

UNIVERSIDADE TIRADENTES
CURSO DE ODONTOLOGIA

**EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Punica granatum* Linn
SOBRE DISPLASIAS EPITELIAIS DÉRMICAS EM MODELO
MURINO**

DANILO NASCIMENTO BARAUNA DA COSTA

Aracaju/SE
Junho/2014

UNIVERSIDADE TIRADENTES
CURSO DE ODONTOLOGIA

**EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Punica granatum* Linn
SOBRE DISPLASIAS EPITELIAISDÉRMICAS EM MODELO
MURINO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do Curso de
Odontologia da Universidade Tiradentes
como parte dos requisitos para obtenção do
grau de bacharel em odontologia.

MARIA DE FÁTIMA BATISTA DE MELO
Orientadora

Aracaju/SE
Junho/2014

DANILO NASCIMENTO BARAUNA DA COSTA

EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Punica granatum* Linn SOBRE
DISPLASIAS EPITELIAIS DÉRMICAS EM MODELO MURINO

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado à
Coordenação do Curso de
Odontologia da Universidade
Tiradentes como parte dos
requisitos para obtenção do
grau de bacharel em
odontologia.

APROVADA EM ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

MARIA DE FÁTIMA BATISTA DE MELO
ORIENTADORA/PRESIDENTE DA BANCA

1º EXAMINADOR

2º EXAMINADOR

ATESTADO

Eu, Maria de Fátima Batista de Melo, orientadora do discente Danilo Nascimento Barauna da Costa, atesto que o trabalho intitulado: “Efeito do extrato aquoso de *Punica granatum* Linn sobre displasias epiteliais dérmicas em modelo murino” está em condições de ser entregue à Supervisão de Estágio e TCC, tendo sido realizado conforme as atribuições designadas por mim e, de acordo com os preceitos estabelecidos no Manual para a Realização do Trabalho de Conclusão do Curso de Odontologia.

Atesto e subscrevo,

Maria de Fátima Batista de Melo

“Chamamos de Ética o conjunto de coisas que as pessoas fazem quando todos estão olhando. O conjunto de coisas que as pessoas fazem quando ninguém está olhando chamamos de caráter”

Oscar Wilde

Efeito do extrato aquoso de *Punica granatum* Linn sobre displasias epiteliais dérmicas em modelo murino

Danilo Nascimento Barauna da Costa ¹, Maria de Fátima Batista de Melo ², Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior ², Talita Santos Bastos ³.

¹ Graduando em Odontologia – Universidade Tiradentes; ² Professor Titular do Curso de Odontologia – Universidade Tiradentes; ³ Mestre em Saúde e Ambiente - Universidade Tiradentes.

Resumo

Tem sido demonstrado que o extrato da *Punica granatum* apresenta efeito inibitório sobre o crescimento de diferentes linhagens celulares tumorais. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da administração oral de extrato aquoso de *Punica granatum* (EAPG) sobre carcinogênese dérmica em modelo murino. Para tanto, foi induzida a carcinogênese química no dorso de camundongos utilizando 4NQO, que foram tratados com EAPG nas doses de 10 e 25 mg/Kg. O grupo controle positivo (TUM) foi tratado com veículo inerte e no controle negativo (CTR1 e CTR2), a indução foi realizada apenas com o solvente. Após 14 semanas os animais foram eutanasiados e a área do dorso foi examinada histologicamente. Foram observadas lesões displásicas de intensidade variável, classificadas entre leve e moderada. A administração do EAPG reduziu significativamente a intensidade dos escores médios das alterações citomorfológicas epitelial ($p < 0,05$), independente da dose utilizada, mas não houve diferença quanto à análise de alterações arquiteturais ($p > 0,05$). Concluiu-se que a administração oral do EAPG foi capaz de inibir parcialmente o desenvolvimento de alterações displásicas induzidas pelo 4NQO sobre o epitélio escamoso dérmico em modelo murino.

Palavras chaves: Quimioprevenção; *Punica granatum*; Carcinogênese; Carcinoma epidermóide.

Abstract

It has been reported that *Punica granatum* Linn extract exerts inhibitory effect on growth of different tumor cell lines. Thus, the goal of this paper was to assess the effect of oral administration of aqueous extract of *Punica granatum* (EAPG) on skin carcinogenesis in mice. Therefore, chemical carcinogenesis was induced in mice backs using 4NQO, which were treated with EAPG in doses of 10 and 25 mg/Kg. The positive control group (TUM) was treated with inert vehicles, whereas in the negative control (CTR1 and CTR2), the induction was carried out with the solvent. After 14 weeks, the animals were euthanized and the back area was histologically examined. Dysplastic lesions of variable intensity, classified between mild and moderate dysplasias, were found. EAPG administration reduced significantly the mean scores of epithelial cytomorphological changes ($p < 0,05$), irrespective of the dose used, but no difference in the analysis of architectural changes were observed ($p > 0,05$). We concluded that the oral administration of EAPG was capable of partially inhibiting the growth of dysplastic changes induced by 4NQO in the dermal squamous epithelium in mice.

