g. caféico)</p>	<p>Diminuição das células metastática cancerosas através da baixa regulação de expressão de metaloproteinase; Inibição da metaloproteinase 9 e redução de invasão das células tumorais;</p>	<p>HAWANG <i>et al.</i> (2005) JIN <i>et al.</i> (2005)</p>
	<p>Catequinas e Epicatequinas</p>	<p>Redução de P-glicoproteínas mediada a resistência à multidrogas; Fator de crescimento antagonico induzido por proliferação anormal; Potente inibição de proteína tirosina quinase ativa</p>	<p>QIAN <i>et al.</i> (2005) DOSS <i>et al.</i> (2005) GOUNI-BERTHOLD & SCHINIDIS (2004)</p>
	<p>Protocianidinas e Antocianidinas</p>	<p>Atividade antiangiogênica, antioxidante e anticarcinogênica; Inibição da atividade de ciclogênase, produção de óxido nítrico e potente inibição de fator receptor de crescimento epidermal;</p>	<p>BAGCHI <i>et al.</i> (2004) HOU <i>et al.</i> (2003);</p>
	<p>Quercetina</p>	<p>Atividade antimutagênica (revisão); Inibição da carcinogênese; Efeito antitumoral de flavonóides (revisão); Inibição de crescimento de células cancerosas pulmonares via G2/M e indução de apoptose</p>	<p>GALVAZO <i>et al.</i> (2004) LAMBERT <i>et al.</i> (2005) KANADASWANI <i>et al.</i> (2005) YANG <i>et al.</i> (2006)</p>

SUCO E CASCA	Elagitaninos (Punicalagin e Punicalagina)	Diminuição da UV- B, ativação modulada por NF- κ B e atividade mitogênica de proteína quinase (MAPK); Diminuição significativa de células inflamatórias em câncer de cólon ; Atividade antiproliferativa, apoptótica e antioxidante	AFAQ <i>et al.</i> (2005) ADAMS <i>et al.</i> (2006) SEERAM <i>et al.</i> (2005)
CASCA	Em adição dos compostos polifenólicos encontrados no suco...	Diminuição da expressão de fator α de necrose tumoral, expressão de gene de interleucinas- $l\beta$ em células tumorais; Atividade com sinergismo com quercetina na inibição de proliferação de células tumorais de peito	KOWALSKI <i>et al.</i> (2005); ACKLAND <i>et al.</i> (2005)
	Flavonóides (e. g. Kaempferol)	Diminuição na síntese de ácidos graxos saturados em células tumorais humanas; Diminuição da atividade quinase na adesão local, uma chave regulatória na invasão de células tumorais; Aumento de células apoptóticas através da alta regulação de receptor de morte e ativação de caspases ativas	BRUSSELMANS <i>et al.</i> (2005) Huang <i>et al.</i> (2005) HORINAKA <i>et al.</i> (2005)

FORNE: LANSKY & NEWMAN, 2007

1.9.3 MECANISMO GERAL DE AÇÃO DOS POLIFENÓIS

O desenvolvimento do câncer é um processo que ocorre em várias etapas, constituindo de algumas etapas descritas na carcinogênese (iniciação, promoção e progressão) podendo ser seguida pela invasão e metástase (Doll & Peto, 1981). Assim sendo os produtos naturais podem intervir nas etapas da carcinogênese por meio dos mecanismos de ação dos compostos fenólicos (Figura 13), tais como:

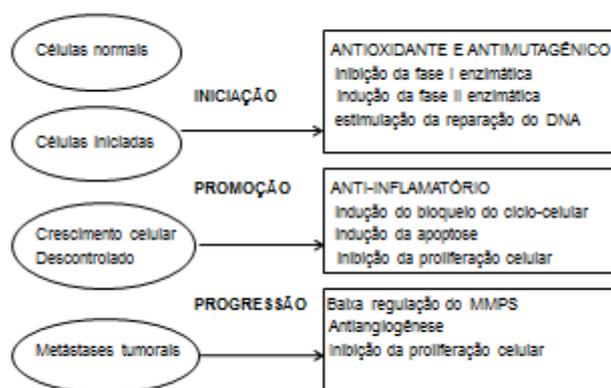


FIGURA 13: Potencial anticancer envolvendo os mecanismos de ação dos compostos fenólicos dos produtos naturais durante a carcinogênese.

FONTE: Talita Santos Bastos (2014), adaptado de Dai & Mumper, (2010)

O efeito inibidor dos compostos fenólicos derivados dos produtos naturais na carcinogênese é mediante dois mecanismos: (1) modificação do estado redox, (2) interferências nas funções celulares básicas, tais como ciclo celular, apoptose, inflamação, angiogênese, invasão e metástase (Kampa *et al.*, 2007).

1.9.4 INTERFERÊNCIA DE FUNÇÕES CELULARES BÁSICAS PELOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Fenólicos naturais podem afetar as funções celulares básicas relacionadas com o desenvolvimento do câncer por diferentes mecanismos. Em primeiro lugar, na fase de iniciação os compostos fenólicos podem inibir a ativação de pró-cancerígenos através da inibição de fase I de enzimas metabolizadoras, tais como o citocromo P450 (Hodek *et al.*, 2002) e também auxiliando na desintoxicação e eliminação das substâncias cancerígenas pela indução da fase II metabolizando enzimas como glutationa-S-transferase (GST), NAD (P) H oxirredutase quinina (NQO) e UDP glucuroniltransferase (UGT) (GALATI *et al.*, 2000). Podendo limitar a formação das células iniciadas por estimulação de reparo no DNA (Webster *et al.*, 1996; Imanishi *et al.*, 1991). Em segundo lugar os fenólicos podem inibir a formação e o crescimento de tumores através da inibição do ciclo celular através da apoptose. As células malignas são caracterizadas pela proliferação excessiva com incapacidade de diferenciação celular ou realização da apoptose sob condições normais, tendo como consequência uma prolongada e imortalizada vida, sendo assim a regulação do ciclo celular está alterada nesse tipo de células. Assim qualquer perturbação nas proteínas específicas

do ciclo celular pelos fenólicos pode potencialmente afetar ou bloquear a proliferação contínua das células tumorigênicas. Os fenólicos naturais apresentam a capacidade de induzir a parada do ciclo celular em diferentes fases, tais como através da regulação de ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs) ou indiretamente induzindo a expressão de genes p21, p27 e p53 (Ramos, 2008; Fresco *et al.*, 2006). Além disso alguns estudos tem mostrado que os compostos fenólicos naturais exibem efeito diferencial contra células cancerosas das células normais, tendo como exemplo a ação da antocianina induzindo o bloqueio da fase G1/G0 e da fase G2/M no câncer de cólon de linhagem HT-29, mas não apresentou a mesma ação em células do cólon NCW460 normais (Malik *et al.*, 2003).

Os fenólicos naturais tem sido utilizados para intervir em todos os estádios da carcinogênese. Além da ação antioxidante, a inibição do desenvolvimento do câncer por compostos fenólicos dependem de um número certo de mecanismos celulares básicos, envolvendo uma gama de bases moleculares. Além disso os extensos estudos sobre esta classe de compostos irá fornecer pistas sobre a sua possível exploração farmacêutica no âmbito da oncologia (Dai & Mumper, 2010).

1.9.5 PROMOÇÃO DA APOPTOSE POR MEIO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS PRESENTES NOS PRODUTOS NATURAIS

Em células que sofrem apoptose há alterações morfológicas a nível celular, tais como a retração da cromatina e a fragmentação do DNA em corpos apoptóticos ligados à membrana, havendo conservação do conteúdo citoplasmático, sendo posteriormente fagocitada por células especializadas (Kerr *et al.*, 1972).

As células que sofrem apoptose tipicamente apresentam condensação de cromatina e fragmentação nuclear, sendo rapidamente reconhecidas pelos macrófagos antes da lise celular, sendo removidos sem induzir uma resposta inflamatória no organismo. Portanto, os agentes indutores da apoptose pode ser considerado um fármaco anticancerígeno ideal (RAMOS *et al.*, 2005).

A apoptose reportada pela ação dos polifenóis naturais foi caspase-3-dependente. A indução da apoptose e a inibição de proliferação tem sido relatada por alguns mecanismos desempenhados pelo polifenóis naturais, tais como o bloqueio da cinase reguladora extracelular (ERK), cinase-s-Jun N-terminal (JNK) e P38 ativada pela proteína mitógena quinase (MAPK), inibição dos fatores de transcrição NF- κ B e ativador de proteína 1 (AP1); supressão da proteína quinase C (PKC) e supressão do fator de crescimento das vias (Fresco *et al.*, 2006; Ramos, 2008).

1.10 DETECÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS PRESENTES NOS PRODUTOS NATURAIS ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA

A cromatografia em coluna tem sido amplamente utilizado para fracionar extratos fenólicos. Embora o método se apresente muitas vezes trabalhoso com o consumo de solventes, ele é capaz de fornecer uma maior quantidade de frações permitindo o isolamento e a identificação de substâncias puras subsequentes (Queiroz *et al.*, 2005; Ek *et al.*, 2006; Agarwal *et al.*, 2007).

A quantificação dos compostos fenólicos no extrato de produtos naturais é influenciado pela natureza química do analito, bem como o método de ensaio, a seleção de padrões e a presença de possíveis substâncias interferentes (Naczki *et al.*, 2006).

O HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) é uma técnica confiável para a análise de compostos fenólicos. Vários suportes estão disponíveis para análise de compostos fenólicos, tais como as antocianinas, protocianidinas, taninos hidrolisáveis, flavonóis, flavan-3-ol, flavanonas, flavonas e ácidos fenólicos (Prior *et al.*, 2001; Yanagida *et al.*, 2002; Vrhovsek *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2005; Anttonen *et al.*, 2006; Lin & Harnly, 2007; McCallum *et al.*, 2007; Harris *et al.*, 2007; Rodriguez-Bernado *et al.*, 2007; Mertz *et al.*, 2007; Pawlowska *et al.*, 2008).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS E DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DE *Punica granatum Linn*

Os frutos de *Punica granatum* Linn, popularmente conhecido como romã utilizados na pesquisa foram coletados no Projeto Irrigado Senador Nilo Coelho, proveniente do Núcleo Irrigado: N9, situado na zona rural do município de Petrolina/Pernambuco/Brasil, com localização geográfica: 9° 23'34''S 40° 30'28''O, localizado na mesorregião do São Francisco, no semiárido de Pernambuco, extremo Oeste do Estado. Os frutos das romãs empregados neste estudo foram previamente cadastrados no Herbário da Universidade Federal de Sergipe (UFS), com *voucher* dessa espécie vegetal, constando de exsicata nº 20881 para fins de comprovação científica da planta em estudo (**Figura 14**).



FIGURA 14: Registro Científico (Exsicata- nº 20.881), da amostra de *Punica granatum* Linn
FONTE: Nascimento (2013)

2.2 TRIAGEM DAS AMOSTRAS DE *Punica granatum* Linn

As romãs foram submetidas a lavagem em água corrente, com a finalidade de retirar as possíveis impurezas retidas na casca das amostras, sendo estas o objeto de estudo da pesquisa e posteriormente submetidas à secagem em ambiente arejado e ventilado. Em seguida fez-se a separação dos seus constituintes em: cascas e arilos polposos, os quais continham as sementes. Após a separação, os mesmos foram acondicionados em recipientes hermeticamente fechados, mantidos sob refrigeração a -20°C.

As cascas de *Punica granatum* Linn previamente separadas foram submetidas à secagem em estufa de circulação em temperatura de 50±5°C de 48 a 72 horas (**Figura 15**), até a secagem completa da amostra. Após este processo as cascas foram quebradas em pedaços menores por ação mecânica.

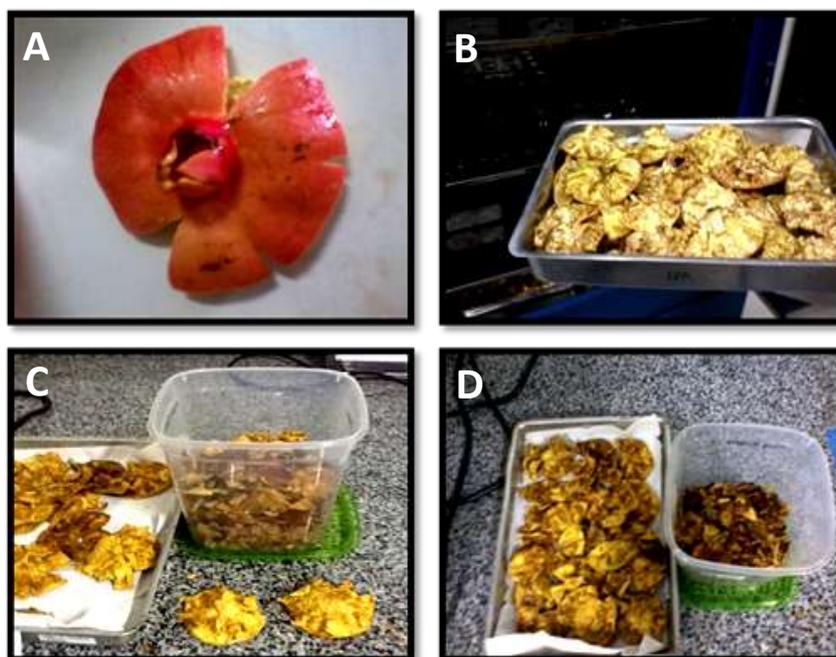


FIGURA 15: Secagem das dascas de *Punica Granatum* Linn. (A) Casca *In Natura*; (B) Secagem da Casca do fruto em estufa de circulação; (C) E (D) Amostras de Casca obtidas após secagem
FONTE: Talita Santos Bastos ,2013 (imagem própria)

Os fragmentos das cascas secas mecanicamente quebrados foram submetidas ao moinho de facas (10 *mesh*), para a obtenção do pó granulado (**Figura 16**), sendo este acondicionado em recipiente âmbar e hermeticamente fechado até a preparação do extrato aquoso.



FIGURA 16: Moinho de facas utilizado para obtenção do granulado da casca de *Punica Granatum* Linn
FONTE: Talita Santos Bastos, 2013 (imagem própria)

O material granulado foi então submetido a extração aquosa sob agitação, na proporção de 5g/500 mL (m/V) . Após \pm 2 horas sob agitação em temperatura ambiente (até obter solução homogênea), o material foi filtrado. Em seguida fez-se a utilização da solução homogênea filtrada vertendo-a em placas de vidros, previamente

esterilizadas em que estas foram então submetidas a evaporação em estufa de circulação de ar com temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 5$. O extrato seco obtido após evaporação do solvente foi pesado e acondicionado em frasco âmbar.

2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM ESPECTROMETRIA DE MASSA ACOPLADA (CLAE)

A amostra do extrato seco da casca do fruto de *Punica granatum* Linn foi solubilizada em uma mistura de água: metanol (50%) e filtrada em ultrafiltro de $0,45 \mu\text{m}$. Uma solução de 1 mg/mL do extrato foi analisada por CLAE. Essa análise foi realizada utilizando um equipamento *Shimadzu*, modelo LC-6AD, com detector de díodo SPD-M20A, coluna de fase reversa C-18 ($25 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$). Fase móvel: $0,1\%$ (v/v) de H_3PO_4 em água (A). Fluxo 1 mL/min volume injetado de $10 \mu\text{L}$. Os ácidos foram analisados utilizando o equipamento da *Shimadzu* modelo LC-6AD, modelo UV-Vis detector SPD-20A, coluna de fase reversa C-18 Phenomenex Gemini ($15 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$). Fase móvel: $0,1\%$ (v/v) de H_3PO_4 em água (95%) e de $0,1\%$ (v/v) de H_3PO_4 em acetonitrila (5%). Fluxo 1 mL/min e volume injetado de $10 \mu\text{L}$.

2.4 SUBMISSÃO DO PROJETO AOS PROTOCOLOS DE ÉTICA COM A OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

O presente trabalho foi submetido a princípios éticos, para que houvesse a manipulação dos animais a serem estudados de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e CEUA (Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Tiradentes (UNIT/ Aracaju/SE), seguindo a rigor todos os parâmetros estipulados pelos mesmos. Após a obtenção do Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa emitido pelo CEUA da UNIT o estudo foi realizado no Biotério concomitantemente com o Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural (LMBE), situado no Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), na Universidade Tiradentes (UNIT/SE), com número de protocolo 021213 adquirido pela submissão ao CEUA.

2.5 ENSAIO BIOLÓGICO

Foram necessários 60 camundongos *Swiss (Mus musculus)*, machos, adultos, com massa corpórea de $25 \pm 5\text{g}$. Os mesmos foram divididos em 05 grupos randomicamente em gaiolas apropriadas com $n=12$ cada. Os animais foram mantidos no Biotério da Universidade Tiradentes, em caixas de polipropileno e grades metálicas apropriadas com cama de maravalha, trocadas diariamente (**Figura 17**), em grupos do mesmo gênero. A temperatura do local foi regulada de acordo as exigências do

COBEA, variando de 22 °C ± 3 °C e a umidade relativa de 30 % a 70 %. A iluminação foi artificial, com uma alternância de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Os animais receberam água *ad libitum* e dieta padrão Labina® (Purina, São Paulo, Brasil).



FIGURA 17: Acondicionamento e marcação dos animais experimentais

FONTE: Talita Santos Bastos, 2013 (imagem própria)

Os cinco grupos contendo 12 animais em cada foram separados em: Grupo Controle Positivo (CTL+), tratados com fármaco padrão 5-Fluoracil (5FU), Grupo Controle Negativo (CTL-), tratados com solução salina, e os grupos experimentais divididos em *Punica granatum* (PG) 10, 25 e 50 mg/Kg, tratados respectivamente com as doses previamente estabelecidas (**Tabela 01**). Em seguida, os mesmos foram previamente marcados e submetidos aos procedimentos experimentais com posterior comparação terapêutica com a utilização do extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum* Linn nas diferentes concentrações (10; 25; 50 mg/ Kg) em relação aos grupos controles positivo e negativo. Durante todo o período experimental, os camundongos foram pesados, a fim de registrar as medidas de massa corpórea dos animais.

TABELA 01. DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DE *Punica granatum* Linn

Grupos n=12	Translocação das células tumorais	Administração terapêutica Intraperitoneal (IP)
Controle negativo	tumor Sarcoma 180 (2 x 10 ⁶ células/0,5 mL/camundongos)	Salina
Controle positivo	tumor Sarcoma 180 (2 x 10 ⁶ células/0,5 mL/camundongos)	5FU
PG 10 mg/Kg	tumor Sarcoma 180 (2 x 10 ⁶ células/0,5 mL/camundongos)	Extrato aquoso (10mg/Kg)
PG 25 mg/Kg	tumor Sarcoma 180 (2 x 10 ⁶ células/0,5 mL/camundongos)	Extrato aquoso (25mg/Kg)
PG 50mg/Kg	tumor Sarcoma 180 (2 x 10 ⁶ células/0,5 mL/camundongos)	Extrato aquoso (50 mg/Kg)

2.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL EM CAMUNDONGOS TRANSPLANTADOS COM CÉLULAS TUMORAIS DE SARCOMA 180

2.6.1 PRINCÍPIO DO TESTE COM O SARCOMA 180

O Sarcoma 180, também conhecido como tumor de Crocker, é um tumor indiferenciado descrito pela primeira vez em 1914. Tal tumoração foi encontrada na região axilar direita em modelo experimental de roedores (camundongos) e previamente classificado como carcinoma. Devido a proximidade da tumoração desenvolvida na região subcutânea axilar com o tecido mamário não foi identificar o tecido de origem, impossibilitando a confirmação neoplásica (cutânea ou mamária). Por meio de estudos realizados posteriormente notou-se que as células a respito não possuíam laminina, descartando desse modo a caracterização como de origem epitelial. Uma das características do sarcoma 180 é a capacidade de invadir tecidos, tais como muscular esquelético, adiposo, nervoso e vascular (Stewart *et al.*, 1959).

As células tumorais de Sarcoma 180 podem ser transplantadas através de translocação subcutânea, intramuscular e intraperitoneal, apresentando crescimento rápido em 90 a 100% dos animais submetidos à translocação (Zuckerberg, 1973). Mesmo apresentando um comportamento agressivo local, o sarcoma 180 não é capaz de produzir metástase (Kurashige & Mitshuashi, 1982).

De acordo com todas as características inerentes as células tumorais do Sarcoma 180, estas tem sido amplamente utilizadas em estudos para avaliar componentes químicos, físicos e biológicos, possibilitando a investigação a respeito do crescimento, patogênese, citogenética e terapêutica do câncer (Stewart *et al.*, 1959). Sendo este um requisito relevante para o desenvolvimento da pesquisa em questão.

2.6.2 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS DO SARCOMA 180

Os testes para avaliação da atividade antitumoral foram realizados utilizando o tumor experimental Sarcoma 180 oriundo do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) da Universidade Federal do Ceará, em que as células tumorais foram mantidas na cavidade ascítica de camundongos da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

Sendo assim, para a realização do estudo *in vivo* foram utilizadas células tumorais malignas de Sarcoma 180 ascites de animais portadores de tumor com dez dias de implantação. Para a extração das células do Sarcoma 180 o animal de manutenção/ doador foi previamente anestesiado com xilazina e quetamina e em seguida sacrificado para a realização de coleta do líquido ascítico da cavidade abdominal, através de punção ascítica, removendo assim, as células tumorais viáveis a serem avaliadas no experimento. Posteriormente fez-se o preparo de suspensão celular com 5,0 mL de solução Ringer lactato e 0,5 mL do líquido ascítico para a contagem de células viáveis a serem utilizadas no experimento.

2.7 VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO MÉTODO DE EXCLUSÃO DO AZUL DE TRIPAN

O método de exclusão por meio do azul de Tripán permite quantificar separadamente as células tumorais viáveis das células tumorais mortas pela substância testada, sendo este um corante de contraste para identificação de células viáveis. O corante apresenta a capacidade de penetrar em todas as células, todavia somente as células viáveis conseguem bombear o corante azul de Tripán para o meio extra-celular, permitindo desta forma observar uma coloração azulada nas células mortas.

A contagem das células tumorais viáveis foi feita através do contraste com Azul de Tripán em câmera de Neubauer (**Figura 18**) por meio de microscopia óptica a fim de constatar a contagem das células tumorais viáveis para a pesquisa.

A concentração de células viáveis foi ajustada em solução *Ringer lactato* para 5×10^6 líquido ascítico contendo células tumorais do Sarcoma 180, as quais foram inoculadas de forma subcutânea na região axilar dos animais experimentais.

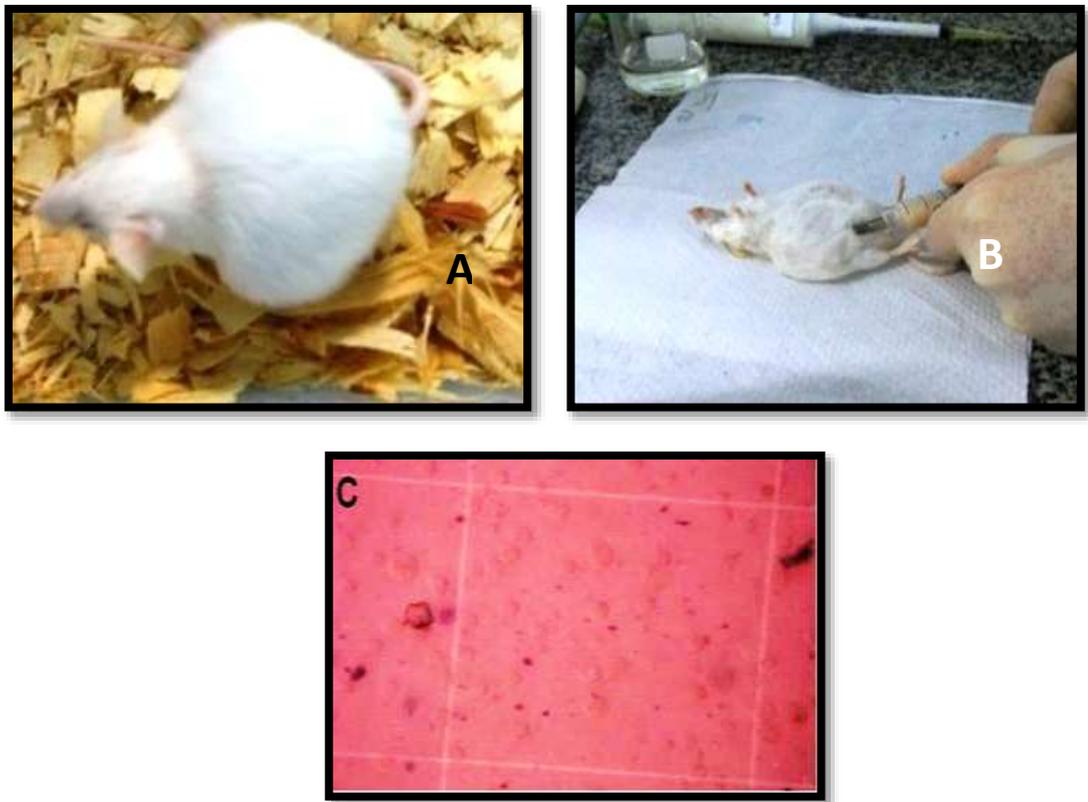


FIGURA 18: (A) Tumor Ascítico em animal de manutenção; (B) Punção ascítica das células tumorais em animal de manutenção; (C) contagem das células tumorais viáveis do Sarcoma 180 em Microscopia Óptica

FONTE: Talita Santos Bastos, 2013 (imagem própria)

2.8 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

Os animais depois de inoculados com tumor Sarcoma 180 (2×10^6 células/0,5 mL/camundongos) por via subcutânea (Bezerra *et al.*, 2006; Bezerra *et al.*, 2008a; Bezerra *et al.*, 2008b; Zheng *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010) na região axilar, foram submetidos, um dia depois ao tratamento via intraperitoneal (**Figura 19**) com o extrato aquoso de *Punica granatum Linn* (1%) nas doses de 10, 25 e 50 mg/Kg durante sete dias consecutivos e os demais grupos: controle negativo(CTL-), tratado com solução salina e o grupo controle positivo (CTL+), tratado com fármaco padrão 5FU.



FIGURA 19: Imobilização do Animal para administração do extrato, bem como as substâncias relativas aos controles (Positivo: 5FU/ Negativo: Salina) Via Intraperitoneal (Ip)

FONTE: Talita Santos Bastos, 2013 (acervo pessoal)

No oitavo dia, um dia após o final do tratamento, os animais foram submetidos a coleta das amostras sanguíneas sob efeito anestésico, a fim de realizar as análises bioquímicas e hematológicas. Em seguida, os camundongos foram eutanasiados através de câmara de gás com fluxo contínuo com CO₂ para executar a excisão dos tumores, bem como dos órgãos de interesse, sendo eles: fígado, rins e baço, sendo devidamente pesados em balança de alta precisão e analisados macroscopicamente. Posteriormente os espécimes foram acondicionados em frascos coletores, previamente identificados, contendo solução de formaldeído a 10%, a fim de fixar os espécimes, mantendo suas propriedades física e química. Após 24 horas de fixação dos espécimes excisionados, os mesmos foram processados histopatologicamente. Após a obtenção das lâminas com os cortes histológicos fez-se a análise microscópica a fim de avaliar o efeito terapêutico do extrato aquoso da casca de *Punica granatum Linn*, por meio das características histopatológicas do sarcoma 180 observadas nos tecidos analisados nos animais experimentais.

2.9 PARÂMETROS AVALIADOS

2.9.1 MASSA CORPÓREA DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

A massa corpórea dos animais foi mensurada a partir do primeiro dia experimental, uma vez que os animais foram pesados diariamente para avaliar ganho ou perda de massa corpórea, sendo também observados os possíveis sinais de anormalidades comportamentais em relação a massa corpórea de cada animal avaliado.

2.9.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

No oitavo dia foram coletadas amostras sanguínea por meio do plexo orbital sob efeito anestésico, em que foram utilizados capilares internamente revestidos com ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), evitando assim a coagulação da amostra até o tubo coletor. Os tubos coletores utilizados foram de recém-nascidos, uma vez que a quantidade sanguínea se apresenta limitada por se tratar de camundongos. O exame hematológico foi realizado através de automação, com o aparelho Pentra 80. Tanto a série branca como a série vermelha foram avaliadas. Na série branca, fez-se a contagem total e diferencial dos leucócitos enquanto que na série vermelha fez-se a quantificação de hemáceas, hemoglobina e hematócrito.

2.9.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

A avaliação dos parâmetros bioquímicos foi realizado por meio da amostra também obtida via plexo orbital, destinadas a investigar as funções sobre os tecidos, nomeadamente renais e hepático. O sangue venoso coletado foi depositado em tubos coletores de recém-nascidos a seco. Os parâmetros bioquímicos mensurados foram Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT), para avaliação de função hepática e para avaliação renal foi mensurado os marcadores uréia e creatinina utilizando-se *kits* comerciais Labtest. A determinação destes parâmetros foi realizada por aparelho semi-automatizado *Bioplus 200* e automatizado pelo *Labmax 240*, realizados no Laboratório Central da Universidade Tiradentes.

2.9.4 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Punica granatum Linn* NA EVOLUÇÃO DA MASSA PONDERAL, VOLUME E TAXA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DOS TUMORES:

Os tumores foram excisionados e pesados no fim do experimento. A massa ponderal foi expressa como a massa tumoral aferida por 100 g de massa corpórea dos camundongos. O volume tumoral foi determinado pelo produto da altura, profundidade e largura dos tumores, multiplicado pelo fator de correção 0,52 e expressa em mm³ (LEE et al., 2003). A taxa de inibição tumoral (%) foi calculada pela fórmula seguinte:

$$PI \% = [(A - B) / A - 1] \times 100$$

Na qual:

PI – Percentual de inibição da massa tumoral;

A – Média da massa do tumor do controle negativo;

B – Média da massa do tumor do grupo em tratamento com PG 10, 25 e 50 mg/Kg;

2.9.5 AVALIAÇÃO ANÁTOMO-PATOLÓGICA E HISTOMORFOLÓGICA DOS ESPÉCIMES

Baço, fígado e rins foram removidos e analisados quanto a sinais de lesões, mudança de cor e hemorragias. A massa relativa dos órgãos foi calculada pela equação a seguir: $MR = (\text{massa do órgão} \times 100) / \text{massa do animal}$.

