

Efeito carcinogênico e anticarcinogênico do extrato aquoso da folha da romã (*Punica Granatum*), por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster*

Carcinogenic and anti-carcinogenic effect and of pomegranate leaf aqueous extract (Punica Granatum), through the test for detection of clones of epithelial tumors (warts) in Drosophila melanogaster



Agne Valesca Soares Ribas

Graduanda do curso de Nutrição (UNIPAM). e-mail: agnevalesca_1208@hotmail.com

Nayane Moreira Machado

Professora orientadora (UNIPAM). e-mail: nayane@unipam.edu.br

RESUMO: A romã (*Punica granatum*) é originária da Ásia, e vários estudos vêm sendo realizados apontando cada vez mais seus benefícios, incluindo a elevada quantidade de antioxidantes presentes em diferentes partes da planta e seu possível efeito anticarcinogênico. Diante disto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito carcinogênico e/ou anticarcinogênico da folha de romã por meio do teste *warts* em *Drosophila melanogaster*. Os resultados obtidos evidenciaram que o extrato da folha de romã, apenas na concentração isolada de 50%, apresentou aumento significativo ($p > 0,05$) na frequência de tumores quando comparados ao controle negativo, apresentando um efeito carcinogênico. Entretanto, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando as concentrações do extrato aquoso da folha de romã (12,5%; 25% e 50%) foram associadas à doxorrubicina e comparadas ao controle positivo, apresentando efeito anticarcinogênico. Sendo assim, conclui-se que concentrações elevadas da folha de romã apresenta um potencial carcinogênico, entretanto, quando esta é associada à doxorrubicina, apresentou efeito anticarcinogênico, reduzindo a frequência de tumores epiteliais induzidos pela DXR.

PALAVRAS-CHAVE: Folha de romã; *Drosophila melanogaster*; Carcinogênese.

ABSTRACT: The pomegranate (*Punica granatum*) originates from Asia, and several studies have been carried out aiming more and more at its benefits, including the high amount of antioxidants present in different parts of the plant and its possible anti-carcinogenic effect. In view of this, the objective of the present study was to evaluate the carcinogenic and / or anti-carcinogenic effect of pomegranate leaf by means of the warts test in *Drosophila melanogaster*. The results showed that the pomegranate leaf extract, only at the isolated concentration of 50%, presented a significant increase ($p > 0.05$) in tumor frequency when compared to the negative control, presenting a carcinogenic effect. However, there was a statistically significant difference ($p < 0.05$) when pome-

granate leaf aqueous extract concentrations (12.5%, 25% and 50%) were associated with doxorubicin and compared to the positive control, presenting anti-carcinogenic effect. Therefore, it is concluded that high concentrations of pomegranate leaf present a carcinogenic potential; however, when associated with doxorubicin, it presented anti-carcinogenic effect, reducing the frequency of epithelial tumors induced by DXR.

KEYWORDS: Pomegranate leaf; *Drosophila melanogaster*; Carcinogenesis.

1. INTRODUÇÃO

O DNA sofre alterações denominadas mutações, que podem ser causadas por erros durante a sua duplicação, na divisão celular. O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e a diversidade das espécies. Muitas mutações não implicam mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo, passando despercebidas. Outras mutações podem determinar a morte celular e também não são detectáveis. Porém, um pequeno número de mutações pode determinar vantagens e um crescimento desordenado de células (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

Os agentes mutagênicos são os responsáveis por alterar a sequência de bases de DNA, podendo acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações, que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias. Ao passar por várias divisões, uma célula poderá acumular mutações que, se em número elevado, poderão determinar a perda do controle da divisão, determinando o aparecimento do câncer (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

O câncer é definido como um conjunto de distúrbios que compartilham a característica comum de crescimento celular descontrolado, e resulta do surgimento de um clone de células livres de programação e de desenvolvimento, que são capazes de uma proliferação inadequada e desordenada (JORDE; CAREY; BAMSHAD, 2010). É considerado um problema de saúde pública, e devido a sua magnitude, atualmente, houve um grande aumento no número de pesquisas sobre medicina complementar e alternativa ao câncer, com o objetivo de analisar novas substâncias químicas na ação contra a doença (LEAL; SCHWARTSMANN; LUCAS, 2008).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que, no ano de 2030, estão previstos 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. No Brasil, as estimativas para o ano de 2016 e 2017 apontaram a ocorrência de aproximadamente 596.070 novos casos de câncer, anualmente, o que reforça a magnitude da doença no país e no mundo (Instituto Oncoguia, 2015).

Pesquisas mostram que algumas substâncias possuem fatores mutagênicos, que lesam as células, alterando o material genético, podendo induzir a carcinogênese. Já outras substâncias, dentre elas a *Punica granatum*, vêm sendo testadas com o intuito de avaliar suas respostas anticarcinogênicas ou carcinogênicas, para tentar desenvolver novas drogas e estratégias de combate à doença (LEME, 2015).

