

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica**

*A Romã (Punica granatum L.) como Perspectiva Terapêutica para  
o Câncer de Mama*

**Carolina Croso Mazzuco**

Trabalho de Conclusão do Curso de  
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de  
Ciências Farmacêuticas da Universidade de  
São Paulo.

Orientadora:

Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi

São Paulo

2018

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>                     | <b>1</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>                         | <b>3</b>  |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>                          | <b>4</b>  |
| <b>RESUMO .....</b>                                   | <b>5</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                 | <b>5</b>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                             | <b>6</b>  |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>                              | <b>7</b>  |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                    | <b>8</b>  |
| <b>3.1. ESTRATÉGIAS DE PESQUISA.....</b>              | <b>8</b>  |
| <b>3.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....</b>               | <b>8</b>  |
| <b>3.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....</b>               | <b>8</b>  |
| <b>3.4. COLETA E ANÁLISE DOS DADOS.....</b>           | <b>8</b>  |
| <b>4. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO.....</b>             | <b>9</b>  |
| <b>4.1. CÂNCER.....</b>                               | <b>9</b>  |
| <b>4.1.1. FISIOPATOLOGIA.....</b>                     | <b>9</b>  |
| <b>4.1.2. CÂNCER DE MAMA.....</b>                     | <b>10</b> |
| <b>4.1.3. MAGNITUDE .....</b>                         | <b>11</b> |
| <b>4.1.4. FATORES DE RISCO.....</b>                   | <b>12</b> |
| <b>4.1.5. CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA .....</b>   | <b>13</b> |
| <b>4.1.6. MECANISMOS MOLECULARES ONCOGÊNICOS.....</b> | <b>15</b> |
| <b>4.1.7. DIAGNÓSTICO .....</b>                       | <b>16</b> |
| <b>4.1.8. PREVENÇÃO.....</b>                          | <b>17</b> |
| <b>4.1.9. TRATAMENTO .....</b>                        | <b>19</b> |
| <b>4.2. A ROMÃ.....</b>                               | <b>21</b> |
| <b>4.2.1. CARACTERIZAÇÃO VEGETAL .....</b>            | <b>21</b> |

|   |                  |
|---|------------------|
| <b><u>4.2.2. USO TRADICIONAL .....</u></b>  | <b><u>21</u></b> |
| <b><u>4.2.3. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....</u></b>                                      | <b><u>22</u></b> |
| <b><u>4.2.4. ATIVIDADES DEMONSTRADAS FRENTE AO CÂNCER DE MAMA.....</u></b>            | <b><u>24</u></b> |
| <b><u>4.2.4.1. ATIVIDADE ANTI-CARGINOGENICA.....</u></b>                              | <b><u>24</u></b> |
| <b><u>4.2.4.2. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA.....</u></b>                               | <b><u>25</u></b> |
| <b><u>4.2.4.3. ATIVIDADE PRÓ-APOPTÓTICA.....</u></b>                                  | <b><u>30</u></b> |
| <b><u>4.2.4.4. ATIVIDADE ANTIANGIOGENICA.....</u></b>                                 | <b><u>33</u></b> |
| <b><u>4.2.4.5. ATIVIDADE ANTI-INVASIVA .....</u></b>                                  | <b><u>34</u></b> |
| <b><u>4.2.4.6. ATIVIDADE INIBIDORA DA AROMATASE.....</u></b>                          | <b><u>35</u></b> |
| <b><u>4.2.4.7. ATIVIDADE INIBITÓRIA DA 17B-HIDROXISTEROIDE-DESIDROGENASE.....</u></b> | <b><u>36</u></b> |
| <b><u>4.2.4.8. ATIVIDADE MODULADORA DE GENES.....</u></b>                             | <b><u>37</u></b> |
| <b><u>4.2.5. CINÉTICA.....</u></b>  | <b><u>42</u></b> |
| <b><u>4.2.6. TOXICIDADE.....</u></b>  | <b><u>43</u></b> |
| <b><u>4.2.7. INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS.....</u></b>                                   | <b><u>44</u></b> |
| <b><u>5. DISCUSSÃO .....</u></b>  | <b><u>45</u></b> |
| <b><u>6. CONCLUSÕES.....</u></b>  | <b><u>46</u></b> |
| <b><u>7. BIBLIOGRAFIA.....</u></b>  | <b><u>48</u></b> |
| <b><u>8. ANEXOS.....</u></b>  | <b><u>53</u></b> |
| <b><u>8.1. ANEXO 1 – TABELA RESUMO DOS ESTUDOS <i>IN VITRO</i> RELATADOS.....</u></b> | <b><u>53</u></b> |
| <b><u>8.2. ANEXO 2 – TABELA RESUMO DOS ESTUDOS <i>IN VIVO</i> RELATADOS.....</u></b>  | <b><u>54</u></b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|         |   |
|---------|---|
| AKT     | Serina-treonina Quinase                                       |
| AP      | Ácido Púrico  |
| AU      | Ácido Ursólico  |
| AUB     | Urolitina A Acetilada   |
| CLA     | Ácido Conjugado Linoleico                                     |
| COX-2   | Ciclooxigenase - 2  |
| Cyt c   | Citocromo c   |
| DMBA    | 7,12-dimetil-benzanthraceno                                   |
| DMSO    | Dimetilsulfóxido  |
| E+      | Células Estrógeno Positivas                                   |
| E-      | Células Estrógeno Negativas                                   |
| E2      | 17 $\beta$ -estradiol   |
| EA      | Ácido Elágico   |
| ER      | Receptor de Estrógeno   |
| FGF     | Fator de Crescimento Fibroblástico                            |
| GA      | Ácido Gálico  |
| HER2    | Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano          |
| MIF     | Fator Inibitório de Migração de Macrófagos                    |
| miR-155 | MicroRNA-155  |
| miR-27A | MicroRNA-27A  |
| MUA     | Urolitina A Metilada  |
| MUB     | Urolitina B Metilada  |
| NAC     | N-acetilcisteína  |
| NFkB    | Fator Nuclear kappa B   |
| P       | Extrato do Pericarpo da Romã                                  |
| PFE     | Suco Fermentado dos Grãos combinado a Óleo de Semente de Romã |
| Pg      | Extrato Metanólico de Polifenóis do Suco de Romã              |
| PI3K    | Fosfatidilinositol 3-quinase                                  |
| POMxp   | Extrato Polifenólico em Pó de Preparação de Romã              |
| POMxl   | Extrato Polifenólico Líquido de Preparação de Romã            |

|              |  |
|--------------|--|
| PR           | Receptor de Progesterona                                 |
| PSM          | Extrato Metanólico da Semente da Romã                    |
| PSO          | Óleo da Semente da Romã                                  |
| RB           | Gene do Retinoblastoma                                   |
| S            | Suco Fresco de Romã                                      |
| SERM         | Modulador Seletivo dos Receptores de Estrogênio          |
| SHIP-1       | Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato-5-fosfatase 1        |
| Sp           | Proteína Específica                                      |
| TGF- $\beta$ | Fator de Transformação do Crescimento Beta               |
| TNBC         | Câncer de Mama Triplo Negativo                           |
| TP53         | Gene Supressor Tumoral p53                               |
| Trolox       | Ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano  |
| UA           | Urolitina A  |
| UAG          | Urolitina A Glucuronizada                                |
| UB           | Urolitina B  |
| UBS          | Urolitina B Sulfatada                                    |
| VEGF         | Fator de Crescimento Endotelial Vascular                 |
| VEGFR-1      | Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular - 1 |
| W            | Suco Fermentado da Romã                                  |
| ZBTB10       | Proteína Dedo de Zinco                                   |

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1** - Estimativa para o ano de 2018 das taxas de incidência brutas e ajustadas por 100 mil habitantes e do número de novos casos de câncer no Brasil, por sexo e localização primária da neoplasia;

**FIGURA 2** - Estimativa da incidência Global do Câncer de Mama segundo IDH, em 2012;

**FIGURA 3** - Incidência Global do Câncer de Mama;

**FIGURA 4** - Subtipos moleculares do câncer de mama, Luminal A, Luminal B, Tipo HER2 e Tipo Triplo Negativo; principais biomarcadores, células envolvidas e possível tratamento;

**FIGURA 5** - Recomendações do Ministério da Saúde para o Diagnóstico Precoce do Câncer de Mama;

**FIGURA 6** - Romã, ilustração;

**FIGURA 7** - Atividade antiproliferativa de óleo de semente de romã (PSO) em células MCF-7 após (a) 24h de cultivo e (b) 72h de cultivo. (c) Comparativo da atividade antiproliferativa de PSO e ácido  $\gamma$ -linolênico, após 24h de cultivo;

**FIGURA 8** - Redução da viabilidade celular de células MDA-MB-231 (a) e MCF-7 (b), por ação do tratamento com polifenóis do suco de romã fermentado (W) e fresco (S);

**FIGURA 9** – Atraso do crescimento celular pelo pré-tratamento de células MCF-7 com suco comercial de romã (POM Wonderful®);

**FIGURA 10** – Inibição do crescimento celular pelo tratamento de células MCF-7 com suco comercial de romã (POM Wonderful®);

**FIGURA 11** - Efeito antiproliferativo do suco comercial de romã (POM Wonderful®) em comparação a NAC e Trolox;

**FIGURA 12** - Modulação da expressão gênica pelo tratamento com suco de romã (POM Wonderful®). (A) genes de reparo do DNA, (B) genes de controle do ciclo celular e (C) genes previamente conhecidos como alvo de extratos de romã;

**FIGURA 13** - Indução apoptótica da combinação do suco fermentado e do óleo de semente de romã (PFE) em células (A) MDA-231 e (B) SUM-149, comparada a células normais MCF-10A;