Keywords: Chemoprevention; Pomegranate; Carcinogenesis; Squamous cell carcinoma.

1. Introdução

Os tumores originam-se de um crescimento clonal de células mutagênicas (ROBBINS et al, 2005). Segundo o Instituto Nacional do Câncer-INCA (Brasil, 2011), o conceito do câncer está associado a um conjunto de patologias que apresentam em comum o crescimento descontrolado e desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo alastrar-se para outras regiões corporais, além do sofrimento físico e emocional que as neoplasias causam, a problemática do câncer torna-se ainda mais complexa, visto que o câncer não se configura numa doença, mas variados distúrbios diretamente associados a crescimentos desregulados e profundos, a carcinogênese.

A incidência de câncer é a maior causa de mortalidade em todo o mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), há um total de 58 milhões de mortes em todo o mundo relatado em 2005, onde as mortes relacionadas ao câncer somam 7.6 milhões (ou 13%) do total das mortes (LAMARI E CORDOPATIS, 2008). As variáveis mais comuns são fatores como, idade, etnia, fatores geográficos e condições genéticas. Nos últimos anos, o câncer de pele tem sido considerado um dos mais prevalentes, em âmbito mundial.

No Brasil sua incidência tem aumentado significativamente nos últimos anos e, isso se deve a vários fatores, alguns ainda não conhecidos e outros decorrentes de hábitos com a exposição solar, (BONERANDI et al, 2011). Em 2006, na Europa houve uma estimativa de 3.2 milhões de casos diagnosticados (excluindo o câncer de pele não melanoma) e 1.7 milhões de mortes por câncer (FERLAY et al.,2007).Desde o século XIX, extratos de ervas contendo aditivos com produtos naturais são a principal fonte de medicamentos (LAMARI E CORDOPATIS, 2008), com isso, considera-se que as plantas e os microrganismos tem sido a maior fonte de produtos naturais utilizados em pesquisas (BALUNAS E KINGHORN, 2005).

Atualmente, diversas plantas estão sendo analisadas na medicina preventiva, devido a isso algumas pesquisas estão sendo realizadas para que sejam disponibilizados á população. A pesquisa de drogas contra o câncer tem sido focada nas células cancerosas com quimiopreventivos eficientes e seletivos. A *P.granatum* Linn (romãzeira) é uma planta originária da região do Oriente Médio (DEGASPARI,2011). Devido suas características geográficas de adaptação, o nordeste brasileiro apresenta alto potencial de cultivo dessa espécie, condicionando em uma aquisição satisfatória de produção (DEGASPARI, 2011) e todas as suas partes possuem compostos químicos (fenólicos, quercetina, ácidos fenólicos e taninos) bastante estudados para comprovações medicinais. Seu fruto (romã) possui composição majoritária de elagitaninos e ácidos hidroxibenzóicos (punicalina, punicalaginas e ácidos gálico e elágico) que atuam nas mais diversas atividades biológicas (NASCIMENTO, 2013; GILL et al, 2012; SARKER et al, 2012). Hora et al. (2003) avaliaram os efeitos profiláticos do óleo de semente da romã a 5% na carcinogênese cutânea estimulados em ratas, em que gerou uma diminuição na incidência de tumor significativa. Os resultados apresentaram um elevado potencial do óleo como um agente quimiopreventivo satisfatório contra o câncer de pele.

De acordo com pesquisas nota-se que o óleo derivado da semente da romã e uma fração do extrato purificado do suco do fruto bloquearam 75 a 90% formação da lesão na ação de agentes carcinogênicos (MEHTA, LANSKY, 2004). Estudos têm mostrado que o aumento da ingestão de frutos vegetais parecem está associado à redução do risco de câncer, desencadeando assim pesquisas na identificação e caracterização das propriedades biológicas de produtos naturais, principalmente no campo da quimioprevenção (REDDY, et al., 2003).

Os fatores determinantes da atividade antitumoral da *Punica granatum* ainda são pouco conhecidos, mas tem sido postulado que esta ação biológica

poderia está relacionado ao elevado poder antioxidante desta planta (MONEIM et al 2012). Baseado nesses dados, pesquisas utilizando *Punica granatum*, têm sido de interesse mundial, embora ainda escassas no Brasil nas diversas áreas, incluindo a Oncologia. Baseado em evidências científicas e, colaboração nas políticas públicas de saúde, essa pesquisa teve propósito de avaliar o efeito do extrato aquoso de *Punica granatum* Linn sobre displasias epiteliais dérmicas em modelo murino.