Posteriormente, as amostras dos órgãos e tumores removidos foram armazenados em solução de formaldeído 10% tamponado. Decorridas 24h da fixação dos espécimes, estes foram submetidos ao processamento histológico de rotina laboratorial para obtenção das secções histológicas a serem avaliadas em microscopia óptica. As lâminas foram analisadas e documentadas em fotomicroscópio OLYMPUS CX31 (**Figura 20**). Para registro dos cortes, campos histológicos específicos de cada tecido foram fotografados e documentados para posterior análise dos achados histopatológico.

2.10 DETECÇÃO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE TUNEL (*Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling*)

Secções histológicas de 5 µm de espessura foram incubadas em *in situ cell death detection kit, POD* (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), de acordo com o seguinte protocolo:

- Desparafinação dos cortes em solução xilol (em 3 banhos de 3 min cada)
- Lavagem em álcool absoluto (2 banhos de 3 min)
- Lavagem em álcool 70%, 80% e 70% (1 banho por 3 min cada)
- Lavagem com água destilada (1 banho de 3 min)
- Lavagem em PBS (2 banhos de 3 min)
- Recuperação antigênica com Citrato de Sódio (10 min em microondas)
- Bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% + álcool metílico (10 min em câmara escura)
- Lavagem em Solução PBS (2 banhos de 3 min)
- Secagem das lâminas com papel toalha com isolamento dos cortes com caneta hidrofóbica
- Incubação com solução etiqueta (fluoresceína – dUTP) em câmara úmida escura 37°C--100µL (1 hora)
- Secagem das lâminas em papel toalha

- Lavagem em Solução PBS (3 banhos de 3 min)
- Secagem das lâminas em papel toalha
- Incubação com anticorpo anti-fluoresceína-POD (câmara úmida escura 37°C -- 50µL) durante 30 min
- Secagem das lâminas em papel toalha
- Lavagem em Solução PBS (3 banhos de 5min cada)
- Incubação com solução cromógena reveladora DAB (câmara úmida escura (150µL) com adição de 1,2 µL de peróxido de hidrogênio para ativação do cromógeno (1min)
- Lavagem em água destilada
- Contracoloração com Hematoxilina de Harris (1 min)
- Lavagem em água destilada (2 banhos de 3 min)
- Desidratação em álcool 70, 80 e 90% e absoluto (1 banho de 3 min cada)
- Diafinização em xilol I e II (1 banho de 3 min cada)
- Montagem em permount

As medidas quantitativas foram expressas em porcentagem de células apoptóticas contadas em objetivas de maior aumento (40x). Áreas tumorais necróticas ou com intenso infiltrado inflamatório foram evitadas. Áreas periféricas, respeitando os limites tumorais, foram priorizadas na análise.

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm Erro Padrão da média (E.P.M). Para comparações múltiplas dos dados foi utilizada análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey utilizando o programa Prisma (GraphPad Software, Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

3. RESULTADOS

3.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM ESPECTOMETRIA DE MASSA ACOPLADA (CLAE/MS)

A cromatografia é considerada uma das técnicas de maior eficiência de maximização do rendimento dos fenóis totais, tanto das atividades biomoleculares como dos compostos químicos presentes nos produtos naturais. Na análise cromatográfica do extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum* Linn (**Figura 21**) foram identificados os compostos tânicos majoritários: ácido gálico, punicalagina α , punicalagina β e ácido elágico, em conformidade com os picos presentes no cromatograma.

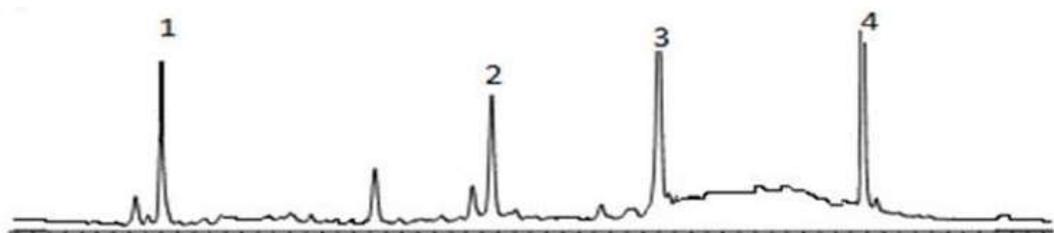


Figura 20: Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (CLAE) do Extrato Aquoso da casca de *Punica granatum* Linn. (1) Ácido Gálico; (2) Punicalagina α ; (3) Punicalagina β e (4) Ácido Elágico.

FONTE: Fernandes (2012).

A concentração do ácido gálico no extrato analisado foi de 32,24 mg/g e do ácido elágico foi 41,67 mg/g. As punicalaginas (punicalagina α e punicalagina β) foram identificadas, todavia não foram passíveis de determinação quantitativa.

3.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO EXTRATO AQUOSO DA *Punica granatum* Linn

Como pode ser demonstrado na **Figura 21A/B**, a massa e os volumes tumorais dos animais tratados com 5-FU foi significativamente menor do que os do grupo tratados somente com solução salina ($p < 0.001$). Similarmente, a administração intraperitoneal do EAPG (10, 25 e 50 mg/Kg) também reduziu significativamente a massa e o volume dos tumores avaliados ($p < 0.001$). A redução da massa e do volume dos tumores nos grupos tratados com o EAPG nas doses de 10 e 50 mg/Kg foi estatisticamente semelhante ao grupo tratado com o quimioterápico padrão, 5-FU ($p > 0.05$). Entretanto não houve diferença significativa dessas duas variáveis entre os grupos tratados com o extrato aquoso, em que todos foram capazes de diminuir o tamanho tumoral ($p > 0.05$). Não houve diferença significativa quanto a taxa de

inibição do crescimento tumoral observadas entre os grupos tratados com o 5-FU e os grupos tratados com EAPG 10 mg/Kg e 50 mg/Kg ($p>0.05$) (**Figura 21C**). Todavia, a taxa de inibição do crescimento tumoral induzida no grupo tratado com o EAPG na dose de 25 mg/Kg foi significativamente mais baixa do que o 5-FU ($p<0.05$). Sendo assim os dados referentes ao peso tumoral e a Taxa de Inibição de Crescimento tumoral (TxIC) revela que o tratamento efetuado com o EAPG frente ao Sarcoma 180 não foi dose-dependente.

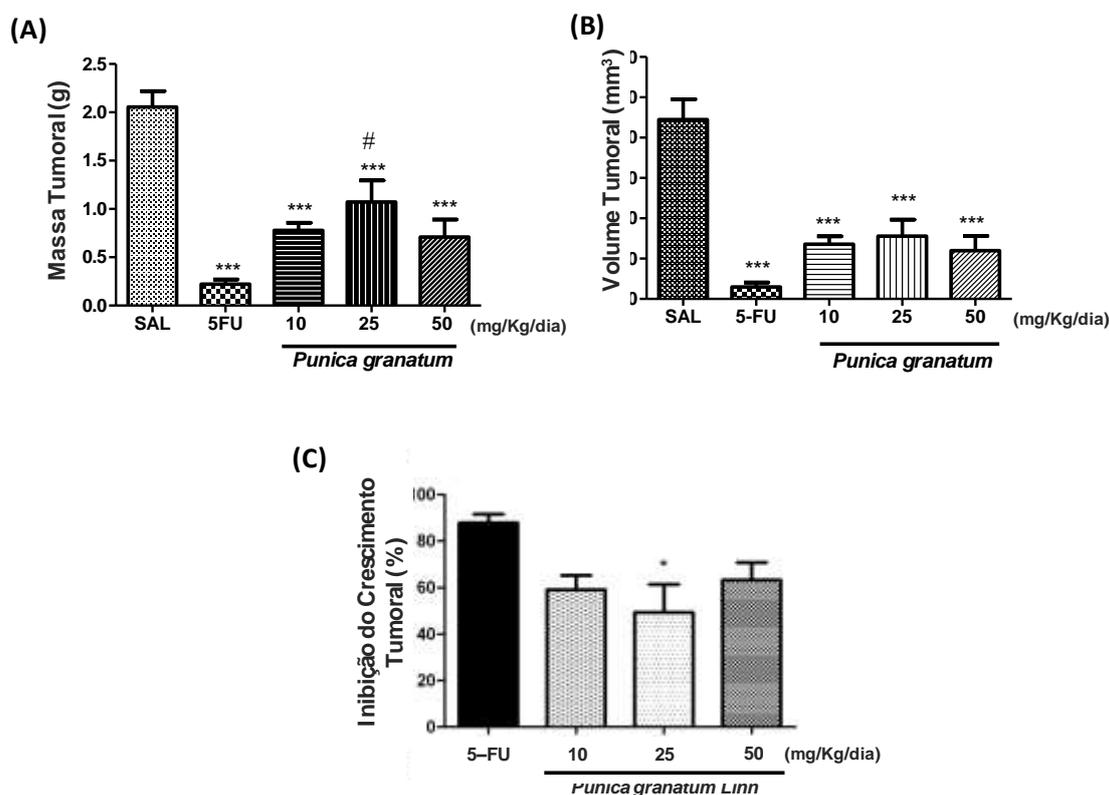


Figura 21. (A) Determinação da massa média e (B) do volume médio dos tumores nos diferentes grupos analisados. (C) Determinação da Taxa de Inibição do Crescimento Tumoral analisados nos grupos (em relação a massa tumoral do grupo tratado com salina). Os dados foram expressos como média \pm Erro padrão da média (EPM). *** Diferença significativamente estatística ($p<0.001$) em comparação com o grupo tratado com salina; # Diferença significativamente estatística ($p<0.05$) em comparação ao grupo tratado com 5-FU; * Diferença significativamente estatística ($p<0.05$) em comparação com grupo tratado com 5-FU (ANOVA e Teste de Tukey).

A análise post-mortem dos tumores revelou similaridade histopatológica entre os grupos (**Figura 22**). O tecido tumoral foi caracterizado por neoplasia composta por células poligonais pequenas e ovóides compactamente organizadas em algumas áreas e frouxamente dispostas em outras. As células tumorais frequentemente invadem lóbulos de tecido adiposo, assim como o músculo estriado esquelético. Muitas das células tumorais exibiam citoplasma fortemente eosinofílico e núcleos hipercromáticos e moderadamente pleomórficos, embora algumas vezes a cromatina nuclear se apresentasse finamente dispersa, com nucléolos proeminentes. Figuras típicas e atípicas de mitose foram frequentemente observadas no parênquima

neoplásico (2-3 mitoses/campo histológico/400x). Além disso, foram observadas extensas áreas de necrose coagulativa, bem como moderado infiltrado inflamatório constituído por linfócitos e neutrófilos. Invasão vascular e perineural, ainda que raras, foram encontradas em todos os grupos avaliados, independente do tratamento aplicado aos animais.

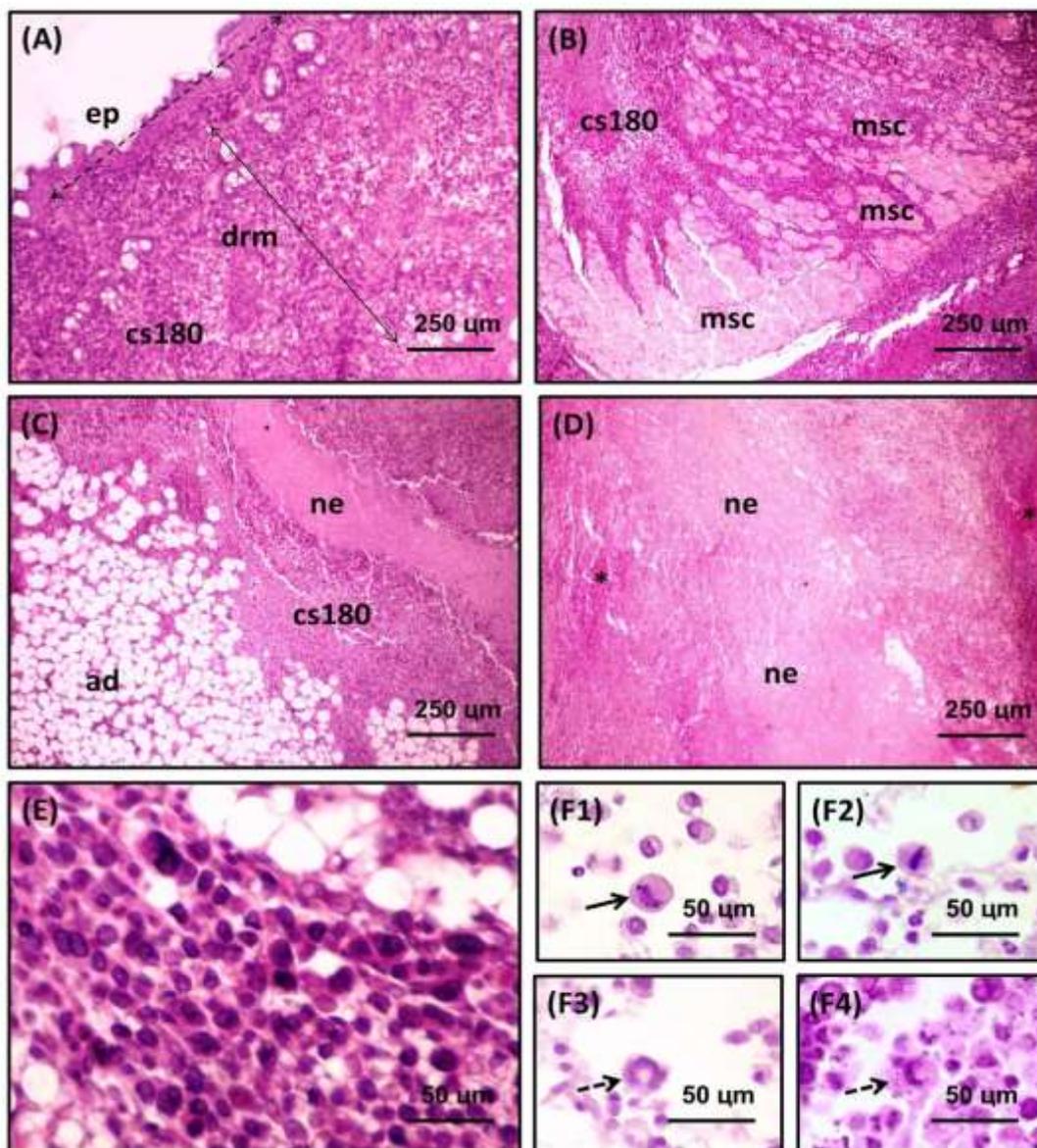


Figura 22. Fotomicrografias de secções histológicas do Sarcoma 180 coradas com Hematoxilina\Eosina. **(A)** Células tumorais de Sarcoma 180 (cs180) proliferação abaixo da epiderme (ep, seta dupla pontilhada), invadindo a derme subjacente (drm, seta dupla sólida). **(B)** Invasão e dissociação nos feixes de fibras musculares esqueléticas por células tumorais (msc). **(C)** Células tumorais (cs180) invadindo o tecido adiposo hipodérmico (d), e causando focos de necrose coagulativa tissular (ne). **(D)** Extensas áreas de necrose coagulativa (ne) limitada por células tumorais viáveis (*). **(E)** Detalhe do parênquima tumoral exibindo pleomorfismo celular e hiperchromatismo nuclear. **(F1 e F2)** Figuras de mitose típica e **(F3 e F4)** atípica (HE, A - D, x 100, E - F, x 800).

Neste estudo, a morte celular por apoptose foi detectada usando a marcação para TUNEL (*Terminal Deoxyuridine Nick-End Labeling*). A marcação positiva foi

identificada por meio da coloração marrom evidenciada no núcleo celular (**Figura 24**). O número de células TUNEL-positivas variou consideravelmente em todos os grupos avaliados (**Figura 24**), mas o percentual médio de células TUNEL-positivas foi significativamente maior nos grupos tratados com 5-FU ($p < 0.01$) e EAPG nas doses de 10 mg/Kg ($p < 0.01$), 25 mg/Kg ($p < 0.01$) e 50 mg/Kg ($p < 0.001$). Não houve diferença significativa entre o grupo tratado como o quimioterápico padrão 5-FU e as três doses administradas com o EAPG, nem entre essas últimas.

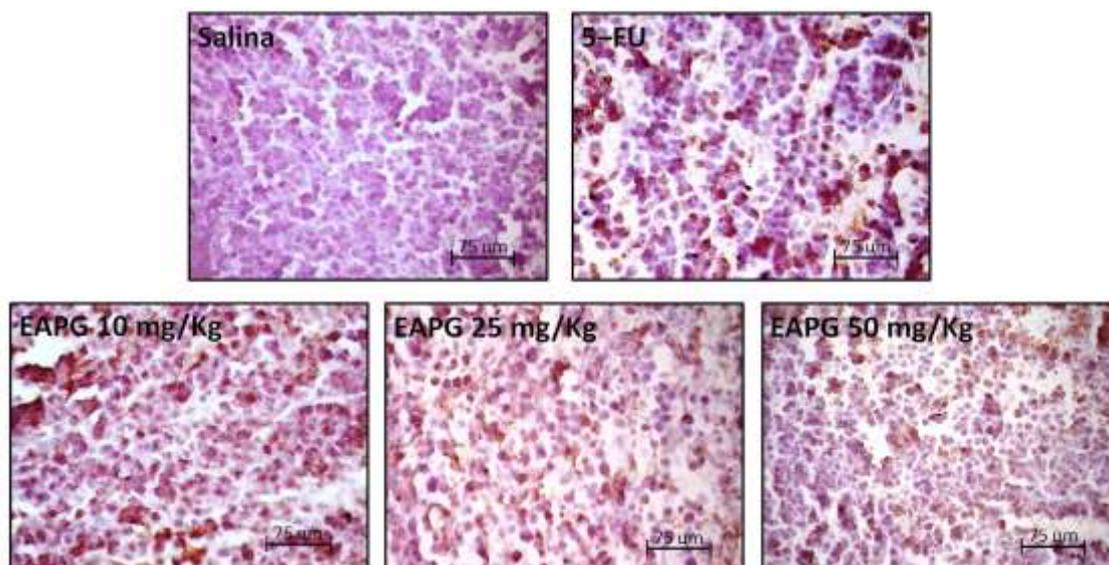


Figura 23. Marcação das células apoptóticas in situ através do método TUNEL em seções histológicas impregnadas em parafina de S-180 tratados com Salina, 5-FU e EAPG nas doses de 10, 25 e 50 mg/Kg. Células tumorais apoptóticas TUNEL-positivas apresentam coloração nuclear marrom escura. Observe a marcação bastante evidente nos grupos tratados com quimioterápico padrão 5-FU e com o EAPG em relação ao grupo tratado com salina (ampliação original de 800 x).

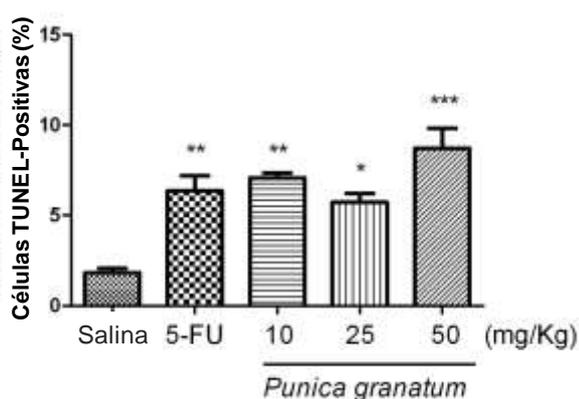


Figura 24. Avaliação do percentual médio de células tumorais marcadas positivamente pelo TUNEL. Os dados foram expressos em média \pm Erro Padrão da Média (EPM). Diferenças estatisticamente significativas entre os valores foram expressos como * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) e *** ($p < 0.001$) em comparação com o grupo tratado com a salina (ANOVA e Teste de Tukey).

3.3 ANÁLISE DOS EFEITOS ADVERSOS CAUSADOS NA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA *Punica granatum* Linn (EAPG)

A **Figura 25A** mostra a massa corpórea média dos animais no início e no fim do experimento. Não foram observadas mudanças significantes na massa dos animais estudados no início do experimento ($p > 0.05$). Todavia, no 8º dia a massa dos animais tratados com 5-FU foi significativamente menor do que nos demais grupos ($p < 0.05$). Além disso, como demonstrado na **Figura 25B**, o percentual médio da perda de massa (em relação a massa inicial) foi significativamente maior no grupo tratado com 5-FU do que nos outros grupos ($p < 0.05$).

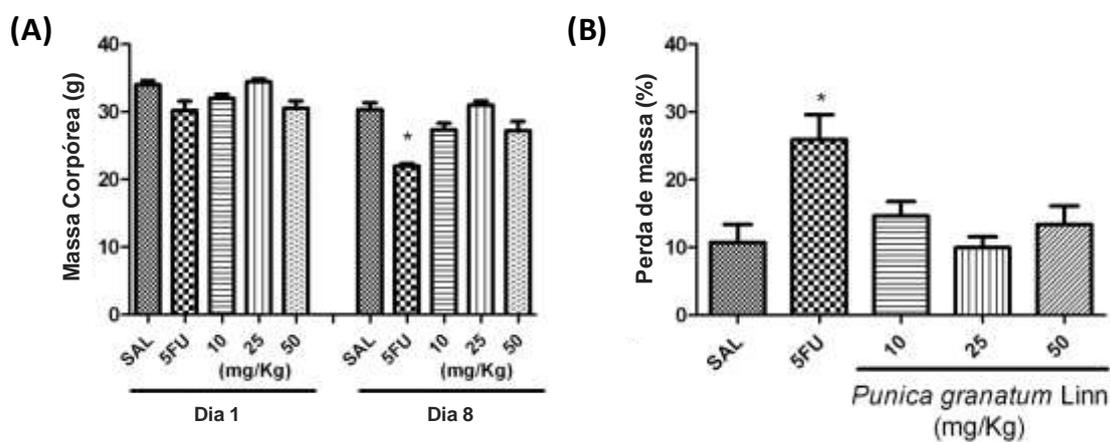


Figura 25. (A) Avaliação inicial e final da massa corpórea dos animais e **(B)** índice de perda de massa dos animais nos diferentes grupos ao longo do período experimental. Os dados foram expressos em média \pm Erro Padrão da Média (EPM). * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em comparação como o grupo tratado com Salina (ANOVA Teste de Tukey).

A **Tabela 02** apresenta os resultados dos parâmetros bioquímicos avaliados neste estudo. Os níveis séricos de Aspartato Aminotransferasa (ALT) se apresentaram significativamente aumentados no grupo tratado com 50 mg/Kg do EAPG em comparação ao grupo tratado com a salina ($p < 0.001$). Os níveis de Creatinina se mostraram significativamente aumentados nos grupos tratados com EAPG nas doses de 25 mg/Kg ($p < 0.001$) e 50 mg/Kg ($p < 0.01$), bem como no grupo tratado com 5-FU ($p < 0.05$), em comparação com o grupo tratado com a salina. Apesar das diferenças significativas encontradas nos grupos analisados, os valores se encontravam dentro do intervalo de normalidade estabelecido pelo Banco de Dados de Apoio à Pesquisa Experimental do Biotério da Universidade Tiradentes.

Tabela 02. Efeito do extrato aquoso da *Punica granatum* Linn (EAPG) sobre os parâmetros bioquímicos dos animais transplantados com o Sarcoma 180.

Tratamento	Dose (mg/kg/day)	ALT (U/l)	AST (U/l)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Salina	-	37,2 ± 2,1	217,4 ± 13,4	46,5 ± 3,0	0,41 ± 0,03
	10	42,8 ± 2,2	228,5 ± 10,3	54,4 ± 4,4	0,36 ± 0,05
EAPG	25	43,7 ± 4,3	219,7 ± 11,8	37,9 ± 3,4	0,12 ± 0,02***
	50	56,8 ± 6,4*	276,2 ± 31,7	43,0 ± 3,3	0,23 ± 0,07**
5-FU	25	30,5 ± 5,3	201,0 ± 9,3	34,3 ± 4,2	0,32 ± 0,01*
Valores de Referencia#	-	17,0 – 77,0	54,0 – 298,0	42,0 – 61,0	0,10 – 0,90

Os valores foram expressos como média ± Erro Padrão da Média (EPM). As diferenças significativas entre os valores foram expressos como *(p<0.05), ** (p<0.01) e *** (p<0.001) em comparação ao grupo tratado com salina (ANOVA e Teste de Tukey). # Valores obtidos a partir do Banco de Dados de Apoio À Pesquisa Experimental do Biotério da Universidade Tiradentes.

A análise dos parâmetros hematológicos não revelou mudanças significativas nos dados pertinentes ao eritrograma, como demonstra a **Tabela 03** (p>0,05). Entretanto, conforme explicitado na **Tabela 04**, o grupo tratado com o 5-FU apresentou diminuição significativa na contagem total dos leucócitos (p<0,01) e na contagem diferencial (relativa) de neutrófilos (p<0,001). Também foi observado um aumento relativo na contagem diferencial de eosinófilos (p<0,001). Contrariamente, a administração do EAPG induziu aumento na contagem diferencial de neutrófilos nas três doses administradas, 10mg/Kg (p<0,05), 25 mg/Kg (P<0,001) e 50 mg/Kg (p<0,05), sem contudo levar a uma leucocitose expressiva.

Tabela 03. Efeito do Extrato aquoso da *Punica granatum* Linn (EAPG) sobre os parâmetros eritrocitários dos animais transplantados com o Sarcoma 180.

Drug	Dose (mg/kg/day)	Eritrócitos Totais (x 10 ⁶)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)
Salina	-	9,08 ± 0,18	12,99 ± 0,32	40,58 ± 0,68
	10	9,78 ± 0,15	14,24 ± 0,23	44,03 ± 0,63
EAPG	25	8,57 ± 0,66	12,74 ± 0,95	39,46 ± 2,91
	50	9,25 ± 0,25	12,94 ± 0,41	40,42 ± 1,09
5-FU	25	8,30 ± 0,56	11,19 ± 0,81	34,80 ± 2,55
Reference Values#	-	6,36 – 9,82	10,2 – 16,6	39 – 49

Os valores foram expressos como média ± Erro Padrão da Média (EPM). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos avaliados (ANOVA e Teste de Tukey). # Valores obtidos a partir do Banco de Dados de Apoio À Pesquisa Experimental do Biotério da Universidade Tiradentes.

Tabela 04 – Efeito do extrato aquoso da *Punica granatum* Linn (EAPG) nos parâmetros hematológicos- Leucograma coletados via plexo orbital nos animais translocados com Sarcoma 180.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Leucócitos Totais (10 ³ cells/mL)	Contagem Diferencial de Leucócitos (%)			
			Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos
Salina	-	7.8 ± 0.6	25.7 ± 2.0	63.2 ± 4.8	2.3 ± 0.4	3.3 ± 0.7
	10	9.6 ± 0.9	37.9 ± 3.1*	56.1 ± 3.2	2.6 ± 0.4	3.3 ± 0.8
EAPG	25	9.9 ± 1.0	48.2 ± 5.8***	55.8 ± 3.6	4.3 ± 0.8*	2.8 ± 0.4
	50	8.1 ± 0.7	32.4 ± 2.4*	59.1 ± 3.3	2.8 ± 0.4	5.8 ± 1.4
5-FU	25	2.1 ± 0.3***	8.8 ± 1.4**	70.4 ± 4.8	2.4 ± 0.5	9.9 ± 1.6***
Valores de Referência#		6 – 15	10 – 40	55 – 95	1 – 4	0 – 4

Os resultados foram expressos como média ± Erro Padrão da Média (EPM). As diferenças estatísticas entre os valores foram expressos como *(p<0.05), ** (p<0.01) e *** (p<0.001) em comparação ao grupo tratado como salina (ANOVA e Teste Tukey). #Valores obtidos a partir do Banco de Dados de Apoio À Pesquisa Experimental do Biotério da Universidade Tiradentes.

O exame histológico dos órgãos excisionados *post-mortem* revelou que o fígado e o baço dos animais tratados com 5-FU mostrou áreas de superfície opacas em comparação com os demais grupos, mas em relação ao formato e consistência não houve diferença entre os grupos analisados. Além disso, o grupo tratado com o 5-FU apresentou redução de peso médio dos baços em relação ao grupo tratado com salina (p<0,05), mas este efeito adverso não foi evidenciado nos grupos tratados com EAPG (p>0,05) (**Table 05**). A análise histológica revelou que a aparência morfoarquitetural e citológica dos tecidos dos órgãos avaliados não apresentou alterações dignas de nota. (**Figura 26**), excetuando o baço dos animais tratados com 5-FU, os quais apresentaram marcante atrofia da polpa branca (**Figura 27**).

Tabela 05. Efeito do extrato aquoso da *Punica granatum* Linn (EAPG) sobre a massa média dos órgãos dos animais transplantado com Sarcoma 180.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Órgãos (g/100 g de massa corpórea)		
		Fígado	Rins	Baço
Salina	-	4,86 ± 0,18	1,22 ± 0,04	0,43 ± 0,05
	10	4,25 ± 0,18	1,22 ± 0,03	0,39 ± 0,06
AEPG	25	5,01 ± 0,28	1,39 ± 0,08	0,49 ± 0,08
	50	4,62 ± 0,42	1,38 ± 0,04	0,43 ± 0,03
5-FU	25	4,45 ± 0,55	1,36 ± 0,04	0,30 ± 0,04**

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Diferenças significativas entre os valores foram expressas como ** (p<0.01) em comparação com o grupo tratado com salina (ANOVA e Teste de Tukey).