**FIGURA 14** - Indução da apoptose em células MDA-MB-435 pelo tratamento com óleo de semente de romã (PSO);

**FIGURA 15** - Modulação das proteínas (A) Bcl-2 e (B) PARP por ação de UA, em células MCF-7;

**FIGURA 16** - Efeito dos polifenóis do suco fermentado de romã (W) óleo da semente de romã (PSO) no aumento da expressão de MIF, em MDA-MB-231;

**FIGURA 17** - Efeito dos polifenóis do suco fermentado de romã (W), e do óleo da semente de romã (PSO) na redução da expressão de VEGF, em células (A) MCF-10A, (B) MCF-7 e (C) MDA-MB-231;

**FIGURA 18** - Atividade anti-invasiva do óleo de semente de romã (PSO) em células MCF-7;

**FIGURA 19** - Atividade antiproliferativa de compostos isolados derivados da romã em células MCF-7, em meios contendo (A) testosterona e (B) estrógeno;

**FIGURA 20** – Ação da combinação de suco fermentado e de óleo de semente de romã (PFE) na supressão da ativação de NF- $\kappa$ B, em células MDA 231 e SUM 149;

**FIGURA 21** - Células imunopositivas para (a) I $\kappa$ B $\alpha$  citossólico, (b) NF- $\kappa$ B nuclear e (c) NF- $\kappa$ B citossólico, em grupo controle e em grupos tratados com diferentes concentrações de emulsão a base de romã (PE);

**FIGURA 22** – Modulação a nível transcricional (níveis de mRNA) de genes envolvidos no processo apoptótico;

**FIGURA 23** - Células imunopositivas para (A) Bax e (B) Bcl2 e (C) relação Bax/Bcl2, em grupo controle em grupos tratados com emulsão a base de romã (PE);

**FIGURA 24** – Ação dos polifenóis do suco de romã (Pg) na expressão de (a) miR27a e (b) miR155;

**FIGURA 25** - Ação dos polifenóis do suco de romã (Pg) na modulação do mRNA de SHIP-1 em células (a) BT474 e (b) MDA-MB-231, e na expressão das proteínas SHIP-1, PI3K e AKT em células (c) BT474 e (d) MDA-MB-231;

**FIGURA 26** - Contenção de (a) volume e (b) peso tumoral em animais tratados com suco de romã (Pg) e (c) prevalência de lesões apoptóticas em animais de animais controle e em tratamento (Pg);

**FIGURA 27** - Expressão de (a) mRNAs e de (b) proteínas em animais tratados com polifenóis do suco de romã (Pg) e em grupo controle.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Agentes quimiopreventivos e seus mecanismos;

**Tabela 2** - Constituintes químicos da romã;

**Tabela 3** - Parâmetros cinéticos de plasma e urina relativos ao ácido elágico e seus metabólitos, após ingestão de suco de romã comercial.

**RESUMO:** A romã (*Punica granatum* L.), infrutescência da romãzeira, tem recebido novos olhares da comunidade científica, graças às atividades farmacológicas que tem demonstrado nas últimas duas décadas. Destas, destaca-se a atividade antitumoral, já demonstrada por diversos autores em diferentes tipos de células cancerígenas, por meio de mecanismos pró-apoptóticos, antiproliferativos, antiangiogênicos, entre outros. Com isso, tem-se o uso da romã como promissor na terapia de diversos tipos tumorais, o que é de extrema relevância, frente ao cenário atual em que se encontra o câncer. O câncer de mama é a neoplasia que se desenvolve no tecido mamário, a partir da divisão descontrolada das células locais. O melhor prognóstico da doença está associado à detecção tumoral precoce e ao tratamento eficaz. A romã tem demonstrado potencialidade terapêutica tanto para a prevenção quanto para o tratamento do câncer de mama, algo a ser explorado e aproveitado, de modo a se trazer significativas melhorias terapêuticas.

Palavras-chave: romã; câncer; prevenção; tratamento.

**ABSTRACT:** The pomegranate (*Punica granatum* L.), infructescence of the pomegranate tree, has received new glances from the scientific community thanks to the pharmacological activities that it has demonstrated in the last two decades. Of these, we highlight the antitumor activity, already revealed by several authors in different types of cancer cells, through pro-apoptotic, antiproliferative and antiangiogenic mechanisms, among others. Said so, the use of pomegranate appears promising in the therapy of several tumor types, something extremely relevant, taking into account the current scenario in which cancer is found. Breast cancer is the neoplasm that develops in the breast tissue, from the uncontrolled division of the local cells. The best prognosis of the disease is associated with early tumor detection and effective treatment. The pomegranate has demonstrated therapeutic potential for both prevention and treatment of breast cancer, something to be explored and harnessed in order to bring significant therapeutic improvements.

Keywords: pomegranate; cancer; prevention; treatment.

MAZZUCO, C. C. **A Romã (*Punica granatum* L.) como Perspectiva Terapêutica para o Câncer de Mama**. 2018. no. f. 54. Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

## 1. INTRODUÇÃO

O ser humano sempre soube o que lhe é saudável e o que não lhe é. Optar por alimentos frescos, por verduras e frutas, ao lugar de alimentos industrializados e demasiadamente processados, é sabidamente uma forma mais saudável de se alimentar (1). O grupo de pessoas que reconhece tais hábitos e os faz valer em sua vida é a cada dia maior, priorizando alimentos e terapias que tragam ao corpo um bem estar a longo prazo, que tratem a origem de seus sintomas, ou que cuidem para que o corpo não adoça. Os imensos danos que práticas contrárias a estas vêm trazendo à saúde humana são evidentes. São tantas as complicações que acometem a sociedade atual, e tantas as doenças que tem a dieta e o estilo de vida como fortes fatores de desencadeamento patológico. Destas, destaca-se o câncer (2).

Mundialmente, o câncer representa a segunda causa de morte, com uma incidência que tende apenas a crescer. Considerando-se a população feminina, tem-se o câncer de mama como o tipo de câncer de maior incidência e mortalidade (3). Configura uma neoplasia que se desenvolve no tecido mamário, quando as células locais entram em um processo de divisão descontrolada, como resultado de alterações genéticas a elas associadas (4). A detecção precoce é o fator que possibilita o melhor prognóstico para a doença. No Brasil, no entanto, 60% dos casos das neoplasias de mama são diagnosticadas tardiamente. Como segundo fator de sobrevida da doença, tem-se o tratamento eficaz (5). Com base nesse cenário, faz-se urgente a necessidade de se explorar novos agentes farmacológicos, que tragam melhores perspectivas tanto na prevenção e no tratamento da doença, quanto na qualidade de vida do doente.

Um agente terapêutico considerado ideal é aquele de caráter atóxico às células saudáveis, efetivo contra as células doentes e economicamente acessível. Os agentes quimioterápicos tradicionalmente usados no combate do câncer, não atendem perfeitamente a esses critérios. A começar, tem um custo significativamente elevado

(6), o que limita o acesso da população como um todo ao tratamento. Ainda mais grave que isso é o fato de serem fármacos extremamente tóxicos ao organismo como um todo, carregando consigo múltiplos efeitos colaterais, que debilitam ainda mais o paciente, já comprometido (7). As mesmas considerações valem para os agentes quimiopreventivos utilizados no âmbito do câncer, que também costumam ser de elevado custo e toxicidade.

Desta forma, justifica-se a crescente busca por novas alternativas para o tratamento oncológico. Sendo cada vez maior o consenso e mais estabelecida a relação entre uma dieta saudável e a menor suscetibilidade ao câncer, tem crescido o interesse científico sobre os produtos alimentares (8). Neste âmbito, o reino vegetal tem ganhado destaque, tendo muito a oferecer. São muitas as plantas que já tiveram atividade terapêutica demonstrada contra o câncer, e provavelmente tantas outras que poderiam ser excelentes para tal, mas que não são conhecidas pelo homem ou estudadas. Das que já se tem conhecimento, a romã é um exemplo.

De uso alimentar e medicinal milenar, a romã recebeu significativa atenção da comunidade científica desde o início do século atual. Com inúmeros estudos realizados e artigos publicados, a sua notável atividade antitumoral tem sido demonstrada em diferentes linhagens de células cancerígenas, mostrando-se, portanto, promissora frente a diversos tipos de câncer (9, 10, 11, 12, 13). Como mecanismos antitumorais da romã evidenciados, têm-se os pró-apoptóticos (14), antiproliferativos, anti-invasivos, antiestrogênicos (15), antiangiogênicos (16), entre outros. De tal modo, o fruto tem demonstrado atividade tanto para a prevenção quanto para o tratamento oncológico, o que rende imensa importância aos estudos com ele realizados. Neste cenário, o presente trabalho tem foco no câncer de mama, explorando os benefícios e avanços que o uso da romã pode trazer para a sua terapia.

## **2. OBJETIVOS**

Busca-se aqui reunir e esclarecer as investigações feitas a respeito da atividade antitumoral da romã, com foco no seu potencial na prevenção e no tratamento do câncer de mama. O objetivo é o de dar um novo enfoque ao tema, na

perspectiva de se mostrar sua relevância e, assim, instigar a continuidade de seus estudos. Os principais pontos explorados são:

- Compreensão da atividade terapêutica da romã (princípios ativos e mecanismos de ação);
- Toxicidade da romã;
- Interações medicamentosas da romã;
- Cenário geral do câncer de mama e de sua terapia.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Estratégias de pesquisa**

A metodologia explorada para a realização desse trabalho foi a pesquisa bibliográfica, a qual permitiu o acesso a materiais científicos pertinentes ao tema, de forma a se reunir as diversas evidências existentes na literatura a respeito da atividade antitumoral da romã, para a revisão e esclarecimento destas.

#### **3.2. Critérios de inclusão**

Foram consideradas apenas publicações feitas a partir do ano 2000, período no qual os estudos sobre a atividade da romã tomaram maior destaque.

#### **3.3. Critérios de exclusão**

Não foram considerados artigos que não nos idiomas português, inglês, espanhol e italiano, nem artigos de data anterior ao período estabelecido.