2. Material e métodos

Obtenção do extrato aquoso de *Punica granatum*

Frutos de *Punica granatum* Linn foram coletados em setembro de 2011, no Projeto Irrigado Senador Nilo Coelho, N4, zona rural do município de Petrolina/Pernambuco/Brasil. A escolha da amostra foi padronizada de acordo com a semelhança de peso (300g), o amadurecimento (totalmente maduros) e coleta (mesmo plantio e mesma safra). A exsicata foi depositada no ASE-Herbário da Universidade federal de Sergipe (Voucher 20881). Os frutos foram lavados em água corrente e despulpados. As cascas foram desidratadas em estufa e trituradas. Para a extração, o método empregado foi o de maceração dinâmica durante um período de 2 horas em uma temperatura de 100°C, sob agitação magnética constante. Foram utilizados 10 g do pó em 1000 mL do solvente extrator (água), posteriormente o homogeneizado foi submetido ao procedimento de filtração em papel filtro obtendo-se assim o filtrado. O extrato filtrado foi então colocado em placas de petri e armazenado em estufa de circulação a 60°C por um período de 24 horas, sendo assim o solvente foi evaporado obtendo-se assim o extrato seco de *Punica granatum* como produto final dessa extração, que foi pesado e armazenado em recipiente, sob refrigeração até o uso. Baseado no método de extração utilizado por RAJPUT (2011).

Ensaio Biológico

Um total de 45 camundongos *Mus musculus*, machos e fêmeas, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes, com massa corporal aproximadamente 30±5g e divididos em dois grupos com 10 animais cada PG e os grupos CTR e TUM foram divididos em grupos de 5 camundongos cada conforme demonstrado no quadro 1.

Quadro 1. Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o tratamento preconizado.

| Grupos | Produto aplicado da carcinogênese | Tratamento |
|--------|-----------------------------------|---|
| CTR 1 | Propilenoglicol | Água |
| CTR 2 | Propilenoglicol | Extrato aquoso de <i>P. granatum</i> a 25mg/kg |
| TUM | 4 NQO | Água |
| PG 10 | 4 NQO | Extrato aquoso de <i>P. granatum</i> de 10mg/kg |
| PG 25 | 4 NQO | Extrato aquoso de <i>P. granatum</i> de 25mg/kg |

Acondicionamento dos animais

Os animais foram mantidos em gaiolas com cama de maravalha, trocadas diariamente, mantidos à temperatura controlada de 22°C, em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12h e água ad libitum e dieta padrão Labina® (Purina, São Paulo, Brasil). Após atingir o peso de 30± 5g, os animais foram submetidos aos procedimentos de indução de carcinogênese química experimental e posterior comparação quimiopreventiva com a utilização do extrato aquoso de *Punica granatum* em diferentes concentrações (10 e 25mg) no Biotério da UNIT/SE. Durante todo o período experimental, foram semanalmente registradas as características clínicas.

Procedimento de indução de carcinogênese química

O protocolo de preparação e tratamento com 4NQO seguiu os critérios estabelecidos por Tang et al. (2004). A indução de carcinogênese cutânea foi realizada através de aplicações de 100µL de solução de 4-nitroquinolina-1-óxido (4 NQO), este sendo obtido através da diluição de 0,1g de 4NQO em 100ml de propilenoglicol, em seguida a aplicação tópica de 100µg/ml foi efetuada com a utilização de uma micropipeta, diretamente sobre a pele da região dorsal após tricotomia, três vezes por semana, durante um período de 14 semanas.

Análise macroscópica das lesões 4NQO - induzidas

As lesões elaboradas na pele do dorso dos camundongos foram classificadas de acordo com a sua demonstração clínica podendo ser elas ulcerativas ou papilíferas, coloração (leucoplásica, eritoplásica ou leuco-eritoplásica) e índice de sangramento (espontaneamente sangrantes ou não sangrantes). Além disso, durante todo período experimental, foi determinado e registrado o volume tumoral de cada animal, no período de indução e de quimioprevenção.

Procedimentos de processamento laboratorial e análise dos espécimes necropsiados.