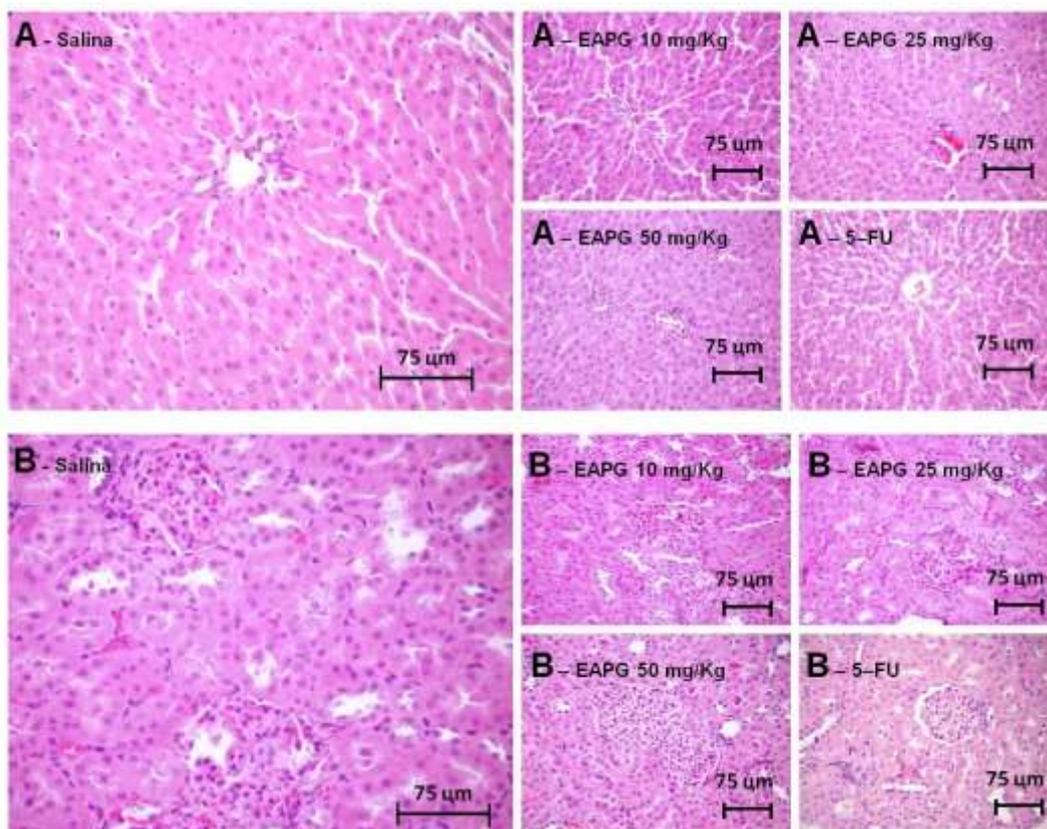


Figura 26. Fotomicrografia do (A) fígado e (B) rins revelando a aparência arquitetural e citológica nos tecidos analisados sem maiores alterações em todos os grupos avaliados (HE, ampliação de 400 x).

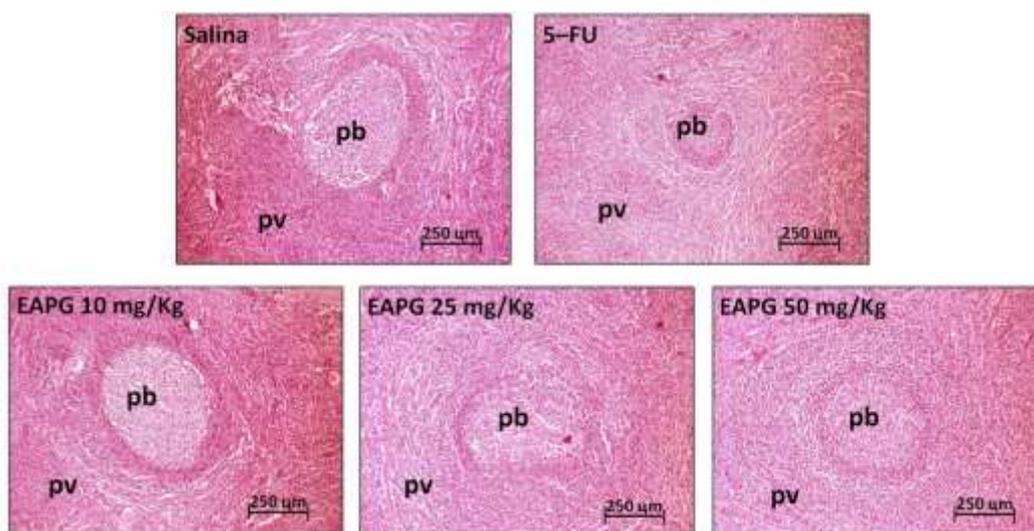


Figura 27. Fotomicrografia de tecido esplênico. Polpa branca (pb) apresentando atrofia significativa no grupo tratado com 5-FU, mas mantendo o aspecto arquitetural habitual nos demais grupos analisados (Salina, EAPG 10, 25 e 50 mg/Kg), Polpa vermelha (pv) se mostrou normal e semelhante em todos os grupos (HE, ampliação de 100 x).

4. DISCUSSÃO

O tratamento antineoplásico convencionalmente aplicado aos tumores malignos nos dias atuais, a exemplo da quimioterapia, apresenta fortes efeitos adversos, decorrente da ação inespecífica desses fármacos, que causam danos tanto às células cancerosas quanto as células saudáveis do paciente, comprometendo a funcionalidade de tecidos normais saudáveis. Dentre os citados efeitos adversos destaca-se a hipoplasia medular de moderada a severa, esta última determinando marcante quadro de imunossupressão e conseqüente aumento substancial da susceptibilidade a infecções secundárias (Ismael *et al.*, 2008). Desta forma, torna-se cada vez mais necessária a busca por novos constituintes bioativos mais seletivos e/ou menos agressivos ao organismo, visando minimizar os efeitos colaterais ocasionados pela quimioterapia.

Tem sido demonstrado que a prospecção de produtos naturais representa uma das mais eficazes estratégias de descoberta de novos compostos bioativos com potencial aplicação na terapia anticâncer (Ortholand & Ganesan, 2004). De fato, cerca de 60% dos fármacos correntemente utilizados na terapia antineoplásica foram isolados de plantas ou derivados de fontes naturais (Newman & Cragg, 2007), o que apoia e justifica a prospecção continuada desses recursos naturais em busca de novas alternativas para o tratamento e controle do câncer.

Diante do exposto se faz necessário o desenvolvimento da geração de agentes apresentando melhoria nas suas características, tais como aumento da eficácia e estabilidade, melhoria nas propriedades farmacocinéticas, bem como a diminuição dos efeitos colaterais e adversos (Ortholand & Ganesan, 2004).

Estudos tem demonstrado que os compostos químicos encontrados na *Punica granatum* Linn apresentam atividade biológica antitumoral que poderiam servir de base para criação de novos fármacos quimioterápicos (Garret & Worman, 1999; Wilson & Danishefsky, 2007). Desta forma, para analisar o potencial antitumoral do extrato aquoso da casca de *Punica granatum* Linn foi utilizado modelo experimental de transplantação de Sarcoma 180 em camundongos Swiss.

O Sarcoma 180 (S-180) é um tumor maligno murino de baixo potencial metastático que representa uma das linhagens mais freqüentemente utilizadas em pesquisas de atividade antitumoral em modelo experimental com roedores (Hodnett *et al.*, 1983; Wang *et al.*, 1992; Araújo, 2012). O tumor experimental S-180 foi descoberto em 1914 no *Crocker Laboratory (Columbia University, New York)*, é originalmente um tumor sólido, surgido espontaneamente na região axilar de camundongos, e foi inicialmente classificado como carcinoma mamário. Após vários transplantes

subcutâneos, assumiu a forma sarcomatosa. As células tumorais do Sarcoma 180 são mantidas na forma ascítica em camundongos *swiss* a cada 10 dias, sendo estes os animais de manutenção. Atualmente, o Sarcoma 180 é uma linhagem celular ATCC (*American Type Culture Collection*) na qual é transplantada através de inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal apresentando potencial de crescimento rápido em 90 a 100% dos animais inoculados. Sendo assim, o uso do modelo experimental utilizando células tumorais como aquelas derivadas do Sarcom 180 tem sido um ótimo modelo, uma vez que este se apresenta eficiente, com fase de promoção rápida quando comparados com outros modelos experimentais tumorigênicos. Em geral, as neoplasias são resultantes de múltiplos eventos genéticos, em que são necessárias várias mutações para que ocorra a transformação da célula cancerosa (Oliveira- Júnior *et al.*, 2005).

Uma vez transplantado, o S-180 forma um tumor sólido, de crescimento bastante rápido, em 90 a 100% dos animais experimentais, atingindo o tamanho de aproximadamente 18 mm em seu maior diâmetro em sete dias (Barba, 2010). Esses dados corroboram aqueles obtidos no presente estudo, uma vez que os tumores transplantados apresentaram comportamento similar em todos os grupos.

No presente estudo, a utilização de solução salina, um veículo inerte, foi adotada como controle negativo, e 5-Fluoracil (5-FU), um quimioterápico com reconhecida ação antitumoral foi preconizada por outros estudos (Schwartz *et al.*, 1995; Longley *et al.*, 2003). O tratamento com 5-FU (CTL+) reduziu significativamente a massa média dos tumores transplantados, em comparação com aqueles tratados apenas com solução salina (CTL-). O mecanismo de ação deste composto químico parece estar relacionado à inibição da Timidilato Sintase (TS), uma enzima fundamental para síntese das pirimidinas, pelo 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (dUMP), incorporação de 5-fluoro-5-trifosfato (FUTP) ao RNA e incorporação de 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato (FdUTP) ao DNA celular. Esses fenômenos parecem induzir a redução da síntese e reparo do DNA, promovendo morte da célula-alvo (Barba, 2010).

As três doses do extrato aquoso da casca de *Punica granatum* Linn testadas neste experimento promoveram redução significativa da massa tumoral média após sete dias de transplantação de células do sarcoma 180 em comparação com o tratamento apenas com solução salina, mas esta resposta não foi dose-dependente. Além disso, observou-se que a taxa de inibição do crescimento tumoral nas doses de 10 e 50 mg/Kg foram estatisticamente comparáveis àquelas obtidas usando o

quimioterápico padrão (5-FU). Estes dados sugerem um elevado potencial de atividade antitumoral para o extrato aquoso da casca da *Punica granatum* Linn. Apoiando estes achados, Oliveira *et al.* (2010) observaram a atividade antitumoral do extrato etanólico, cuja polaridade do solvente extrator, o etanol, é próxima a da água, solvente utilizado neste estudo, de outras partes da *Punica granatum* Linn, como fruto e sementes, em ensaios biológicos *in vivo* utilizando Tumor Ascítico de Ehrlich. Adicionalmente, Motaal & Shaker (2011) também observaram importante atividade antitumoral *in vitro* de extratos polares da casca da romã sobre linhagens ATCC MCF-7 e HCT-116 c, derivadas de carcinoma humano de mama e cólon, respectivamente, e atribuem esta atividade biológica a presença de considerável concentração de compostos tânicos como ácido gálico e elágico nos extratos. Estes últimos dados também parecem suportar os resultados obtidos no presente estudo, já que o ácido gálico e elágico foram compostos químicos majoritários do extrato aquoso de *Punica granatum* (EAPG).

Os mecanismos fisiopatológicos associados à atividade antitumoral de extratos de *Punica granatum* Linn obtidos com solventes mais polares ainda não estão claramente elucidados. Vários trabalhos que estudaram a ação da *Punica granatum* Linn sobre diferentes indicadores de atividade antitumoral observaram que tanto frações lipídicas quanto aquosas dos extratos parecem apresentar potencial pró-apoptótico seletivo contra diferentes linhagens de células cancerígenas (Kim *et al.*, 2002; Albrecht *et al.*, 2004; Johar *et al.*, 2004; Seeram *et al.*, 2005; Lansky & Newmann, 2007). Neste sentido, Sehper *et al.* (2012) demonstraram que o extrato etanólico da casca da *Punica granatum* Linn induzia a morte celular programada em células ATCC PC3 de carcinoma prostático por meio de quantificação da produção de nucleosomos durante a desnaturação nuclear de células apoptóticas. Jayakumar *et al.* (2012) também evidenciaram a ação citotóxica apoptose-induzida do extrato metanólico de *Punica granatum* sobre células ATCC A549 derivadas de carcinoma pulmonar humano por meio da análise quantitativa da fragmentação do DNA das células tumorais. Portanto, a literatura parece apontar que os componentes de extratos polares de *Punica granatum* poderiam desempenhar um papel importante na indução de apoptose de células tumorais *in vitro* e *in vivo*.

De acordo com Elmore, (2007), apoptose é o processo refinadamente controlado de morte celular programada disparada por vias de sinalização bioquímica intrínsecas. Os mecanismos de apoptose envolvem uma cascata de eventos moleculares dependentes de energia (ATP-dependentes) que inclui a ativação de proteases de cisteína como a ECI (enzima conversora de IL-1 β), ativação de segundos

mensageiros dependentes da interação Fas-Fas ligante, distúrbios da progressão do ciclo celular, estresse celular, ativação de genes da família bcl-2 e ação da proteína oncosupressora p53. Todas essas vias conduzem a eventos bioquímicos comuns, caracterizado pela clivagem da caspase-3, resultando em degradação do citoesqueleto celular e proteínas nucleares, fragmentação do DNA, ligação cruzada de proteínas, inversão (*blebbing*) de membrana e formação de corpos apoptóticos e, finalmente, expressão de receptores para células fagocitárias levando à fagocitose sem inflamação secundária.

Desta forma, para avaliar a participação da via apoptótica na atividade antitumoral exercida pelo EAPG, o índice apoptótico foi mensurado por meio da marcação terminal de fragmentos de DNA nuclear (técnica do TUNEL). Foi observado que o tratamento com EAPG promoveu aumento significativo do percentual de células TUNEL-positivas quando comparado ao grupo Salina. Este aumento foi similar àquele evidenciado no grupo tratado com 5-FU. Esses dados sugerem fortemente que o efeito antitumoral promovido pelo extrato está associado a maiores índices de morte celular induzida por apoptose. É possível que os compostos tânicos majoritários presentes no EAPG, tais como ácido elágico e gálico, estejam crucialmente envolvidos nos mecanismos responsáveis pelos efeitos pró-apoptóticos. Sustentando esta hipótese, tem sido demonstrado que o ácido elágico é capaz de estimular a apoptose em linhagens celulares de carcinoma pancreático humano pouco e moderadamente diferenciadas (MIAPaCa-2 e PANC-1, respectivamente), em resposta a inibição seletiva da transcrição do fator NF- κ B. Esta inibição leva a ativação da via pró-apoptótica mitocondrial com liberação do citocromo C e consequente ativação da cascata de caspases (Edderkaoui *et al.* 2008). Além disso, também foi relatado que o ácido gálico induz apoptose em linhagens de células HL-60 derivadas de leucemia promielocítica humana (Yeh *et al.*, 2011), bem como de células A375.S2 derivadas de melanoma humano (Lo *et al.*, 2010) por meio de vias dependentes de caspases. Contudo, estudos posteriores ainda são necessários a fim de desvendar os mecanismos específicos associados ao efeito pró-apoptótico do EAPG sobre células tumorais.

Um dos maiores desafios relativos ao sucesso da quimioterapia contra o câncer reside na eliminação ou minimização dos efeitos colaterais e/ou adversos das drogas utilizadas correntemente. Corroborando relatos prévios efetuados por El-Sayyad *et al.*, (2009) e Gonzaga *et al.* (2009), o tratamento com 5-FU promoveu, no presente estudo, uma gama de efeitos colaterais/adversos indesejáveis, como perda de massa corpórea, mielossupressão severa e atrofia esplênica. Por outra ótica, os resultados

deste trabalho também demonstram que a administração de EAPG não provocou alterações significativas na contagem de leucócitos totais, indicando ausência de efeitos imunossupressivos direto nos leucócitos do sangue periférico. De fato, o EAPG chegou a promover discreta, mas significativa, neutrofilia relativa, sugerindo que o extrato possa apresentar um potencial papel estimulatório da resposta imune. No entanto, como os valores relativos deste leucócitos ainda se enquadravam dentro do intervalo de normalidade, essa sugestão deve ser encarada com parcimônia, de modo que mais estudos são necessários para que se possa investigar adequadamente a natureza desses resultados.

A análise dos parâmetros bioquímicos também fornece um panorama interessante. Embora algumas diferenças significativas tenham sido observadas nos marcadores de função hepática (AST e ALT) e renal (creatinina e uréia) nos grupos tratados com EAPG, em relação ao grupo tratado com salina, todos os valores séricos obtidos neste estudo permaneceram dentro do intervalo de normalidade. Tais achados parecem sugerir que essas diferenças, ainda que significativas, poderiam representar resultados estatísticos espúrios e, portanto, sem relevância clínica. A análise da massa média, aspecto macroscópico e características histopatológicas dos rins e fígados desses animais, indicando achados notoriamente dentro dos padrões de normalidade anatomopatológicos e similares aos encontrados no grupo tratado com Salina, parecem corroborar a hipótese de que as alterações encontradas nos marcadores bioquímicos possam constituir apenas variações de fisiológicas não representantes de dano funcional real dos órgãos. Desta forma, uma vez que, segundo Vidal *et al.*(2003), esses parâmetros hematológicos, bioquímicos e anatomopatológicos podem ser usados para determinar evidências de toxicidade em extratos de *Punica granatum Linn*, os dados obtidos nesse estudo são sugestivos de que, nas doses estudadas, o uso extrato aquoso de *Punica granatum Linn* é toxicologicamente seguro.

Desta forma os dados obtidos neste estudo sugerem que a administração intraperitoneal do extrato aquoso de *Punica granatum Linn* apresentou atividade antitumoral em modelo experimental de sarcoma 180 em camundongos comparável àquela exercida pelo 5-FU (quimioterápico padrão). Além disso, o tratamento com o extrato não promoveu efeitos adversos típicos do quimioterápico, como perda de peso e leucopenia. No entanto, estudos posteriores ainda são necessários a fim de elucidar os mecanismos fisiopatológicos responsáveis por esta atividade biológica.

5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, foi possível concluir que:

- ✓ O extrato aquoso de *Punica granatum L.* apresenta, entre seus compostos majoritários, o ácido gálico e elágico e a punicalagina α e β .
- ✓ A administração intraperitoneal do extrato aquoso de *Punica granatum L.* promoveu inibição do crescimento tumoral comparável ao quimioterápico padrão (5-FU).
- ✓ Não foi observada relação de dependência entre dose e eficácia da atividade inibitória do crescimento tumoral.
- ✓ A administração do extrato aquoso de *Punica granatum L.* nas três doses não promoveu efeitos adversos/colaterias evidenciados com o uso do quimioterápico padrão.
- ✓ A dose efetiva antitumoral foi a de 10 mg/mg do extrato aquoso de *Punica granatum Linn*

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHED, A., BOUHLEL, I., SKANDRANI, I., VALENTI, K., KADRI, M., GUIRAUD, P., STEIMAN, R., MARIOTTE, A.M., GHEDIRA, K., LAPORTE, F., DIJOUX-FRANCA, M.G., CHEKIR-GHEDIRA, L. Study of antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*. Confirmation by microarray expression profiling. **Chem. Biol. Interact.** 165, 1–13, 2007,

7.

ACHIWA, Y., HASEGAWA, K., KOMIYA, T., UDAGAWA, Y. Ursolic acid induces Bax-dependent apoptosis through the caspase-3 pathway in endometrial cancer SNG-II cells. **Oncology Reports**, 13, 51–57, 2005.

ACKLAND, M.L., VAN DEWAARSENBERG, S., JONES, R., 2005. Synergistic antiproliferative action of the flavonols quercetin and kaempferol in cultured human cancer cell lines. **In Vivo**, v. 19, p. 69–76, 2005.

ADAMSN, L. S.; SEERAM, N. P.; AGGARWAL, B. B.; TAKADA, Y.; SAND, D.; HEBER, D. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. **J. Agric. Food Chem.**; 54, 980-985, 2006.

ADHAMI, V. M.; KHAN, N.; MUKHTAR, H. Cancer Chemoprevention by Pomegranate: Laboratory and Clinical Evidence. **Nutrition and Cancer**, vol. 61, 2009.

AFAQ, F., MALIK, A., SYED, D., MAES, D., MATSUI, M.S., MUKHTAR, H. Pomegranate fruit extract modulates UV-B-mediated phosphorylation of mitogen activated protein kinases and activation of nuclear factor kappa B in normal human epidermal keratinocytes paragraph sign. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, p. 38–45, 2005.

AGARWAL, C., TYAGI, A., AGARWAL, R. Gallic acid causes inactivating phosphorylation of cdc25A/cdc25C-cdc2 via ATM-Chk2 activation, leading to cell cycle arrest, and induces apoptosis in human prostate carcinoma DU145 cells. **Mol. Cancer Ther.**5, 3294–3302, 2006.

AGARWAL, C.; VELURI, R.; KAUR, M.; CHOU, S.C.; THOMPSON, J.A.; AGARWAL, R. Fractionation of high molecular weight tannins in grape seed extract and identification of procyanidin B2-3,3'-di-Ogallate as a major active constituent causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. **Carcinogenesis** 2007, 28, 1478-1484.

AGULLO, G.; GAMET-PAYRASTRE, L.; FERNANDEZ, Y.; ANCIAUX, N.; DEMIGNE, C.; REMESY, C. Comparative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29 cells). **Cancer Lett.**1996, 105, 61-70.

AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism. **Nutrition**. New York: v. 18,n. 1, p. 75-81, 2002.

AHN D, PUTT D, KRESTY L, STONER GD, FROMM D AND HOLLENBERG PF: The effects of dietary ellagic acid on rat hepatic and esophageal mucosal cytochromes p450 and phase II enzymes. **Carcinogenesis** 17: 821-828, 1996.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. Molecular biology of the cell. 3 ed. Nova Iorque: Garland Publishing; 1994; Stanley MA. Human papillomavirus and cervical carcinogenesis. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**; 15:663-76, 2001.

ALBRECHT, M.; JIANG, W.; KUMI-DIAKA, J.; LANSKY, E. P.; GOMMERSAL, L. M.; MANSEL, R. E. Pomogranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. **J Med Food**; vol. 7, p.274-83, 2004.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A., DONNICI, C.L. Câncer e agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos que Interagem com o DNA: Uma Introdução. **Quim.Nova**,v. 28, No. 1, 118-129, 2005.

AMARAVADI, R. K. & THOMPSON, C. B. The Roles of Therapy-Induced Autophagy and Necrosis in Cancer Treatment. **Clinical Cancer Research**, vol. 13, pp. 7271, 2007.

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90, 7915-7922, 1993.

ANTTONEN, M.J.; KARJALAINEN, R.O. High-performance liquid chromatography analysis of black currant (*Ribes nigrum* L.) fruit phenolics grown either conventionally or organically. **J. Agric. Food Chem.**, 54, 7530-7538, 2006.

ARAÚJO, A. A. S. Avaliação da atividade antitumoral do extrato hidroalcoólico da *Remirea maritima* Aubl. **Universidade Federal de Sergipe**. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Departamento de Fisiologia, 2012.

ARMIN, L.; ANDREA, P.; DOUGLAS, G. R.; MELINO, G. Death fold domain interaction in apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, Vol. 10, p10. 3, 2003.

ARORA-KURUGANTI P, LUCCHESI PA, WURSTER RD. Proliferation of cultured human astrocytoma cells in response to an oxidant and antioxidant. **J Neurooncol** ;44:213– 21,1999.

ATKINS, M. B. Cytokine-based therapy and biochemotherapy for advanced melanoma. **Clin Cancer Res.** 2006; 12(7 Suppl.), 2006.

AVILA, M. A.; CANSADO, J.; HARTER, K. W.; VELASCO, J. A.; NORATIO, V. Quercetin as a modulator of the cellular neoplastic phenotype. Effects on the expression of mutated H-ras and p53 in rodent and human cells. **Adv Exp Med Biol**; 401:101–10, 1996.

AVILA, M. A.; VELASCO, J. A.; CANSADO, J.; NOTARIO, V. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. **Cancer Res**;54:2424–8, 1994.

AVIRAM M, ROSENBLATT M, GAITANI D, NITECKI S, HOFFMAN A, DORNFIELD L. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis (CAS) reduces common carotid intima-media thickness (IMT), blood pressure and LDL oxidation. **Clin Nutr**; 23:423–33, 2004.

AVIRAM, M.; DORNFIELD, L.; ROSENBLATT, M.; VOLKOVA, N.; KAPLAN, M.; COLEMAN, R. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. **Am J Clin Nutr**; 71, 1062-76, 2000.

AWAD, A.B., BURR, A.T., FINK, C.S., 2005. Effect of resveratrol and beta-sitosterol in combination on reactive oxygen species and prostaglandin release by PC-3 cells. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 72, p. 219–226, 2005.

AWAD, A.B., FINK, C.S. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2127–2133, 2000.

AYRTON, A. D.; LEWIS, D. F. V.; WALKER, R. ; IONNADES, C. Antimutagenicity of ellagic acid towards the food mutagen IQ: Investigation into possible mechanisms of action. **Food and Chem. Toxicol**, v. 30, p. 289-295, 1992.

BALLOUX, F.; ZAFIROPOULOS, P.J.; YAMAGUCHI, S.; WINTER, S.; CARTHEW, R.W.; COOPER, M.; JONES, D.; FRENZ, L.; GLOVER, D.M. Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression. **Nature**, v.432, 980-987p., 2004.

BARASCH, A. & PETERSON, DE. Risk factors for ulcerative oral mucositis in cancer patients: unanswered questions. **Oral Oncol.**, 39; 91-100, 2003.

BARCH DH, RUNDHAUGEN LM, STONER GD, PILLAY NS AND ROSCHE WA: Structure-function relationships of the dietary anticarcinogen ellagic acid. **Carcinogenesis** 17: 265-269, 1996.

- BATE-SMITH EC: Detection and determination of ellagitannins. **Phytochemistry**, 11: 1153-1156, 1972.
- BERASAIN C.; CASTILLO, J.; PERUGORRIA, M. J.; LATASA, M. U.; PRIETO, J.; AVILA, M. A. Inflammation and liver cancer: new molecular links. **Ann N Y Acad Sci.**;1155:206-21, 2009.
- BETTENCOURT-DIAS, M.; GIET, R.; SINKA, R.; MAZUMDAR, A.; LOCK, W. G.; BALLOUX, F.; ZAFIROPOULOS, P. J.; YAMAGUCHI, S.; WINTER, S.; CARTHEW, R. W.; COOPÉR, M.; JONES, D.; FRENZ, L.; GLOVER, D. M. Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression. **Nature** 432, 980-987 , doi:10.1038/nature03160; 2004.
- BEZERRA, D.P. Estudo Farmacológico das Propriedades Anticâncer da Piplartina. Tese de Doutorado, Fortaleza, 255p., 2008.
- BEZERRA, D.P.; CASTRO, F.O.; ALVES, A.P.N.N.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; ELMIRO, F.J.M.; COSTA-LOTUFO, L.V. *In vivo* growth-inhibition of sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from *piper*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, p.801- 807, 2006.
- BEZERRA, D.P.; CASTRO, F.O.; ALVES, A.P.N.N. ; PESSOA,C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; ELMIRO, F.J.M.; ALENCAR, N.M.N.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M.W.; LOTUFO, L.V.C. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. *J Appl Toxicol*, v. 28, p. 156-163, 2008.**
- BHALLA K, IBRADO AM, TOURKINA E, TANG C, MAHONEY ME AND HUANG Y: Taxol induces internucleosomal DNA fragmentation associated with programmed cell death in human myeloid leukemia cells. **Leukemia** 7: 563-568, 1993.
- BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, vol. 90, pp. 157-177, 2001.
- BLANKENBERG, F. G. In vivo imaging of apoptosis.**Cancer Biol Ther** 7:1525–32; 2008.
- BLOCK, G.; PATTERSON, B.; SUBAR, A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. **Nutr Cancer**, v. 18, p. 1-29, 1992.
- BOATRIGT, K. M & SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspases activation. *Curr Opin Cell Biol*;v. 15, p.725-31, 2003.
- BOIK, J. Mutations, gene expression, and proliferation. In *Natural Compounds in Cancer Therapy*, 1st ed.; S. Farnell, Ed. Oregon Medical Press: Princeton, MN,; p 22, 2001.
- BONASSA, E. M. A. & SANTANA, T. R. Enfermagem em terapêutica oncológica.São Paulo: Atheneu; 2005.
- BORGES, P. Novos modelos de sobrevivência com fração de cura baseados no processo de carcinogênese. Tese de doutorado; **UFSCar-São Carlos**, São Paulo, 2012.
- BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol.*; vol. 39, p. 615-47, 2003. HENGATNER, M. O. The biochemistry of apoptosis.*Nature*; v. 407, p. 770-76, 2000.
- BOUKHARTA M, JALBERT G, CASTONGUAY A. Efficacy of ellagitannins and ellagic acid as cancer chemopreventive agents. **Bull de Liaison- Groupe Polyphenols**;16:245– 9, 1992.
- BOYLE, P. & LEVIN, B. World Cancer Report 2008.World Health Organization/ **International Agency of Research on Cancer**, Lyon, p.524, 2008.
- BRACA, A.; SORTINO, C.; POLITI, M.; MORELLI, I.; MENDEZ, J. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*.**J Ethnopharmacology**; v.79, p. 379-381, 2002.