A *Punica granatum* é uma planta com propriedades fitoterápicas, conhecida popularmente como romãzeira, romeira e granado, sendo originária da Ásia e distribuída por todo Brasil. É um fruto consumido desde a antiguidade, devido a suas propriedades nutricionais, e sua composição inclui flavonoides, antocianinas, alcaloides, ácido ascórbico, ácidos graxos conjugados e o ácido ursólico (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Um grande número de pesquisas com *P. granatum* estão sendo realizadas, avaliando o potencial biológico das folhas e também do fruto. Porém, ainda não há um consenso sobre os seus reais efeitos sobre a carcinogênese. Estudos com camundongos envolvendo a *P. granatum* demonstraram que os extratos do fruto apresentaram relevante atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Através da pesquisa, foi possível observar a redução do número de células tumorais na cavidade peritoneal dos animais (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Diante disto, o objetivo do presente estudo foi analisar o potencial anticarcinogênico da romã (*Punica granatum*) contra a ação carcinogênica, induzida pela doxorrubicina, além de verificar se ela possui efeito carcinogênico. Ambas as avaliações foram feitas por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. CÂNCER

A população brasileira vem vivenciando mudanças significativas no seu perfil demográfico, como a queda da taxa de fecundidade e o aumento da expectativa de vida. Essa mudança trouxe consigo o aumento na incidência de doenças crônico-degenerativas, dentre elas o câncer (ROSAS *et al.*, 2013). Atualmente, o câncer é considerado um problema de saúde pública, sendo uma das maiores causas de morte no mundo. É uma doença genômica, que surge como consequência de alterações cumulativas no material genético de células normais, as quais sofrem transformações até se tornarem malignas (DANTAS *et al.*, 2009).

O câncer é uma doença caracterizada pela multiplicação e disseminação desordenada de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (Instituto Nacional do Câncer - INCA, 1996). Ele é um exemplo de doença genética somática, e embora alterações somáticas não sejam passadas para a geração seguinte, várias predisposições ao câncer são herdadas, como, por exemplo, genes anormais (GRIFFITHS *et al.*, 1998).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 1996), o câncer é uma doença que se forma através de um processo denominado carcinogênese. Na carcinogênese ocorrem mutações genéticas herdadas ou adquiridas pela ação de agentes ambientais, químicos, hormonais, radioativos e virais, denominados carcinógenos. Esse processo da formação do tumor passa por estágios que ocorrem lentamente, sendo eles a iniciação, a promoção e a progressão. A iniciação é um estágio caracterizado pela exposição das células aos carcinógenos, com consequente mutação e formação de clones celulares anormais. A

promoção se caracteriza pela multiplicação desses clones celulares, nos quais a supressão do contato com os carcinógenos pode interromper o processo. O último estágio da carcinogênese corresponde à progressão e à conversão maligna das células, e nesse processo, as células transformadas apresentam autonomia para proliferar e tornam-se invasivas (SILVA; SERAKIDES; CASSALES, 2004).

A carcinogênese resulta de várias etapas e pode envolver dezenas de genes, por meio de mutações gênicas, quebras e perdas cromossômicas, ampliações gênicas, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos. Os principais grupos de genes envolvidos nesse processo são os proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes relacionados ao reparo do DNA. A identificação dos genes envolvidos no câncer proporciona uma melhor compreensão acerca da doença, assim como contribui para novas formas de diagnosticá-lo mais precocemente, facilitando assim o seu tratamento (DANTAS *et al.*, 2009).

Normalmente, o ciclo de proliferação celular é severamente controlado, e as células constituem comunidades organizadas. No entanto, as células cancerosas não se enquadram nesse esquema de cooperação por serem células com o DNA danificado, escapando dos mecanismos de controle do ciclo celular (LOPES *et al.*, 2002).

2.2. *PUNICA GRANATUM*

A *Punica granatum linn* é uma espécie de arbusto ou árvore, que atinge de quatro a seis metros de altura. Ela apresenta folhas simples e flores isoladas, de corola vermelha alaranjada e cálices esverdeados, além de um fruto tipo baga, redondo, de casca coriácea, amarela ou avermelhada contendo inúmeras sementes envolvidas. Ela pertence à família *Punicaceae*, e é popularmente conhecida no Brasil como “romã” (MENEZES; PINTO; CORDEIRO, 2008).

A romã surgiu na Ásia, e vem sendo espalhada em toda a região do Mediterrâneo, sendo cultivada em quase todo o mundo, inclusive no Brasil (DEGASPARI; DUTRA, 2011). A *Punica granatum* cresce em regiões áridas e a produção do fruto se dá no período de setembro a fevereiro. Dentre os compostos físico-químicos presentes na parte comestível da fruta se encontram fenólicos como antocianinas (delfinidina, cianidina e pelargonidina), quercetina, ácidos fenólicos (cafeico, catequínico, clorogênico, orto e paracumárico, elágico, gálico e quínico) e taninos (punicalagina) (SANTOS *et al.*, 2008).

Devido ao crescente interesse pelas propriedades da romã, vários estudos vêm sendo realizados apontando cada vez mais seus benefícios, como o estudo de Jardini *et al.* (2010), que demonstrou que os compostos fenólicos da romã apresentam uma atividade antioxidante. Em células provenientes de epitélio sadio, a fração de ácidos fenólicos livres extraídos da polpa da romã apresentou aumento significativo, tanto na proliferação quanto na viabilidade das células MDCK (epitélio renal sadio), mostrando-se uma fonte de compostos bioativos com potencial antioxidante.