#### **3.4. Coleta e análise dos dados**

Foram feitas buscas em bases de dados como PubMed, Medline, Elsevier, SciELO e LILACS, priorizando-se sempre as publicações atuais e cientificamente validadas. Com a pesquisa bibliográfica realizada e com os dados coletados a partir desta, torna-se possível a análise criteriosa das informações levantadas, buscando-se chegar a discussões relevantes e conclusões significativas.

## 4. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

### 4.1. CÂNCER

O câncer é a neoplasia que se desenvolve a partir do processo de divisão descontrolada das células, como resultado do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas a elas associadas. Tais alterações levam uma célula normal a se tornar uma célula dita maligna, definida por características tais quais autossuficiência em relação a sinais de crescimento, insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento, habilidade de evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, capacidade antigênica, invasiva e metastática (17).

#### 4.1.1. Fisiopatologia

Apesar das diferentes manifestações clínicas existentes, observam-se comportamentos comuns às células cancerígenas, que dizem respeito a características fundamentais do câncer, conforme explicado a seguir.

Capacidade Proliferativa Sustentada – diferentemente da homeostasia tida em tecidos saudáveis, onde se verifica um controle normal do crescimento e da divisão celular, células cancerígenas possuem a capacidade de desregular os sinais que mantém tais processos. Espera-se assim maior produção de sinais de proliferação, elevação de receptores de fatores de crescimento, ou mesmo ativação constitutiva de componentes da via de sinalização destes fatores de crescimento (18).

Escape dos Mecanismos de Supressão da Proliferação – os mecanismos que impedem uma célula normal de manter-se continuamente no estado proliferativo são regulados, principalmente, por genes como o de supressão tumoral p53 (TP53), e o do retinoblastoma (RB). Estes, percebendo sinais intra e extracelulares, decidem a progressão ou interrupção do ciclo celular. Escapando desta regulação, a célula cancerígena se mantém proliferativa (19).

Resistência à Morte Celular – para que um tumor progrida, as células cancerígenas devem ser capazes de contornar os mecanismos apoptóticos, dos quais se pode citar novamente a atuação de TP53, envolvido na percepção de danos no DNA, ao que responde induzindo à apoptose. No câncer, pode-se observar a perda da funcionalidade do gene TP53 em muitos casos. Outras estratégias utilizadas pelas

células cancerígenas são a maior expressão de reguladores antiapoptóticos, como a família Bcl-2, e a menor expressão de fatores proapoptóticos, como as proteínas Bax e Bak. As proteínas da família Bcl-2 atuam como inibidoras apoptóticas, pela supressão das proteínas Bax e Bak.

Potencial Replicativo Infinito – uma célula saudável possui um número limitado de ciclos de divisão. O mecanismo envolvido com a perda da capacidade de divisão celular é o encurtamento dos telômeros, um processo natural das células normais. Contornando este processo, tem-se a enzima telomerase, a qual se encontra expressa significativamente em células cancerígenas. A telomerase age adicionando segmentos aos telômeros, ou seja, contra o encurtamento destes (20), possibilitando assim a proliferação ilimitada.

Estímulo à Angiogênese – a angiogênese corresponde ao crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos já existentes. Tal processo é de fundamental importância no quadro do câncer, para que o tecido tumoral seja irrigado para o seu crescimento. A angiogênese encontra-se continuamente ativada no câncer, sustentada pela regulação positiva dos fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) e de crescimento fibroblástico (FGF) (21).

Capacidade Invasiva e Metastática – dentre as diferentes alterações que uma célula cancerígena apresenta, têm-se as modificações na sua capacidade adesiva frente às outras células e à matriz extracelular. Em grande parte dos processos tumorais, a menor expressão da molécula de E-caderina faz com que as células cancerígenas percam a junção que tem entre si e, com isso, a organização na sua forma de agrupamento. As células tendem então a sair do estado de quiescência, desenvolvendo potencial invasivo e metastático (22). Ainda, moléculas de caráter pró-inflamatório e pró-migratório encontram-se com uma expressão elevada no quadro cancerígeno.

#### **4.1.2. Câncer de Mama**

O câncer de mama refere-se ao tipo de câncer que se origina em células do tecido mamário, englobando diversas doenças de comportamentos próprios, levando a manifestações clínicas e morfológicas heterogêneas. A principal manifestação da

doença é o surgimento de nódulos em 90% dos casos, localizados nas mamas, axilas ou mesmo na região do pescoço, sendo fixos, endurecidos e, em geral, indolores. Existe a possibilidade de surgimento de alterações da pele da mama, a qual pode assumir aparência avermelhada, enrugada e retraída. Pode ocorrer a liberação espontaneamente de líquidos do mamilo, que pode também ter seu bico alterado (23).

#### 4.1.3. Magnitude

O câncer mais incidente nas mulheres brasileiras, sem considerar-se o câncer de pele não melanoma, é o de mama. No Brasil, 28% dos novos casos de câncer são relativos ao câncer de mama. Destes, apenas 1% diz respeito ao câncer de mama masculino (24). Estima-se para o ano de 2018 cerca de 600.000 novos casos de câncer, dos quais 59.700 são representados pelo câncer de mama feminino (25).

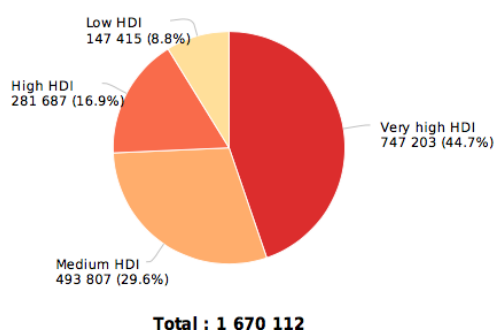
**FIGURA 1** - Estimativa para o ano de 2018 das taxas de incidência brutas e ajustadas por 100 mil habitantes e do número de novos casos de câncer no Brasil, por sexo e localização primária da neoplasia

| Localização Primária da Neoplasia Maligna | Estimativa dos Casos Novos |            |             |          |            |             |          |            |             |          |            |             |
|---|----------------------------|------------|-------------|----------|------------|-------------|----------|------------|-------------|----------|------------|-------------|
|   | Homens                     |            |             |          |            |             | Mulheres |            |             |          |            |             |
|   | Estados                    |            |             | Capitais |            |             | Estados  |            |             | Capitais |            |             |
|   | Casos                      | Taxa Bruta | Taxa Ajust. | Casos    | Taxa Bruta | Taxa Ajust. | Casos    | Taxa Bruta | Taxa Ajust. | Casos    | Taxa Bruta | Taxa Ajust. |
| Mama Feminina                             | -                          | -          | -           | -        | -          | -           | 59.700   | 56,33      | 51,29       | 19.920   | 80,33      | 63,98       |
| Todas as Neoplasias Malignas              | 300.140                    | 290,86     | -           | 69.430   | 312,52     | -           | 282.450  | 266,47     | -           | 78.680   | 317,47     | -           |

FONTE: INCA, Estimativas 2018, incidências de câncer no Brasil

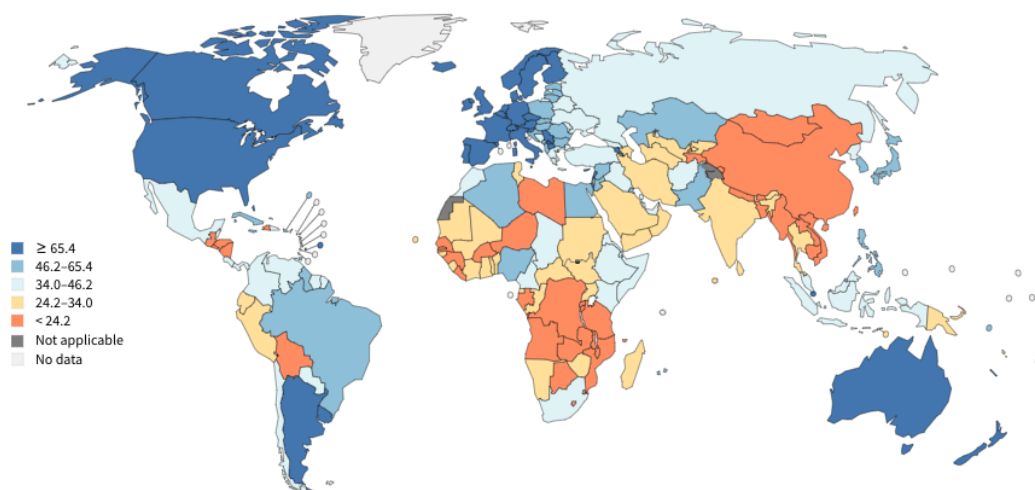
Globalmente, observa-se uma maior incidência do câncer de mama em países desenvolvidos em relação aos demais (26). Tal efeito pode ser relacionado ao estilo de vida e à história reprodutiva mais comumente tido pela população feminina de países desenvolvidos, os quais tendem a se aproximar dos fatores de risco para a doença, como apresentado adiante.

**FIGURA 2** - Estimativa da incidência Global do Câncer de Mama segundo IDH, em 2012



FONTE: GLOBOCAN, 2012 - IARC/WHO

**FIGURA 3** - Incidência Global do Câncer de Mama



FONTE: GLOBOCAN, 2012 - IARC/WHO

#### 4.1.4. Fatores de Risco

Os fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama são muitos, sendo que os mais estabelecidos e aceitos são:

Idade – o envelhecimento está diretamente relacionado ao maior risco para o câncer, em todas as suas formas, o que é explicado especialmente pelo acúmulo de alterações genéticas no indivíduo (27).