BRASILEIRO-FILHO, G.; BOGLIOLO, L.; ROCHA, A. Patologia, Guanabara Koogan, 2006.

BRONNER, M. O.; CULIN, C.; REED, J. C.; FURTH, E. E. The Bcl-2 proto-oncogene and gastrointestinal tumor progression model. **Am J Pathol**; vol. 146, p.20-26, 1995.

BROW, J. M. & ATTARDI, L. D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. **Nature Reviews Cancer**, vol. 5, pp. 231-237 ;doi:10.1038/nrc1560, 2005.

BROW, J. M. & WILSON, W. R. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. **Nature Reviews Cancer**, vol.4, pp.437-447 | doi:10.1038/nrc1367, 2004.

BROWN, D. C. & GATTER, K. C. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. **Histopathology**;17:489-503, 1990.

BRUIN, E. C. & MEDENA, J. P. Apoptosis and non-apoptosis deaths in cancer development and treatment response. **Cancer treatments Review**; 34, 737-749, 2008.

BRUSSELMANS, K., VROLIX, R., VERHOEVEN, G., SWINNEN, J.V., 2005. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v 280, p. 5636–5645, 2005.

BU-ABBAS, A.; CLIFFORD, M. N.; WALKER, R.; IONNADES, C. Marked antimutagenic potential of aqueous green tea extracts: **Mechanisms of action mutagenesis**, v. 9, p.325-331.

BUTLER, M. S. The role of nature product chemistry in drug discovery. **J. Nat. Prod.**, 67 (12): 2141- 2153, 2004.

CAMPBELL, S.E., STONE, W.L., LEE, S., WHALEY, S., YANG, H., QUI, M., GOFORTH, P., SHERMAN, D., MCHAFFIE, D., KRISHNAN, K., 2006. Comparative effects of RRR-alpha- and RRR-gamma-tocopherol on proliferation and apoptosis in human colon cancer cell lines. **BMC Cancer**, v. 6, p. 13, 2006.

CARLO M. CROCE, M.D. Oncogenes and Cancer.Molecular origins of cancer.**N Engl J Med**; v.358: p.502-11; 2008.

CASTONGUAY A, GALI-MUHTASIB HU, PERCHELLET EM, GAO XM. Antitumorogenic and antipromoting activities of ellagic acid, ellagitannins and oligomeric anthocyanin and procyanidin.**Int J Oncol**; 10:367– 73, 1997.

CASTONGUAY, A.; GALI-MUTSABI, H. U.; PERCHELLET, E. M.; GAO, X. M. Anti-tumorogenic and antipromoting activities of ellagic acid, ellagitannins and oligomeric anthocyanin and procyanidin. **Int J Oncol**; vol. 10, p.367-73, 1997.

CERDA B, CERON JJ, TOMAS-BARBERAN FA, ESPIN JC. Repeated oral administration of high doses of pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. **J Agric Food Chem**;51:3493– 501; 2003.

CERDA B, LLORACH R, CERON JJ, ESPIN JC, TOMAS-BARBERAN FA. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice.**Eur J Nutr**;42:18– 28, 2003.

SANTOS-BUELGA, C. & SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **J. Sci. Food Agric**; 80:1094-117, 2000.

CERDA, B.; CERON, J. J.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; ESPIN, J. C. Repeated oral administration of high doses of pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. **J Agric Food Chem**; vol.51, p.3493-501, 2003.

CERTO, M.; MOORE, V. D. G.; NISHINO, M.; WEI, G.; KORSMEYER, S.; ARMSTRONG, S. A.; LETAI, A. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. **Cancer cell**, vol. 9, pp. 351-365, 2006.

CHABNER, B.A.; LONGO, D.L. Cancer chemotherapy and biotherapy; 2thedn., Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996.

CHANG, B. D.; SWIFT, M. E.; SHEN, M.; FANG, J.; BROUDE, E. V.; RONINSON, I. B.: Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by chemotherapeutic agent. **Proc Natl Acad Sci USA** 99: 389-394, 2002.

CHEN R., ALVERO A.B., SILASI D. AND MOR G. Inflammation, 5.cancer and chemoresistance: taking advantage of the Toll-like receptor signaling pathway. **Am J Reprod Immunol.**;57:93-107; 2007.

CHIATTONE, H. B. C. Uma vida para o câncer. Em: V. A. Angerami-Camon, (Org.). *O doente, a psicologia e o hospital* (pp. 75-89). **São Paulo: Pioneira**, 1996.

CHIN, Y. W., BALLUNAS, M. J., CHAI, H. B., KINGHORN, A. D. Drug discovery from natural sources. **The AAPS Journal**, v.8, p.239-243, 2006.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C. & SALGADO, H. R. N. Animais de Laboratório: o camundongo, **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**,28 (1):11-23, 2007.

CHU, E. Clinical Colorectal Cancer: "Ode to 5-Fluoracil", **Clinical Colorectal Cancer**, v.9, p.609, 2007.

CHUNG JG: Inhibitory actions of ellagic acid on growth and arylamine N-acetyltransferase activity in strains of *Helicobacter pylori* from peptic ulcer patients. **Microbios**, 93: 115-127, 1998.

CLARDY, J. & WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**.V.432, p.829-837, 2004.

CLIFFORD, M. N.; SCALBERT, A. Ellagitannins- nature occurrence and dietary burden. **J. Sci Food Agri**; 80:1118-25, 2000.

CONDEELIS J; POLLARD JW. Macrophages: obligate 6. partners for tumour cell migration, invasion and metastasis. **Cell**.;124:263-6; 2006.

COOK, N. C. & SAMMAN, S. Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, vol. 7, pp. 66-76, 1996.

CORREA M, MACHADO JR J, CARNEIRO CRW, PESQUERO JB, 7. BADER M, TRAVASSOS LR, CHAMMAS R, JASIULIONIS MG. Transient inflammatory response induced by apoptotic cells is an important mediator of melanoma cell engraftment and growth. **Int J Cancer**.;114:356-63; 2005.

COSTA-LOTOUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer. **Revista Virtual de Química**, vol. 2, n.1, 2010.

COTELLE, N. Role of flavonoids in oxidative stress. **Curr.Top. Med. Chem**, 1, 569-590, 2001.

COUSSENS LM, WERB Z. Inflammation and cancer. **Nature**, vol.8, pp..420:860; 2002.

COUSSENS,L. M. & WERB, Z. "[Inflammatory Cells and Cancer](#)", **Journal of Experimental Medicine**, March 19, 2001, vol. 193, no. 6, pages F23-26, , 2010.

CRAGG, G. M. & NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 100, pp. 72-79, 2005.

- CRAGG, G. M. & NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer and anti-HIV agents. **An-appl. Biol.**, v.143, p. 127-133, 2003.
- CRECZYNSKI-PASA, T.B.; PEDROSA, R.C. Alvos moleculares na pesquisa de fitofármacos e fitoterápicos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (Ed.). Plantas medicinais sob a ética da química medicinal moderna. Chapecó, SC: **Argos Editora Universitária**, p.195-229, 2001.
- CRIGHTON, D.; WILKINSON, S.; O'PREY, J.; SYED, N.; SMITH, P.; HARRISON, P. R.; GASCO, M.; GARRONE, O.; CROOK, T.; RYAN, K. M. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. **Cell**, 126, pp. 121–134, 2006.
- CRUZ, M.; ENES, M.; PEREIRA, M.; DOURADO, M.; RIBEIRO, A. B. S. **Rev. Port. Pneumol.**, v. 15, p. 669. [CrossRef] [PubMed] 2009.
- D. DE BEER, E. JOUBERT, W.C. GELDERBLOM, M. Manley, Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: free radical scavenging, **J. Agric. Food Chem.** 51 902–909 (2003).
- DAI, J. & MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**;15, 7313-7352, 2010.
- DALIMOV, D.N., DALIMOVA, G.N., BHATT, M. Chemical composition and lignins of tomato and pomegranate seeds. **Chemistry of Natural Compounds** (Translation of Khimiya Prirodnikh Soedinenii), v. 39, p. 37–40, 2003.
- DALTON, A. J. & FELIX, M. D. The electron microscopy of normal and malignant cells. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 63: 1117-140, 1956.
- DAMIANAKI, A.; BAKOGEORGOU, E.; KAMPA, M.; NOTAS, G.; HATZOGLOU, A.; PANAGIOTOU, S.; GEMETZI, C.; KOUROUMALIS, E.; MARTIN, P.M.; CASTANAS, E. Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. **J. Cell Biochem.**2000, 78, 429-441.
- D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann. Ist. Super. Sanita** 2007, 43, 348-361.
- DAS M, BICKERS DR AND MUKHTAR H: Effect of ellagic acid on hepatic and pulmonary xenobiotic metabolism in mice: studies on the mechanism of its anticarcinogenic action. **Carcinogenesis** 6: 1409-1413, 1985.
- DE NIGRIS, F.; BALESTRIERI, M. L.; WILLIAMS-IGNARO, S. D.; ARMIENTO, F. P. ; FIORITO, C.; IGNARO, L. J. The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese Zucker rats. **Nitric oxide**; v. 17, p. 50-54, 2007.
- DE SMET, P. A. G. M. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs** v.54, p.801-840, 1997.
- DEBATIN, K. M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. **Cancer Immunol Immunother**; vol. 53, p. 153-59, 2004.
- DEL BELLO B, PAOLICCHI A, COMPORTI M, POMPELLA A, MAELLARO E. Hydrogen peroxide produced during gamma-glutamyl transpeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells. **FASEB J**;vol. 79, pp.13:69, 1999.
- DEVITA, JR.; VINCENT, T.; HELLMAN, SAMUEL; ROSENBERG, STEVEN, A. Cancer: principles and practice of oncology. 7. ed. Philadelphia: **Lippincott Williams & Wilkins**, p. 3120, 2005.
- DIAS, M. V.; BARRETO, A. P. M.; COELHO, S. C.; FERREIRA, F. M. B.; VIEIRA, G. B. S.; CLÁUDIO, M. M. O grau de interferência dos sintomas gastrointestinais no estado nutricional do paciente com câncer em tratamento quimioterápico. **Rev Bras Nutr Clín.**;21(3):211-8, 2006.
- DIKMEN, M.; OZTURK, N.; OZTURK, Y. The antioxidant potency of Punica granatum Linn fruit peel reduces cell proliferations and induces apoptosis on breast cancer. **Journal of Medicine Food**, New York, v. 14, n. 12, p.1-9, Dec. 2011.

DING, M.; FENG, R.; WANG, S.Y.; BOWMAN, L.; LU, Y.; QIAN, Y.; CASTRANOVA, V.; JIANG, B.H.; SHI, X. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. **J. Biol. Chem.**2006, 281, 17359-17368.

DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **J. Natl. Cancer Inst.**1981, 66, 1191-1308.

DOMINIQUE, G. M. D. A natural Liquid Cartilage Extract brings new hope for patients with metastatic renal cell carcinoma. 2003.

DONEHOWER, L. A.; HARVEY, M.; SLAGLE, B. L.; MCARTHUR, M. J.; MONTGOMERY, J. C. A.; BUTEL, J. S.; BRADLEY, A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors, **Nature**, 356, pp. 215–22, 1992.

DORMAN, H. J. D.; PELTOKETO, A.; HILTUNEN, R.; TIKKANEN M. J. **Food Chem.**, 83, 255; 2003.

DOSS, M.X., POTTA, S.P., HESCHELER, J., SACHINIDIS, A., 2005. Trapping of growth factors by catechins: a possible therapeutic target for prevention of proliferative diseases. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 259–266, 2005.

DOW LR, CHOU TT, BECHLE MB, GODDARD C AND LARSON RE: Identification of tricyclic analogs related to ellagic acid as potent/selective tyrosine protein kinase inhibitors. **J Med Chem** 37: 224-231, 1994.

DREXLER, H. G.; DIRKS, W.; MACLEOD, R. A. F.; QUENTMEIER, H.; STEUBE, K.; UPHOFF, C. C. (EDS): DSMZ Catalogue of Human and Animal Cell Lines, Seventh edition, Braunschweig, Germany, 1999.

EK, S.; KARTIMO, H.; MATTILA, S.; TOLONEN, A. Characterization of phenolic compounds from lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*). **J. Agric. Food Chem.**2006, 54, 9834-9842.

ELFORD, H.L.; M. FREESE, E. PASSAMANI, H.P. MORRIS, Ribonucleotide reductase and cell proliferation. I. Variations of ribonucleotide reductase activity with tumor growth rate in a series of rat hepatomas, **J. Biol. Chem.** 245 5228–5233 (1970).

FALCONE, A.; RICCI, S.; BRUNETTI, I.; PFANNER, E.; ALLEGRINI, G.; BARBARA, C.; CRINO, L.; BENEDETTI, G.; EVANGELISTA, W.; FANCHINI, L.; CORTESI, E.; PICONE, V.; VITELLOS, S.; CHIARA, S.; GRANETTO, C.; PORCILE, G.; FIORETTO, L.; ORLANDINI, C.; ANDREUCETTI, M.; MAIS, G. Phase III Trial of infusional, leucovorin, oxilaplatin and ironotecan compared with infusional fluoracil, leucovorin and irinotecan as first line treatment for metastatic colorectal cancer. **J. Clin. Oncol.**; 25: 1670-1676; 2007.

FARIED, A., KURNIA, D., FARIED, L.S., USMAN, N., MIYAZAKI, T., KATO, H., KUWANO, H., Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. **Int. J. Oncol.** 30, 605–613, 2007.

FILHO BRAZ, R. Contribuição do fotoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, vol. 33, p.229-239, 2010.

FISCHER, P. M., GLOVER, D. M., LANE, D. P. Targeting the cell cycle. **Drug Disc. Today**, v.1, n.4, 417-423p., 2004.

FISCHER, C.; JONCKX, B.; MAZZONE, M.; ZACCHIGNA, S.; LOGES, S.; PATTARINI, L. Anti-PIGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy Vessels. **Cell.**, v.131, p. 463-75, 2007.

FISIOPATOLOGIA DO CÂNCER. In: Ações de enfermagem no controle do câncer. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA, p. 55-81, 2002.

FLEMMING, S. The molecular biology of cancer: the basics. Surgery (Oxford), v.21, p iii-vi, 2003.

FOSTER, I. Cancer: a cell cycle defect. **Radiography**.v.14, n.2, 144-149 p., 2008.

FRANCISCHETTI, I.; MORENO, J. B.; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, W. B. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, 2010.

FRESCO, P.; BORGES, F.; DINIZ, C.; MARQUES, M.P. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med. Res. Rev.* **2006**, *26*, 747-766.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.*, v. 294, p.1871, 2001.

G. D. Identification of Mammalian Vps24p as an Effector of Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphate-dependent Endosome Compartmentalization. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**, Inc. 2003.

GALATI, G.; TENG, S.; MORIDANI, M.Y.; CHAN, T.S.; O'BRIEN, P.J. Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics. *Drug Metabol. Drug Interact.***2000**, *17*, 311-349.

GALI-MUHTASIB HU, YOUNES IH, KARCHESY JJ, EL-SABBAN ME. Plant tannins inhibit the induction of aberrant crypt foci and colonic tumors by 1,2-dimethylhydrazine in mice. *Nutr Cancer*;39:108– 16, 2001.

GALI-MUHTASIB, H. U.; YOUNES, I. H.; KARCHESY, J. J; EL-SABBAN, M. E. Plant tannins inhibit the induction of aberrant crypt foci and colonic tumors by 1,2-dimethylhydrazine in mice. *Nutr Cancer*; vol. 39, p. 108-16, 2001.

GALUZZI, L.; MAIURI, M. C.; VITALE, I.; ZISCHKA, M.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell death & Differentiation*, vol. 14, pp.1237-1266,DOI: 10.1038/sj.cdd.4402148 2007.

GALVANO, F., LA FAUCI, L., LAZZARINO, G., FOGLIANO, V., RITIENI, A., CIAPPELLANO, S., BATTISTINI, N.C., TAVAZZI, B., GALVANO, G., 2004. Cyanidins: metabolism and biological properties. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 15, p. 2–11, 2004.

GARRITY, M. M., BURGART, L. J., RIEHLE, D. L., HILL, E. M., SEBO, T. J., AND WITZIG, T. Identifying and quantifying apoptosis: Navigating technical pitfalls. *Mod Pathol* 16, 389–94, 2003. GAVRIELI, Y., SHERMAN, Y., AND BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119, 493–501, 1992.

GERDES J, LEMKE H, BAISCH H, WACKER H, SCHWAB U, STEIN H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*; vol.133, pp. 1710-5, 1984.

GIFTSON, J.S., JAYANTHI, S., NALINI, N. Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Invest. New Drugs*, 2009.

GIL MI, TOMAS-BARBERAN FA, HESS-PIERCE B, HOLCROFT DM, KADER AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem*; 48:4581– 9, 2000.

GIL, M. I.; FERRERES, F.; THOMAS –BARBERAN, F. A. Effect of post harvest storage and processing on the antioxidant constituents of fresh cut Spinach. *J Agric Food Chem*; v.47, p.2213-7, 1999.

GIL, M. I.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT, B. M.; KADER, A. A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem*;v. 48, p. 4581-9, 2000.

GIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*; vol. 53 (3), p. 335-343, 2007.

GONZÁLES-POLO, R. A.; BOYA, P.; PAULEAU, A. L.; JALIL, A.; LAROCLETTE, N.; SOQUERE, S.; ESKELINEN, E. L.; PIERRON, G.; SAFTIG, P.; KROEMER, G. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. **J. Cell Science**, vol. 118, pp. 3091-3102, 2005.

GOPALAKRISHNAN, A. & KONG, A. T. Anticarcinogenesis by dietary phytochemicals: Cytoprotection by Nrf2 in normal cells and cytotoxicity by modulation of transcription factors NF- κ B and AP-1 in abnormal cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 46, pp. 1257-1270, 2008.

GOUNI-BERTHOLD, I. & SACHINIDIS, A., 2004. Molecular mechanisms explaining the preventive effects of catechins on the development of proliferative diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, p. 1261–1271, 2004.

GROSS, A.; MCDONNELL, J. M.; KORSMEYER, S. J.: BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes Develop** 13: 1899-911, 1999.

GU, L.; KELM, M.; HAMMERSTONE, J. F.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. **J. Nutr**; 134:613-7, 2004.

HAGEMANN T13. , BISWAS SK, LAWRENCE T, SICA A, LEWIS CE. Regulation of macrophage function in tumors: the multifaceted role of NF-kappaB. **Blood**.;113(14):3139-46; 2009.

HAGIWARA, Y.; KASUCABE, T.; KANEKO, Y.; NIITSU, N.; OKABE-KADO, J. Ellagic acid , a natural polyphenolic compound, induces apoptosis and potentiates retinoic acid-induced differentiation of human leukemia HL-60 cells. **Int J. Hematol**, 92, 136-143, 2010.

HAN, Z.; WEI, W.; DUNAWAY, S.; DARNOWSKI, J. W.; CALABRESI, P.; SEDIVY, J.; HENDRICKSON, E. A.; BALAN, K. V.; PANTAZIS, P. WYCHE, J. H.: Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. **J Biol Chem**277: 17154-17160, 2002.

HANAHAH, D. & WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell.**, v.100:57-70, 2000.

HARKNESS, S. E & WAGNER, J. E. *Biologia e Clínica de coelhos e roedores*, 3. ed., São Paulo: **Livraria Roca Ltda**, p.238, 1993.

HARMAND, P.O., DUVAL, R., DELAGE, C., SIMON, A., 2005. Ursolic acid induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and caspase-3 activation in M4Beu melanoma cells. **International Journal of Cancer**, v. 114, p. 1–11, 2005.

HARPER, J. W.; ADAMI, G. R.; WEI, N.; KEYOMARSI, K.; ELLEDGE, S. J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases, **Cell**, 75, pp. 805–816, 1993.

HARRIS, C.S.; BURT, A.J.; SALEEM, A.; LE, P.M.; MARTINEAU, L.C.; HADDAD, P.S.; BENNETT, S.A.; ARNASON, J.T. A single HPLC-PAD-APCI/MS method for the quantitative comparison of phenolic compounds found in leaf, stem, root and fruit extracts of *Vaccinium angustifolium*. **Phytochem. Anal.**, 18, 161-169, 2007.

HEALTH STATISTICS AND INFORMATICS DEPARTAMENT. Disponível em: [http:// www. Who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/em/index.html](http://www.Who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/em/index.html).

HENGATNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*; vol.407, 770-76; 2000.

HERNANDEZ, F., MELGAREJO, P., TOMAS-BARBERAN, F.A., ARTES, F. Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punicagranatum*) clones. **European Food Research and Technology**, v. 210, p. 39–42, 1999.

HILSKA, M. M. D.; COLLAN, Y. U.; PATH, F. R. C.; LAINE, V. J. O.; KOSSI, J.; HIRSIMAKI, P.; LATTO, M.; ROBERTS, P. J. The significance of tumor markers for proliferation and apoptosis in predicting survival in colorectal cancer. *Diseases of Colon & rectum*, 2005.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVA, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem. Biol. Interact.*, 139, 1-21, 2002.

HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.*, 37, 937-942, 1999.

HOPKINS, C.Y., CHISHOLM, M.J. A survey of the conjugated fatty acids of seed oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v.45, p. 176–182, 1968.

HORA, J.J., MAYDEW, E.R., LANSKY, E.P., DWIVEDI, C. Chemopreventive effects of pomegranate seed oil on skin tumor development in CD 1 mice. *Journal of Medicinal Food*, v. 6, p. 157–161, 2003.

HORINAKA, M., YOSHIDA, T., SHIRAIISHI, T., NAKATA, S., WAKADA, M., NAKANISHI, R., NISHINO, H., MATSUI, H., SAKAI, T., 2005. Luteolin induces apoptosis via death receptor 5 upregulation in human malignant tumor cells. *Oncogene*, v.24, p. 7180–7189, 2005.

HORNUNG, E., PERNSTICH, C., FEUSSNER, I., 2002. Formation of conjugated ω -11- ω -13-double bonds by ω -12-linoleic acid (1,4)-acyl-lipid-desaturase in pomegranate seeds. *European Journal of Biochemistry*, v. 269, p. 4852–4859, 2002.

HOST, E.; LINDENBERG, S.; SMIDT-JENSEN, S. DNA strand breaks in human spermatozoa: correlation with fertilization in vitro in oligozoospermic men with unexplained fertility. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, Copenhagen, v.79, p. 189-193, 2000.

HOU, D.X., OSE, T., LIN, S., HARAZORO, K., IMAMURA, I., KUBO, M., UTO, T., TERAHARA, N., YOSHIMOTO, M., FUJII, M., 2003. Anthocyanidins induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells: structure-activity relationship and mechanisms involved. *International Journal of Oncology*, v. 23, p. 705–712, 2003.

HSIAO, M.; TSE V, CARMEL J, TSAI Y, FELGNER PL, HAAS M AND SILVERBERG GD: Intracavitary liposome-mediated p53 gene transfer into glioblastoma with endogenous wild-type p53 *in vivo* in tumor suppression and long-term survival. *Biochem Biophys Res Commun* 233: 359-364, 1997.

HUANG, M.T.; XIE, J.G.; WANG, Z.Y.; HO, C.T.; LOU, Y.R.; WANG, C.X.; HARD, G. C.; CONNEY, A.H. Effects of tea, decaffeinated tea, and caffeine on UVB light-induced complete carcinogenesis in SKH-1 mice: demonstration of caffeine as a biologically important constituent of tea. *Cancer Res.*, 57, 2623-2629, 1997.

HUANG, Y.T., LEE, L.T., LEE, P.P., LIN, Y.S., LEE, M.T. Targeting of focal adhesion kinase by flavonoids and small-interfering RNAs reduces tumor cell migration ability. *Anticancer Research*, v.25, p. 2017–2025, 2005.

HWANG, H.J., PARK, H.J., CHUNG, H.J., MIN, H.Y., PARK, E.J., HONG, J.Y., LEE, S.K., 2005. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on cancer cell metastasis mediated by the down-regulation of matrix metalloproteinase expression in human HT1080 fibrosarcoma cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2005.

IBRADO, A. M.; HUANG, Y.; FANG, G.; LIU, L.; BHALLA, K.: Overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL inhibits Ara-C-induced CPP32/Yama protease activity and apoptosis of human acute myelogenous leukemia HL-60 cells. *Cancer Res* 56: 4743- 4748, 1996.

IINO, T.; TASHIMA, K.; UMEDA, M.; OGAWA, Y.; TAKEDA, M.; TAKATA, K. Effect of ellagic acid on gastric damage induced in ischemic rat stomachs following ammonia or reperfusion. *Life Sci*; vol.70, pp.1139–50, 2002.

IMANISHI, H.; SASAKI, Y.F.; OHTA, T.; WATANABE, M.; KATO, T.; SHIRASU, Y. Tea tannin components modify the induction of sister-chromatid exchanges and chromosome aberrations in mutagen-treated cultured mammalian cells and mice. *Mutat. Res.* 1991, vol. 259, pp. 79-87.

IMAPCT. Efficacy of adjuvant fluoracil and folic acid in colorectal cancer: International Multicenter Pooled Analysis of colorectal cancer trials investigators. *Lancet*; v.345, p. 939-944, 1995.

INCA- Instituto Nacional do Câncer, 2011. Disponível em <http://WWW.inca.gov.br>

INCA. Incidência de Câncer no Brasil <www.inca.gov.br/estimativa/2010>. Acessado em 26 de Julho de 2010, 100p.

INOUE, M., SAKAGUCHI, N., ISUZUGAWA, K., TANI, H., OGIHARA, Y. Role of reactive oxygen species in gallic acid-induced apoptosis. **Biol. Pharm. Bull.**, vol.23, pp.1153– 1157, 2000.

INOUE, M., SUZUKI, R., KOIDE, T., SAKAGUCHI, N., OGIHARA, Y., YABU, Y.. Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. **Biochem.Biophys. Res. Commun.** 204, 898–904,1994.

INOUE, M., SUZUKI, R., SAKAGUCHI, N., LI, Z., TAKEDA, T., OGIHARA, Y., JIANG, B.Y., CHEN, Y. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. **Biol. Pharm. Bull.** 18, 1526–1530, 1995.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA). Estimativa 2012- Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, p.98, 2012.

ISUZUGAWA, K.; M. INOUE, Y. OGIHARA, Catalase contents in cells determine sensitivity to the apoptosis inducer gallic acid, **Biol. Pharm. Bull.** 24 1022–1026, 2001.

ISUZUGAWA, K.; M. INOUE, Y. OGIHARA. Ca²⁺-dependent caspase activation by gallic acid derivatives, **Biol. Pharm. Bull.**, vol.24 , pp. 844–847, 2001.

JAHFAR,M., VIJAYAN, K.K., AZADI, P. Studies on a polysaccharide from the fruit rind of *Punica granatum*. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 7, p.43–50, 2003.

JAIN, P. K. & AGARWAL, R. K. Antioxidant and Free radical scavenging properties of developed mono and polyherbal formulation. **Asian J Exper Sci** ; 22(3): 213-220, 2008.

JAIN, R. K. WARD-HARTLEY, K.A. Tumor Blood flow: Characterization, modifications and role and hyperthermia. **IEEE Transactions in Sonics and Ultrasonics**, v.31, 504-526, 1994.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. **Food Chem.**, v. 73, p. 285-289, 2001.

JEE SH, SHEN SC, TSENG CR, CHIU HC, KUO ML. Curcumin induces a p53-dependent apoptosis in human basal cell carcinoma cells. **J Invest Dermatol**; vol.111, pp.656– 61, 1998.

JIANG, Q., ELSON-SCHWAB, I., COURTEMANCHE, C., AMES, B.N., 2000. Gammatocopherol and its major metabolite, in contrast to alpha-tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 97, p. 11494–11499, 2000.

JIANG, Q.,WONG, J., FYRST, H., SABA, J.D., AMES, B.N., 2004. gamma-Tocopherol or combinations of vitamin E forms induce cell death in human prostate cancer cells by interrupting sphingolipid synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 101, p. 17825–17830, 2004.

JIN, S. & WHITE, E. Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. **Autophagy**, vol. 3, pp. 28–31, 2007.

JIN, U.H., CHUNG, T.W., KANG, S.K., SUH, S.J., KIM, J.K., CHUNG, K.H., HGU, Y.H.H., SUZUKI, I., KIM, C.H., 2005. Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: isolation and identification. **Clinica Chimica Acta: International Journal of Clinical Chemistry**, v. 362, p. 57–64, 2005.

JOHNSTONE, G. L. & LAPADAT, R. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. **Science**, vol. 298, pp. 1911-1912, 2002.

JUNG, A.; BRABLETZ, T.; KIRCHNER, T. The migrating cancer stem cells model--a conceptual explanation of malignant tumour progression.**Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings**, v.5, 109–124p., 2006.

KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA, J-P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M.; **J. Agric. Food Chem.**, vol.47, pp. 3954; 1999.

KAMPA, M.; HATZOGLOU, A.; NOTAS, G.; DAMIANAKI, A.; BAKOGEORGOU, E.; GEMETZI, C.; KOUROUMALIS, E.; MARTIN, P.M.; CASTANAS, E. Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. **Nutr. Cancer**, vol.37, pp.223-233, 2000.

KAMPA, M.; NIFLI, A.P.; NOTAS, G.; CASTANAS, E. Polyphenols and cancer cell growth. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, vol. 159, pp. 79-113, 2007.

KANADASWAMI, C., LEE, L.T., LEE, P.P., HWANG, J.J., KE, F.C., HUANG, Y.T., LEE, M.T., 2005. The antitumor activities of flavonoids. **In Vivo**, v. 19, p. 895–909, 2005.