Mehta e Lansky (2004) mostraram os efeitos anticancerígenos obtidos de extratos de romã em células com câncer de mama humano *in vitro*, além da atividade quimiopreventiva de romã em uma cultura de órgão mamário de rato (MMOC).

Outros estudos podem ser citados, como uma pesquisa realizada em 2007, que demonstrou que, ao dividir a romã em vários compartimentos (sementes, suco, casca, folha, flor e raízes), cada porção da romã apresenta importantes atividades farmacológicas. O suco e as cascas, por exemplo, demonstraram propriedades antioxidantes potentes e possuem atividades anti-câncer, incluindo a interferência com a proliferação de células tumorais (LANSKY; NEWMAN, 2007).

Assim, a romã tem sido um fruto alvo de várias pesquisas, além de ser comumente utilizado para fins fitoterápicos, com a finalidade de cura de várias patologias, como doenças inflamatórias (bronquite, inflamações urinárias e epiteliais), úlceras de boca e genitália, atenuação de fatores aterogênicos e tratamento do *diabetes mellitus*, demonstrando diversos efeitos benéficos (WERKMAN *et al.*, 2008).

2.3. DOXORRUBICINA (DXR)

O cloridrato de doxorubicina é um composto antineoplásico derivado das antraciclina e isolado a partir da bactéria *Streptomyces peucetius varcaesius* (NEUWALD, 2009). As antraciclina possuem um anel tetracíclico fixado a um açúcar incomum, além de componentes quinona e hidroquinona em anéis adjacentes (CANDIDO, 2013). Esse composto vem sendo utilizado desde a década de 1960 e representa uma das classes mais utilizadas de antineoplásicos (NEUWALD, 2009).

A DXR vem sendo utilizada no tratamento de tumores sólidos, como o câncer de mama e de ovário, além do tratamento de leucemias, devido a seu amplo espectro de atividades. Sua ação tem efeito pelo fato de as antraciclina causarem um dano irreversível às células tumorais e por elas se intercalarem no DNA, inibindo a síntese de proteínas e produzindo espécies reativas de oxigênio, que causam a morte celular. Porém, apesar de ser uma substância eficaz no tratamento de câncer, pesquisas mostraram que a doxorubicina produz efeitos colaterais intensos, dentre eles a dilatação do coração (SILVEIRA, 2012; CANDIDO, 2013).

Várias pesquisas tentaram explicar a origem dos danos que a doxorubicina causa aos cardiomiócitos. Uma das hipóteses adquiridas através de pesquisas foi o estresse oxidativo. De acordo com os pesquisadores, as antraciclina geram radicais livres, que causam lesões na membrana e em outros componentes das células (SILVEIRA, 2012).

De acordo com Moura (2011), a cardiotoxicidade da doxorubicina é classificada em aguda, subaguda, crônica e tardia. A fase aguda ocorre durante ou imediatamente após a administração da droga, e envolve vasodilatação, hipotensão e arritmias. A fase subaguda é incomum e manifesta-se de um a três dias após o término da quimioterapia, envolvendo pericardite e/ou miocardite. A crônica se desenvolve semanas ou meses após o término do tratamento e manifesta cardiomiopatia dilatada, disfunção contrátil e insuficiência cardíaca congestiva. Por fim, a forma tardia pode ocorrer anos após o término do tratamento.

A DXR é um agente que atua tanto nas células em divisão quanto nas células na fase de repouso. No entanto, sua principal ação citotóxica é observada durante a fase S do ciclo celular. Sua ação farmacológica ocorre por diversos mecanismos. Um deles é sua intercalação com o DNA da célula, levando à inibição da síntese proteica e a reações de

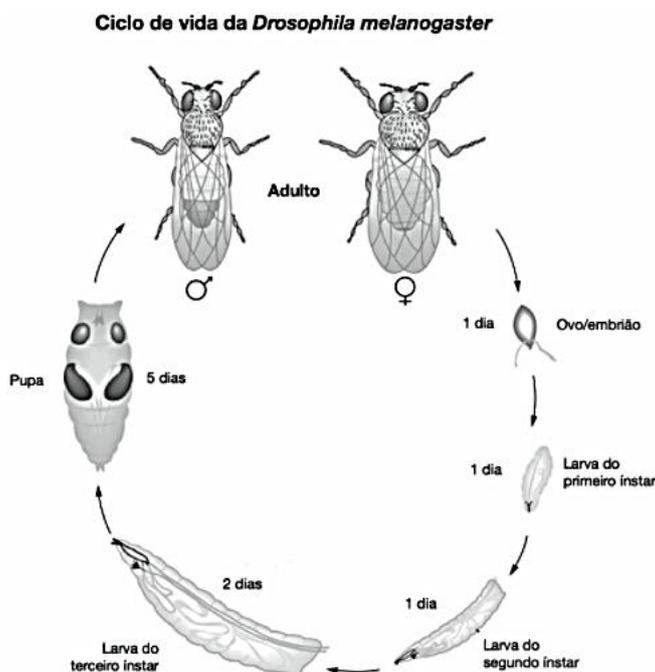
oxidação e redução, com formação de radicais livres. As quebras do DNA são causadas pela união da droga ao DNA e à enzima topoisomerase II, que tem um papel importante na liberação das cadeias de DNA e na condensação dos cromossomos. Logo, a doxorubicina, além de ação mutagênica, tem ação carcinogênica (NEUWALD, 2009).