Fatores endócrinos – a elevada exposição simultânea aos hormônios estrógeno e progesterona é tida como fator de risco para o desenvolvimento de câncer de mama, e está relacionada a uma história reprodutiva de menarca precoce, menopausa tardia e ciclo menstrual curto, assim como a uma prolongada terapia de reposição hormonal. Tais eventos estão, portanto, também relacionados ao maior

risco de desenvolvimento da doença, assim como uma primeira gravidez tardia. Já um histórico de múltiplas gestações e o ato de amamentar são fatores de proteção contra a patologia (28).

Fatores comportamentais e ambientais – o ganho de peso na fase pós-menopausa é tido como fator de risco para o câncer de mama, incluindo, em especial, o acúmulo de gordura corporal. Também a ingestão excessiva de bebida alcoólica é um fator de risco, enquanto que a prática de atividades físicas constitui um fator de proteção contra a doença (29). A radiação ionizante constitui outro fator de risco, sendo proporcional à dose e frequência de exposição (27).

Fatores genéticos – a predisposição genética é um forte fator de risco para o câncer de mama. Tem-se que o risco de desenvolvimento da doença em um mulher que tenha um familiar de primeiro grau acometido pelo câncer de mama antes dos 50 anos é duas ou mais vezes maior. Caso tenha dois familiares de primeiro grau acometidos pelo câncer de mama, esse risco é de quatro a seis vezes maior (30).

Considerando-se os fatores de risco aqui expostos e fazendo-se uma análise dos hábitos de vida da sociedade atual, é de se esperar que o câncer de mama seja uma complicação cada vez mais recorrente. É notável como as meninas tem tido sua primeira menstruação cada vez mais cedo, como as mulheres tem recorrido ao uso de pílulas anticoncepcionais de forma tão regular e natural, como a maternidade tem se tornado uma realidade na vida das mulheres em uma idade cada vez mais avançada ou como muitas tem optado por não ter filhos e, ainda, como a expectativa de vida tem sido cada vez mais alta.

#### **4.1.5. Classificação do Câncer de Mama**

A classificação molecular do câncer de mama pode ser feita com base na expressão de seus principais biomarcadores (31). A identificação destes é de fundamental importância também para que se defina a conduta terapêutica de cada caso tumoral, e para que se visualize de melhor forma o prognóstico da doença.

**FIGURA 4** - Subtipos moleculares do câncer de mama, Luminal A, Luminal B, Tipo HER2 e Tipo Triplo Negativo; principais biomarcadores, células envolvidas e possível tratamento

| Subtype   | ER/PR | HER2 | Ki67 | Treatment    | Cell lines   |
|-----------|-------|------|------|--------------|--------------|
| Luminal A | +/+   | –    | <15% | Antihormonal | MCF7, T47D   |
| Luminal B | +/+   | –/+  | >15% | Antihormonal | BT474        |
| HER2-type | –/–   | +    |      | Anti-HER2    | SkBr3, AU565 |
| TNBC      | –/–   | –/–  | >15% | Chemotherapy | MDA-MB231    |

FONTE: Echeberría et al., 2017

Luminal A – tipo tumoral positivo para ambos os receptores que controlam a resposta hormonal da célula cancerígena, Receptor de Estrógeno (ER) e Receptor de Progesterona (PR). É HER2 negativo e apresenta uma expressão de Ki-67, proteína evidenciada em células em proliferação, em geral baixa, refletindo uma menor taxa proliferativa do câncer. Assim, este tipo tumoral é o relacionado a um melhor prognóstico da doença, com uma intervenção baseada na terapia hormonal (moduladores dos receptores hormonais e inibidores da enzima aromatase). Representa 30-70% dos casos de câncer de mama.

Luminal B – tipo tumoral também positivo tanto para ER quanto para PR, podendo ser HER2 negativo ou positivo. A expressão de Ki-67 costuma ser mais elevada, o que se relaciona a um pior prognóstico da doença, em relação ao tipo Luminal A. A terapia para estes tumores, que representam 10-20% dos casos totais de câncer de mama, é também baseada em hormônios.

Tipo HER2 – o receptor de membrana HER2 está envolvido na transdução de sinais proliferativos. Neste tipo tumoral, HER2 está superexpresso, e os receptores ER e PR não estão presentes. Não há uma relação clara entre as expressões de HER2 e Ki-67. A terapia antitumoral nestes casos envolve inibidores específicos HER2 ou anticorpos monoclonais. Representam cerca de 5-15% dos casos de câncer de mama.

Tipo Triplo Negativo (TNBC) - tumores mamários negativos tanto para ER e PR quanto para HER2. Representando cerca de 10-20% dos casos de câncer de mama, é o tipo de pior prognóstico, por sua maior agressividade, alta capacidade invasiva e impossibilidade de se recorrer a alternativas terapêuticas específicas, ficando-se restrito apenas à quimioterapia clássica.

#### **4.1.6. Mecanismos Moleculares Oncogênicos**

O metabolismo humano, em seu normal funcionamento, gera uma série de radicais livres com suas diversas reações, os quais são também gerados por estímulos externos, como radiações e poluição, ou por estímulos patogênicos, como infecções bacterianas e virais. A produção excessiva e não balanceada de radicais livres leva ao quadro de estresse oxidativo, o qual é problemático para a saúde, por traduzir-se em peroxidação lipídica, alterações e danos a nível proteico e genético. Danos cumulativos ao DNA podem levar a um processo de iniciação tumoral e, a presença de radicais livres como um todo está também envolvida com a progressão do tumor, agindo como fatores mutagênicos para as células cancerígenas e, assim, contribuindo com a transformação destas para estágios de maior malignidade (18). O papel dos radicais livres no quadro do câncer é, no entanto complexo, e de caráter dual. Em um primeiro momento tais radicais agem como acima mencionado, induzindo alterações biológicas e processos mutagênicos. Em um segundo momento, os radicais livres tornam-se prejudiciais também às células cancerígenas, contribuindo para o processo de morte celular destas (31).

Os tumores de mama podem ser do tipo estrógeno dependente ou não. No primeiro caso, tem-se uma importante atuação da enzima aromatase no processo tumoral, por ser responsável pela síntese de hormônios estrogênicos a partir dos androgênicos, (conversão da testosterona em  $17\beta$ -estradiol e de androstenediona em estrona). O receptor de estrogênio (ER) medeia a ação celular do hormônio  $17\beta$ -estradiol (E2). O subtipo ER $\alpha$  é o principal receptor estrogênico presente em células mamárias cancerígenas, do tipo estrógeno positivas, estando envolvido na capacidade proliferativa e de sobrevivência destas. Como mencionado anteriormente, a proteína ZBTB10 regula a expressão de genes e proteínas dependentes de Sp. Destes, o ER $\alpha$  é um exemplo. A indução de ZBTB10 por inibição de miR-27a leva a redução na expressão de ER $\alpha$  (32). Outra enzima de importância no câncer de mama estrógeno positivo é a  $17\beta$ -hidroxiesteroide-desidrogenase, que atua na conversão de estrona em  $17\beta$ -estradiol (33). Tem-se aqui, portanto, possibilidades de se interferir no estímulo estrogênico em células cancerígenas estrógeno positivas, via modulação das enzimas aromatase e  $17\beta$ -hidroxiesteroide-desidrogenase e da expressão de ER $\alpha$ .

A fisiopatologia de diversas condições crônicas, incluindo o câncer, envolve a via de sinalização do NF- $\kappa$ B, um fator de transcrição pró-inflamatório. O NF- $\kappa$ B, em seu estado inativo, tem suas subunidades p50 e p65 ligadas à subunidade inibitória I $\kappa$ B $\alpha$ , no citoplasma celular (34). A via clássica de ativação do NF- $\kappa$ B, envolve a ativação prévia de IKK, proteína quinase responsável por fosforilar I $\kappa$ B $\alpha$ . Livre, o dímero p50-p65 faz sua translocação do citoplasma para o núcleo celular, onde se liga a regiões específicas do DNA, induzindo a transcrição de genes envolvidos em respostas fisiológicas como estresse-oxidativas, inflamatórias, angiogênicas, de proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, apoptóticas e de invasão e metástase (35). Considerando-se tais respostas, compreende-se que a estratégia de modulação do NF- $\kappa$ B seja extremamente interessante para a terapia do câncer, sendo que esta modulação pode se dar em diferentes pontos da via de sinalização do NF- $\kappa$ B.

A enzima ciclooxygenase-2 (COX-2) tem sua expressão induzida no processo carcinogênico, no qual atua com a produção de uma série de prostaglandinas. Estas estão envolvidas em respostas necessárias ao desenvolvimento tumoral, como mutagênese, proliferação, sobrevivência, angiogênese, invasão e escape imunitário (36).

Diversos outros fatores de transcrição encontram-se superexpressos no câncer, tais quais as proteínas específicas Sp1, Sp3 e Sp4. Estes regulam genes necessários à proliferação e sobrevivência das células cancerígenas e à angiogênese. A proteína dedo de zinco ZBTB10 atua na supressão dos fatores de transcrição Sp e de proteínas e mRNAs dependentes de Sp. ZBTB10 é reprimida pela alta expressão do microRNA miR-27a, situação esta que ocorre no câncer de mama, tendo-se assim a superexpressão dos fatores de transcrição Sps (32). Outro microRNA superexpresso no câncer de mama é o miR-155, envolvido no controle negativo da fosfatase SHIP-1, a qual atua na modulação negativa da cascata de ativação PI3K-AKT- NF- $\kappa$ B.

#### **4.1.7. Diagnóstico**

A detecção precoce do câncer de mama é o fator que possibilita o melhor prognóstico para a doença. No Brasil, no entanto, 60% dos casos da neoplasia são diagnosticadas tardiamente (5). A sobrevivência média mundial, após cinco anos do diagnóstico, é de cerca de 85%, enquanto que no Brasil gira em torno de 80% dos

casos diagnosticados. Tal taxa de sobrevida tem aumentado, o que se relaciona, principalmente, ao diagnóstico precoce por exames de mamografia (37).