Decorridas as quatorze semanas a partir do início dos procedimentos de quimioprevenção os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ (fluxo contínuo de 100% de CO₂ por 50 min.(Insight, Ribeirão Preto, SP), para que a área induzida /tratada do dorso dos camundongos fosse submetida à remoção post-mortem. Os espécimes teciduais foram removidos e fixados em formol tamponado (10%, pH 7,4) por 24 horas, desidratados em soluções crescentes de álcool etílico e diafanizados em xilol, para posterior inclusão em parafina. Obtidos secções histológicas de 5µm de espessura, sendo submetida à coloração de rotina pela Hematoxilina/Eosina. Feito análise morfológica das lesões e utilizados

cortes de 5 µm de espessura, corados por hematoxilina e eosina e examinados ao microscópio de luz (Microscópio Óptico Olympus CX31). Os tumores foram categorizados de acordo com sua classificação histológica em três tipos: Lesões intra-epiteliais não invasivas (carcinoma in situ), Carcinoma Verrucoso (não-invasivo ou micro-invasivo) e Carcinoma Epidermóide invasivo. Os tumores diagnosticados como Carcinoma Epidermóide foram analisados histologicamente de acordo com os critérios preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

Análise histomorfológica dos espécimes

As lesões foram classificadas conforme os sistemas de gradação histológica propostos pela Organização Mundial da Saúde (BARNES et al., 2005), e pelo método proposto por Kujan et al.,(2006), denominado de Sistema Binário. Foram avaliadas as seguintes alterações arquiteturais e citológicas: 1) Arquiteturais: estratificação epitelial irregular; perda da polaridade das células da camada basal; projeções epiteliais em forma de gota; aumento do número de figuras de mitose; presença de figuras de mitose anormais na metade superior do epitélio (mitoses altas); queratinização prematura em células isoladas e pérolas de queratina em projeções epiteliais; 2) Citológicas: variação anormal de tamanho do núcleo; pleomorfismo nuclear; variação anormal de tamanho da célula; pleomorfismo celular; proporção núcleo/citoplasma aumentada; aumento no tamanho do núcleo; figuras de mitoses anormais; número e tamanho de nucléolos aumentados; hiper cromatismo nuclear. De acordo com a OMS (BARNES et al., 2005), as alterações foram classificadas em: displasia leve, quando as alterações supracitadas restringem-se ao terço inferior do epitélio (camadas basais e parabasais); displasia moderada, quando tais alterações atingem o terço médio do epitélio (porção média da camada espinhosa) e displasia grave, quando as alterações arquiteturais e citológicas ultrapassam o terço médio do epitélio.

Conforme o Sistema Binário (KUJAN et al., 2006), as alterações epiteliais categorizadas em: 1) lesões de alto risco: presença de 4 ou mais alterações arquiteturais e/ou 5 ou mais alterações citológicas, e 2) lesões de baixo risco: presença de menos de 4 alterações arquiteturais e menos de 5 alterações citológicas.

Análise Estatística

O cálculo das médias das alterações foi obtido a partir da análise das características de atipia epitelial e foram comparados entre os grupos por meio de análise de variância (ANOVA), seguido por pelo teste post-hoc de Tukey. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando o valor de p fosse menor que 0,05.

3. Resultados

Análise macroscópica dos espécimes

As principais alterações macroscópicas evidenciadas no dorso dos animais estiveram representadas por espessamento da epiderme, sinais clínicos de hiperqueratose descamativa e formação de irregularidades discretamente rugosas na superfície cutânea. Em alguns animais, foram verificadas áreas de projeções papilífera, exofítica baixas e rombadas, bem como focos de placas leucoplásicas irregulares e de dimensões variadas. No entanto, estas alterações se distribuíram uniformemente entre os três grupos experimentais, incluindo o grupo controle.

Análise histopatológica dos espécimes

No grupo controle, foi possível observar que as alterações epiteliais foram limitadas a discretas e focais áreas de acantose além de hiperqueratose. Adicionalmente, discreta infiltração inflamatória mononuclear e focos de hiperemia foram evidenciados na derme papilar (Fig. 1a). Não foram identificadas alterações consistentes com atipia celular em nenhum dos animais deste grupo. Nos grupos TUM (Figura 1b) e grupos tratados com EAPG nas doses de 10 e 25 mg/Kg (PG10 e PG25, respectivamente) (Figura 1c e 1d), foram

observadas alterações citomorfológicas e arquiteturais do epitélio pavimentoso estratificado epidérmico compatíveis com displasia epitelial. As principais alterações citomorfológicas estiveram representadas por pleomorfismo celular, hiperchromatismo nuclear e aumento do número de figuras mitóticas. As alterações arquiteturais, por sua vez, se expressaram como perda parcial da estratificação, formação de papilas epiteliais estranguladas (papilas “em gota”) e hiperplasia basilar. Na derme papilar, também foi observada discreta a moderada infiltração inflamatória mononuclear e hiperemia de vasos capilares.