2.4. TESTE PARA DETECÇÃO DE CLONES DE TUMORES EPITELIAIS (WARTS)
EM *DROSOPHILA MELANOGASTER*

A *Drosophila melanogaster*, popularmente conhecida como mosca da fruta, é um organismo da ordem díptera, que geralmente possui uma tonalidade acastanhada e anéis pretos transversais no seu abdômen. É um inseto pequeno, com cerca de 3 milímetros de comprimento, sendo que as fêmeas são maiores do que os machos (ANDRADE; BALCÃO, 2009). Possui $2n = 8$ cromossomos, sendo 3 pares de autossomos e 1 par sexual (FONSECA; PEREIRA, 2004).

A mosca da fruta tem sido um organismo largamente utilizado pelos pesquisadores, por apresentar vantagens como: ser de fácil manutenção em laboratório, possuir um ciclo reprodutivo curto (Figura 1), fornecer um grande número de indivíduos por progênie, apresentar reações metabólicas semelhantes às dos mamíferos, ser de fácil observação a lupa, ter genes homólogos a outros animais, inclusive invertebrados, características morfológicas facilmente detectáveis e desenvolvimento em meio de cultura de baixo custo. Além disso, apresenta um excelente banco de informações sobre mutações, ecologia e comportamento (FONSECA; PEREIRA, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2009; IBMC, INEB, 2008).

FIGURA 1. Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*



FONTE: Garcia e Fernández, 2011

D. melanogaster é um organismo modelo para a compreensão dos mecanismos moleculares de doenças humanas. Muitas propriedades biológicas, fisiológicas, neurológicas e básicas são conservadas entre mamíferos e *Drosophila melanogaster*. Acredita-se que cerca de 75% dos genes causadores de doenças humanas têm um homólogo funcional na mosca. O conceito de que características hereditárias são realizadas nos cromossomos foi desenvolvido através da mosca, assim como muitas outras descobertas consideradas como referência na genética. Na era moderna, a mosca foi o primeiro grande organismo complexo a ter seu genoma sequenciado. Poucos anos depois, as homologias observadas entre os dois genomas destacaram e reforçaram o seu papel como um modelo para entender os processos de biologia e doenças humanas (PANDEY; NICHOLS, 2011).

Além de possuir elevada sensibilidade para detectar a presença de substâncias tóxicas, a *Drosophila* tem sido usada por pesquisadores como indicadores de resíduos de agrotóxicos em alimentos e da presença, no ambiente, de substâncias químicas com potencial mutagênico (ALMEIDA; REYES, RATH, 2001).

Existem genes-mestres presentes na organização do corpo da *Drosophila* responsáveis por promover a organização de seus segmentos teciduais, com elementos característicos em cada segmento, capazes de estipular a função de cada tecido dentro do organismo da *Drosophila*. Essa mesma organização pode ser observada em muitos grupos de animais, inclusive nos mamíferos, possibilitando pesquisas sobre genes com funções parecidas nos demais animais pertencentes à classe *Bilateria*. Além disso, houve a descoberta de que não somente existem genes homólogos destes genes-mestres em quase todos os grupos de animais, mas que também a sua organização gênica foi mantida ao longo da evolução dos grupos (ROCHA *et al.*, 2013).

Estudos realizados por McGinnis *et al.* (1984) revelaram a descoberta de um grande número de genes homólogos na mosca, não apenas pela sua similaridade na sequência de nucleotídeos, mais também na sua função. Muitos desses genes, como, por exemplo, os genes *hox* são genes reguladores mestre que integram complexas redes gênicas. Nos últimos anos a identificação e caracterização de genes que regulam processos de desenvolvimento de organismos modelo, como a *Drosophila*, bem como a comparação desses genes com os seus homólogos presentes em outros organismos, têm contribuído muito para pensar sobre a interação e a dependência mútua entre o desenvolvimento de um organismo e a evolução de grupos de organismos.

O estudo de Nishiyama *et al.* (1999) identificou em *Drosophila melanogaster* um gene homólogo ao humano, o gene *warts* (*wts*). Ele atua como um supressor de tumor na mosca, sendo que a deleção desse gene leva à formação de verrugas nas pernas e no corpo da mosca, o que o torna um gene importante no controle de sua morfogênese e de sua proliferação celular.

A manutenção de genes supressores de tumor entre *Drosophila* e mamíferos durante a evolução mostra uma importante ferramenta na indução e desenvolvimento de tumores no disco imaginal das células da mosca, bem como no entendimento do desenvolvimento de cânceres em humanos. As células dos discos imaginais da *Drosophila* têm um ciclo celular semelhante ao de células de mamíferos, o que nos mostra que os fatores indutores de tumores nessas células podem estar diretamente relacionados com o risco

de estes mesmos fatores induzirem câncer em humanos. Um dos genes envolvidos na regulação do ciclo celular de *Drosophila* é o *wts*, que, conforme descoberta, é homólogo ao *LATS1*, um gene supressor de tumor presente em mamíferos (EEKEN *et al.*, 2002).