Em 01/02/2018, foi publicado no Diário Oficial da União, pelo Ministério da Saúde, a Portaria Conjunta nº4, de 23 de janeiro de 2018, a qual aprova as novas Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Carcinoma de Mama (37). As seguintes recomendações são colocadas, para fins diagnósticos do câncer de mama:

**FIGURA 5** - Recomendações do Ministério da Saúde para o Diagnóstico Precoce do Câncer de Mama

| Recomendações do Ministério da Saúde para o diagnóstico precoce do câncer de mama |  |
|---|--|
| Estratégia de conscientização   | Implementação de estratégias de conscientização para o diagnóstico precoce do câncer de mama. (Recomendação fraca: os possíveis benefícios provavelmente superam os possíveis danos).  |
| Identificação de sinais e sintomas suspeitos                                      | <p>Recomenda que os seguintes sinais e sintomas sejam considerados como de referência urgente para serviços de diagnóstico mamário (Recomendação fraca: os possíveis benefícios provavelmente superam os possíveis danos):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualquer nódulo mamário em mulheres com mais de 50 anos;</li> <li>• Nódulo mamário em mulheres com mais de 30 anos, que persistem por mais de um ciclo menstrual;</li> <li>• Nódulo mamário de consistência endurecida e fixo ou que vem aumentando de tamanho, em mulheres adultas de qualquer idade;</li> <li>• Descarga papilar sanguinolenta unilateral;</li> <li>• Lesão eczematosa da pele que não responde a tratamentos tópicos;</li> <li>• Homens com mais de 50 anos com tumoração palpável unilateral;</li> <li>• Presença de linfadenopatia axilar;</li> <li>• Aumento progressivo do tamanho da mama com a presença de sinais de edema, como pele com aspecto de casca de laranja;</li> <li>• Retração na pele da mama;</li> <li>• Mudança no formato do mamilo.</li> </ul> |
| Confirmação diagnóstica em um único serviço                                       | Recomenda que toda a avaliação diagnóstica do câncer de mama, após a identificação de sinais e sintomas suspeitos na atenção primária, seja feita em um mesmo centro de referência. (Recomendação fraca: os possíveis benefícios provavelmente superam os possíveis danos, quando comparados à organização tradicional dos serviços de investigação diagnóstica).  |

FONTE: Brasil, Portaria Conjunta nº4, de 23 de janeiro de 2018

#### 4.1.8. Prevenção

No câncer de mama, a prevenção diz respeito à busca pela redução de fatores de risco e aumento de fatores protetores. Dados indicam a possibilidade de diminuir-se em 28% do risco de desenvolvimento de câncer de mama em mulheres, por meio de prática de atividades físicas, da boa alimentação e da manutenção de uma quantidade de gordura corporal adequada (38).

A quimioprevenção é também uma estratégia, e pode ser definida como o processo de administração crônica de agentes sintéticos, naturais ou biológicos para se evitar, atrasar ou reverter uma condição maligna em sua fase inicial (39). Os agentes quimiopreventivos podem atuar no bloqueio da iniciação tumoral, agindo de maneira a impedir a interação de agentes pró-carcinogênicos (exógenos, como

fármacos e toxinas, ou endógenos, como radicais livres) com o DNA. Desta forma, contorna-se a instabilidade genômica e a possibilidade de início de uma malignidade. Têm-se ainda agentes quimiopreventivos que atuam na supressão tumoral, os quais se mostram relevantes quando já ocorreu o processo de iniciação de células malignas. Neste caso, os agentes de supressão vão atuar na perturbação de vias de sinalização pró-oncogênicas (39). Assim, tais agentes podem se relacionar com a iniciação, promoção ou progressão tumoral.

**TABELA 1** - Agentes quimiopreventivos e seus mecanismos

| <b>Mecanismo dos Agentes Quimiopreventivos de Bloqueio</b>               |
|--|
| Ação antioxidante  |
| Indução metabólica, detoxificação de agentes pró-carcinogênicos          |
| Bloqueio da captação de agentes pró-carcinogênicos                       |
| Indução do reparo do DNA   |
| <b>Mecanismo dos Agentes Quimiopreventivos Supressores</b>               |
| Modulação da expressão genica ou da transdução de sinais pró-oncogênicos |
| Inibição da proliferação e expansão clonal                               |
| Indução apoptótica   |

**FONTE:** Steward et al., 2013

O tamoxifeno é o fármaco mais comum utilizado na quimioprevenção do câncer de mama estrógeno positivo, sendo um modulador seletivo dos receptores de estrogênio (SERM). Pode ser uma opção preventiva, mas restrita a mulheres de alto risco de desenvolver o câncer mamário, devido a histórico familiar ou a mutações que as predisponham ao câncer (como mutações nos genes BRCA1 e BRCA2). O uso do fármaco por cinco anos mostrou uma eficácia de 49% e 50% na redução de surgimento de câncer de mama invasivo e não invasivo, respectivamente (39). No entanto, tal efeito foi acompanhado por um risco duas vezes maior de desenvolvimento de câncer do endométrio, além de maior risco de eventos tromboembólicos, em relação a indivíduos tratados com placebo, no estudo em questão. Efeitos adversos comuns relacionam-se aos sintomas da menopausa, como

sudorese, ondas de calor, alterações de humor e de sono, além de náuseas, perda de peso, fraqueza e possibilidade de desenvolvimento de catarata (40).

#### **4.1.9. Tratamento**

Os tratamentos disponíveis para o câncer e mais convencionalmente utilizados são apresentados a seguir, sendo que uma combinação de tais possibilidades terapêuticas é, em geral, utilizada.

Quimioterapia – forma terapêutica na qual se faz uso de fármacos antitumorais para se combater as células cancerígenas. A administração costuma ser feita por via endovenosa, e a duração do tratamento depende do tipo de tumor em questão e da agressividade e estágio deste. Os efeitos colaterais da quimioterapia são muitos, e variam de acordo com os fármacos administrados e com a fisiologia do paciente. A curto prazo, os mais comuns são náusea, tontura e vômito. A longo prazo, ocorrem sintomas que estão relacionados à ação dos fármacos, que agem não só nas células tumorais, mas também nas saudáveis da medula óssea, do epitélio e das mucosas. A ação na medula óssea leva a uma inibição da produção de leucócitos, debilitando o indivíduo e tornando-o mais suscetível a infecções, cansaço, fraqueza e variações de peso. Ocorre também interferência na síntese de hemácias, podendo acarretar em anemia, e na síntese de plaquetas, o que pode levar ao comprometimento na coagulação. A ação em células epiteliais leva à queda de cabelo e a feridas bucais, enquanto que a ação em células da mucosa causa dores, em especial no trato digestório (cavidade bucal, esôfago, intestino), além de diarreias (41).

Foi realizado um levantamento bibliográfico de ensaios clínicos australianos e norte americanos, que reportassem dados de sobrevida de cinco anos em casos de câncer, atribuída exclusivamente à quimioterapia citotóxica (42). Verificou-se que a contribuição da quimioterapia para tal sobrevida foi de apenas 1,5% na Austrália e 1,4% nos Estados Unidos, nos casos de câncer de mama. Tem-se que na Austrália, a sobrevida de cinco anos para o câncer (sem distinção de tipos) é de 63,4% e, nesta sobrevida, a quimioterapia contribui somente em 2,3%. Assim, verifica-se uma contribuição mínima desta terapia.

Radioterapia – tratamento baseado na radiação para combater o tumor ou limitar seu crescimento. O número de sessões radioterápicas varia com o tipo, extensão e localização do tumor e com o estado de saúde do paciente. É mais comumente tido como tratamento adjuvante pós-cirúrgico, mas pode ocorrer também, de ser indicada como método paliativo, principalmente em casos metastáticos, ou como tratamento pré-cirúrgico, quando há falha da quimioterapia ou da hormonioterapia (37). Deve-se considerar que a radioterapia leva à destruição tumoral, mas não é capaz de promover a retirada das células destruídas do local em que se encontram. Com isso, há a possibilidade de gerar inflamações. Ainda, cabe mencionar o fato da radiação, por si só, ser um agente cancerígeno, devendo-se tomar o máximo de cuidado para que não se atinja também tecidos saudáveis durante as sessões de radioterapia. Outros possíveis efeitos colaterais da radioterapia incluem: fadiga, perda de apetite, dificuldades na ingestão de alimentos, desidratação e irritações cutâneas (41).

Cirurgia – a mastectomia pode ser realizada para fins curativos ou paliativos. Curativos quando se faz a remoção completa do tumor maligno, e ainda de parte do tecido que o circunda, com certa margem de segurança. É indicada especialmente para tumores sólidos, em estágios iniciais. A cirurgia paliativa é aquela que apenas reduz a população de células tumorais, com a finalidade de amenizar os sintomas da doença (43). A mastectomia pode significar um forte abalo psicológico para a saúde da mulher, afetando sua autoestima, imagem corporal e identidade feminina (44) mesmo nos casos em que a reconstrução mamária é possível.

Como parte da terapia primária no Reino Unido, tem-se que 81% dos pacientes passam por procedimento de mastectomia, 63% é submetido à radioterapia e 34% realiza terapia quimioterápica (45).

Hormonioterapia – forma de tratamento sistêmica que visa impedir ou desacelerar o crescimento de tumores responsivos a hormônios (46). Pode ser conduzida de forma neoadjuvante (antes de um procedimento cirúrgico) ou, mais comumente, de forma adjuvante, para que se evite recidivas da doença (47). Os fármacos utilizados atuam impedindo a síntese ou a ação hormonal. O tamoxifeno é um dos fármacos mais empregados, atuando como inibidor dos receptores de

estrogênio. Os inibidores da aromatase representam o grupo de fármacos que atuam na inibição da síntese estrogênica, tendo-se representantes como letrozol e anastrozol. Efeitos comuns à terapia hormonal relacionam-se a depleção dos níveis estrogênicos, podendo acarretar em problemas como a osteoporose, a exemplo. O tamoxifeno, como já mencionado, pode levar à maior predisposição de câncer do endométrio, existindo ainda a possibilidade de resistência à ação do fármaco por parte de certos pacientes (48).