KAPLAN M, HAYEK T, RAZ A, COLEMAN R, DORNFIELD L, VAYAN J. Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. **J Nutr**; vol.131, pp.2082– 9; 2001.

KATSUBE, N.; IWASHITA, K.; TSUSHIDA, T.; YAMAKI, K.; KOBORI, M. Induction of apoptosis in cancer cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. **J. Agric. Food Chem.**, vol 51, pp. 68-75, 2003.

KATZUNG, G.B. Basic and Clinical Pharmacology, **McGraw-Hill Medical**, 9th edn., United States of America, 1088p., 2003.

KAUFMAN SH: Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. **Cancer Res**, vol.49, pp. 5870-5878, 1989.

KAUR, M., VELMURUGAN, B., RAJAMANICKAM, S., AGARWAL, R., AGARWAL, C. Gallic acid, an active constituent of grape seed extract, exhibits anti-proliferative, proapoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice. **Pharm. Res.**, vol. 26, pp. 2133–2140, 2009.

KAWADA, M., OHNO, Y., RI, Y., IKOMA, T., YUUGETU, H., ASAI, T., WATANABE, M., YASUDA, N., AKAO, S., TAKEMURA, G., MINATOGUCHI, S., GOTOH, K., FUJIWARA, H., FUKUDA, K. Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. **Anticancer Drugs**, vol.12, pp. 847–852, 2001.

KAWAII, S., LANSKY, E.P. Differentiation-promoting activity of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. **Journal of Medicinal Food**, v. 7, p. 13–18, 2004.

KEITH, W.; VANCE, S. C.; GERALD, B. Tbx2 Is Overexpressed and Plays an Important Role in Maintaining Proliferation and Suppression of Senescence in Melanomas. **Cancer Research**; 65: 2260-2268, 2005.

KERR JFR, WYLLIE AH AND CURRIE AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer** 26: 239-257, 1972.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H. CURRIE, A. R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer** 26: 239-257, 1972.

KERR, J.F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J. Cancer**; vol. 6.P.239-57, 1972.

KHAN, A.U.; WILSON, T. Reactive oxygen species as cellular messengers. **Chem. Biol.** 1995, 2, 437-445.

KHANAPURE, S. P. Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology and therapeutics frontiers. **Cour Top Med Chem.**, v.7, p.311, 2007.

KHANBABAEE, K.; VAN REE, T. Tannins: classification and definition. **Nat. Prod. Rep.**, vol. 18, pp. 641-649, 2001.

KHANDUJA KL, GANDHI RK, PATHANIA V, SYANL N. Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. **Food Chem Toxicol**; vol.37, pp.313– 8, 1999.

- KIM, N. D.; METHA, R.; YU, W.; LANSKY, E. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. **Breast Cancer Res. Treatment**, v.71, p. 203-217, 2002.
- KIM, N. D.; METHA, R.; YU, W.; NEEMAN, I.; LIVNEY, T.; AMICHAY, A. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**; vol. 71, p.203-17, 2002.
- KIM, N.D., MEHTA, R., YU, W., NEEMAN, I., LIVNEY, T., AMICHAY, A., POIRIER, D., NICHOLLS, P., KIRBY, A., JIANG, W., MANSEL, R., RAMACHANDRAN, C., RABI, T., KAPLAN, B., LANSKY, E. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 71, p. 203–217, 2002.
- KIM, Y.J. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. **Biol. Pharm. Bull.**30, 1052–1055, 2007.
- KINGSTON, D. G. I. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. In: The practice of medical chemistry. **Ed. By Wermuth CG. Academic Press Limited**, p.102-114, 2009.
- KLAUNING, J.E.; KAMENDULIS, L.M. Chemical carcinogenesis. In: KLAASSEN, C.D. (Ed.). Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons. 7th ed. [S.l.]: **McGraw-Hill**, 329–380p., 2008.
- KOLECKAR, V.; KUBIKOVA, K.; REHAKOVA, Z.; KUCA, K.; JUN, D.; JAHODAR, L.; OPLETAL, L. Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health. **Mini Rev. Med. Chem.**, 8, 436-447, 2008.
- KOSMAS, C.; KALLISTRATOS, M. S.; KOPTERIDES, P.; SYRIOS, J.; SKOPELITIS, H.; MYLONAKIS, N.; KARABELIS, A.; TSAVARIS, M. Cardiotoxicity of fluoropyrimidines in different schedules of administration: a prospective study. **J. Cancer Res Clin Oncol**; v.1, p.75-82, 2008.
- KOWALSKI, I., SAMOJEDNY, A., PAUL, M., PIETSZ, G., WILCZOK, T., 2005. Effect of kaempferol on the production and gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 in J774.2 macrophages. **Pharmacological Reports**: PR 57, 107–112, 2005.
- KRUSCH M, SALIH J, SCHLICKE M. The kinase inhibitors sunitinib and sorafenib differentially affect NK cell antitumor reactivity in vitro. **Journal of Immunology**;183(12):8286–8294, 2009.
- KRYSKO, O.; VANDENABEELE, P.; KRYSKO, V. D.; BACHERT, C. Impairment of phagocytosis of apoptotic cells and its role in chronic airway diseases. **Apoptosis**, vol. 15, pp. 1137-1146, 2010.
- KULKARNI AP, ARADHYA SM, DIVAKAR S. Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant-punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. **Food Chem**;87:551–7, 2004.
- KUMAR, V., ABBAS, A. K, FAUSTO, N., ROBBINS, S. L., COTRAN, R. S. Pathology Basis of Disease. **China: WB Saunders**, 1552p., 2004.
- KUMAR, V., ABBAS, A. K, FAUSTO, N., ROBBINS, S. L., COTRAN, R. S. **PathologyBasis of Disease**. China: WB Saunders, 1552p., 2004.
- KURASAKI, M.; SUN, Y.; KOMORI, M.; MIYAJIMA, M.; HOSOKAWA, T.; SATIO, T. measurement of DNA damage by terminal deoxynucleotidyl transferase reaction. **Advances in Biological Chemistry**, vol. 2; p.243-247, 2012.

KUWANA, T.; MACKEY, M. R.; PERKINS, G.; ELLISMAN, M. H.; LATTERICH, M.; SCNEITER, R.; GREEN, D. R.; NEWMAYER, D. D. Bid, Bax, and Lipids Cooperate to Form Supramolecular Openings in the Outer Mitochondrial Membrane. **Cell**, vol. 111, pp. 331-342, 2002.

L. NOVOTNY, P. RAUKO, J. LISKA, H.L. ELFORD, T. Szekeres, Potentiation of the activity of cisplatin and cyclophosphamide by trimidox, a novel ribonucleotide reductase inhibitor, in leukemia-bearing mice, **Cancer Lett.**, in press.

LALA, G.; MALIK, M.; ZHAO, C.; HE, J.; KWON, Y.; GIUSTI, M.M.; MAGNUSON, B.A. Anthocyaninrich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats. *Nutr. Cancer*, vol.54, pp. 84-93, 2006.

LAMBERT, J.D., HONG, J., YANG, G.Y., LIAO, I., YANG, C.S., 2005. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.81, p. 284S–291S, 2005.

LANGLEY, P. Why a pomegranate? *BMJ* 321 (7269), p.1153–1154, 2000.

LANSKY EP, JIANG W, MO H, BRAVO L, FROOM P, YU W, HARRIS NM, NEEMAN I, AND CAMPBELL MJ: Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. **Invest New Drugs**; 23(1): 11-20, 2005.

LANSKY, E. P & NEWMAN, R. A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and câncer. **Journal of Ethnopharmacology** v.109, p. 177–206, 2007.

LANSKY, E.P., HARRISON, G., FROOM, P., JIANG, W.G. Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel. **Investigational New Drugs**, v. 23, p.121-2, 2005.

LEE, Y. L.; KIM, H. J.; LEE, M. S.; KIM, J. M.; HAN, J. S.; HONG, E. K.; KWON, M. S.; LEE, M. J. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. **Exp. Anim.**, v. 52, p.371-375, 2010.

Lee, Y. S., Yang, H. O., Shin, K. H., Choi, H. S., Jung, S. H., Kim, Y. M., Oh, D. K., Linhardt, R. J., Kim, Y. S., 2003. Suppression of tumor growth by a new glycosaminoglycan isolated from the African giant snail *Achatina fulica*. *Eur J Pharmacol*; vol.465(1-2):191-8, 2003.

LETAI, A.; BASSIK, M. C.; WALENSKY, L. D.; SORCINELLI, M. D.; WEILER, S.; KORSMEYER, S. J. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. **Cancer cell**, vol. 2, pp. 183-192, 2002.

LI, H. X.; WANG, Z.; LIU, Y.Z. Progress in studies on chemical constituents and pharmacological effects of Punicaceae. **Chinese Traditional and Herbal drugs**, v. 33, p. 765-769, 2002.

LI, H.; ALONSO-VANEGAS M, COLICOS MA, JUNG SS, LOCHMULLER H, SADIKOT AF, SNIPES GJ, SETH P, KARPATI G AND NALBANTOGLU J: Intracerebral adenovirus-mediated p53 tumor suppressor gene therapy for experimental human glioma. **Clin Cancer Res** 5: 637-642, 1999.

LI, L., NG, T.B., GAO, W., LI, W., FU, M., NIU, S.M., ZHAO, L., CHEN, R.R., LIU, F. Antioxidant activity of gallic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. **Life Sci**. 77, 230–240, 2005.

LI, T.; CHEN, G.; SU, C.; LIN, J.; YE, C.; CHENG, K.; CHUNG, J. Ellagic acid induced p53/p21 expression, G1 arrest and apoptosis in Human bladder Cancer T24 cells. **Anticancer Research**, 25: 971-980, 2005.

LI, Y. ; GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; XU, J.; CHENG, S. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. **Food Chem.** (In Press), 2005.

LIANG,X. H.; JACKSON, S.; SEAMAN, M.; BROWN, K.; KEMPKE, B.; HIBSHOOSH, H.; LEVINE, B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by *beclin 1*. **Nature**, 402, pp. 672–676, 1999.

LIN EY, NGUYEN AV, RUSSELL RG, POLLARD JW. Colony-17.stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. **J Exp Med.**;193(6):727-40; 2001.

LIN SS, HUNG CF, TYAN YS, YANG CC, HSIA TC, YANG MD AND CHUNG JD: Ellagic acid inhibits arylamine N-acetyltransferase activity and DNA adduct formation in human bladder tumor cell lines (T24 and TSGH 8301). **Urol Res** 29: 371-376, 2001.

LIN WW, KARIN M. A cytokine-mediated link between 18.innate immunity, inflammation, and cancer. **J Clin Invest.**;117(5):1175-83; 2007.

LIN, L.Z.; HARNLY, J.M.A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. **J. Agric. Food Chem.**2007, 55, 1084-1096.

LING YH, PRIEBE W AND PERZE SR: Apoptosis induced by anthracycline antibiotics in P388 parent and multidrug-resistant cells. **Cancer Res** 53: 1845-1852, 1993.

LIOTTA, L. A., KOHN, E. C. The microenvironment of the tumourhost interface. **Nature**,v.411, 375-379p., 2001.

LIU, Z.; J. SCHWIMMER, D. LIU, F.L. GREENWAY, C.T. ANTHONY, E.A. Woltering, Black raspberry extract and fractions contain angiogenesis inhibitors, **J. Agric. Food Chem.** 53 3909–3915, 2005.

LOCKSHIN, R. A. & WILLIAMS, C. M. Programmed cell death II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. **J. Insect Physiol**; vol. 10; p.643-49, 1964.

LODISH, B.; BERK A, ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Molecular cell biology**. 5th ed. New York: W. H. Freeman; 2004.

LONGLAY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-fluoracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**; v.3, p. 330-338, 2003.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEN, T. J.; PINTO, A. S. Farmacologia dos flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **FLAVONÓIDES, Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 2000.

LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: Nativas e exóticas**. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**, 2002.

LORENZI, H. & SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil – arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 3.ed, Nova Odessa: **Plantarum**,. 1088p. 2001.

LORENZI, H; **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**, vol 2, 4 ed. Nova Odessa, SP. **Instituto Plantarum**. 2002.

LOSSO, J. N.; BANSODE, R. R.; TRAPPEY, A.; BAWADI, H. A.; TRUAX, R. In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 2004.

LOURO, I.D., LLERENA JR, J.C., VIEIRA DE MELO, M.S., ASHTON-PROLLA, P., CONFORTI-FRÓES, N. **Genética Molecular do Câncer**. **MSG Produção Editorial**, 1ª. ed., São Paulo, 2002.

LU, Z., NIE, G., BELTON, P.S., TANG, H., ZHAO, B. Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. **Neurochem.Int.** 48, 263–274, 2006.

LUM, J. J.; BAUER, D. E.; KONG, M.; HARRIS, M. H.; LI, C.; LINDSTEN, T.; THOMPSON, C. B. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis, **Cell**, 120, pp. 237–248, 2005.

M. KAWADA, Y. OHNO, Y. RI, T. IKOMA, H. YUUGETU, T. ASAI. Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice, **Anticancer Drugs**, vol. 12, pp. 847–852, 2001.

MACCHETTI, A. H.; MARANA, H. R. C.; CAVALLINI, M. E. Conceitos de cinética tumoral aplicados à quimioterapia para o câncer de mama. **Medicina, Ribeirão Preto**, 40 (2): 213-22, 2007.

MADDIKA, S.; RAO ANDE, S.; PANIGRAHI, S.; PARANJOTHI, T.; WEGLARCZYK, K.; ZUSE, A.; ESHARIGHI, M.; MANDA, K. D.; WIECHEC, E.; LOS, M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: Implications for cancertherapy. **Drug Resistance Updates**, vol.10, pp.13-29, 2007.

MADLENER, S., ILLMER, C, HORVATH, Z., SAIKO, P., LOSERT, A., HERBACEK, I., GRUSCH, M., ELFORD, H.L., KRUPITZA, G., BERNHAUS, A., FRITZER-SZEKERES, M., SZEKERES, T., 2006. Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. **Cancer Letters** [Epub ahead of print] 2006.

MADLENER, S.; ILLMER, C.; HORVATH, Z.; SAIKO, P.; LOSERT, A.; HERBACEK, I.; GRUSCH, M.; ELFORD, H. L.; KRUPITZA, G.; BERNHAUS, A.; FRITZER-SZEKERES, M.; SZEKERES, T. Gallic acid ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. **Cancer Letters**, 245; 156-162, 2007.

MAHDIHASSAN, S. Outline of the beginnings of alchemy and its antecedents. **American Journal of Chinese Medicine**, v.12, p.32–42, 1984.

MALIK, A.; AFAQ, F.; SARFARAZ, S.; ADHAMI, V. M.; SYED, D. N.; MUKHTAR, H. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. **The National academy of Science of USA**, vol. 102, n. 41, p.14813-14818, 2005.

MALIK, M.; ZHAO, C.; SCHOENE, N.; GUISTI, M.M.; MOYER, M.P.; MAGNUSON, B.A. Anthocyaninrich extract from *Aronia meloncarpa* E induces a cell cycle block in colon cancer but not normal colonic cells. **Nutr. Cancer** 2003, 46, 186-196.

MALLERY S.R., ZWICK J.C., PEI P., TONG M., LARSEN P.E., SHUMWAY B.S., LU B., FIELDS H.W., MUMPER R.J., STONER G.D. Topical application of a bioadhesive black raspberry gel modulates gene expression and reduces cyclooxygenase 2 protein in human premalignant oral lesions. **Cancer Res.**2008, 68, 4945-4957.

MALUMBRES, M. & BARBACID, M. Cell cycle kinases in cancer. **Current opinion in Genetics & Development**, vol. 17, pp. 60-65, 2007.

MANTOVANI A, SICA A,20. ALLAVENA P, GARLANDA C, LOCATI M. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. **Hum Immunol.**;70(5):325-30; 2009.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; ALLAVENA, P.; GARLANDA, C.; LOCATI, M. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. **Hum Immunol.** 70(5):325-30, 2009.

MARCHAND, L. L. Cancer preventive effects of flavonoids—a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol. 56, pp. 296-301, 2002.

MARINO, G.; SALVADOR-MONTOLIU, N.; FUEYO, A.; KNECHT, E.; MIZUSHIMA, M.; LOPEZ-OTIN, C. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. **Biol. Chem.**, 282, pp. 18573–18583, 2007.

MASAMUNE, A., SATOH, M., KIKUTA, K., SUZUKI, N., SATOH, K., SHIMOSEGAWA, T., 2005. Ellagic acid blocks activation of pancreatic stellate cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, p.869–878, 2005.

MASAMUNE, A.; KIKUTA, K.; SATOH, M.; KUME, K.; SHIMOSEGAWA, T. Differential roles of signaling pathways for proliferation and migration of rat pancreatic stellate cells. **Tohoku J Exp Med**;199:69–84, 2003.

MATHEW, R.; KONGARA, S.; BEAUDOIN, B.; KARP, C. M.; BRAY, K.; DEGENHARDT, K.; CHEN, G.; JIN, S.; WHITE, E. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. **Genes Dev.**, 21, pp. 1367–1381, 2007.

MAXWELL, S. R. Prospects for the use of antioxidant therapies *Drugs*, v.49, p.345 – 361, 1995.

MCCALLUM, J.L.; YANG, R.; YOUNG, J.C.; STROMMER, J.N.; TSAO, R. Improved high performance liquid chromatographic separation of anthocyanin compounds from grapes using a novel mixedmode ion-exchange reversed-phase column. **J. Chromatogr.**, 1148, 38-45, 2007.

McCANN, M.J.; GILL, C.I.; G, O.B.; RAO, J.R.; MCROBERTS, W.C.; HUGHES, P.; MCENTEE, R.; ROWLAND, I.R. Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis *in vitro*. **Food Chem. Toxicol.**, 45, 1224-1230, 2007.

McDOUGALL, G.J.; ROSS, H.A.; IKEJI, M.; STEWART, D. Berry Extracts Exert Different Antiproliferative Effects against Cervical and Colon Cancer Cells Grown *in vitro*. **J. Agric. Food Chem.**, 56, 3016-3023, 2008.

MEDENA, R. H.; BURGERING, B. M. T.; MAASEN, J. A.; WETERING, M. L. V.; EB, V. A. J.; McCORMICK, F.; BOS, J. L. Insulin stimulation of gene expression mediated by p21 ras activation. *EMBO J.*, vol. 10, pp. 1103-1109, 1991.

MEHTA, R., LANSKY, E.P. Breast cancer chemopreventive properties of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in a mouse mammary organ culture. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 13, p. 345–348, 2004.

MENENDEZ RC, Animales de Laboratorio en las Investigaciones Biomedicas, La Habana: **Ciencias Medicas**, p.205, 1985.

MERTENS-TALCOTT SU, TALCOTT ST, PERCIVAL SS. Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 human leukemia cells. **J Nutr**;133:2669 – 74; 2003.

MERTENS-TALCOTT, S. U. & PERCIVAL, S. S. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. **Cancer Letters**, vol. 218, pp. 141-151, 2005.

MERTZ, C.; CHEYNIER, V.; GUNATA, Z.; BRAT, P. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, 55, 8616-8624, 2007.

METHA, R. & LANKY, E. P. Breast cancer chemopreventive properties of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in a mouse mammary organ culture. **European Journal of Cancer Prevention**, vol. 13, pp. 345-348, 2004.

MIDDLETON, E. JR.; The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol Rev.**, v.52, p. 673-751, 2000.

MIGUEL, G., FONTES, C., ANTUNES, D., NEVES, A., MARTINS, D. Anthocyanin concentration of "Assaria" pomegranate fruits during different cold storage conditions. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p.338–342, 2004.

MILLER, S. B. Prostaglandins in health and diseases: na overview. **Semin Arthritis Rheum.**, v. 36, p. 37, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011. Disponível em [http : //www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br).

MODAK, S. P. & BOLLUM, F. J. Terminal lens cell differentiation: III. Initiator activity of DNA during nuclear degeneration. **Experimental Cell Research**, pp. 421–432, 1970.

MOLLER, P.; FALK, W.; DEBATIN, K. M.; KRAMMER, P. H. Monoclonal antibody mediated tumor regression by induction of apoptosis. **Science**, vol. 245, pp.301-305, 1994.

MOUSINHO, K. C. Estudo do potencial anticâncer de um derivado de chalcona 1-(4-Nitrofenil)-3-fenilprop-2-em-1-ona , in vitro e in vivo. Tese (doutorado). **Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós Graduação em Farmacologia**, 2010.

MUMM JB, OFT M. Cytokine-based transformation of 21. immune surveillance into tumor-promoting inflammation. **Oncogene.**;27:5913-9; 2008.

MUNDE, S.S., PATIL, V.K., CHAVAN, S.D. Chemical composition of pomegranate (*Punica granatum* Linn.) leaves sampled during different stages of crop. **Food Farming Agriculture**, v. 13, p. 177–181, 1981.

MUNDE, S.S., PATIL, V.K., CHAVAN, S.D. Standardization of leaf sampling procedure in pomegranate (*Punica granatum* Linn.). **Journal of Maharashtra Agricultural Universities (India)**, v. 5, p. 90–91, 1980.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 41, 1523-1542, 2006.

NAOVI, S.A.H., KHAN, M.S.Y., VOHORA, S.B. Antibacterial, anti-fungal and anthelmintic investigations on Indian medicinal plants.**Fitoterapia** v.62, p. 221–228, 1991.

NARAYANAN, B, A.; GEOFFROY, O.; WILLINGHAM, M. C.; RE, G. G. AND NIXON, D. W: P53/p21(WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. **Cancer Lett** 136: 215-221, 1999.

NARAYANAN, B. A. & RE, G,G: IGF-II down-regulation associated cell cycle arrest in colon cancer cells exposed to phenolic antioxidant ellagic acid. **Anticancer Res** 21: 359-364, 2001.

NARAYANAN, B. A.; GEOFFROY, O.;WILLINGHAM, M. C.; RE, G. G.; NIXON, D. W. p53/p21(WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. **Cancer Lett**;136: 215–21, 1999.

NASHED, B., YEGANEH, B., HAYGLASS, K.T., MOGHADASIAN, M.H., 2005. Antiatherogenic effects of dietary plant sterols are associated with inhibition of proinflammatory cytokine production in Apo E-KO mice. **Journal of Nutrition**, v. 135, p. 2438–2444, 2005.

NEGI, P. S.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Antioxidante and antimutagenic activites of pomogranate peel extracts.**Food Chem.**, v. 80, p. 393-397, 2003.

NEUHOFER, H.; WITTE, L.; GORUNOVIC, M. Alkaloids in bark of *Punica granatum* L. (pomegranate) from Yougoslavia.**Pharmazie**, v.48, p.389-391, 1993.

NICHENAMETLA, S.N.; TARUSCIO, T.G.; BARNEY, D.L.; EXON, J.H.A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 46, 161-183, 2006.

- NICHOLSON, D. W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**; vol. 407, p. 810-16, 2000.
- NILCHOSON, D. W. & THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends Biochem Sci**; vol. 22, p. 299-306, 1997.
- NUGTEREN, T. H.; CHRIST-HAZELHOLF, E. Naturally occurring conjugated octadecatrienoic acids are strong inhibitors of prostaglandin biosynthesis. **Prostaglandins**, v. 33, p. 403-417, 1987.
- NUSSBAUM, R.L.; MCINEES, R.R.; WILLARD, H.F. **Genética Médica**. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 525 p. 2008.
- O'BYRNE, K.J & DALGLEISH, A.G. "[Chronic Immune Activation and Inflammation as the Cause of Malignancy](#)" **British Journal of Cancer**, August 2001, vol. 85, no. 4, pages 473–483, Retrieved Aug 13, 2010.
- OHNO, Y., FUKUDA, K., TAKEMURA, G., TOYOTA, M., WATANABE, M., YASUDA, N., XINBIN, Q., MARUYAMA, R., AKAO, S., GOTOU, K., FUJIWARA, T., FUJIWARA, H. Induction of apoptosis by gallic acid in lung cancer cells. **Anticancer Drugs** 10, 845–851, 1999.
- OHTA, T.; KINOSHITA, T.; NAITO, M.; NOZAKI, T.; MASUTANI, M.; TSURO, T.; MIYAJIMA, A.: Requirement of the caspase-3/CP32 protease cascade for apoptotic death following cytokine deprivation in hematopoietic cells. **J Biol Chem** 272: 23111- 23116, 1997.
- OKADA, H. & MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. **Nat Rev Cancer**; vol. 4, p. 592-603, 2004.
- OLIVEIRA, A. C.; OLIVEIRA C. E. H.; VIEIRA, F. C.; FREITAS, J. O. *Monografia de Bacharelado em Enfermagem*. Universidade Vale do Rio Doce, Brasil, 2009.
- OLIVEIRA-JÚNIOR, RJ; CHESCHINI, JJ; HUMANES, AC; MORELLI, S; SILVEIRA-LACERDA, EP. Caracterização citogenética de uma linhagem celular tumoral (Sarcoma 180) de Mus musculus. Instituto de Genética e Bioquímica, **Universidade Federal de Uberlândia**. 2005.
- OLIVERA, R.B. & ALVES, R.J. Agentes Antineoplásicos Biorredutíveis: Uma Nova Alternativa para o Tratamento de Tumores Sólidos. **Quim.Nova**, v. 25 (6), p. 976-984, 2002.
- OZCAL, N., DINC, S. Evaluation of the pomegranate (*Punica granatum* L.) peels from the standpoint of pharmacy. **Eczacılık Fak'ultesi Dergisi**, v. 22, p.21–29, 1993.
- PAIK, J.; LEE, J. Y.; HWANG, D. Signaling pathways for TNF-induced COX-2 expression: mediation through MAP kinases and NFκB, and inhibition by certain nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 507, 503-8, 2002.
- PALADINI, A.C., MARDER, M., VIOLA, H., WOLFMAN, C., WASOWSKI, C., MEDINA, J.H. Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, p.519–526, 1999.
- PANDEY, G. & MADHURI, S. Some anticancer agents from plant origin. **Journal Plant Archives**, vol. 8, pp. 527-532, 2008.
- PAPAC, R. J. Origins as cancer therapy. **Journal of Biol. And Medicine**, v.74, p.391-398, 2001.
- PAWLOWSKA, A.M.; OLESZEK, W.; BRACA, A. Quali-quantitative analyses of Flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. **J. Agric. Food Chem.** 2008, 56, 3377-3380.
- PAZDUR, R., KUDELKA, A. P., KAVENAGH, J.J., COHEN, P.R., RABER, M. N. The taxoids: paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere). **Cancer treat. Rev.**, v.19, p.351-86, 1993.
- PERCHELLET JP, GALI EM, PERCHELLE DS AND KLISH AD: Armbrust, antitumor promoting activities of tannin acid, ellagic acid, and several gallic acid derivatives in mouse skin, **Basic Life Sci** 59: 783-801, 1992.
- PEREZ-VICENTE, A., GIL-IZQUIERDO, A., GARCIA-VIGUERA, C. In vitro gastrointestinal study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins and Vitamin C. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2308–2312, 2002.

PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; LEYVA, A.; MORAIS, M. E. A.; MORAIS, M. O. Anticancer potential of northeast brazilian plants in KHAN, M. T. H. & ATHER, A (eds) *Advances in Phytomedicine. Leads molecules from natural products- Discovery and nes trends*. **Netherlands, Elsevier**, vol. 2, 1^oed., 197-211, 2006.

PETROS, A. M; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta*; vol. 1664, p. 83-94, 2004.

PINTO, L.F.R; FELZENSZWALB, I. Genética do Câncer. *In: RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. Mutagênese Ambiental*. 1^a Ed. Canoas: Ulbrap 247-279. . 2003.

POYARAZOGLU, E.; GOKMEN, V.; ARUK, N. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* Linn) grown in Turkey. **J. Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 567-575, 2002.

PRIOR, R.L.; LAZARUS, S.A.; CAO, G.; MUCCITELLI, H.; HAMMERSTONE, J.F. Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using highperformance liquid chromatography/mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, 49, 1270-1276, 2001.

PRİYADARSINI, K. I.; KHOPDE, S. M.; KUMAR, S. S.; MOHAN, H. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. **J Agric Food Chem**;50:2200–6, 2002.

QIAN, F., WEI, D., ZHANG, Q., YANG, S., 2005. Modulation of P-glycoprotein function and reversal of multidrug resistance by (-)-epigallocatechin gallate in human cancer cells. **Biomedicine and Pharmacotherapie**, v. 59, p. 64–69, 2005.

QUEIROZ, C. R. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos de Aroeira-preta. **Rev. Árvore**; vol.26 no.4 Viçosa July/Aug. 2002.

QUEIROZ, E.F.; IOSET, J.R.; NDJOKO, K.; GUNTERN, A.; FOGGIN, C.M.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of the bioactive compounds from *Blumea gariepina* by HPLC-UV-MS and HPLCUV- NMR, combined with HPLC-micro-fractionation. **Phytochem. Anal.**2005, 16, 166-174, 2005.

RAMANATHAN, R. K.; BJARNASON, G. A.; BERNAD, S. A.; DESIMONE, P.; BRAICH, T.; EVARS, J.P.; HRUSHESKY, W. J.; JOLIVET, J. A four-arm, randomized multicenter phase II trial of oxaliplatin combined with varying schedules of 5-fluoracil as first line therapy in previously untreated advanced colorectal cancer: **Clin Colorectal Cancer**, v. 7; p. 134-139, 2008.

RAMOS, S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signaling pathways. **Mol. Nutr. Food Res.**, vol.52,pp. 507-526, 2008.

RAMOS, S.; ALIA, M.; BRAVO, L.; GOYA, L. Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). **J. Agric. Food Chem.**, vol.53, pp.1271-1280, 2005.