Nos zigotos, o marcador *wts* é uma mutação recessiva e letal em homozigose. E por apresentar capacidade letal, é mantido na linhagem estoque na presença do balancer cromossômico *TM3*. As larvas heterozigotas são adquiridas através do cruzamento entre as linhagens *wts/TM3* e *multiple wing hairs (mwh/mwh)*. A perda da heterozigose nas células do disco imaginal origina a formação de clones homozigotos, sendo estes viáveis em conjuntos de células isoladas da larva, que se manifesta como tumores (verrugas) na mosca adulta (SIDOROV *et al.*, 2001).

3. METODOLOGIA

3.1 COMPOSTOS UTILIZADOS

3.1.1 *PUNICA GRANATUM*

Para a realização do tratamento, foi realizada a produção do extrato aquoso da folha de romã (*Punica granatum*), utilizando-se 30g da folha de romã (*Punica granatum*) *in natura* e 100 ml de água de osmose reversa. A água foi aquecida até o ponto de fervura e, em seguida, foram adicionadas as folhas de romã. Posteriormente essa mistura passou por um processo de trituração com o auxílio de um liquidificador padrão de uso doméstico para fracionar as folhas e facilitar o processo de filtração, realizado com papel filtro de 40mm. No tratamento foram utilizadas três concentrações (12,5%, 25% e 50%) obtidas através da diluição do extrato aquoso em água de osmose reversa, sendo as concentrações baseadas em estudos prévios já desenvolvidos com a polpa da romã (*Punica granatum*) no Laboratório de Citogenética e Mutagenese do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM.

3.1.2. DOXORRUBICINA

O cloridrato de doxorubicina, fármaco comumente comercializado como Adriblastina®, foi utilizado como controle positivo no presente estudo. Cada frasco contém 10mg do composto sob forma de pó liofilizado, com peso molecular de 580,0 e fórmula química C₂₇H₂₉NO₁₁. A DXR foi pesada e diluída em água de osmose reversa, para utilização na concentração de 0,4 mM, valor empregado com base nas taxas de sobrevivência de teste de resposta.

3.2. TESTE PARA DETECÇÃO DE CLONES DE TUMORES EPITELIAIS EM *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Para a realização do teste *wts* (*warts*) foram utilizadas duas linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster* (*wts* e *mwh*) portadoras dos marcadores genéticos *warts* (*wts*, 3-100) e *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3). A linhagem *wts/TM3* foi adquirida pelo Bloomington *Drosophila* Stock Center, da Universidade de Indiana, USA, com o número de

registro: Bloomington/7052. Prontamente, o Dr. Ulrich Graf (Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Science, ETH Zurich, Schwerzenbach, Switzerland) cedeu a linhagem *mwh/mwh*.

Os estoques destas linhagens são cultivados no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM, onde são mantidas em frascos com meio de cultura de *D. melanogaster* (234g de banana, 16,5g de ágar, 1230ml de água, 37,5g de fermento biológico fresco, 1,5g de nipagin). As linhagens são mantidas em uma incubadora, sob condições ideais de temperatura e fotoperíodo que possibilitam sua conservação e manutenção.

3.2.1. CRUZAMENTO

A realização dos cruzamentos foi feita após a coleta de machos *mwh/mwh* e de fêmeas virgens *wts/TM3*. Os machos e as fêmeas foram colocados juntos em frascos contendo meio de cultura próprio para postura, composto por fermento biológico e açúcar, onde as fêmeas depositaram seus ovos.

As larvas descendentes desse cruzamento foram tratadas com os compostos químicos de interesse da presente pesquisa (doxorrubicina e extrato aquoso da folha de romã nas concentrações de 12,5%, 25% e 50%). Porém, foram analisadas somente as moscas que não apresentaram o balanceador cromossômico (*TM3, Sb1*), ou seja, somente as moscas de pelos longos e finos foram analisadas. As moscas que apresentaram pelos curtos e grossos foram descartadas, pelo fato de não terem o gene *wts*, o que impossibilita o desenvolvimento de tumor.

3.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 TRATAMENTO

Após 48±4 horas as larvas foram lavadas com água destilada e coletadas. Larvas de 2º estágio, descendentes do cruzamento entre machos *mwh/mwh* e fêmeas virgens *wts/TM3*, foram colocadas em frascos de vidro contendo 1,5g de purê de batata (meio alternativo para a *Drosophila*) em diferentes concentrações do extrato aquoso da *Punica granatum* (12,5%, 25% e 50%), associadas ou não a doxorrubicina. Para controle positivo foi utilizado a doxorrubicina, e para o controle negativo a água osmose reversa. Nesta etapa do tratamento as larvas de 2º estágio foram expostas aos agentes testados por um período de aproximadamente 48 horas, até ocorrer o estágio de pupa.

3.3.2. ANÁLISE DAS MOSCAS

Após sofrerem metamorfose, as moscas foram coletadas e transferidas para frascos contendo etanol (C₂H₆O) 70% para a conservação do corpo da mosca. Posteriormente, as mesmas foram colocadas individualmente numa placa escavada contendo glicerina e foram analisadas. Foram analisados somente machos e fêmeas que apresentaram genótipos (*wts +/+ mwh*), ou seja, indivíduos que apresentam fenotipicamente pelos normais,

caracterizados como pelos longos. As moscas com pelos curtos e grossos (*Stubble*) não foram analisadas e foram descartadas, pelo fato de não terem o gene *wts*, o que impossibilita o desenvolvimento de tumor.