## **4.2. A ROMÃ**

### **4.2.1. Caracterização vegetal**

A Romãzeira, *Punica granatum* L. (49), é tida por alguns como um arbusto e por outros como uma árvore de pequeno porte, frutífera e perene, com seu tamanho médio que vai de 1,5 a 5 metros de altura. Seu nome origina-se das palavras latinas *pomum*, maçã, e *granatus*, sementes (50). Pertencente à família *Punicaceae*, a romãzeira é originária da antiga Pérsia, hoje Irã, tendo seu cultivo sido estendido pelas regiões da Ásia central, da península arábica e do mediterrâneo. Foi mais tarde trazida também para as Américas, onde é cultivada especialmente nas regiões mais áridas dos Estados Unidos e Chile (51).

A infrutescência da romãzeira é a romã, de histórica importância alimentar e medicinal. Pode-se dividir a romã em três componentes principais (52), sendo estes o pericarpo, qual engloba a casca e as membranas internas, o suco, que corresponde a cerca de 30% de seu peso total, e as sementes, com apenas 3% de seu peso, constituídas de óleo fixo em cerca de 20%.

### **4.2.2. Uso Tradicional**

O uso da romã é de longa data na medicina tradicional, integrando diversas culturas. A preparação de extratos e infusões de partes do fruto tem se relaciona ao tratamento de condições como infecções microbianas e parasitárias, disenteria, úlceras, inflamações em geral e infertilidade (53).

**FIGURA 6** – Romã, ilustração



FONTE: autoria própria, 2018

#### 4.2.3. Caracterização química

A romã apresenta um vasto aporte de constituintes químicos, muitos dos quais já revelados como sendo biologicamente ativos, embora nem todos com mecanismo de ação estabelecido. O pericarpo corresponde a 50% do peso do fruto, rico em flavonoides, elagitaninos, antocianidinas, ácidos orgânicos e polissacarídeos (54). O fruto apresenta numerosos grãos (ou arilos) em seu interior, os quais revelam as sementes, circundadas por seu suco. Este suco é composto por 85% em água, 10% em açúcares e 1,5% em demais componentes, como ácidos orgânicos, antocianinas, flavonoides e aminoácidos. (55, 56, 57). Já as sementes possuem uma constituição que vai de 12 a 20% em óleo (52). Este apresenta ácidos graxos poli-insaturados em sua maioria, a exemplo dos ácidos púnico, linoleico e linolênico, além de uma diversidade de compostos esteroides. Pode-se encontrar ainda, tanto no pericarpo quanto no suco, nutrientes como K, Ca, Mg, P, Na, N, Zn, Cu, Fe e Mn (58).

**Tabela 3-** Constituintes Químicos da Romã

| Classe Química           | Composto        | Principal Localização Vegetal |
|--------------------------|-----------------|-------------------------------|
| Açúcar Simples           | Glicose         | Suco                          |
| Açúcar Simples           | Frutose         | Suco                          |
| Açúcar Simples           | Sacarose        | Suco                          |
| Ácido Orgânico Alifático | Ácido Ascórbico | Suco                          |
| Ácido Orgânico Alifático | Ácido Cítrico   | Suco                          |
| Ácido Orgânico Alifático | Ácido Málico    | Suco                          |

|                              |                                   |                           |
|------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| Ácido Orgânico Alifático     | Ácido Tartárico                   | Suco                      |
| Ácido Orgânico Alifático     | Ácido Fumárico                    | Suco                      |
| Ácido Orgânico Alifático     | Ácido Succínico                   | Suco                      |
| Ácido Hidroxibenzóico        | Ácido Gálico                      | Pericarpo e Suco          |
| Ácido Hidroxibenzóico        | Ácido Elágico                     | Pericarpo, Suco e Semente |
| Ácido Hidroxicinâmico        | Ácido Caféico                     | Pericarpo e Suco          |
| Ácido Hidroxicinâmico        | Ácido Clorogênico                 | Pericarpo e Suco          |
| Ácido Hidroxicinâmico        | Ácido p-Cumárico                  | Pericarpo e Suco          |
| Ácido Ciclohexanocarboxílico | Ácido Quínico                     | Pericarpo e Suco          |
| Flavonóide                   | Flavan-3-ol                       | Pericarpo e Suco          |
| Flavonóide                   | Catequina                         | Pericarpo e Suco          |
| Flavonóide                   | Epicatequina                      | Pericarpo e Suco          |
| Flavonóide                   | Epigallocatequina 3-galato        | Pericarpo e Suco          |
| Flavonóide                   | Quercetina                        | Pericarpo e Suco          |
| Flavonóide                   | Camferol                          | Pericarpo                 |
| Glicosídeo Flavonóide        | Rutina                            | Pericarpo e Suco          |
| Glicosídeo Flavonóide        | Camferól 3-O-glicosídeo           | Pericarpo                 |
| Glicosídeo Flavonóide        | Camferól 3-O-ramnoglicosídeo      | Pericarpo                 |
| Flavona                      | Luteolina                         | Pericarpo                 |
| Glicosídeo Flavônico         | Luteolina 7-O-glicosídeo          | Pericarpo                 |
| Glicosídeo Flavônico         | Naringina                         | Pericarpo                 |
| Antocianidina                | Delfinidina                       | Pericarpo                 |
| Antocianidina                | Cianidina                         | Pericarpo                 |
| Antocianidina                | Pelargonidina                     | Pericarpo                 |
| Antocianidina                | Cianidina 3-O-glicosídeo          | Suco                      |
| Antocianidina                | Cianidina 3,5-di-O-glicosídeo     | Suco                      |
| Antocianidina                | Delfinidina 3-O-glicosídeo        | Suco                      |
| Antocianidina                | Delfinidina 3,5-di-O-glicosídeo   | Suco                      |
| Antocianidina                | Pelargonidina 3-O-glicosídeo      | Suco                      |
| Antocianidina                | Pelargonidina 3,5-di-O-glicosídeo | Suco                      |
| Elagitanino                  | Punicalina                        | Pericarpo e Suco          |
| Elagitanino                  | Punicalagina                      | Pericarpo e Suco          |
| Elagitanino                  | Corilagina                        | Pericarpo                 |
| Elagitanino                  | Casuarinina                       | Pericarpo                 |
| Elagitanino                  | Galagildilactona                  | Pericarpo                 |
| Elagitanino                  | Pedunculagina                     | Pericarpo                 |
| Elagitanino                  | Telimagrandina                    | Pericarpo                 |
| Elagitanino                  | Granatina A                       | Pericarpo                 |
| Elagitanino                  | Granatina B                       | Pericarpo                 |

|                           |                     |                |
|---------------------------|---------------------|----------------|
| Aminoácido                | Glutamina           | Suco           |
| Aminoácido                | Aspartato           | Suco           |
| Aminoácido                | Serina              | Suco           |
| Aminoácido                | Alanina             | Suco           |
| Indolamina                | Triptamina          | Suco           |
| Indolamina                | Serotonina          | Suco           |
| Indolamina                | Melatonina          | Suco           |
| Alcalóide Peletierínico   | Peletierina         | Pericarpo      |
| Ácido Graxo Conjugado     | Ácido Púnico        | Semente        |
| Ácido Graxo não-Conjugado | Ácido Linoléico     | Semente        |
| Ácido Graxo não-Conjugado | Ácido Oléico        | Semente        |
| Ácido Graxo não-Conjugado | Ácido Palmítico     | Semente        |
| Ácido Graxo não-Conjugado | Ácido Esteárico     | Semente        |
| Fitoesterol               | Daucoesterol        | Semente        |
| Fitoesterol               | Campesterol         | Suco e Semente |
| Fitoesterol               | Stigmaesterol       | Suco e Semente |
| Fitoesterol               | $\beta$ -Sitosterol | Suco e Semente |
| Fitoesterol               | Colesterol          | Semente        |
| Esteróide Sexual          | 17-alfa-estradiol   | Semente        |
| Esteróide Sexual          | Estrona             | Semente        |
| Esteróide Sexual          | Testosterona        | Semente        |
| Esteróide Sexual          | Estriol             | Semente        |
| Tocoferol                 | $\gamma$ -Tocoferol | Semente        |
| Triterpenóide             | Ácido Ursólico      | Semente        |
| Glicolípideo              | Cerebrosídeo        | Semente        |
| Coumestans                | Coumestrol          | Semente        |
| Glicosídeo Fenilalifático | Icarisídeo D1       | Semente        |