RAMPINO, N.; YAMAMOTO, H.; IONOV, Y.; LI, Y.; SAWAI, H.; REED, J. C.; PERUCHO, M. Somatic Frameshift Mutations in the *BAX* Gene in Colon Cancers of the Microsatellite Mutator Phenotype, **Science**, Vol. 275 no. 5302 pp. 967-969 **DOI: 10.1126/science.275.5302.967**, 1997.

RANG, M. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. *Farmacologia*. 5.ed. USA: **Elsevier**, 2004.

RANGANATAH, R. M. & NAGASHREE, N. R. Role of programmed cell death in development. **Int. Rev. Cytol**, vol. 202, p.159-242, 2001.

REDDY, L.; ODHAVI, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, vol. 99, pp. 1-13, 2003.

RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F. MARQUES, E. K. Mutagênese Ambiental. **Canoas: Editora da ULBRA**, 356p., 2003.

RIPPLE MO, HENRY WF, SCHWARZE SR, WILDING G, WEINDRUCH R. Effect of antioxidants on androgen-induced AP-1 and NF-kappaB DNA-binding activity in prostate carcinoma cells. **J Natl Cancer Inst**;91:1227– 32,1999.

ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v.1, p.364-369, 2001.

RODRIGUEZ-BERNALDO DE QUIROS, A.; LOPEZ-HERNANDEZ, J.; FERRACES-CASAS, P.; LAGE-YUSTY, M.A. Analysis of non-anthocyanin phenolic compounds in wine samples using high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. **J. Sep. Sci.**, 30, 1262-1266, 2007.

ROSAS, M. S. L, DA SILVA, B. N. M., PINTO, R. GABRIEL M. P., DA SILVA, B. V., DA SILVA, A. R., GUERRA, L. R., SOARES, G. C. M. T, CASTRO, H. C., LIONE, V. O. F. Incidência do Câncer no Brasil e o Potencial Uso dos Derivados de Isatinas na Cancerologia Experimental. **Revista Virtual de Química**, Vol. 5, No 2, 2013.

ROSS, H.A.; MCDUGALL, G.J.; STEWART, D. Antiproliferative activity is predominantly associated with ellagitannins in raspberry extracts. **Phytochemistry**, 68, 218-228, 2007.

ROSS, R. G.; SELVASUBRAMANIAN, S.; JAYASUNDAR, S. Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits—a preliminary study. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 78, pp. 85-87, 2001.

ROZZINI, C,T; MORS, W,B; Botânica econômica brasileira, 2 ed, revisada e atualizada. – Rio de Janeiro: **Âmbito Cultural**.1995.

RUIZ, D.; EGEA, J.; GIL, M.I.; TOMAS-BARBERAN, F.A. Characterization and quantitation of phenolic compounds in new apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. **J. Agric. Food Chem.**, vol.53, pp.9544-9552, 2005.

RUPNARAIN, C.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S.; BHOOLA, K. Colon cancer: genetics and apoptotic events. **Biol Chem.**; vol. 385, p.449-64, 2004.

S. RAJAN, S. MAHALAKSHMI, VM. DEEPA, K. SATHYA, S. SHAJITHA, T. THIRUNALASUNDARI. ANTIOXIDANT POTENTIALS OF *PUNICA GRANATUM* FRUIT RIND EXTRACTS. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, 2011.

SAKAGAMI, H. & SATOH, K. Prooxidant action of two antioxidants: ascorbic acid and gallic acid. **Anticancer Res.** 17, 221–224, 1997.

SAKAGUCHI, N.; M. INOUE, Y. OGIHARA, Reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺, common signals for apoptosis induced by gallic acid, **Biochem. Pharmacol.**55 1973–1981, 1998.

SALUCCI, M.; L.A. STIVALA, G. MAIANI, R. BUGIANESI, V. VANNINI. Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco2), **Br. J. Cancer**, vol.86, pp.1645–1651, 2002.

SANTI, D. V.; MCHENRY, C. S.; SOMMER, H. Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridilate. **Biochemistry**, v. 13; p.471-481, 1974.

SANTOS, R. P. B. Estudo estrutura-atividade do taxol e derivados [Tese de Doutorado]. São Paulo, Instituto de Física, **Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)**, 1998.

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

SARKAR, F.H.; LI, Y. Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. **Cancer Metastasis Rev.**, 21, 265-280, 2002.

- SAWYER, S. A.; PARSCH, J.; ZHANG, Z.; HARTL, D. L. "Prevalence of positive selection among nearly neutral amino acid replacements in *Drosophila*". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (16): 6504-10, 2007.
- SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45, 287-306, 2005.
- SCHMIDT, E.E.; ICHIMURA, K.; REIFENBERGER, G.; COLLINS, V.P. CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res.*, 54, pp. 6321–6324, 1994.
- SCHUBERT SY, NEEMAN I, RESNICK N. A novel mechanism for the inhibition of NF-kappaB activation in vascular endothelial cells by natural antioxidants. *FASEB J.*;16:1931– 3, 2002.
- SCHUBERT, S. Y.; LANSKY, E. P.; NEWMAN, I. Antioxidant and ecosainoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 66, p.11-17, 1999.
- SCHWANDNER R, YAMAGUCHI K AND CAO Z .Requirement of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6 in interleukin 17 signal transduction. *J Exp Med*, 191, 1233–1239, 2000.
- SCHWARTZ, E. L.; BAPTISTE, N.; MEGATI, S.; WADLER, S.; OTTER, B. A. -Ethoxy-2'-deoxyuridine, a novel substrate for thymidine phosphorylase, potentiates the antitumor activity of 5-fluorouracil when used in combination with interferon, an inducer of thymidine phosphorylase expression. *Cancer Res.*; 55(16):3543-50, 1995.
- SEERAM, N. P.; ADAMS, L. S.; HENNING, A. M.; NIU, Y.; ZHANG, Y.; NAIR, M. G.; HEBER, D. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochemistry*, vol. 16, p. 360-367, 2005.
- SEERAM, N. P.; ADAMS, L. S.; HENNING, S. M.; NIU, Y.; ZHANG, Y.; NAIR, M. G.; HEBER, D. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J. Nutr. Biochem.*, v. 16, p. 360-367, 2005.
- SEERAM, N. P.; ADAMS, L. S.; HENNING, S. M.; NIU, Y.; ZHANG, Y.; NAIR, M. G.; HEBER, D. In vitro antiproliferation, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2005.
- SEERAM, N. P.; LEE, R.; HARDY, M. L.; HEBER, D. Larger-scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Sep Purif Tech*; vol. 41, p.49-55, 2005.
- SEERAM, N.P., ADAMS, L.S., HENNING, S.M., NIU, Y., ZHANG, Y., NAIR, M.G., HEBER, D., 2005. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 16, p. 360–367, 2005.
- SEERAM, N.P.; ADAMS, L.S.; ZHANG, Y.; LEE, R.; SAND, D.; SCHEULLER, H.S.; HEBER, D. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9329-9339, 2006.
- SEPEHR, K. S.; BARADARAN, B.; MAZANDARANI, M.; KHORI, V.; SHAHNEH, F. Z. Activities of *Punica granatum L. var. spinosa* (Apple Punice) Extract on Prostate Cell Line by Induction of Apoptosis. *ISRN Pharmaceutics*, 2012.
- SERRANO, A., PALACIOS, C., ROY, G., CESPON, C., VILLAR, M.L., NOCITO, M., GONZALEZ PORQUE, P. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. *Arch. Biochem. Biophys.* 350, 49–54, 1998.
- SETTHEETHAM, W., ISHIDA, T. Study of genotoxic effects of anti-diarrheal medicinal herbs on human cells *in vitro*. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v. 26, p. 306–310, 1995.

- SHANKARAN, V.; IKEDA, H. ; BRUCE, A. T. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. **Nature**.;410(6832):1107–1111, 2001.
- SHEU, M. L.; CHAO, K. F.; SUNG, Y. J.; LIN, W. W.; LIN-SHIAU, S. Y.; LIU, S. H. Activation of phosphoinositide 3-kinase in response to inflammation and nitric oxide leads to the upregulation of cyclooxygenase-2 expression and subsequent cell proliferation in mesangial cells. **Cell.Siggnalling**, 17 (8), 975-84, 2005.
- SHINKAI K, MUKAI M, AKEDO H. Superoxide radical potentiates invasive capacity of rat ascites hepatoma cells in vitro. **Cancer Lett**;32:7– 13, 1986.
- SILVA, S. R. Assistência de enfermagem e acompanhamento domiciliar em quimioterapia antineoplásica. **Rev Bras Enferm.**; 55(2):123-7, 2002.
- SINHA P, CLEMENTS VK, OSTRAND-ROSENBERG S. Interleu27.kin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis. **Cancer Res.**;65(24):11743-51; 2005.
- SKHLAR G. Mechanisms of cancer inhibition by anti-oxidant nutrients.**Oral Oncol**;34:24– 9, 1998.
- SMETS, A. **Anticancer drug.**, vol.3, pp.5-9, 1994.
- SOHI, K.K., MITTAL, N., HUNDAL, M.K., KHANDUJA, K.L.. Gallic acid, an antioxidant, exhibits antiapoptotic potential in normal human lymphocytes: a Bcl-2 independent mechanism. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**(Tokyo) 49, 221–227, 2003.
- SPANDIDOS, D. A. Oncogenes and tumor suppressor genes as paradigms in oncogenesis.**Journalof Buon**,12 Suppl 1, 9–12p., 2007.
- SPENCE, R.A.J.; JONHSTON, P.G.**Oncology, Oxford University Press, Oxford**, 536p., 2001.
- SREERAM, N. P.; LYNN, S.; SUSANNE, M. H.; YANTOU, N.; YAJUN, Z.; MURALIEEDHARAN, G. N.; DAVID, H. *In vitro* proliferative, apoptic and antioxidant activities of punicalgin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols found in pomegranate juice. **J Nutri Biochem**;v. 16, p. 360-7, 2005.
- SREERAM, N.; LEE, R.; HARDY, M.; HEBER, D. Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by product of the commercial juice industry.**Separation and purification technology** ; v. 41, p. 49-55, 2005.
- SRIDHAR, S.B.; U.D. SHEETAL, M.R. PAI, M.S. SHASTRI. Preclinical evaluation of the antidiabetic effect of Eugenia jambolana seed powder in streptozotocin-diabetic rats, Braz. **J. Med. Biol. Res.** 38 463–468, 2005.
- SRIVASTAVA, V., NEGI, A. S., KUMAR, J. K., GUPTA, M., KHANUJA, S. P. S. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. **Bioorg.Med. Chem.**, v.13, p.5892-5908, 2005.
- STEINBACH, G.; LYNCH, P. M.; PHILLIPS, R. K.; WALLACE, M. H.; HAWK, E.; GORDON, G. B.; WAKABAYASHI, N.; SAUNDERS, B.; SHEN, Y.; FUJIMURA, T. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase- 2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis.**N. Engl. J. Med.**, 342, 1946-1952,2000.
- STEVNSNER T AND BOHR VA: Studies on the role of topoisomerase in general, gene and strand-specific DNA repair. **Carcinogenesis** 14: 1841-1850, 1993.
- STEWART, H. L., SNELL, K. C., DUNHAN, L. S., SCHIYEN, S. M. Transplantable and transmissible tumors of animals. In: Atlas of tumor Pathology. Section 12, Fascicle 40. Washington, D. C.: **Armed Forces Institute of Pathology**, 1959.
- STEWART, H. L.; SNEU, K. C.; DUNHAM, L. J.; SCHLYIEN, S. M. Transplantable and transmissible tumor of animals. Armed Forces Institute of pathology, Washigton, pag. 324-329, 1959.

STHEETHAM, W. & ISHIDA, T. Study of genotoxic effects of anthidiarreal medicinal herbs on human cells in vitro. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.26, p. 306-310, 1995.

STONER GD AND MORSE AM: Isothiocyanates and plant polyphenols as inhibitors of lung and esophageal cancer. **Cancer Lett** 114: 113-119, 1997.

STRLIC, M., RADOVIC, T., KOLAR, J., PIHLAR, B., Anti- and prooxidative properties of gallic acid in fenton-type systems. **J. Agric. Food Chem.** 50, 6313–6317, 2002.

SUDHEER, A.R.; MUTHUKUMARAN, S.; DEVIPRIYA, N.; MENON, V.P. Ellagic acid, a natural polyphenol protects rat peripheral blood lymphocytes against nicotine-induced cellular and DNA damage *in vitro*: with the comparison of N-acetylcysteine. **Toxicology**, 230, 11-21, 2007.

SUDHEESH, S.; PRESANNAKUMAR, G.; VIJAYA KUMAR, S.; VIJAYALAKSHMI, N. R. Hypolipidemic effect of flavonoids from *Solanum melongean*. **Plant foods Human Nutri**; v.51, p. 321-30, 1997.

SUGIURA, K. & STOCK, C. C. Studies in a Tumor Spectrum. 1. Comparison of the Action of Methylbis (2-chloroethyl) amine and 3- Bis (2-chloriethyl) aminomethyl-4-methoxymethyl-5-hydroxy-6-methylpyridine on the Growth of a Variety of mouse and rat tumors. **Cancer**, 5: 382-402, 1952.

SUMNER, M. D., M. ELLIOTT-ELLER, G. WEIDNER, J. J. DAUBENMIER, M. H. CHEW, R. MARLIN, C. J. RAISIN AND D. ORNISH. Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heartdisease. **Am. J. Cardiol.** 96810-814, 2005.

SUMPTER, L.R.; M.S. INAYAT, E.E. YOST, W. DUVALL, E. HAGAN, C.N. MAYHEW. In vivo examination of hydroxyurea and the novel ribonucleotide reductase inhibitors trimidox and didox in combination with the reverse transcriptase inhibitor abacavir: suppression of retrovirus-induced immunodeficiency disease, **Antiviral Res.** 62 111–120, 2004.

SUN Y & OBERLEY LW.Redox regulation of transcriptional activators.**Free Radic Biol Med** 21:335–48,1996.

SUN, J.; Y.F. CHU, X. WU, R.H. LIU.Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits, **J. Agric. Food Chem.** Vol.50, pp.7449–7454, 2002.

SUPAYANG, V.; AMORNAT, L.; WANPEN, J.; TRACHADA, S.; SOUWALAK, P. P.; THANOMJIT, S. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:47. **J Ethnopharmacol** ;v. 94, p. 49-54, 2004.

SUZUKI, R., NOGUCHI, R., OTA,T., ABE, M., MIYASHITA, K.,KAWADA,T.Cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on mouse tumor and human monocytic leukemia cells. **Lipids**, v. 36, p.477–482, 2001.

SZEKERES, T.; K. GHAREHBAGHI, M. FRITZER, M. WOODY, A. SRIVASTAVA, B. VAN'T RIET.Biochemical and antitumor activity of trimidox, a new inhibitor of ribonucleotide reductase, **Cancer Chemother.Pharmacol.**, vol. 34, pp.63–66, 1994.

TAATJES, D. J., SOBEL, B. E., AND BUDD, R. C. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis.**Histochem Cell Biol** 129, 33–43, 2008.

TAKEDA, E. & G. WEBER. Role of ribonucleotide reductase in expression in the neoplastic program, **Life Sci.** 28 1007–1014, 1981.

TALCOTT ST & LEE J-H. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice. **J Agric Food Chem**;50:3186 –92, 2002.

TANAKA, T.; KOJIMA, T.; KAWAMORI, T.; WONG, A.; SUZUI, M.; OKAMOTO, K.; MORI, H. Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids, **Carcinogenesis**, v. 14, p.1321-1325, 1993.

TANAKA,T.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Taninis and related compounds XI. Revision of the structure of punicalin and punicalagin, and isolation and characterization of 2-O-galloylpunicalin

from the bark of *Punica granatum Linn.* **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, p. 9424-9428, 1986.

TANNOCK, I. F. The basic science of oncology. 4th ed. 30. New York: McGraw Hill; 2005.

TEEL, R. W.: Ellagic acid binding to DNA as a possible mechanism for its antimutagenic and anticarcinogenic action. **Cancer Lett** 30: 329-336, 1986.

TE-MAO LI, GUANG-WEI CHEN, CHIN-CHENG SU, JAUNG-GUNG LIN, CHIN-CHUNG YEH, KWOK-CHU CHENG and JING-GUNG CHUNG. Ellagic Acid Induced p53/p21 Expression, G1 Arrest and Apoptosis in Human Bladder Cancer T24 Cells. **Anticancer Research** 25: 971-980, 2005.

THRESIAMMA KC AND KUTTAN R: Inhibition of liver fibrosis by ellagic acid. **Indian J Physiol Pharmacol** 40: 363-366, 1996.

THRESIAMMA, K. C. & KUTTAN, R. Inhibition of liver fibrosis by ellagic acid. **Indian J Physiol Pharmacol**; 40:363-6, 1996.

THUN, M.J.; M.M. NAMBOODIRI, C.W. HEATH JR., Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer, **N. Engl. J. Med.**, vol. 325, pp. 1593-1596, 1991.

TIHAN, T.; H.L. ELFORD, J.G. CORY. Studies on the mechanisms of inhibition of L1210 cell growth by 3,4-dihydroxybenzohydroxamic acid and 3,4-dihydroxybenzamidoxime, **Adv. Enzyme Regul.**, vol. 31, pp. 71-83, 1991.

TOI, M.; BANDO, H.; RAMACHADRAN, C. Preliminary studies of anti-angiogenic potential of pomogranate fractions in vitro and in vivo. **Angiogenesis**, v. 6, p. 121-128, 2003.

TORNUSCIOLO, D. R., SCHMIDT, R. E., AND ROTH, K. A. Simultaneous detection of TDT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL)-positive cells and multiple immunohistochemical markers in single tissue sections. **BioTechniques** 19, 800-5, 1995.

TRINCAUS, M. R. *A morte em seu mostrar-se ao paciente oncológico em situação de metástase*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós – Graduação em Enfermagem Fundamental, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da **Universidade de São Paulo**, São Paulo; 2005.

TROTTI, A.; BELLM, L. A.; EPSTEIN, J. B.; FRAME, D.; FUCHS, H.J.; GWED, C. K.; KOMAROFF, E.; NALYSNYCK, L.; ZILBERBERG, M. D. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. **Radiother. Oncol.**, v. 66; p. 253-262, 2003.

TSIMBERIDOU, A.M.; Y. ALVARADO, F.J. GILES, Evolving role of ribonucleoside reductase inhibitors in hematologic malignancies, **Expert Rev. Anticancer Ther.**, vol. 2, pp. 437-448, 2002.

TSUYUKI, H., ITO, S., NAKATSUKASA, Y. Lipids in pomegranate seeds. *Nihon Daigaku No-Juigakubu Gakujutsu Kenkyu Hokoku*, v. 38, p. 141-148, 1981.

VANDER HEIDEN, M. G. & THOMPSON, C. B: Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis. **Nature Cell Biol** 1: E209-16, 1999.

VANDER HEIDEN, M. G. V. & THOMPSON, C. B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis: *Nat Cell Biol*; E209-16, 1999.

VELURI, R., SINGH, R.P., LIU, Z., THOMPSON, J.A., AGARWAL, R., AGARWAL, C. Fractionation of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active constituents causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. **Carcinogenesis** 27, 1445-1453, 2006.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**, vol. 243, pp. 167-190, 2000.

VIDAL, A., FALLARERO, A., PENA, B.R., MEDINA, M.E., GRA, B., RIVERA, F., GUTIERREZ, Y., VUORELA, P.M. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 295–300, 2003.

VIDIGAL, D. J. A.; SILVA, A. L.; VASCONCELOS, A. C.; FALZITO, D. R.; VERÇOSA, B. L. A.; SANTANA, N. G.; VIDIGAL, F. E. C. Effect of finasteride on serum prostate-specific antigen (PSA) and on prostate of hamster *Mesocricetus auratus* (hMa). **Acta Cirúrgica Brasileira - Vol. 25 (1)– 47,2010**.

VOUSDEN, K. H. & LANE, D. P. p53 in health and disease. **Nature Reviews, Molecular Cell Biology**, vol. 8, pp. 275-283, doi:10.1038/nrm2147, 2007.

VRAKA, P.S., DROUZA, C., RIKKOU, M.P., ODYSSEOS, A.D., KERAMIDAS, A.D., 2006. Synthesis and study of the cancer cell growth inhibitory properties of alpha-, gamma-tocopheryl and gamma-tocotrienyl 2-phenylselenenyl succinates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 2684–2696, 2006.

VRHOVSEK, U.; RIGO, A.; TONON, D.; MATTIVI, F. Quantitation of polyphenols in different apple varieties. **J. Agric. Food Chem.**, 52, 6532-6538, 2004.

WADDELL, W. R.; GANSER, G. F.; CERISE, E. J.; LOUGHRY, R. W. Sulindac for polyposis of the colon. **Am. J. Surg.**, 157, 175-179, 1989.

WALKER PR, SMITH C, YOUNDALE T, LEBLANC J, WHITFIELD JF AND SIKORSKA M: Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. **Cancer Res** 51: 1078-1085, 1991.

WALL, M. E. & WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacologic**, v.51, p.239-254, 1996.

WANG, R. F.; XIANG, L.; DU, L. J.; WANG, W. The constituents of *Punica granatum*. **Asia-pacific Traditional Medicine**, v.3, p. 369-372, 2006.

WANG, R. F.; XIE, W. D.; ZHANG, Z.; XING, D. M.; DING, Y.; WANG, W.; MA, C.; DU, L. J. Bioactive compounds from the seeds of *Punica granatum* (pomegranate). **Journal of Natural Products**, v.67, p. 2096-2098, 2004.

WANG, R.; YING, Y.; LIU, R.; XIANG, L.; DU, L. Pomogranate: constituents, bioactivities and Pharmacokinetics. Fruit, vegetable and Cereal Science. **Globol Science Book**, 2010.

WANG, R.F., XIE, W.D., ZHANG, Z., XING, D.M., DING, Y., WANG, W., MA, C., DU, L.J Bioactive compounds from the seeds of *Punica granatum* (Pomegranate). **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2096–2098, 2004.

WEBSTER, R.P.; GAWDE, M.D.; BHATTACHARYA, R.K. Protective effect of rutin, a flavonol glycoside, on the carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats. **Cancer Lett.**1996, 109, 185-191, 1996.

WEI, M. C.; ZONG, W.; CHENG, E. H. Y.; LINDSTEN, T.; PANOUTSAKOPOULOU, V.; ROSS, A. J.; ROTH, K. A.; MacGRAGOR, G.; THOMPSON, C. B.; KORSMEYER, S. J. Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. **Science**, vol. 292, pp. 727-730, DOI: 10.1126/science.1059108, 2001.

WEISBURG, J.H.; WEISSMAN, D.B.; SEDAGHAT, T.; BABICH, H. *In vitro* cytotoxicity of epigallocatechin gallate and tea extracts to cancerous and normal cells from the human oral cavity. **Basic Clin.Pharmacol.Toxicol**, 95, 191-200, 2004.

WHITESIDE TL.The tumor microenvironment and 32.its role in promoting tumor growth. **Oncogene**.;27(45):5904-12; 2008.

WHO Classification of Tumours, Volume 8 IARC (International Agency for Research on Cancer) **WHO Classification of Tumours**, No 8 IARC; 2004.

- WHO Official Records, n. 68, p. 14, 1956, resolution EB17, R40.
- WHO Official Records, n. 79, p. 467, 1957, resolution WHA10.18.
- WILLINGHAM, M. C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. **J Histochem Cytochem** 47, 1101–10, 1999.
- WOLFE, K., WU, X., LIU, R.H. Antioxidant activity of apple peels. **J. Agric. Food.Chem.** 51, 609–614, 2003.
- WOLFSON, E.R. The Book of the Pomegranate: Moses de Leon's Sefer Ha-Rimmon. **Scholar's Press, Atlanta, GA**, 1988.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. CANCER (WHO). Fact sheet n° 297. [homepage on the internet]. Geneva: **World Health Organization**; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>.
- WYLLIE AH, KERR RG AND CURRIE AR: Cell death: the significance of apoptosis. **Int Rev Cytol** 68: 251-306, 1980.
- YAMASAKI, M., KITAGAWA, T., KOYANAGI, N., CHUJO, H., MAEDA, H., KOHNO- MURASE, J., IMAMURA, J., TACHIBANA, H., YAMADA, K., 2006. Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice. **Nutrition**, v. 22, p.54–59, 2006.
- YANAGIDA, A.; SHOJI, T.; KANDA, T. Characterization of polymerized polyphenols by sizeexclusion HPLC. **Biosci.Biotechnol.Biochem.**, 66, 1972-1975, 2002.
- YANG, J. H. H., HSIA, T.C., KUO, H.M., CHAO, P.D., CHOU, C.C., WEI, Y.H., HCHUNG, J.G., 2006. Inhibition of lung cancer cell growth by quercetin glucuronides via G2/M arrest and induction of apoptosis. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, v. 34, p. 296– 304, 2006.
- YANO, H.; MIZOGUCHI A, FUKUDA K, HARAMAKI M, OGASAWARA S, MOMOSAKI S AND KOJIRO M: The herbal medicine sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G0/G1 phase. **Cancer Res** 54, 448-454, 1994.
- YOKOZAWA, T.; DONG, E.; LIU, Z.W. & SHIMIZU, M. Antioxidant activity of flavones and flavonols in vitro. **Phytotherapy Research**. Vol.11:446-450,1997.
- YOU, B. R.; MOON, H. J.; HAN, Y. H.; PARK W. H. Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer via apoptosis and/or necrosis. **Food and Chemical Toxicology**, 48: 1334-1340, 2010.
- YU, J. L.; COOMBER, B. L.; KERBEL, R. S.: A paradigm for therapy-induced microenvironmental changes in solid tumors leading to drug resistance. **Differentiation**70: 599-609, 2002.
- YUE, Z.; JIN, S.; YANG, C.; LEVINE, A. J.; HEINTZ, N. *Beclin 1*, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 100, pp. 15077–15082, 2003.
- ZAND, R.S., JENKINS, D.J., DIAMANDIS, E.P. Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 62, p. 35–49, 2000.
- ZHANG, G.; MIURA, Y.; YAGASAKI, K. Effects of green, oolong and black teas and related components on the proliferation and invasion of hepatoma cells in culture. **Cytotechnology**, 31, 37-44, 1999.
- ZHANG, H.; HUANG Q, KE N, MATSUYAMA S, HAMMOCK B, GODZIK A AND REED JC: Drosophila pro-apoptotic Bcl-2/Bax homologue reveals evolutionary conservation of cell death mechanism. **J Biol Chem**275: 27303-6, 2000.
- ZHANG, Y.; SEERAM, N.P.; LEE, R.; FENG, L.; HEBER, D. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. **J. Agric. Food Chem**, 56, 670-675, 2008.
- ZHENG, Y.; ZHOU, F.; WU, X.; WEN, X.; LI, Y.; YAN, B.; ZHANG, J.; HAO, G.; YE, W.; WANG, G. 23-hydroxybetulinic acid from *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel synergizes the antitumor activities of doxorubicin *in vitro* and *in vivo*. **J Ethnopharmacol**.2010.

ZHOU, B. P.; LIAO, Y.; XIA, W.; SOPHN, B.; LEE, M. H.; HUNG, M. C.: Cytoplasmic localization of p21CIP1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. **Nat Cell Biol**3: 245-252, 2001.

ZIEGLER, U. & GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci**; vol. 19, p. 124-28, 2004.

ZITVOGEL L, APETOH L, GHIRINGHELLI F, ANDRÉ F, TESNIERE A, KROEMER G. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? **Journal of Clinical Investigation**.2008;118(6):1991–2001.

7. ANEXOS

7.1 DADOS DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

Título: Safety use and apoptosis-related antitumor effect of aqueous extract of *Punica granatum* Linn in Sarcoma 180 murine model (Utilização segura e efeito antitumoral do extrato aquoso de *Punica granatum* Linn em modelo experimental murino de sarcoma 180)

Autores: Talita Santos Bastos^a, Danilo Barauna Nascimento da Costa^a, Rafael Barreto Vieira Valois^a, Clauberto Rodrigues de Oliveira^a, Marismar Fernandes do Nascimento^a, Grace Anne Azevedo Dória^b, Ricardo Amaral Guimarães^b, Cláudia Andréa Lima Cardoso^c, Isabel Bezerra Lima-Verde^{a,d}, Francine F. Padilha^{a,d}, Margarete Zanardo Gomes^{a,d}, Juliana Cordeiro Cardoso^{a,d}, Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque-Júnior^{a,d}.

Periódico: Food and Chemical Toxicology

ISSN: 0278-6915

Fator de Impacto: 3,215

Qualis CAPES: A2 (Interdisciplinar)

aTiradentes University, Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia, CEP 49032-490, Aracaju, Sergipe, Brazil
bDepartamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon, Cidade Universitária, CEP 49100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil
cUniversity of State of Mato Grosso do Sul, Unid. Dourados, Rod. Ithau km 12 79804-970, Dourados/MS, Brazil
dInstituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia, CEP 49032-490, Aracaju, Sergipe, Brazil

7.1. 2 ARTIGO CIENTÍFICO

Safety use and apoptosis-related antitumor effect of aqueous extract of *Punica granatum* Linn in Sarcoma 180 murine model

Talita Santos Bastos^a, Danilo Barauna Nascimento da Costa^a, Rafael Barreto Vieira Valois^a, Clauberto Rodrigues de Oliveira^a, Marismar Fernandes do Nascimento^a, Grace Anne Azevedo Dória^b, Ricardo Amaral Guimarães^b, Cláudia Andréa Lima Cardoso^c, Isabel Bezerra Lima-Verde^{a,d}, Francine F. Padilha^{a,d}, Margarete Zanardo Gomes^{a,d}, Juliana Cordeiro Cardoso^{a,d}, Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque-Júnior^{a,d}

^aTiradentes University, Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia, CEP 49032-490, Aracaju, Sergipe, Brazil

^bDepartamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon, Cidade Universitária, CEP 49100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

^cUniversity of State of Mato Grosso do Sul, Unid. Dourados, Rod. Ithau km 12 79804-970, Dourados/MS, Brazil

^dInstituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia, CEP 49032-490, Aracaju, Sergipe, Brazil

*Author for correspondence:

Ricardo Luiz C. de Albuquerque Júnior

Tiradentes University

Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia 49032-490, Aracaju (SE), Brazil

Phone: +55 79 32182190 r2615

FAX: +55 79 32182190

E-mail: ricardo.patologia@uol.com.br

Abstract

Background: Aqueous extracts of *Punica granatum* (AEPG) have shown an important antitumor activity. In this work we investigated the antitumor effect of AEPG using transplanted mouse sarcoma-180 cells and evaluated the apoptosis induction. The biochemical effect and toxicity on healthy tissues of AEPG were also investigated and compared to 5-fluorouracil performance and side effects data.