Para a análise das moscas foram utilizadas lupas estereoscópicas, pinças entomológicas e pincéis. A localização de cada tumor foi observada e registrada em uma planilha padrão, que separa quantitativamente a incidência de tumores nas regiões do olho, cabeça, asa, corpo, perna, halteres e o total por mosca, em cada concentração testada.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças estatísticas entre as frequências de tumores das concentrações testadas e os controles foram calculadas utilizando o teste *U*, não paramétrico, de Mann-Whitney, empregando o nível de significância $< 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo utilizou o teste para a detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster* para avaliar o potencial carcinogênico e anticarcinogênico do extrato aquoso da folha da romã (*Punica granatum*) em três diferentes concentrações (12,5%; 25% e 50%) isoladas e associadas à DXR.

Ao analisar 200 indivíduos de cada concentração testada, foram obtidos os seguintes resultados: quando comparado ao controle negativo (água), a concentração isolada de 50% apresentou aumento significativo ($p < 0,05$), evidenciando um possível efeito carcinogênico nessa concentração. Já as concentrações associadas à doxorrubicina (DXR), quando comparadas ao controle positivo (DXR), apresentaram redução na frequência de tumores, sugerindo um possível efeito anticarcinogênico (Tabela 1).

Na tabela 1, são apresentadas as frequências de tumores observadas nos descendentes heterozigotos tratados com as diferentes concentrações testadas. Como já esperado o controle positivo DXR induziu um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de tumores quando comparado ao controle negativo, indicando que a DXR atua como agente indutor de tumor, o que é relatado por Mendanha *et al.* (2010).

Analisando os resultados dos indivíduos tratados com as diferentes concentrações isoladas do extrato aquoso da folha de romã (Tabela 1), é possível observar que apenas uma das concentrações utilizadas apresentou aumento significativo ($p > 0,05$) na frequência de tumores, quando comparadas ao controle negativo, indicando um possível efeito carcinogênico desta concentração (50%).

TABELA 1. Frequência de clones de tumor observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, tratada com diferentes concentrações do extrato aquoso da folha de romã, isoladas e associadas ao quimioterápico doxorubicina (DXR 0,4 mM).

Tratamentos		Número de moscas analisadas	Número de tumores analisados							Frequência (nº de tumores/mosca)
Extrato aquoso da folha de romã (%)	DXR (mM)		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter	Total	
0	0	200	0	1	11	6	16	0	34	0,17
12,5%	0	200	0	0	15	8	10	0	33	0,16
25%	0	200	0	0	14	5	12	0	31	0,15
50%	0	200	0	2	24	18	37	0	81	0,40*
0	0,4	200	0	51	133	229	271	4	688	3,44 *
12,5%	0,4	200	0	3	133	16	103	0	255	1,27 **
25%	0,4	200	0	0	13	16	82	0	111	0,55 **
50%	0,4	200	0	4	68	17	81	0	170	0,85 **

Diagnóstico estatístico de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância $p \leq 0,05$.

* Valor considerado diferente do controle negativo ($p < 0,05$). ** Valor considerado diferente do controle positivo (DXR 0,4mM) ($p < 0,05$). DXR, doxorubicina.

Segundo Dassprakash *et al.* (2012), as propriedades medicinais da romã se justificam devido à suas propriedades antioxidantes, encontradas em diferentes locais da planta, incluindo árvore e fruto, apresentando uma longa lista de constituintes químicos com fitoquímicos quimiopreventivos, como ácido ascórbico, ácido elágico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogênico, catequina, epicatequina, 3-galato de epigallocatequina, quercetina, rutina, apigenina, naringina, delphinidina, cianidina, pelargonidina, punicalina, punicalagina e melatonina, indicando que as propriedades medicinais da romã podem ser atribuídas aos efeitos combinados de muitos constituintes, sendo essas propriedades medicinais presentes em quase todas as partes da árvore e/ou fruto da *Punica granatum*.

Rummun *et al.* (2013) analisaram o teor de antioxidantes presentes em diferentes partes da *P. granatum* (casca, flor, caule, folhas e sementes), e observaram que esses antioxidantes presentes são potentes eliminadores de radicais hidroxila em virtude da sua capacidade de inibir a degradação da desoxirribose, componente estrutural do DNA. A casca de romã proporcionou a proteção mais alta contra esses radicais hidroxila, seguida por extratos de flor, caule, folha e semente. O extrato da folha de romã apresentou uma maior proteção contra os danos causados por radicais superóxidos, sendo considerado o segundo mais potente, ficando atrás apenas do extrato de caule, além de possuir uma ação dose-dependente.

Portanto, os antioxidantes presentes na folha da romã podem sugerir que a não ocorrência de efeito carcinogênico nas concentrações isoladas inferiores (12,5% e 25%), estão associadas à ação antioxidante deste, enquanto a carcinogenicidade detectada na concentração de 50% pode estar relacionada à atividade pró-oxidante do extrato em altas concentrações. Estudo de Rocha et al. (2015) demonstra que determinadas substâncias podem atuar como antioxidantes quando se encontram associadas à outras substâncias com as mesmas propriedades, ou como pró-oxidantes, em decorrência da concentração utilizada.