FONTE: Lansky and Newman, 2007

#### 4.2.4. Atividades Demonstradas Frente ao Câncer de Mama

##### 4.2.4.1. Atividade Anti-Carginogênica

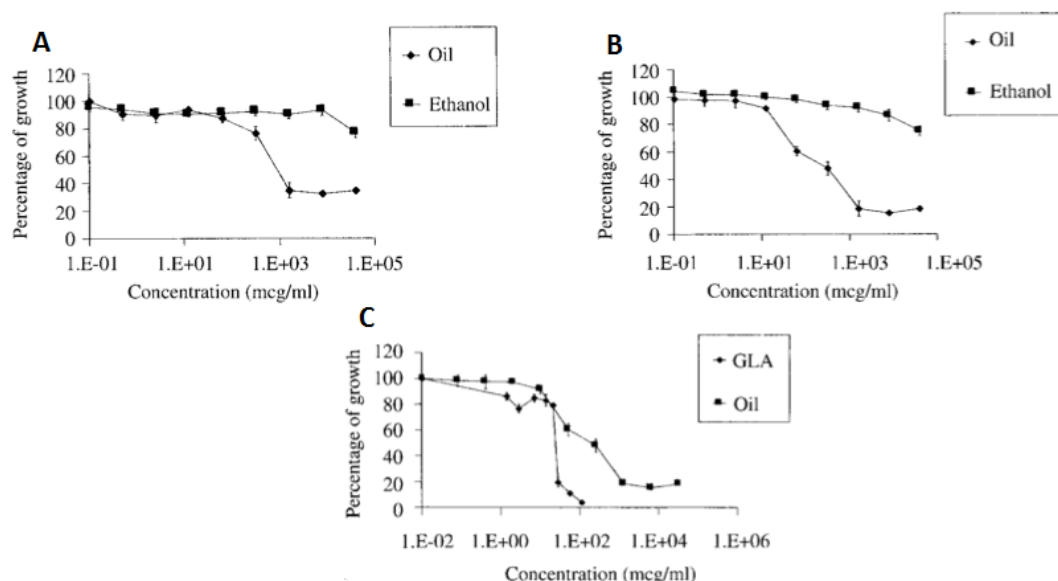
Em estudo feito com uma cultura de órgão mamário de ratas, foi avaliada a iniciação tumoral, a partir da indução desta pela incubação com substância carcinogênica 7,12-dimetil-benzanthraceno (DMBA), e o efeito do tratamento da cultura com suco fermentado de romã (W), obtido por expressão do fruto, e com óleo de semente de romã (PSO), obtido por prensagem das sementes. W demonstrou o efeito de reduzir a ocorrência tumoral em 42%, enquanto que PSO levou a essa redução em 87% (59). Neste mesmo estudo, verificou-se uma relação não linear entre concentração de PSO e ação preventiva frente ao câncer, sendo que 1  $\mu\text{g/ml}$  de PSO levou a maior supressão do desenvolvimento tumoral que 10  $\mu\text{g/ml}$ .

A atividade preventiva da romã frente à carcinogênese se relaciona à sua capacidade em inibir as enzimas COX-2, aromatase e 17 $\beta$ -hidroxiesteroide-desidrogenase, sendo a primeira responsável pela síntese de prostaglandinas e as duas últimas pela síntese de estradiol. A diferença na ação anticarcinogênica do W, em relação à PSO é explicada pelo autor pelo fato de que, embora os polifenóis encontrados no W sejam de maior atividade antioxidante, aqueles encontrados no PSO são de maior atividade inibitória da enzima ciclooxigenase e da enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide-desidrogenase (15).

#### 4.2.4.2. Atividade Antiproliferativa

Células cancerígenas mamárias MCF-7 (E+) foram cultivadas com PSO (prensado das sementes), para avaliação da ação antiproliferativa deste (15). Como controle positivo, células MCF-7 foram cultivadas também com ácido  $\gamma$ -linolênico, o qual tem atividade antiproliferativa frente a células cancerígenas já demonstrada e, como controle negativo, utilizou-se células cultivadas em etanol. O estudo evidencia que tal atividade antiproliferativa existe por parte de PSO, sendo que uma supressão do crescimento das células em questão foi obtido em 70%, em relação ao controle negativo, após 24h. Após três dias de cultivo, tal inibição foi ainda mais forte. Avaliando-se o controle positivo, tem-se que o ácido  $\gamma$ -linolênico mostrou uma supressão do crescimento células superior a PSO. A suposta ação do ácido púnico na inibição da síntese de prostaglandinas possivelmente relaciona-se com a atividade antiproliferativa verificada. Ainda, o óleo é conhecido por conter componentes de caráter estrogênico, a exemplo do coumestrol, de modo que se pode supor que estes atuem como antagonistas do ER, inibindo o crescimento de células ER (+).

**FIGURA 7** - Atividade antiproliferativa de óleo de semente de romã (PSO) em células MCF-7 após (a) 24h de cultivo e (b) 72h de cultivo. (c) Comparativo da atividade antiproliferativa de PSO e ácido  $\gamma$ -linolênico, após 24h de cultivo

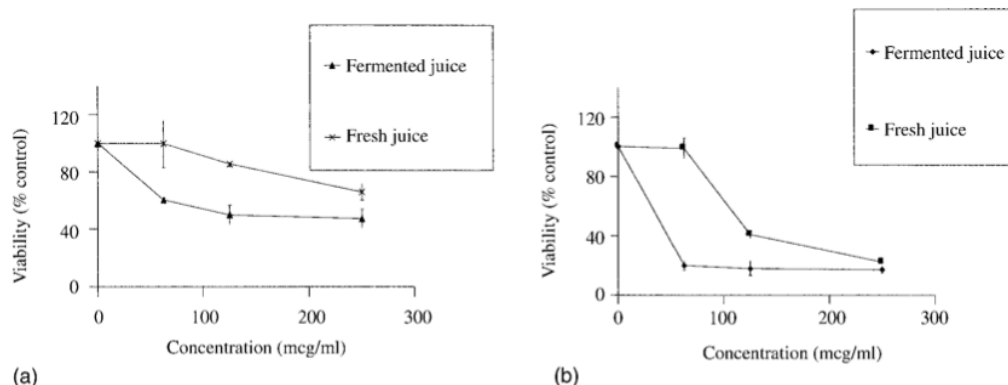


FONTE: Kim et al., 2002

Em estudo paralelo destes autores, verificou-se também a atividade antiproliferativa de outras frações da romã: polifenóis do suco da romã fresco (S) e fermentado (W), obtidos por expressão do fruto, e do pericarpo da romã (P), extrato obtido por decocção. Avaliou-se aqui, além de células MCF-7 (E+), células MDF-10A (células normais do epitélio mamário) e células MDA-MB-231 (E-). Verificou-se inibição do crescimento de 80%, por parte de W em células MCF-7. Em células MDA-MB-231 o mesmo efeito foi verificado, mas em grau menor. Já em células MDF-10A, tal efeito foi mínimo. As células tratadas com P reagiram de modo próximo àquelas tratadas com W. Já S, mostrou-se menos potente como agente antiproliferativo para tais culturas celulares (15).

A diferente potência evidenciada entre W e S pode ser explicada pelo fato de que, no processo fermentativo, ocorre quebra da ligação açúcar-polifenol, permitindo que os compostos polifenólicos estejam em sua forma livre, na qual se mostram biologicamente ativos (15). Como verificado pelos autores, W e P exibem atividade de inibição da enzima aromatase, de modo que a capacidade antiestrogênica destes deve relacionar-se à ação anti-proliferativa em questão, em células MCF-7 (ER+).

**FIGURA 8** - Redução da viabilidade celular de células MDA-MB-231 (a) e MCF-7 (b), por ação do tratamento com polifenóis do suco de romã fermentado (W) e fresco (S)

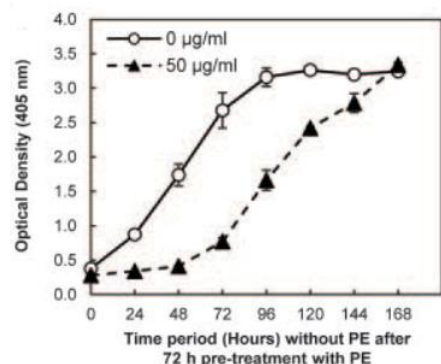


FONTE: Kim et al., 2002

O extrato metanólico da semente da romã (PSM) foi também estudado por sua atividade citotóxica frente a células MCF-7, sob diferentes concentrações (60). Os resultados revelam uma máxima inibição de crescimento celular de 87,6%, verificada à concentração de 250µg/ml. Mesmo a baixas doses (5µg/ml) a atividade antiproliferativa de PSM foi alta, correspondendo a 82,7%.

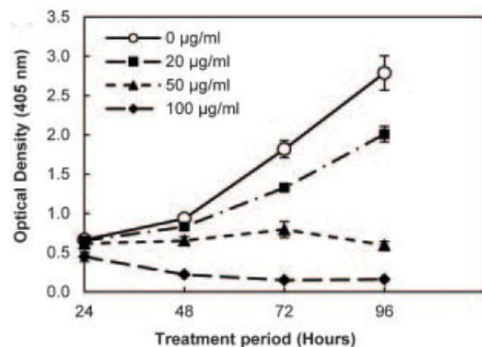
Avaliou-se o efeito do pré-tratamento de células MCF-7 com suco comercial de romã (POM Wonderful®), preparado a partir do fruto inteiro (61). Observou-se que células assim tratadas tardaram mais a iniciar sua proliferação, quando deixadas em um meio sem o suco de romã (FIG.9). Ou seja, o pré-tratamento parece ser responsável por um atraso na proliferação das células cancerígenas em questão. Já o tratamento desta linhagem celular com diferentes concentrações do suco de romã (FIG.10) mostra que o suco tem ação antiproliferativa, dose e tempo dependente.

**FIGURA 9** - Atraso do crescimento celular pelo pré-tratamento de células MCF-7 com suco comercial de romã (POM Wonderful®)



FONTE: Shirode et al., 2013

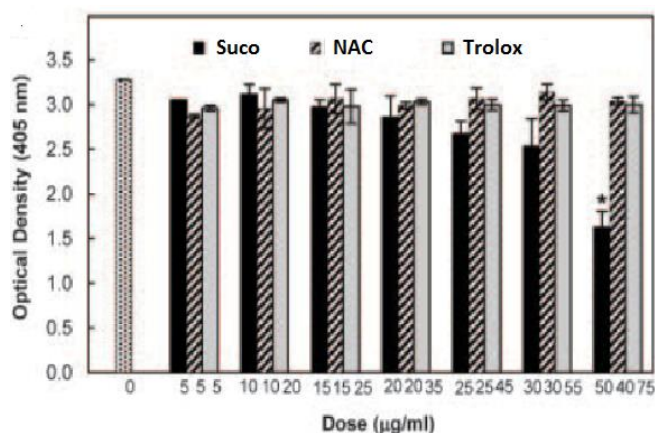
**FIGURA 10** - Inibição do crescimento celular pelo tratamento de células MCF-7 com suco comercial de romã (POM Wonderful®)



FONTE: Shirode et al., 2013

Neste mesmo trabalho (61) foram estudados, comparativamente, a atividade antiproliferativa do suco de romã, e dos compostos antioxidantes NAC (N-acetilcisteína) e Trolox (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano). A comparação entre os três compostos foi feita com base na equivalência do poder antioxidante, e não na concentração destes. A finalidade foi avaliar se a ação antiproliferativa da romã deve-se apenas ao seu poder antioxidante. Ocorreu que NAC e Trolox não exibiram ação antiproliferativa em doses de capacidade antioxidante equivalente à da romã. Assim, assume-se que a ação inibitória da romã frente ao crescimento celular se deva também a outros mecanismos, que não só antioxidantes.