Methods: The extract was analyzed by HPLC-MS. Sarcoma 180 cells were transplanted to 60 mice, which were treated with AEPG 10, 25 and 50 mg/kg (n=12 each), saline (n=12) and 5-fluorouracil 25 mg/kg (n=12) during 7 days. The animals were euthanized at day 8 and the body, organs and tumor weights were recorded. Biochemical and hematologic analyses were carried out. Tumors were excised and analyzed by histological techniques, and *in situ* apoptosis rates were assessed using TUNEL staining. Morphological study of the organs was also performed to assess possible the toxicological effects.

Results: Ellagitannins were identified as major compounds, with high contents of gallic acid (32.24 mg.g⁻¹) and ellagic acid (41.67 mg.g⁻¹). AEPG and 5-Fluorouracil induced significant inhibition of tumor growth when compared to saline (p<0.05). The percentage of apoptotic cells was significantly increased in 5-Fluorouracil (p<0.01) and AEPG-treated groups (p<0.01). No significant difference was observed between 5-Fluorouracil and the three doses of AEPG. 5-Fluorouracil induced toxicity effects, such as decrease of body weight, splenic atrophy and leucopenia, but these effects were not evidenced in AEPG-treated groups.

Conclusions: Our results provided evidence that AEPG presents antitumor effects in murine model comparable to 5-Fluorouracil, likely resulting of increased apoptotic rate, but with no remarkable side effects presented by the chemotherapeutic currently used.

Key-words: *Punica granatum* Linn, sarcoma-180, cancer, chemotherapy

1. Introduction:

Punica granatum is a deciduous tree belonging to family Punicaceae and contains hydrolysable tannins as major active chemical constituents, i.e. punicalagin, punicalin, gallic acid, ellagic acid and ellagic acid derivative (Gil *et al.*, 2000). There is a wide literature about bioactive compounds from this fruit (pomegranate), showing important biological activities, such as healing (Hayouni *et al.*, 2011), antimicrobial (Abdollahzadeh *et al.*, 2011), chemopreventive (Bishayee *et al.*, 2011), and antitumor (Motal and Shaker, 2011).

Cancer is a disease that involves environmental, chemical, physical, metabolic, and genetic factors. Several studies demonstrated that natural compounds (including tannins) have a wide variety of biological functions which are mainly related to modulation of carcinogenesis and anti-proliferative effect, such as, antioxidant and pro-apoptotic activities (Dikmen *et al.*, 2011). Furthermore, these compounds present safety, low toxicity, and general acceptance (Fresco *et al.*, 2006).

Apoptosis plays an important role in elimination of tumor cells by chemotherapeutic agents (Thompson, 1995; Galati *et al.*, 2000). According to Dai and Mumper (2010), apoptosis-inducing compounds are expected to be ideal anticancer

drugs due to promoting DNA damage in tumor cells, which ones are rapidly recognized by macrophages and removed without inducing inflammatory response.

In vitro studies had already described positive results of treatment with *P. granatum* extract by apoptosis-induced death on many cell lines, such as, colon cells - SW620, HT-29, and HCT-116 (Seeram *et al.*, 2005; Joseph *et al.*, 2013), prostate cells- PC3 (Lansky *et al.*, 2005; Sineh Sepehr *et al.*, 2012) lung cells - A549 (Sangeetha *et al.*, 2012), breast cells - MCF-7 (Joseph *et al.*, 2011), and K-562 leukemia cells (Oliveira *et al.*, 2010). However, in these models, the systemic effect of these compounds could not be assessed.

The drugs currently used in chemotherapy promote innumerable systemic side effects. 5-fluorouracil (5-FU) is an important and efficient antitumor drug, but exhibit depression of immune system (Gonzaga *et al.*, 2009). The investigation of antitumor activity and the systemic effect of natural products can be assessed using transplanted tumor cells model.

Therefore, we investigated the effect of aqueous extract of *Punica granatum* (AEPG) as antitumor drug using transplanted mouse sarcoma-180 cells as *in vivo* model. We hypothesize that the ellagitannins from AEPG are capable to induce apoptosis in mice sarcoma-180. We also investigated the biochemical effect and cytotoxicity on healthy tissues of AEPG, comparing to 5-FU performance and side effects data.

2. Material and Methods

2.1. Plant material

Punica granatum L. fruits were collected in Petrolina, PE, Brazil (9°23'34"S 40°30'28"W). The plant was authenticated at ASE - Herbarium of the Federal University of Sergipe and a voucher specimen number 20881 was deposited in the same Institute. The fruits were washed with tap water and pulping. The peel was dried at 55°C and uniformly powdered. The extraction was carried out by dynamic

maceration using boiling water 1:100 (w/v) as solvent during two hours. The suspension was filtered and the solvent was removed in circulating air stove at $50 \pm 5^\circ\text{C}/48\text{-}72\text{h}$, obtaining the dry extract labeled AEPG. The percentage of extraction yield was found 63.4%, calculated in terms of dried weight. All the chemicals were purchased from Sigma Chemicals Co., St Louis, USA and were of analytical reagent grade.

2.2. HPLC- MS analysis

AEPG was solubilized in a mixture of water: methanol (50%) and filtered (0.45 μm). A extract sample (1 mg/mL) was analyzed by HPLC-MS. The high performance liquid chromatography analysis (HPLC-MS) was conducted using Shimadzu model LC-6AD, with diode array detector SPD-M20A, column reverse phase C-18 (25 cm x 4.6 mm x 5 mm). The volume of the sample injected was 10 μL and the mobile phase contained 0.1% (v/v) H_3PO_4 in water (95%) and 0.1% (v/v) H_3PO_4 in acetonitrile (5%) was used and the flow rate 1 mL/min

2.3. Animals

Sixty male six-week-old Swiss mice (20 ± 2 g weight) were obtained from the Animal Facility of Tiradentes University (Sergipe, Brazil). The mice were maintained under controlled temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) and relative humidity ($50 \pm 5\%$), with a 12 h light/dark cycle and free access to a standard mouse diet and water. All the procedures for animal research were performed in accordance with the guideline of the Brazilian Council for Animal Experimentation and followed a protocol approved by the Animal Ethics Committee of Tiradentes University (approval subscription n^o 021113).

2.4. S180 murine sarcoma cells transplantation and samples collection

The experimental procedures of ascitic and solid-type sarcoma 180 tumor transplantations were performed as described by Chen *et al.* (2014). The cell line was first cultured over 10 days in the abdominal cavity of a Swiss mouse. Subsequently, the cultured cells were harvested with the peritoneal fluid and centrifuged at $300 \times g$ for 10 min in phosphate-buffered saline (PBS). The separated sarcoma cells were suspended

in PBS, centrifuged at $1,800 \times g$ for 5 min and their concentration was adjusted to 1.0×10^6 cells/mL by diluting in Lactated Ringer's solution. The sarcoma 180 cells (0.2 mL; concentration, 1.0×10^6 cells/mL) were implanted subcutaneously in the left groin of the mice. Animals were randomly assigned into five groups ($n=12$) and subjected to the experimental treatment procedures, as demonstrated in Table 1, for seven days. Prior to the intraperitoneal injection, the crude aqueous extract was suspended in saline at final concentration of $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Body weight, food and water intakes were measured daily over the time course of the experiment. Signs of abnormalities, as well as behavior changes were recorded along the entire period of treatment. The animals were euthanized in CO_2 chamber 8 days after the S180 cells transplantation. Kidneys, liver and spleen were removed from each animal and preserved for further histopathological examination. Prior to euthanize, blood samples were also collected by cardiac puncture for hematological and biochemical analysis.

Table 1. Distribution of the animals into the experimental groups according to the treatment after transplantation of 2×10^6 S180 cells/0.5 mL.

Group	Treatment (0.2 mL i.p. administration)
Saline	Saline
5-FU	25 mg/Kg of 5-Fluorouracil
PG10	10 mg/Kg of AEPG
PG25	25 mg/Kg of AEPG
PG50	50 mg/Kg of AEPG

i.p. (intraperitoneal administration); AEPG (Aqueous extract of *Punica granatum* Linn. at 10 mg/mL).

2.5. Antitumor activity

The tumors were excised and their size was measured using a digital-caliper and the volume of tumors was determined using the formula $\text{width}^2 \times \text{length} \times 0.52$ (Lee *et al.*, 2003). The effects of AEPG on tumor growth were assessed by evaluating tumor volume, tumor weight and tumor growth inhibition ratio (IR). The IR data were obtained

using the following equation: $IR (\%) = (S_w - T_w) / S_w \times 100$; where S_w and T_w represent the average tumor weight of the saline and test groups, respectively.

2.6. Hematological and biochemical analysis

Hematological analysis was performed using an automatic hematological analyser Sysmex Xs1000i (Sysmex America, Inc., EUA). The differential leukocyte counting was performed with an optical microscopy after staining with Pappenheim's method and, in each case, the percentage of each leukocyte was assessed. Blood serum samples were analyzed to assess the following parameters: aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), urea and creatinine using the analyser Architect C8000 (ABBOTT, Québec, Canada).

2.7. Gross and histopathological studies

The organs and tumors samples were weighed and data were expressed in relative terms (g/100 g body weight). Subsequently, they were fixed in a 10% formalin solution (pH 7.4) for 24 h. The fixative was removed by washing specimens thoroughly with running tap water overnight. After dehydration through a graded series of alcohols, the tissues were cleaned in methyl-benzoate, and embedded in paraffin wax. Histological sections (7 μ m thick) were obtained and stained with hematoxylin/eosin, and observed under light microscope for detail.

2.8. Terminal deoxyuridine nick-end labeling (TUNEL) staining

Apoptosis cell death detection was performed as described by Woodside et al. (2003). Three histological sections (5 μ m thick) at 50 μ m intervals were obtained from the paraffin-embedded tissue. The samples were deparaffinized, rehydrated in graded alcohol (99 °GI, 95 °GI, and 70 °GI), and washed with deionized water. For identification of apoptotic cells, TUNEL staining (ApoTag; Oncor, San Francisco, CA) was used. The histological sections were treated with proteinase K (20 μ L/mL in phosphate-buffered saline – PBS) to digest proteins, and endogenous peroxidase activity was quenched with 2% H_2O_2 in PBS. Subsequently, 75 μ L of equilibration buffer was placed on each

section. Diluted TdT enzyme solution was applied and the section was incubated at 37°C for 1 h. After incubation, the slices were placed in stop wash buffer. Next, 55 µL of anti-digoxigenin peroxidase was added and the slices were incubated for 30 min at room temperature. Sections were again washed, and diaminobenzidine (DAB)-hydrogen peroxide was used for color development. Sections were then counterstained with 2% hematoxylin and mounted for examination. Apoptotic cells were identified either as cells with brown-stained nuclei or as apoptotic bodies (fragments of apoptotic cells engulfed by neighboring cells). The number of labeled cells was determined in 1000 cells counted and the Apoptosis Ratio (AR) was assessed according to the following equation: $AR(\%) = (TnP/1000) \times 100$, where AR is the apoptosis ratio and TnP is the number of TUNEL-positive cells.

2.9. Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm S.E.M or as percentages of saline group. Subsequently, data were assessed by the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the post hoc Tukey–Kramer Multiple Comparisons Test. The values at $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1 Chromatographic characterization of the AEPG

HPLC-MS analysis revealed that the major chemical compounds in the AEPG were punicalagin α and β , ellagic acid and gallic acid. The concentrations of gallic acid and ellagic acid in the sample were 32.24 mg.g⁻¹ and 41.67 mg.g⁻¹ respectively.

3.2 Analysis of the antitumor effects of the AEPG

As demonstrated in Fig. 1A/B, the tumor weight and volume of 5-FU-treated animals was significantly lower than saline group ($p < 0.001$). Similarly, intraperitoneal administration of AEPG (10, 25 and 50 mg/kg) also reduced significantly the average weight and volume of the tumors ($p < 0.001$). Reduction of the tumor weight and volume

obtained with the treatment with AEPG at 10 mg/Kg and 50 mg/Kg were statistically similar to that obtained with 5-FU ($p > 0.05$). Moreover, there was no significant difference in the average tumor weight and volume between the AEPG-treated groups ($p > 0.05$). No significant difference in the tumor growth inhibition ratio was observed between 5-FU and the treatment with 10 mg/Kg and 50 mg/Kg AEPG ($p > 0.05$) (Fig. 1C). However, the inhibition ratio induced by 25 mg/Kg AEPG was significantly lower than 5-FU ($p < 0.05$). The assessment of the average tumor weight and tumor growth inhibition ratio indicates that the response to the treatment with AEPG on the sarcoma 180 growth was not dose-dependent.

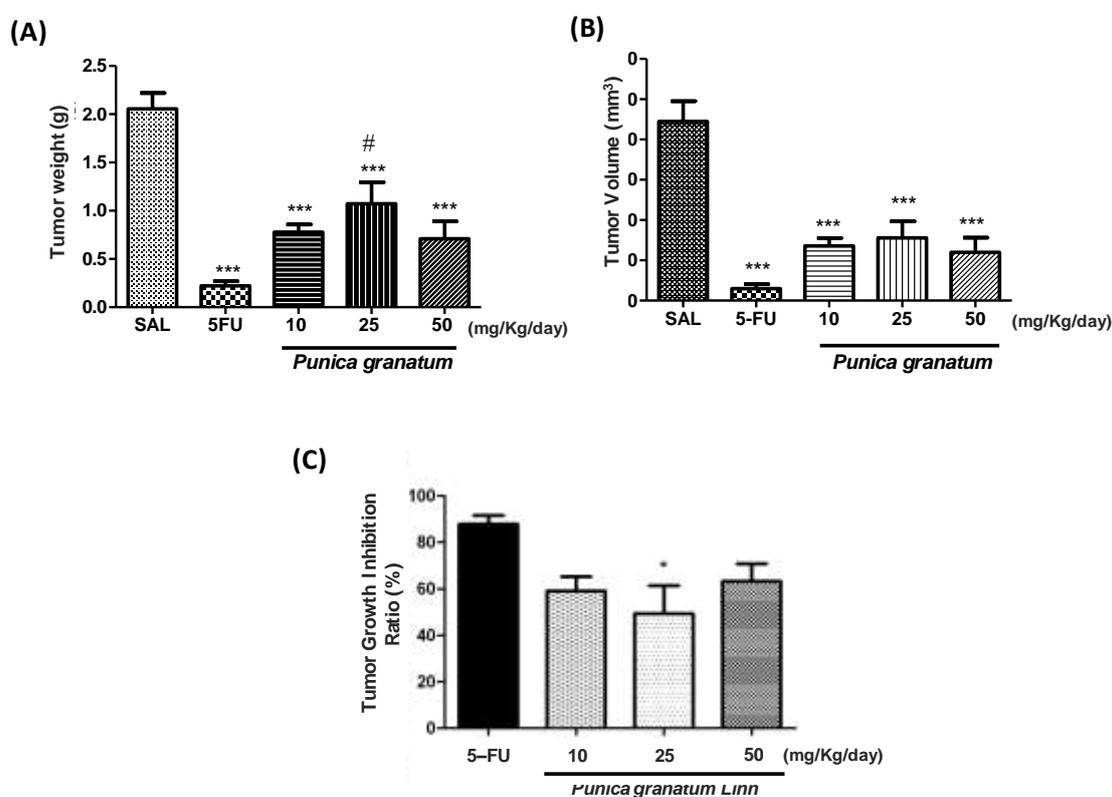


Figure 1. (A) Assessment of the average tumor weight and (B) tumor volume of the different test groups. (C) Assessment of the average tumor growth inhibition ratio of the different test groups (in relation to tumor weight of the saline-treated group). Data were expressed as mean \pm standard error mean (SEM). *** Statistically significant difference ($p < 0.001$) in comparison to Saline-treated group; # Statistically significant difference ($p < 0.05$) in comparison to 5-FU-treated group; * Statistically significant difference ($p < 0.05$) in comparison to 5-FU-treated group (ANOVA and Tukey test).

Post-mortem analysis of the tumors revealed similar histopathological features in all the groups (Fig. 2). Thus, tumors were characterized by neoplastic sheets of

small polygonal and ovoid cells compactly arranged in some areas but loosely disposed in others. Tumor cells often invaded and dissociated lobules of adipose tissue and striated skeletal muscle bundles. Most of the tumor cells exhibited strongly eosinophilic cytoplasm and round-shaped hyperchromatic and moderately pleomorphic nuclei, but sometimes the nuclear chromatin was disperse and presented prominent nucleoli. Typical and atypical mitotic figures were often found (2-3 mitosis/histological field/400 x magnification) among the neoplastic parenchyma. In addition, extensive areas of coagulative necrosis and mild to moderate inflammatory response composed of lymphocytes and neutrophils were also observed. Vascular and perineural invasion were rare histological findings in all the groups, regardless the treatment applied to the animals.

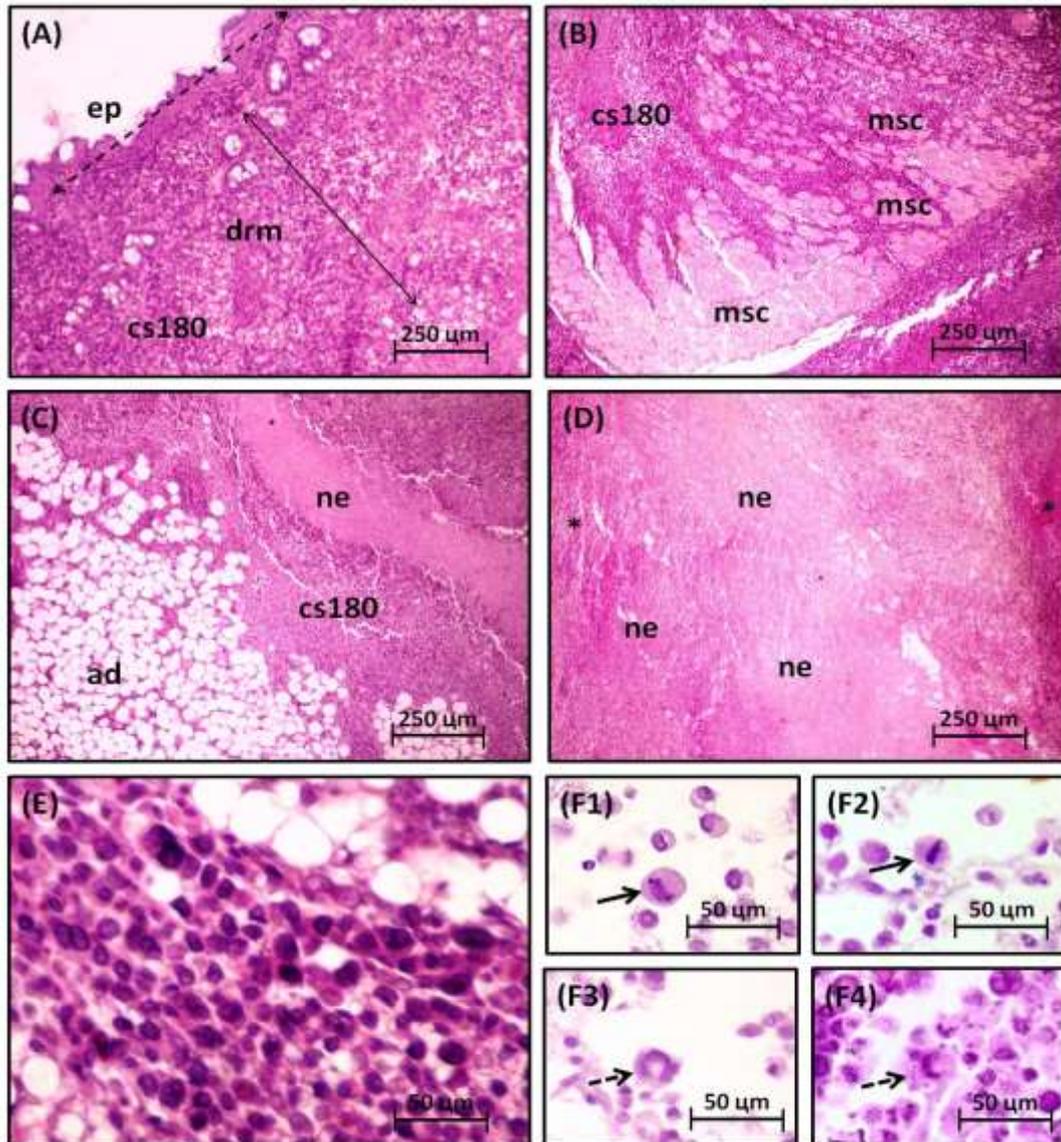


Figure 2. Photomicrographs of sarcoma 180 histological sections stained with hematoxylin/eosin. (A) Tumor cells of sarcoma 180 (cs180) proliferating below epidermis (ep, dashed double headed arrow), deeply invading the underlying dermis (drm, solid double headed arrow). (B) Tumor cells invading and dissociating bundles of skeletal muscle fibers (msc). (C) cs180 invading the hypodermic adipose tissue (ad), and causing foci of parenchymal coagulative necrosis (ne). (D) Extensive areas of coagulative necrosis (ne) limited by viable tumor cells (*). (E) Detail of tumor parenchymal component showing intense cell pleomorphism and hyperchromatic nuclei. (F1 and F2) typical and (F3E F4) atypical mitotic figures (HE, A - D, x 100, E - F, x 800).

In this study, apoptotic cells death was detected using Terminal deoxyuridine nick-end labeling (TUNEL) staining. Positive labeling was identified by nuclear brownish color, regardless the intensity of the stain (**Fig. 3**). TUNEL-positive cells count

ranged considerably in all groups (**Fig. 4**), but the average percentage was significantly increased in the groups treated with 5-FU ($p<0.01$) and AEPG at the doses of 10 mg/Kg ($p<0.01$), 25 mg/Kg ($p<0.01$) and 50 mg/Kg ($p<0.001$). No significant difference was observed either between 5-FU and the three doses of AEPG or between the groups treated with the extracts.

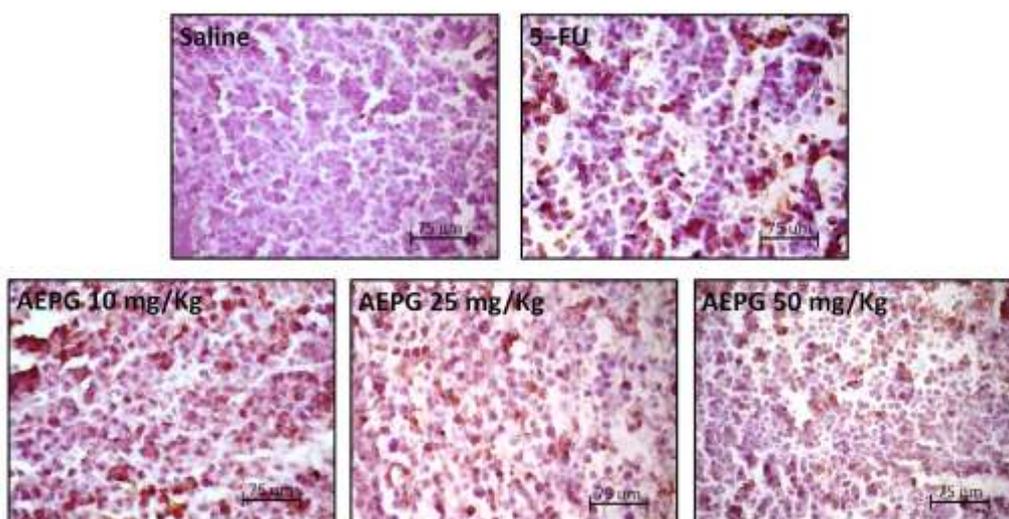


Figure 3. *In situ* apoptotic cell labeling by terminal desoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) method in paraffin-embedded histological sections of Sarcoma 180 treated with Saline, 5-Fluorouracil (5-FU) and 10, 25 e 50 mg/Kg aqueous extract of *Punica granatum* Linn (AEPG10, AEPG25 e AEPG50 mg/Kg, respectively). TUNEL–positive apoptotic tumor cells are shown with brown-stained nuclei. Note the scarce labeling in Saline–treated group but intense in 5-FU and AEPG–treated groups (original magnification 800 x).

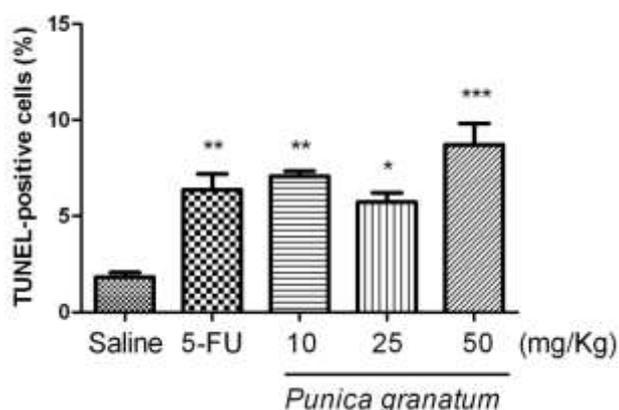


Figure 4. Assessment of the average percentage of TUNEL-positive cells. Data were expressed as mean \pm standard error mean (SEM). Statistically significant difference between the values were expressed as * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$) and *** ($p<0.001$) in comparison to saline-treated group (ANOVA and Tukey test).

3.3 Analysis of the adverse effects of the AEPG

No behavioral changes were observed in the animals treated either with AEPG or 5-FU, as well as no remarkable changes were observed on the intake of food and water of the animals, regardless the treatment. Fig. 5a shows the body weight of the animals at the beginning and end of the experiment. No significant changes were observed in body weights at the beginning of the experiment ($p>0.05$), but at the 8th days, the body weight of the mice treated with 5-FU was significantly lower than the other groups ($p<0.05$). Furthermore, as demonstrated in **Fig. 5b**, the average percentage of weight loss (in relation to the initial body weight) was significantly greater in the group treated with 5-FU than in the others ($p<0.05$).

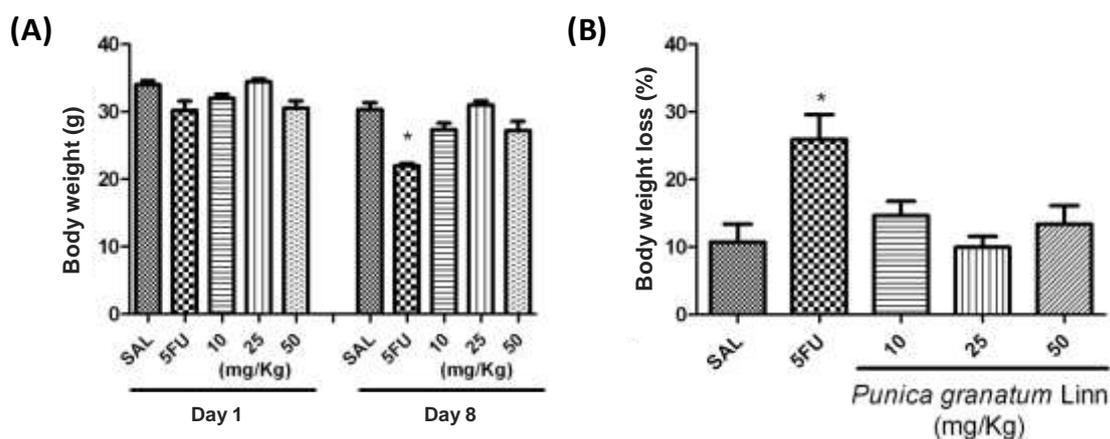


Figure 5. (A) Assessment of the body weight and **(B)** body weight loss ratio of the animals of the different groups at the 1st and 8th days of experiment. Data were expressed as mean \pm standard error mean (SEM). * Statistically significant difference ($p<0.05$) in comparison to Saline-treated group (ANOVA and Tukey test).

Table 2 presents the results of the biochemical parameters. Serum levels of aspartate aminotransferase (ALT) we significantly increased in the group treated with 50 mg/Kg AEPG in comparison to the saline-treated group ($p<0.001$). Creatinine levels were significantly decreased in the AEPG-treated groups at doses 25 mg/Kg ($p<0.001$) and 50 mg/Kg ($p<0.01$), as well as in 5-FU-treated group ($p<0.05$), again in comparison

to the group treated with saline. Despite the significant difference found in this data, the values were within the normal interval established by experimental research support database of the Tiradentes University Biotherium.

Table 2. Effect of the aqueous extract of *Punica granatum* Linn (AEPG) on the biochemical parameters of mice subjected to S180 sarcoma cells transplantation.