Ao avaliar os resultados encontrados na associação entre as diferentes concentrações do extrato aquoso de folha de romã e DXR (Tabela 1), é possível notar que as três concentrações do extrato tiveram um potencial modulador sobre a toxicidade da DXR. Tal efeito pode ser observado pela redução significativa na frequência de tumores ($p < 0,05$), indicando que o extrato aquoso da folha de romã apresenta efeito anticarcinogênico. Tais resultados se confirmam devido a uma possível relação com suas propriedades citotóxicas. Oliveira et al. (2010) ressaltaram que inúmeros estudos apontam que a *Punica granatum* apresenta vários indicadores de atividade antitumoral, sugerindo um potencial apoptótico seletivo contra diferentes linhagens celulares cancerígenas, incluindo aquelas hormônio-dependente, além de apresentar ação retardante no processo de proliferação tumoral. Contudo, a atividade antitumoral desempenhada pela *P. granatum* está associada à sua capacidade citotóxica, se assemelhando a ação dos quimioterápicos.

Li et al. (2016) exploraram os efeitos do extrato das folhas de romã no câncer de pulmão em pequenas células *in vitro*. Para esse estudo utilizou-se o extrato da folha de romã nas seguintes concentrações: 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 mg/mL, em intervalo de 24, 48 e 72 horas. Diante das análises observou-se que o extrato da folha de romã reduziu a viabilidade do câncer de pulmão de maneira dependente da concentração e do tempo, comprovando um efeito citotóxico em células cancerígenas de pulmão. Durante o tratamento de células de câncer de pulmão com extrato da folha da *P. granatum*, observou-se que, no período de 48 horas, o extrato apresentou ação estimuladora da apoptose das células tumorais, sendo de caráter dose-dependente, ou seja, quanto maior a concentração utilizada, maior o poder apoptótico. Além disso, o estudo demonstra que esse extrato foi responsável por inibir o crescimento e a proliferação de células de carcinoma A549, H1299 e LL/2 de maneira dependente da dose e do tempo. Deste modo, o tratamento com o extrato da folha de romã teve a capacidade de restringir significativamente a migração e a invasão de células tumorais.

Todos esses resultados apontam que o papel inibidor de danos genéticos do extrato da folha de romã é dependente das concentrações utilizadas e do sistema de tratamento realizado: isolado ou associado à DXR. Ou seja, o extrato pode atuar aumentando a frequência de tumores em altas concentrações como também atua como agente modulador em um sistema de cotratamento, sendo capaz de alterar a carcinogenicidade da doxorubicina, o que resulta na redução da frequência de tumores.

7. CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se que o extrato aquoso da folha de romã teve efeito carcinogênico quando testado isoladamente e em alta concentração. Conclui-se ainda que o extrato apresentou efeito anticarcinogênico, reduzindo significativamente a frequência de tumores quando associado a DXR, porém não apresentou caráter dose-dependente. Tais resultados sugerem a realização de novos estudos, com diferentes organismos testes e metodologias, para explorar as propriedades terapêuticas da folha de romã sobre o câncer.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, G. R.; REYES, F. G. R; RATH, S. *Drosophila melanogaster* meigen: sensibilidade ao carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Química Nova*, 24(6): 768-772, nov./dez. 2001.
- ANDRADE, A. F. P.; BALCÃO, V. M. *Feromonas e a comunicação por meios químicos – as feromonas da Drosophila melanogaster*. Disponível em: <https://curriculumvitaeandrade1987.weebly.com/uploads/1/0/4/0/10405053/feromonas_e_a_comunicacao_por_meios_quimicos_as_feromonas_da_drosophila_melanogaster.pdf> Acesso em 26 fev. 2016.
- CANDIDO, C. D. *Avaliação de distribuição de doxorubicina incorporada em microemulsão lipídica em tecido tumoral e cardíaco em camundongos*. 74f. Programa de Pós-graduação (Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP. Araraquara, 2013.
- DANTAS, É. L. R. *et al*. Genética do Câncer Hereditário. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 55(3):263-269, 2009.
- DASSPRAKASH, M. V. *et al*. In vitro and in vivo evaluation of antioxidant and antigentoxic potential of *Punica granatum* leaf extract. *Pharmaceutical biology*, 50(12): 1523-1530, 2012.
- DEGASPARI, C. H.; DUTRA, A. P. C. Propriedades fitoterápicas da romã (*Punica granatum* L.). *Visão Acadêmica*, 12(1):36-46, jan./jun 2011.
- EEKEN, J. *et al*. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor supressor gene wts. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 40 (2002): 277-282.
- FONSECA, C.; PEREIRA, D. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. *Infarma*, 16 (2004):7-8.

GARCIA, Sônia M. Lauer de; FERNÁNDEZ, Casimiro Garcia. *Embriologia*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

GRIFFITHS, A. *et al. Introdução à Genética*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

IBMC, INEB. *Estaleiro da ciência: guia prático*. Porto: Universidade do Porto/ IBMC, INEB, 2008.

Instituto Nacional de Câncer (INCA). *Como é o processo de carcinogênese?* Rio de Janeiro, 1996. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319>. Acesso em: 26 de fevereiro de 2016.

Instituto nacional de Câncer (INCA). *O que é o câncer?* Rio de Janeiro, 1996. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 26 de fevereiro de 2016.