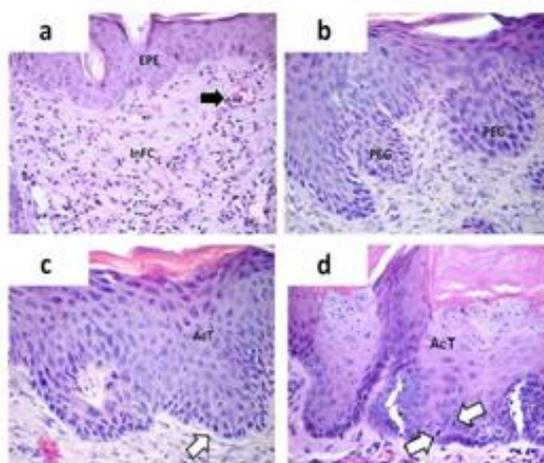


Figura 1. (a). Secções histológicas coradas em HE da derme dorsal dos animais experimentais. (CTR) grupo controle exibindo discreto espessamento (acantose) do epitélio pavimentoso estratificado epidérmico (EPE), sem atipia citomorfológica, bem como infiltrado inflamatório crônico (InFC) e hiperemia capilar (seta escura) no tecido conjuntivo da derme papilar (b) Secções histológicas coradas em HE da derme dorsal dos animais experimentais. (TUM) grupo submetido a carcinogênese química sem tratamento exibindo sinais citomorfológicos e morfoarquiteturais de atipia. Note a variação no tamanho e forma de queratinócitos (pleomorfismo celular) e a formação de papilas estranguladas em “gota” (PGL). (c) e (d) Secções histológicas coradas em HE da derme dorsal dos animais experimentais. PG10 e PG25, respectivamente, grupo submetido a carcinogênese química tratado com EAPG exibindo sinais citomorfológicos e morfoarquiteturais de atipia. Note a variação no tamanho e forma de queratinócitos (pleomorfismo celular), a considerável acantose

(AcT) e a presença de hiperplasia basilar (seta clara) (HE, 400 x).

Análise da gradação histológica das displasias epiteliais de acordo com o Sistema Binário

Não foram observadas alterações arquiteturais ou citológicas consistentes com atipia nos grupos CTR1 e CTR2. Além disso, não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos TUM ($2,09 \pm 0,68$), PG10 ($2,45 \pm 0,67$) e PG25 ($2,04 \pm 0,78$) com relação aos escores médios de alterações morfológicas arquiteturais. (Fig. 2a). Contudo, foi evidenciada uma redução significativa das alterações citológicas nos grupos PG10 ($0,12 \pm 0,06$) e PG25 ($0,02 \pm 0,02$) ($P < 0,001$) quando comparados ao grupo TUM ($0,81 \pm 0,22$) (Fig. 2b). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos tratados com a administração oral do EAPG.

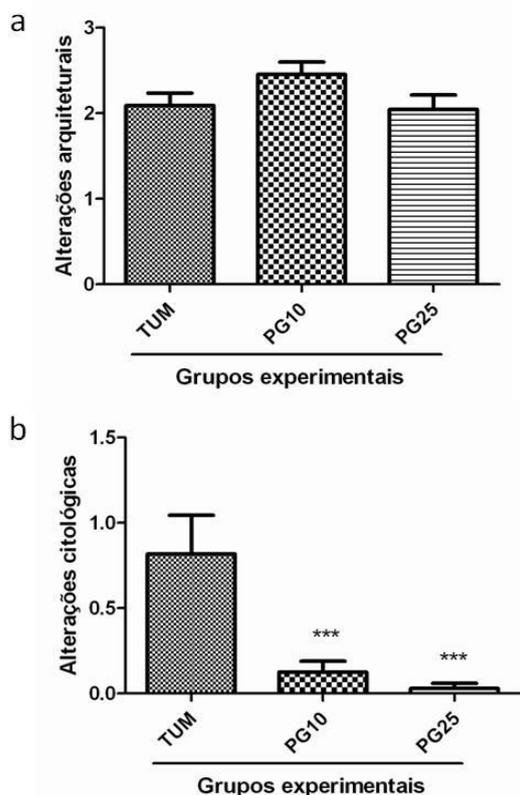


Figura 2. (a) Escores médios das alterações morfológicas arquiteturais e (b) citológicas nos grupos experimentais submetidos a

carcinogênese dérmica lenta tratado com veículo inerte (TUM) e com administração oral de extrato aquoso de *Punica granatum* Linn. nas doses de 10 e 25 mg/Kg (PG10 e PG25, respectivamente). *** Representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo TUM ($p < 0,001$).