Drug	Dose (mg/kg/day)	ALT (U/l)	AST (U/l)	Urea (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
Saline	-	37.2 ± 2.1	217.4 ± 13.4	46.5 ± 3.0	0.41 ± 0.03
	10	42.8 ± 2.2	228.5 ± 10.3	54.4 ± 4.4	0.36 ± 0.05
AEPG	25	43.7 ± 4.3	219.7 ± 11.8	37.9 ± 3.4	0.12 ± 0.02***
	50	56.8 ± 6.4*	276.2 ± 31.7	43.0 ± 3.3	0.23 ± 0.07**
5-FU	25	30.5 ± 5.3	201.0 ± 9.3	34.3 ± 4.2	0.32 ± 0.01*
Reference Values#	-	17.0 – 77.0	54.0 – 298.0	42.0 – 61.0	0.10 – 0.90

Data were expressed as mean ± standard error mean (SEM). Statistically significant difference between the values were expressed as *(p<0.05), ** (p<0.01) and *** (p<0.001) in comparison to saline-treated group (ANOVA and Tukey test). # Values obtained from the experimental research support database of the Tiradentes University Biotherium.

The analysis of the hematological parameters revealed no significant changes in the erythrogram data (Table 3, p>0.05). However, as demonstrated in Table 4, treatment with 5-Fu induced significant decrease in the total leukocyte count (p<0.01) and relative neutrophils count (p<0.001). In addition, a relative increase in the differential count of eosinophils was observed (p<0.001). Oppositely, the administration of AEPG induced increased of neutrophils count at the three doses of 10 mg/Kg (p<0.05), 25 mg/Kg (P<0.001) and 50 mg/Kg (p<0.05), without causing expressive leukocytosis.

Table 3. Effect of the aqueous extract of *Punica granatum* Linn (AEPG) on the erythrocyte parameters in peripheral blood of mice subjected to S180 sarcoma cells transplantation.

Drug	Dose (mg/kg/day)	Red blood cell (x 10 ⁶)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)
Saline	-	9.08 ± 0.18	12.99 ± 0.32	40.58 ± 0.68
	10	9.78 ± 0.15	14.24 ± 0.23	44.03 ± 0.63
PG	25	8.57 ± 0.66	12.74 ± 0.95	39.46 ± 2.91
	50	9.25 ± 0.25	12.94 ± 0.41	40.42 ± 1.09
5-FU	25	8.30 ± 0.56	11.19 ± 0.81	34.80 ± 2.55
Reference Values#	-	6.36 – 9.82	10.2 – 16.6	39 – 49

Data were expressed as mean ± standard error mean (SEM). No statistically significant difference between the groups was observed (ANOVA and Tukey test). # Values

obtained from the experimental research support database of the Tiradentes University Biotherium.

Table 4 - Effect of the aqueous extract of *Punica granatum* Linn (AEPG) on the total leukocytes in peripheral blood of mice subjected to S180 sarcoma cells transplantation.

Drug	Dose (mg/kg)	Total leukocytes (10 ³ cells/mL)	Differential count of leukocytes (%)			
			Neutrophil	Lymphocyte	Monocyte	Eosinophil
Saline	-	7.8 ± 0.6	25.7 ± 2.0	63.2 ± 4.8	2.3 ± 0.4	3.3 ± 0.7
	10	9.6 ± 0.9	37.9 ± 3.1*	56.1 ± 3.2	2.6 ± 0.4	3.3 ± 0.8
AEPG	25	9.9 ± 1.0	38.2 ± 5.8***	55.8 ± 3.6	4.3 ± 0.8*	2.8 ± 0.4
	50	8.1 ± 0.7	32.4 ± 2.4*	59.1 ± 3.3	2.8 ± 0.4	5.8 ± 1.4
5-FU	25	2.1 ± 0.3***	8.8 ± 1.4**	70.4 ± 4.8	2.4 ± 0.5	9.9 ± 1.6***
Reference Values [#]		6 – 15	10 – 40	55 – 95	1 – 4	0 – 4

Data were expressed as mean ± standard error mean (SEM). Statistically significant difference between the values were expressed as *(p<0.05), ** (p<0.01) and *** (p<0.001) in comparison to saline-treated group (ANOVA and Tukey test). # Values obtained from the experimental research support database of the Tiradentes University Biotherium.

Pathological examination of the organs removed on a gross basis revealed that livers and spleens of the 5-FU-treated group showed an opaque surface tissue in comparison to the other groups, but no difference was grossly detected between the experimental groups regarding the shape and consistence. Furthermore, significant reduction of the spleens average weight in relation to the saline group was observed in the 5-FU treated animals (p<0.05), but not in the AEPG groups (p>0.05) (Table 5). Histological analysis revealed that architectural and cellular appearance of the organ tissues were comparatively unremarkable in all groups (**Fig. 6**), except for the spleen samples from 5-FU-treated groups, which displayed atrophy of the white pulp (**Fig. 7**).

Table 5. Effect of the aqueous extract of *Punica granatum* Linn (AEPG) on the average weight of the organs removed from mice subjected to S180 sarcoma cells transplantation.

Drug	Dose (mg/kg)	Organs (g/100 g body weight)		
		Liver	Kidney	Spleen
Saline	-	4.86 ± 0.18	1.22 ± 0.04	0.43 ± 0.05
	10	4.25 ± 0.18	1.22 ± 0.03	0.39 ± 0.06
AEPG	25	5.01 ± 0.28	1.39 ± 0.08	0.49 ± 0.08
	50	4.62 ± 0.42	1.38 ± 0.04	0.43 ± 0.03

5-FU	25	4.45 ± 0.55	1.36 ± 0.04	0.30 ± 0.04**
------	----	-------------	-------------	---------------

Data were expressed as mean ± standard error mean (SEM). Statistically significant difference between the values were expressed as ** (p<0.01) in comparison to saline-treated group (ANOVA and Tukey test).

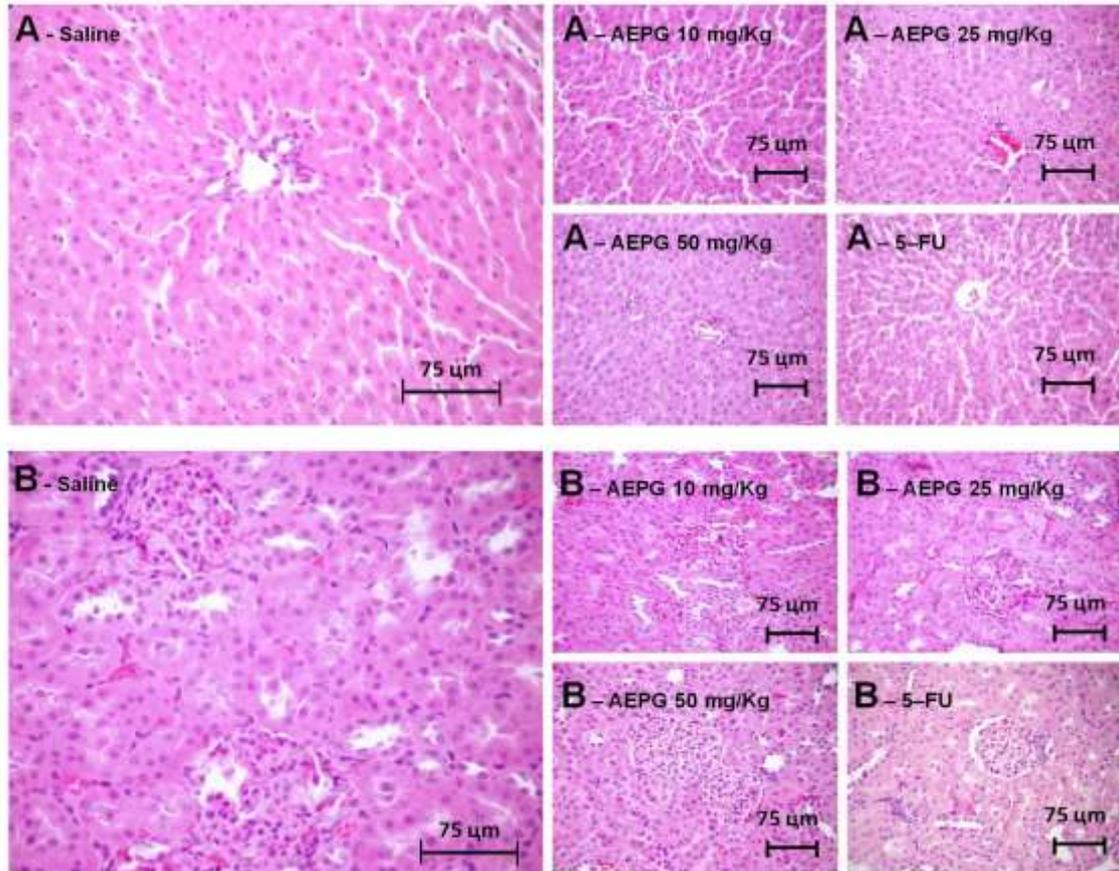


Figure 6. Photomicrographs of (A) liver and (B) kidneys samples showing comparatively unremarkable architectural and cellular appearance of the organ tissues in all groups (HE, 400 x magnification).

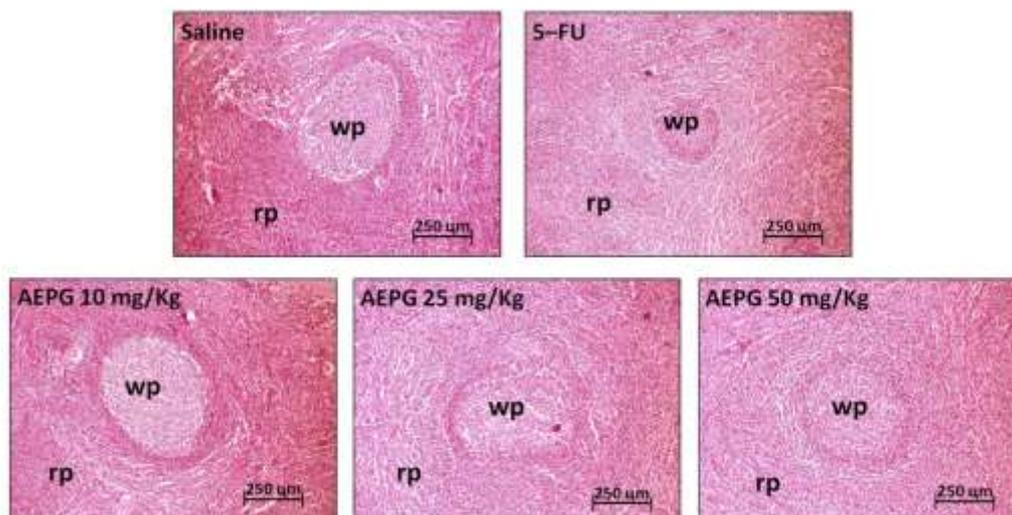


Figure 7. Photomicrographs of spleen samples. White pulp (wp) presents signs of atrophy in 5-FU-treated group, but remains with the usual architectural and morphological appearance in the other groups. Red pulp (rp) was unremarkable and similar in all the groups (HE, 100 x magnification).

4 Discussion

Natural products play a relevant role in cancer therapy with substantial numbers of anticancer agents (Nobili *et al.*, 2009). Furthermore, because cancer treatments have become more aggressive during the last 20 years, the need for new methods to manage adverse and/or side effects of such therapy has become apparent (Redd *et al.*, 2011).

In this study, the treatment with aqueous extract of *Punica granatum* at doses of 10, 25 and 50 mg/Kg significantly inhibited the growth of sarcoma 180 in mice, but not in a dose-dependent scale. These data suggest an antitumor activity of the extract, comparatively to the effects promoted by 5-Fluorouracil, a chemotherapeutic widely used in experimental models (Mousinho *et al.*, 2011). Therefore, our study provides information that AEPG may be promising in anticancer therapy, which appears consistent with previous *in vitro* research (Sineh Sepehr *et al.*, 2012; Jayakumar *et al.*, 2012). It is possible that such antitumor effects are related to the chemical compounds present in the extract. It has been demonstrated that phytochemical constituents found in *Punica granatum* Linn present cytotoxic effects on tumor cell lines, particularly tannic compounds, such as ellagic acid (Zhao *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014) and gallic acid

(Liang *et al.*, 2012; Locatelli *et al.*, 2013). As recently reported by Qu *et al.* (2012), we also found high content of these tannic compounds in the aqueous extract of *Punica granatum* (AEPG) using HPLC-MS method, suggesting that ellagic and gallic acids may play an important role in the inhibition of the murine sarcoma 180 growth.

Since tissue homeostasis is the result of a balance between proliferation and cell death, the apoptosis rate displays a key role in tumor formation and progression (Evan and Vousden, 2001; Fulda, 2009). Apoptosis is the process of highly controlled programmed cell death triggered by intrinsic biochemical signaling pathways. The mechanisms of apoptosis involves an energy-dependent cascade of molecular events that includes activation of cysteine proteases as ICE (IL-1 β converting enzyme); Fas signaling; cell cycle interfaces; stress responses; Bcl-2 family; and the tumor suppressor gene p53. This process leads to the cleavage of caspase-3 and results in DNA fragmentation, degradation of cytoskeletal and nuclear proteins, cross-linking of proteins, formation of apoptotic bodies, expression of ligands for phagocytic cell receptors and finally uptake by phagocytic cells with no secondary inflammation (Elmore, 2007). Thus, to explore the antitumor pathway of AEPG on S180 tumor in our study, apoptosis was detected by *in situ* end-labeling of nuclear DNA fragments (TUNEL) staining. We found that the treatment with AEPG increased significantly the number of TUNEL-positive cells in comparison with Saline. The increased number of TUNEL-positive cells observed in AEPG-treated groups was statistically comparable to that resulting from 5-FU treatment. It is strongly suggestive that the antitumor effects promoted by the extract are related to increased apoptosis-induced tumor cell death. It is possible that the major tannic compounds present in the extract, such as ellagic and gallic acid, are involved in the proapoptotic effects of AEPG. It has been demonstrated that ellagic acid is able to stimulate apoptosis in poorly differentiated MIAPaCa-2 and moderately differentiated PANC-1 human pancreatic carcinoma cell lines, as a response of inhibition of the transcription factor NF- κ B. The decrease in NF- κ B leads to activation of the mitochondrial proapoptotic pathway, resulting in cytochrome C release

and caspase activation (Edderkaoui *et al.* 2008). In addition, gallic acid has shown to induce apoptosis of HL-60 Human promyelocytic leukemia cells (Yeh *et al.*, 2011) and A375.S2 human melanoma cells (Lo *et al.*, 2010) through caspases dependent and independent pathways. However, further investigations are necessary in order to clarify the precise mechanisms underlying the pro-apoptotic effect of AEPG on tumor cells.

One the most important challenge regarding to the chemotherapy against cancer is the minimization of the adverse/side effects of the drugs. As previously demonstrated by Gonzaga *et al.* (2009), the treatment with 5-FU promoted a variety of undesirable adverse effects, such as body weight loss, severe myelosuppression and spleen atrophy. Herein, we demonstrated that no remarkable changes were observed in the total leukocyte count of the AEPG-treated groups, indicating no suppressive effects on the peripheral blood white cells. In fact, AEPG induced the increase of neutrophils, suggesting that the extract might exert a possible stimulatory role on the bone marrow. In addition, although significant differences were observed in biochemical parameters of liver and renal function in the AEPG-treated groups, all the serum values remained within the physiological reference range, suggesting that those changes might be considered as irrelevant. The fact that the weight, gross appearance and histological features of the organs were unremarkable and comparable to the Saline group seems to support the hypothesis that the biochemical changes were not severe enough to express real functional damages. Thus, as these hematological, biochemical and gross/histological parameters have been used to assess the toxicity of *Punica granatum* fruit extracts (Vidal *et al.*, 2003), our data seem to point at the safety use of AEPG in the studied doses.

In conclusion, we demonstrated that intraperitoneal administration of AEPG inhibits the growth of transplanted sarcoma 180 cells in murine model, and that the antitumor effects are likely related to increased apoptosis ratios. In addition, the use of the extracts proved to be safe, with no adverse/side effects associated to the use of chemotherapeutics.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

We would like to thank the Research and Technology Innovation Support Foundation of Srgipe, Brazil (FAPITEC/SE) and the Brazilian Coordination for Improvement of Higher Education Staff (CAPES) for the financial support.

References

- Abdollahzadeh, S., Mashouf, R. Y., Mortazavi, H., Moghaddam, M. H., Roozbahani, N., Vahedi., M., 2011. Antibacterial and Antifungal Activities of Punica Granatum Peel Extracts Against Oral Pathogens. *J Dent (Tehran)*, 8(1): 1–6.
- Bishayee, A., Bhatia, D., Thoppil, R. J., Darvesh, A. S., Nevo, E., Lansky, E. P., 2011. Pomegranate-mediated chemoprevention of experimental hepatocarcinogenesis involves Nrf2-regulated antioxidant mechanisms. *Carcinogenesis*. 2011 Jun;32(6):888-96. doi: 10.1093/carcin/bgr045.
- Chen, C.,Zheng, W., Gao, X., Sun, X. X. D., Wei, J., Chu, C., 2007. Aqueous Extract of *Inonotus bliquus* (Fr.) Pilat (Hymenochaetaceae) Significantly Inhibits the Growth of Sarcoma 180 by Inducing Apoptosis. *Am J Pharm Toxicol*, 2(1):10-17. doi:10.3844/ajptsp.2007.10.17.
- Chen, S., Li, G., Zhu, K., Sun, P., Wang, R., Zhao, X., 2014. Antitumor activities of Juemingzi (*Cassia tora* L.) on Balb/c sarcoma 180-injected mice. *Oncol*, 7(1):250-254.

- Dai, J. And Mumper, R., 2010. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 21;15(10):7313-52. doi: 10.3390/molecules15107313.
- Dilkmen, M., Ozturk, N., Ozturk, Y., 2011. The Antioxidant Potency of *Punica granatum* L. Fruit Peel Reduces Cell Proliferation and Induces Apoptosis on Breast Cancer. *J Med Food*, 14(12):1638-46. doi: 10.1089/jmf.2011.0062.
- Edderkaoui, M., Odinkova, I., Ohno, I., Gukovsky, I., Liang, V., Go, W., Stephen, J., P., Gukovskaya, A. S., 2008. Ellagic acid induces apoptosis through inhibition of nuclear factor kB in pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol*, 14(23):3672-80.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4):495-516.
- Evan, G. I. and Vousden, K. H., 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 17;411(6835):342-8.
- Gil, M. I., Tomas-Barberan, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., Kader, A. A., 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing, *J Agric Food Chem*, 48(10):4581-9.
- Gonzaga, M. L. C., Bezerra, D. P., Alves, A. P. N. N., De Alencar, M. N. M., Mesquita, R. O. Lima, M. W., Soares, S. A., Pessoa, C., Moraes, M. O., Costa-Lotufo, L. V., 2009. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by an (1 4)-glucan– b-(1 6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill. *J Nat Med*, 63(1):32-40. doi: 10.1007/s11418-008-0286-4.
- Jayakumar, S., Haridass, S., Krishnamurthy, V., 2012. Anticancer Activity Of *Punica Granatum* Rind Extracts Against Human Lung Cancer Cell Line. *Asian J Pharm Clin Res*, 5(Suppl 2):204-210.
- Lansky, E. P., Harrison, G., Froom, P., Jiang, W. G., 2005. Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of

human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel. *Invest New Drugs*. 2005 Mar;23(2):121-2.

Lee, Y. S., Yang, H. O., Shin, K. H., Choi, H. S., Jung, S. H., Kim, Y. M., Oh, D. K., Linhardt, R. J., Kim, Y. S., 2003. Suppression of tumor growth by a new glycosaminoglycan isolated from the African giant snail *Achatina fulica*. *Eur J Pharmacol*, 28;465(1-2):191-8..

Liang, C. Z., Zhang, X., Li, H., Tao, Y. Q., Tao, L. J., Yang, Z. R., Zhou, X. P., Shi, Z. L., Tao, H. M., 2012. Gallic acid induces the apoptosis of human osteosarcoma cells in vitro and in vivo via the regulation of mitogen-activated protein kinase pathways. *Cancer Biother Radiopharm*, 27(10):701-10. doi: 10.1089/cbr.2012.1245.

Lo, C., Lai, T.Y., Yang, J.H., Yang, J.S., Ma, Y.S., Weng, S.W., Chen, Y.Y., Lin, J.G., Chung, J.G., 2010. Gallic acid induces apoptosis in A375.S2 human melanoma cells through caspase-dependent and -independent pathways. *Int J Oncol*, 37(2):377-85.

Locatelli, C., Filippin-Monteiro, F. B., Creczynski-Pasa, T. B., 2013. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. *Eur J Med Chem*, 60:233-9. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.10.056.

Motaal, A. A. And Shaker, S., 2011. Anticancer and Antioxidant Activities of Standardized Whole Fruit, Pulp, and Peel Extracts of Egyptian Pomegranate. *The Open Conf Proceed, J*, 2: 41-45.

Mousinho, K. C., Oliveira, C. C., Ferreira, J. R. O., Carvalho, A., Magalhães, H. I. F., Bezerra, D. P., Alves, A. P. N. N., Costa-Lotufo, L. V., Pessoa, C., de Matos, M. P. V., Ramos, M. R., Moraes, M. O., 2011. Antitumor effect of laticifer proteins of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel – Apocynaceae. *J Ethnopharmacol*, 1;137(1):421-6. doi: 10.1016/j.jep.2011.04.073.

- Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., Capaccioli, S., 2009. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res*, 59(6):365-78. doi: 10.1016/j.phrs.2009.01.017.
- Qu, W., Breksa III, P., Pan, Z., Ma, H., 2012. Quantitative determination of polyphenols constituent in pomegranate products. *Food Chem.*, 132(3): 1585-1591. doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.106
- Redd, W. H., Montgomery, G. H., Katherine, N., DuHamel., 2001. Behavioral Intervention for Cancer Treatment Side Effects. *JNCI J Natl Cancer Inst* 93 (11): 810-823. doi: 10.1093/jnci/93.11.810.
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Henning, S. M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M. G., Heber, D., 2005. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem*, 16(6):360-7.
- Sineh Sepehr, K., Baradaran, B., Mazandarani, M., Khori, V., Shahneh, F. Z., 2012. Studies on the Cytotoxic Activities of *Punica granatum* L. var. spinosa (Apple Punice) Extract on Prostate Cell Line by Induction of Apoptosis. *ISRN Pharm*, 2012:547942. doi: 10.5402/2012/547942.
- Vidal, A., Fallarero, A., Peña, B. R., Medina, M. E, Gra, B., Rivera, F., Gutierrez, Y., Vuorela, P. M., 2003. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *J Ethnopharmacol*, 89(2-3):295-300.
- Woodside, K. J., Spies, M., Wu, X. W., Song, J., Quadeer, S. S., Daller, J. A., Wolf, S. E., 2003. Decreased lymphocyte apoptosis by anti-tumor necrosis factor antibody in Peyer's patches after severe burn. *Shock*. 20(1):70-3.
- Yeh, R. D., Chen, J. C., Lai, T. Y., Yang, J. S., Yu, C. S., Chiang, J. H., Lu, C. C., Yang, S. T., Yu, C. C., Chang, S. J., Lin, H. Y., Chung, J. G., 2011. Gallic

acid induces G₀/G₁ phase arrest and apoptosis in human leukemia HL-60 cells through inhibiting cyclin D and E, and activating mitochondria-dependent pathway. *Anticancer Res*, 31(9):2821-32..

Zhang, H., Guo, Z. J., Xu, W. M., You, X. J., Han, L., Han, Y. X., Dai, L. J., 2013. Antitumor effect and mechanism of an ellagic acid derivative on the HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line. *Oncol Lett*, 7(2):525-530.

Zhao, M., Tang, S. N., Marsh, J. L., Shankar, S., Srivastava, R. K., 2013. Ellagic acid inhibits human pancreatic cancer growth in Balb c nude mice. *Cancer Lett*, 337(2):210-7. doi: 10.1016/j.canlet.2013.05.009.

7.2 PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEUA\UNIT)

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Avaliação da atividade antitumoral do extrato aquoso de *Punica granatum* Linn frente a carcinogênese com Sarcoma 180 em modelo murino

Pesquisador Responsável

Data da Versão 19/10/2013

Cadastro 021113

Data do Parecer 28/11/2013

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

Objetivos do Projeto

Avaliar a atividade antitumoral do extrato aquoso de *Punica granatum* Linn frente a carcinogênese induzida com Sarcoma 180 em modelo murino.

Objetivos específicos

- Caracterização do extrato da *Punica granatum* Linn;
- Avaliar o efeito do extrato aquoso de *Punica granatum* L. sobre o crescimento tumoral dos animais experimentais transplantados com o tumor Sarcoma 180;
- Avaliar o efeito do extrato sobre os parâmetros hematológicos (leucócitos totais e diferenciais);
- Avaliar o efeito do extrato sobre os parâmetros bioquímicos (marcadores de função hepática e renal);
- Avaliação macroscópica quanto as dimensões do tumor induzido pela implantação do Sarcoma 180, bem como do fígado, rins e baço;
- Avaliação citopatológica das estruturas renais e hepáticas post mortem dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180;

Sumário do Projeto

A *Punica granatum* L. (Punicaceae), conhecida como romã, é um fruto bastante utilizado na medicina popular para o tratamento de várias afecções. Tem sido demonstrado que o extrato da *P. granatum* apresenta efeito inibitório sobre o crescimento de diferentes linhagens celulares tumorais. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a atividade terapêutica a partir da administração intraperitoneal do extrato aquoso de *Punica granatum* frente a carcinogênese com Sarcoma 180 em modelo murino. Para o desenvolvimento deste projeto, serão utilizados 60 camundongos *Mus musculus* (30-35 g), do gênero masculino, divididos em 5 grupos (n=10). Os testes para avaliação da atividade antitumoral serão realizados utilizando o tumor experimental Sarcoma 180 oriundo do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) da Universidade Federal do Ceará. Nesse experimento, os animais serão inoculados com tumor Sarcoma 180 (2 x 10⁶ células/0,5 mL/camundongos) por via subcutânea (BEZERRA et al., 2006; BEZERRA et al., 2008a; BEZERRA et al., 2008b; ZHENG et al., 2010; CHEN et al., 2010). Serão escolhidas 3 doses do extrato, a depender da IC50, a fim de observar qual delas apresentar a melhor atividade antitumoral, sendo utilizadas as doses de 10, 25 e 50mg/Kg do extrato aquoso da casca de *Punica granatum*. Para avaliar o efeito das substâncias sobre o crescimento tumoral, um dia após a inoculação do tumor será iniciado o tratamento (por via intraperitoneal ou oral) por 7 dias consecutivos. No oitavo dia, os animais serão anestesiados para a coleta da amostra sanguínea para a realização dos exames hematológicos e bioquímicos, sendo em seguida sacrificados por meio de câmara de fluxo contínuo com CO₂ para excisão dos tumores, bem como os órgãos de interesse, como fígado, rins e baço, sendo estes pesados e analisados macroscopicamente e histomorfologicamente, em que o material será fixado, processado e incluído em parafina, gerando seções histológicas de 5µm que serão submetidas à coloração de rotina pela HE e examinadas ao microscópio de luz. Os resultados serão expressos como média ± E.P.M. Para comparações múltiplas dos dados será utilizado o teste de Kaplan-Meier ou a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Student Newman-Keuls utilizando o programa Prisma (GraphPad Software, Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

UNIVERSIDADE TRADENTES/UNIT
Prof. *Marta Alice Nordein*
Coordenadora
Comitê de Ética no Uso Animal

Página 1-3

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessária
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de identificação

Introdução	Adequada
------------	----------

Comentários sobre a introdução

Objetivos	Adequados
-----------	-----------

Comentários sobre os objetivos

Pacientes e Métodos	Comentário
Delineamento	Total 50 Local unit
Tamanho de amostra	Não calculado
Cálculo do tamanho da amostra	Não
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não se aplica
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Ausentes
Crterios de inclusão e exclusão	Não se aplica
Relação risco-benefício	Não utiliza
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não se aplica
Monitoramento da segurança e dados	Adequada - quantitativa
Avaliação dos dados	Não se aplica
Privacidade e confidencialidade	Não se aplica
Termo de Consentimento	Sim
Adequação as Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

As doses serão administradas por via oral ou intraperitoneal? Isso já deve ser definido. Na primeira deve-se descrever a forma: gavagem, que envolveria a manipulação direta do animal ou por administração na água para consumo, descrever tudo no item 13. O anestésico (tiopental) utilizado para coleta de sangue, é aplicado também por via intravenosa, ele não causará alteração nas amostras de sangue? O tiopental pode levar a sedação ou excitação, o mais indicado é utilizar, cetamina (anestésico) e acepromazina (sedativo), por via intra muscular. Colocar as referências do resumo no item 9. Modelo animal, o mesmo, não informa o delineamento experimental, quantos animais serão utilizados por dose e no resumo diz que serão utilizados 5 grupos com n= 10, dessa forma serão necessários 50 animais e não 50 como informa na tabela do item 9.2. Se utilizar 10 animais por dose e 5 a 10 animais como controle, poderá ser utilizado até 40 animais. Em relação ao método de eutanásia, o projeto possui recurso para compra do gás, uma vez que a mesma está sem utilização por falta de gás?

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	03/03/14
Data de término prevista	20/04/14
Orçamento	Ausente
Fonte de financiamento externa	Não

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Referências Bibliográficas	Ausentes
----------------------------	----------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Reencaminhar aos autores

UNIVERSIDADE TRADENTES - UNIT
 Prof. Maria Júlia Moricelli
 Coord. de Ética no Uso Animal
 Coordenadora

Página 2-3

Comentários Gerais sobre o Projeto

O projeto deve ser reencaminhado aos autores para adequação da metodologia e para a reavaliação do quantitativo de animais utilizados nos experimentos. No item 13 do formulário acrescentar a metodologia de administração do medicamento e os procedimentos de eutanásia.

UNIVERSIDADE TRADENTES - UNIF
Prof.ª *Maria Júlia Nardini*
Coordenadora
Comitê de Ética no Uso Animal