Instituto Oncoguia. *Estimativas no Mundo*. 24/04/2015. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estimativas-no-mundo/1706/1/>>. Acesso em 26 de fevereiro de 2016.

JARDINI, F. A. *et al.* Compostos fenólicos da polpa e sementes de romã (*Punica granatum L.*): atividade antioxidante e protetora em células MDCK. *Alimentação e Nutrição*, 21(4): 509-517, out./dez. 2010.

JORDE, L. B; CAREY, J. C; BAMSHAD, M. J. *Genética Médica*. 4 ed. São Paulo: Editora Elsevier, 2010.

LANSKY, EP; NEWMAN, R. A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(2): 177-206, jan. 2007.

LEAL, F.; SCHWARTSMANN, G.; LUCAS, H. S. Medicina complementar e alternativa: uma prática comum entre os pacientes com câncer. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 54(6): 481-482, nov./dez, 2008.

LEME, C. *Substâncias anticancerígenas presentes nos alimentos*. Setembro, 2015. Disponível em: <<http://www.artedeviverbem.org.br/2015/substancias-anticancerigenas-presentes-nos-alimentos/>>. Acesso 26 fev. 2016.

LI, Y. *et al.* *Punica granatum* (pomegranate) leaves extract induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and inhibits migration and invasion in non-small cell lung cancer in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 80 (2016):227-235.

LOPES, A.; OLIVEIRA, A.; PRADO, C. Principais genes que participam na formação de tumores. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 2(2): 2002.

MCGINNIS, William, *et al.* A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell Research*, 37(2): 403-408, 1984.

MEHTA, R.; LANSKY, E. P. Breast cancer chemopreventive properties of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in a mouse mammary organ culture. *Eur J Cancer Prev.* 13(4): 345-8, 2004.

MENDANHA, D. M. *et al.* Modulatory effect of *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae) against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics and molecular research*, 9(1): 69-77, 2010.

MENEZES, S. M.; PINTO, D. M.; CORDEIRO, L. N. Atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* de *Punica granatum* L. (romã). *Grupo editorial Moreira Jr. Ceará*. Crato – CE, agosto 2008, pp. 388-391 .

MOURA, L. R. *Cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina: mecanismos de lesão e terapias antioxidantes*. 35f. Dissertação (Doutorado) – Ciência Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Universidade federal de Goiás, 2011.

NEUWALD, E. B. *Avaliação Hematológica, bioquímica e eletrocardiográfica de cães com diferentes neoplasias tratados com doxorubicina*. 2009. 93f. Dissertação (Mestrado) - Ciências Veterinárias na área de morfologia, cirurgia e patologia animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

NISHIYAMA, Y. *et al.* A human homolog of *Drosophila* warts suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. *Febs Letters*, 459(1999): 159-165.

OLIVEIRA, L. P. *et al.* Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(2): 201-207, abril/maio 2010.

PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. *Pharmacol Rev.*, 63(2): 411- 436, jun., 2011.

RIBEIRO, L.; SALVADORI, D.; MARQUES, E. “A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana”, in: RIBEIRO, Lucia; MARQUES, Edmundo. *Mutagênese ambiental*. Canoas: ULBRA, 2003, pp. 21-27.

RIBEIRO, V. *et al.* Ausência de mutagenicidade de *Solanum paniculatum* L. em células somáticas de *Drosophila melanogaster*: smart/asa. *Rev. Biol. Neotrop.* 6(2): 27-33, 2009.

ROCHA, A. A. de O.; ALVES, G. C. B; ORSOLIN, P. C. Efeito modulador do Roacutan® (isotretinoína) sobre a carcinogenicidade da doxorubicina, avaliado por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster*. *Perquirere*, 12(2): 201-212, dez, 2015.

ROCHA, L. D. L. S. *et al.* *Drosophila*: um importante modelo biológico para a pesquisa e ensino de genética. *Scire Salutis*. 3(1): 37-48, out./nov./dez 2012, jan./fev./mar. 2013.

ROSAS, M. S. L. *et al.* Incidência do câncer no Brasil e o potencial uso dos derivados de isatinas na cancerologia experimental. *Rev. Virtual Quim.*, 5(2): 243-265, abril 2013.

RUMMUN, N. *et al.* Bioactivity of Nonedible Parts of *Punica granatum* L.: A Potential Source of Functional Ingredients. *International Journal of Food Science*, vol. 2013 (1-2).

SÁNCHEZ-LAMAR, A. *et al.* Assessment of the genotoxic risk of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 115 (2008): 416-422, fev. 2008.

SANTOS, E. H. de B. *et al.* *Composição físico-química dos frutos da romã (Punica granatum L.)*. IF SERTÃO-PE, Coordenação de Tecnologia em Alimentos, Campus Petrolina, Jardim São Paulo, 2008.

SIDOROV, R. A. *et al.* Induction of tumor clones in *D. Melanogaster* wts/+ heterozygotes with chemical carcinogens. *Mutation Research*, 498 (2001): 181-191.

SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. *Ciência Rural*, 34(2): 625-633, mar./abr. 2004.

SILVEIRA, E. Remédio e veneno: Composto usado para tratar câncer danifica células do coração. *Pesquisa FAPESP*. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2012/06/048-049_coracao_196.pdf>. Acesso em: 27 jan. 2016.