4. Discussão

A ausência de alterações clínicas compatíveis com formações tumorais nos animais submetidos aos procedimentos de carcinogênese química sugere que as alterações histomorfológicas, que porventura se fizessem presentes estavam em fase subclínica. Este dado tem fundamental importância, posto que estudos utilizando o modelo experimental empregado neste trabalho podem, por vezes parecer frustrantes em razão da falta de lesões macroscopicamente visíveis, e, assim, os achados histológicos serem desprezados precoce e equivocadamente. Também é importante destacar que, neste trabalho, as poucas alterações macroscópicas evidenciadas foram identificadas tanto nos animais do grupo CTR quanto naqueles do grupo TUM e PGL, sugerindo que estas estariam mais relacionadas a traumatismos provocados pelo contato agressivo entre os próprios animais do que a alterações clínicas induzidas pelo agente carcinogênico. Tem sido relatado que o carcinógeno 4NQO é uma quinolina com potente atividade carcinogênica, e, juntamente com o 1,12 dimetil benzentraceno (DMBA) representa um dos compostos químicos mais largamente utilizados para indução experimental de tumores epiteliais malignos derivados do epitélio escamoso, denominados carcinomas epidermóides, em modelo murino (RIVERA 2012). Estudos anteriores têm demonstrado que a carcinogênese efetuada com DMBA promoveu a

formação de tumores epidérmicos malignos de natureza invasiva em 100% dos espécimes submetidos aos procedimentos de indução química (PINHEIRO, 2012; Pereira-Filho, 2013). Comparando estes dados com aqueles obtidos neste estudo, onde apenas alterações displásicas leves foram evidenciadas, é possível sugerir que o carcinógeno 4NQO foi bem menos efetivo quanto a indução de iniciação e promoção da carcinogênese cutânea. Muitos estudos vêm comprovando a elevada eficiência do 4NQO em modelos de carcinogênese experimental oral (RIVERA, 2012; Faria, 2006; GAMA, 2010) mas pouco vem sendo publicado na literatura especializada acerca da atividade pró-cancerígena deste composto químico em modelos de carcinogênese dérmica. Assim, sugere-se que, apesar de relevante em modelos intraorais, o 4NQO demonstrou um padrão lento de indução de alterações epiteliais no modelo cutâneo testado neste experimento, o que limita sua utilização em pesquisas com câncer de pele não-melanoma. De acordo com o Sistema Binário (KUJAN *et al.*, 2006), a classificação das alterações epiteliais seguem o padrão que a presença de 4 ou mais alterações arquiteturais e/ou 5 ou mais alterações citológicas, trata-se de lesões de alto risco e a presença de menos de 4 alterações arquiteturais e menos de 5 alterações citológicas, se trata de lesões de baixo risco.

Nessa pesquisa foi demonstrado que o EAPG foi capaz de inibir parcialmente o processo displásico, minimizando as alterações citomorfológicas epiteliais em relação ao grupo não tratado (TUM). Estes dados sugerem uma possível ação quimiopreventiva do EAPG sobre estágios iniciais da carcinogênese química. De fato, a ação antitumoral de derivados da *Punica granatum* vem sendo relatada em estudos recentes,

como aqueles descritos por Chen *et al.* (2013) e Li, Zhang e Wang (2014), o que corrobora os dados obtidos no presente estudo.

Não obstante os achados obtidos no presente estudo serem sugestivos de uma ação antitumoral mediada pelo EAPG, os mecanismos fisiopatológicos responsáveis por tal efeito ainda não estão claros. Alguns estudos com produtos naturais tem associado a atividade antitumoral ou quimiopreventiva destes compostos a sua atividade antioxidante (KUMAR *et al.*, 2013; MONDAL *et al.*, 2013; PANDYA *et al.*, 2013). Suportando esta teoria, Nascimento (2013) avaliou o mesmo extrato utilizado no presente estudo, e obteve uma elevada atividade antioxidante, e atribui essa propriedade biológica a seus compostos tânicos majoritários (ácido gálico e ácido elágico), que possuem potente atividade antioxidante (CASTONGUAY *et al.*, 1990; KIM *et al.*, 2007). Também corroborando esta provável mecanismo de ação, estudos recentes reportados por Waly *et al.* (2012) demonstraram a atividade antitumoral da casca da *Punica granatum* em modelos de câncer colorretal, mediada por ação antioxidante.

Desta forma, considerando a relevância da incidência do câncer de pele, é possível sugerir que o EAPG poderia ser utilizado como agente antioxidante potencialmente preventivo do câncer de pele não-melanoma associados ao dano oxidativo, como os carcinomas epidermóides provocados por exposição solar excessiva. No entanto, estudos posteriores ainda são necessários a fim de investigar os mecanismos precisos associados a natureza dos resultados obtidos no presente trabalho.

5. Conclusão

No modelo experimental utilizado neste trabalho, e dentro das condições empregadas neste estudo, a administração oral crônica de extrato aquoso de *Punica granatum* Linn foi capaz de inibir parcialmente o desenvolvimento de alterações histopatológicas displásicas induzidas pelo 4NQO no epitélio escamoso (epiderme) de camundongos. Portanto, este extrato pode ser considerado promissor em estudos futuros para a identificação de compostos ativos naturais com potencial atividade quimiopreventiva contra o câncer de pele não melanoma.

Referências

1. AHMED E. ABDEL MONEIM, MOHAMED A. DKHIL, SALEH AL-QURASHY. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(20), pp. 5083-5088, 30 September, 2012. Academic Journals. **Studies on the effect of pomegranate (*Punicagranatum*) juice and peel on liver and kidney in adult male rats**
2. BALUNASA, M. J.; KINGHORN, A. D. **Drugdiscovery from medicinal plants**, V. 78, Issue 5. 22: 431-441, 2005.
3. BARNES L., EVESON J.W., REICHART P., SIDRANSKY D.: **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**. IARC Press: Lyon 2005 ISBN 92 832 2417 5.
4. BONERANDI, J. J.; BEAUVILLAIN, C.; CAQUANT, L.; CHASSAGNE, V.; CHAUSSADE, J. F.; CLAVERE, P.; DESOUCHES, C.; GARNIER, F.; GROLLEAU, J. L.; GROSSIN, M.; JOURDAIN, A.; LEMONNIER, J. Y.; MAILLARD, H.; ORTONNE, N.; RIO, E.; SIMON, E.; SEI, J. F.; GROB-MARTIN, J. J. L. **Guidelines for the diagnosis and treatment of cutaneous squamous cell carcinoma and precursor lesions**: *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol.25 (Suppl. 5), 1-51, 2011.
5. BRITO JL, Walker B, Jenner M, Dickens NJ, Brown NJ, Ross FM, Avramidou A, Irving JA, Gonzalez D, Davies FE, et al. **MMSET deregulation affects cell cycle progression and adhesion regulons in t(4;14) myeloma plasma cells**. *Haematologica*. 2011;94:78-86
6. CHEN B, LONGTINE MS, NELSON DM. Punicalagin, a polyphenol in pomegranate juice, downregulates p53 and attenuates hypoxia-induced apoptosis in cultured human placental syncytiotrophoblasts. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**. 2013 Nov 15;305(10):E1274-80.
7. CHRYSSANTHI DG, LAMARI FN, IATROU G, PYLARA A, KARAMANOS N.K., CORSOPATIS P. **Inhibition of breast cancer cell proliferation by style constituents of different *Crocus* species** *Anticancer. Rev.* 27, 357-62 (2008)
8. CURADO M, EDWARDS B, SHIN H, STORM H, FERLAY J, HEANUE M, ET AL., editors. **Cancer incidence in five continents**, vol. IX. Lyon, France: IARC, 2007.
9. DEGASPARI, H C **Propriedades fitoterápicas da romã (*Punica granatum* L.)**. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v.12, n.1, Jan. - Jun./2011 - ISSN 1518-5192
10. ELSOHLY, H. N.; CROOM, E. M.; KOPYCKI, W. J.; JOSHI, A. S.; MCCHESENEY, J.D.; **Phytochem. Anal.** 2007, 9, 124.
11. FARIA, P. R. **Carcinogênese induzido pelo 4NQO em língua de camundongo knockout para o gene da galectina-3**, 2006
12. GAMA, R, **Efeitos de quimioterapia dos ligantes PPAR- γ e dos ácidos graxos poliinsaturados omega-3 no processo de carcinogênese da via aerodigestiva superior induzida pelo**

- uso de 4-nitroquinolina-1-oxido em camundongos Swiss**, São Paulo, 2010
13. GILL, N. S.; DHAWAN, S.; JAIN, S.; ARORA, R.; BALI, M. Antioxidant and Anti Ulcerogenic Activity of Wild *Punicagranatum* Ethanolic Seed Extract. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 6, n. 7, p. 47, 2012.
 14. GRACIOUSROSS R, SELVASUBRAMANIAN S, JAYASUNDAR S. **Immunomodulatory activity of Punicagranatum in rabbits--a preliminary study.** *J Ethnopharmacol*. 2001 Nov;78(1):85-7.
 15. HORA, J.J. et al. Chemopreventive effects of pomegranate seed oil on skin tumor development in CD1 mice. **Journal of Medicinal Food**, v.6, n.3, p.157-61, 2003.
 16. JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 43, n. 1, p. 137-147, 2007.
 17. KUJAN, O.; OLIVER, R. J.; KHATTAB, A.; ROBERTS, S. A.; THAKKER, N.; SLOAN, P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncol**; v. 42, n.10, p. 987-93, 2006.
 18. KUMAR RB, KAR B, DOLAI N, KARMAKAR I, HALDAR S, BHATTACHARYA S, HALDAR PK. Antitumor activity and antioxidant role of *Streblus asper* bark against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *Journal Exp Ther Oncology* 2013;10(3):197-202.
 19. LI J, ZHANG F, WANG S. **A polysaccharide from pomegranate peels induces the apoptosis of human osteosarcoma cells via the mitochondrial apoptotic pathway.** *Tumour Biology*. v. 2. 2014 [Epub ahead of print]
 20. MEHTA, R.; LANSKY, E.P. **Breast cancer chemopreventive properties of pomegranate (*Punicagranatum*) fruit extracts in a mouse mammary organ culture.** *European Journal of Cancer Prevention*, v.13, n.4, p.345-8, 2004.
 21. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2011.
 22. MONDAL A, SINGHA T, MAITY TK, PAL D. Evaluation of Antitumor and Antioxidant Activity of *Melothria heterophylla* (Lour.) **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2013 Sep;75(5):515-22.
 23. NASCIMENTO, M F., CARDOSO, J.C., ALBUQUERQUE-JUNIOR, R.L.C . **Desenvolvimento, caracterização, e avaliação do potencial cicatrizante de membranas de gelatina contendo extrato aquoso de *punica granatum* Linn.** 2013.p 166 Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente). Universidade Tiradentes
 24. NEWMAN DJ, CRAGG GM. **Natural products as sources of new drugs over the last 25 years.** *J Nat Prod*. 2007 Mar;70(3):461-77. Epub 2007 Feb 20.
 25. PANDYA NB, TIGARI P, DUPADAHALLI K, KAMURTHY H, NADENDLA RR. Antitumor and antioxidant status of *Terminalia catappa* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2013 Sep-Oct;45(5):464-9.
 26. PEREIRA-FILHO, R. N., CARDOSO, J.C., ALBUQUERQUE-JUNIOR, R.L.C . **Efeito da administração oral de própolis verde sobre carcinogênese dérmica induzida por 9,10 dimetil 1,2 benzantraceno (DMBA).** 2013.p 436 Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente). Universidade Tiradentes.
 27. PINHEIRO, Antonio Luiz Barbosa et al. Does LLLT Stimulate Laryngeal

- Carcinoma Cells An in vitro study.** Braz Dent J, Ribeirão Preto, p. 109-112. 2012.
- de Plantas Mediciniais v.10, n.3, p.104-111, 2008.**
28. RAJPUT, R., SAGAR, V.S., ADIGA, S., RAMYASUDHA, **Effect of *Punicagranatum* peel extract on burn wound healing in albino wistar rats.** International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology. 2011 v.2, p.353-357.
 29. RIVERA, M. C. A. **4NQO carcinogenesis: a model of oral squamous cell carcinoma.** Int. J. Morphol., 30(1):309-314, 2012.
 30. SARKER, B; DEY, K; KHAN, R. A. **Effect of Incorporation of Polypropylene on the Physico-Mechanical and Thermo-Mechanical Properties of Gelatin Fiber Based Linear Low Density Polyethylene Bio-foamed Composite.** Journal of Thermoplastic Composite Materials. v. 24, n. 5, p. 679-694, 2011.
 31. STEELE, R. G., LONG, A., REDDY, K. A., LUHR, M., & PHIPPS, S. **Changes in maternal distress and child-rearing strategies across treatment for pediatric cancer.** *Journal of Pediatric Psychology*, (2003). 28, 447-452.
 32. TANG, X. H.; KNUDSEN, B.; BEMIS, D.; TICKOO, S.; GUDAS, L. J. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. **Clinical Cancer Reserarch**, Estados Unidos , v. 10, n. 1, p. 301-313, 2004.
 33. WALY MI, ALI A, GUIZANI N, AL-RAWAHI AS, FAROOQ SA, RAHMAN MS. Pomegranate (*Punica granatum*) peel extract efficacy as a dietary antioxidant against azoxymethane-induced colon cancer in rat. **Asian Pacific Organization for Cancer Prevention**. 2012;13(8):4051-5.
 34. WERKMAN, C.; GRANATO, D.C.; KERBAUY, W.D.; SAMPAIO, F.C.; BRANDÃO, A.A.H.; RODE, S.M. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum L.* (romã). **Revista Brasileira**