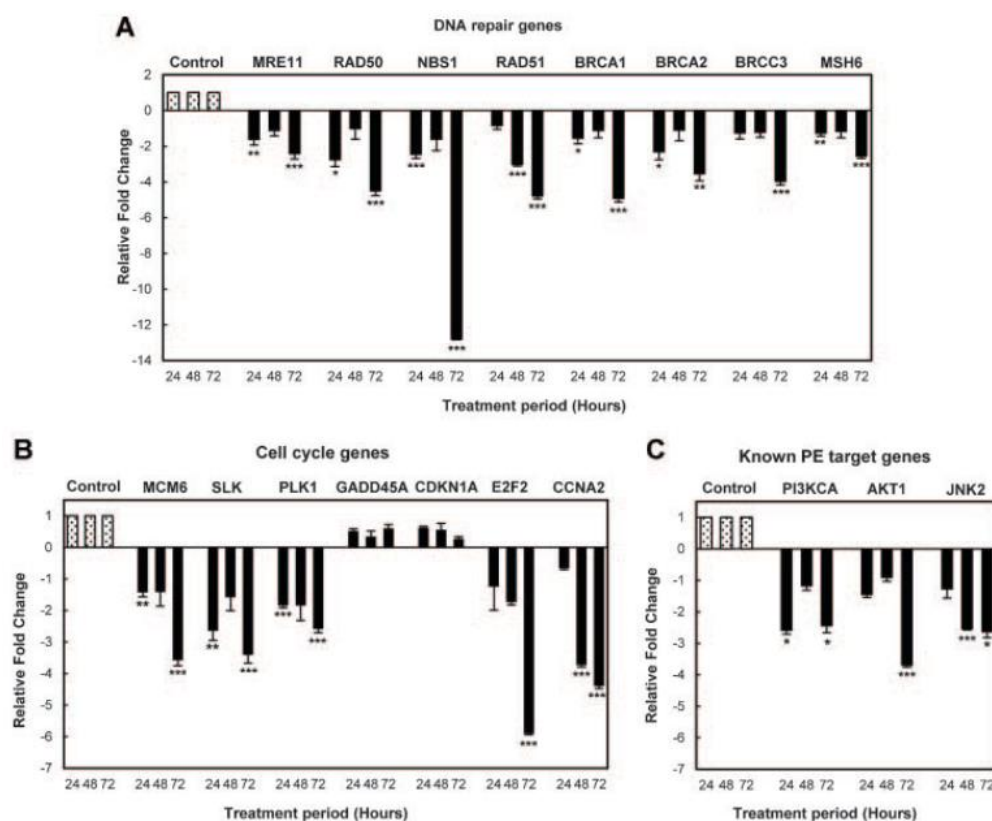
**FIGURA 11** - Efeito antiproliferativo do suco comercial de romã (POM Wonderful®) em comparação a NAC e Trolox



FONTE: Shirode et al., 2013

Ainda, para investigar os mecanismos relacionados à atividade antiproliferativa da romã, os autores realizaram um screening dos genes que tiveram modulação modificada após o tratamento com o suco comercial de romã. Verificou-se que diversos genes de função de reparo do DNA sofreram regulação negativa, o que leva à interferência na progressão do ciclo celular, como pode ser constatado no estudo, que evidenciou acúmulo das células em G2, indicando um bloqueio do ciclo nesta etapa, da qual se seguiu para a apoptose celular.

**FIGURA 12** - Modulação da expressão gênica pelo tratamento com suco de romã (POM Wonderful®). (A) genes de reparo do DNA, (B) genes de controle do ciclo celular e (C) genes previamente conhecidos como alvo de extratos de romã



FONTE: Shirode et al., 2013

A regulação do ciclo celular foi também avaliada pelo tratamento com o ácido elágico (EA) isolado, verificando-se ação na modulação de reguladores do ciclo

celular (62). Em células MCF-7, EA demonstrou atividade antiproliferativa, em doses de 10 a 40 µg/ml, nas quais proporcionou uma redução no número de células de 13,5 a 80%, respectivamente, em comparação às células controle. Investigando-se o mecanismo antiproliferativo de EA, verificou-se que 16 genes relacionados à via de sinalização TGF-β/Smads tiveram sua expressão alterada, após 24h de tratamento das células com o composto. Tal alteração inclui forte aumento das proteínas Smad3, p15, p19 e p21 e leve aumento de TGF-β além de redução de ciclinas A2, D e E2.

Proteínas Smads medeiam a ação do fator de crescimento transformador-β (TGF-β), um potente agente antiproliferativo, pró-apoptótico e de diferenciação celular, o qual age modulando de forma positiva componentes inibidores do ciclo celular (p15, p19 e p21) e de forma negativa componentes necessários à progressão deste (ciclinas E e D), comprometendo a passagem da célula de G1 para S (63). Em vista de tal mecanismo e das evidências do estudo em questão, pode-se considerar que o efeito antiproliferativo da romã deva-se, ao menos em parte, à ação de EA na modulação do ciclo celular.

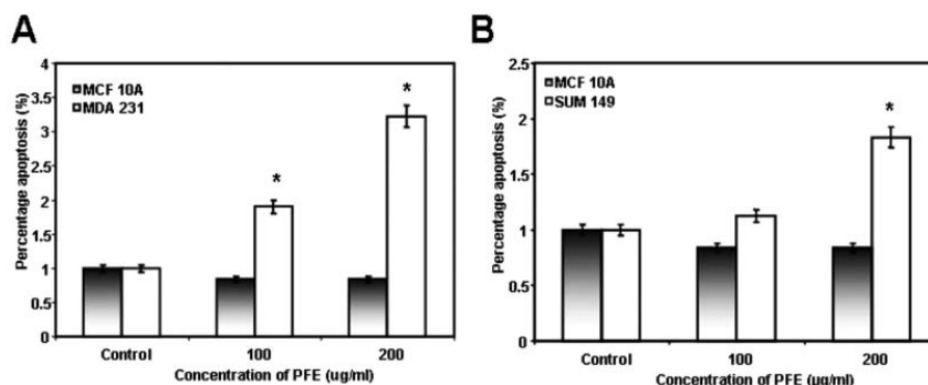
Células de câncer de mama ER (-), MDA-231 e SUM-149 também foram estudadas quanto à resposta antiproliferativa frente ao tratamento com romã. Ambas se relacionam com fenótipos agressivos de câncer de mama e possuem ativação constitutiva de NF-kB. Trabalhou-se aqui com 200 mg/mL de um extrato de romã (PFE), que consiste na combinação do suco fermentado obtido dos grãos do fruto e do óleo de suas sementes, demonstrando-se decréscimo, tempo e concentração dependente, da taxa proliferativa das linhagens celulares em questão, em comparação com as células controle, MCF-10A. Em cinco dias de tratamento, houve decréscimo de 67% e de 24% na proliferação de MDA-231 e de SUM-149, respectivamente. As células controle não tiveram seu crescimento afetado, mostrando-se a romã extremamente seletiva (14).

#### **4.2.4.3. Atividade Pró-Apoptótica**

Células MDA-231 e SUM-149, ambas ER (-), mostraram-se seletivamente sensíveis ao efeito pró-apoptótico da romã, demonstrado por PFE (14). Uma taxa apoptótica três vezes maior em MDA-231, em relação às células não tumorais MCF-

10A, foi evidenciada em tratamento com PFE (200 mg/ml). Para SUM-149, essa mesma taxa foi duas vezes maior.

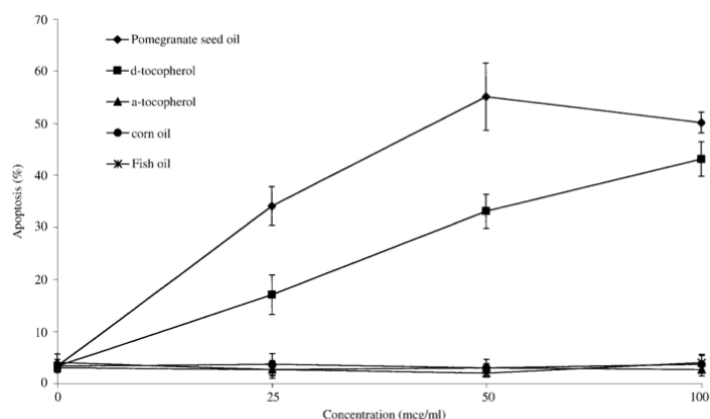
**FIGURA 13** - Indução apoptótica da combinação de suco fermentado e de óleo de semente de romã (PFE) em células (A) MDA-231 e (B) SUM-149, comparada a células normais MCF-10A



FONTE: Khan et al., 2009

Células ER (-), MDA-MB-435, isoladas de portadores de câncer de mama metastático, foram estudadas para avaliação do efeito pró-apoptótico de PSO, obtido por prensagem das sementes (15), avaliando-se também a ação de outros tipos de óleo, para fins comparativos: óleo de milho, de peixe,  $\Delta$ -tocoferol e  $\alpha$ -tocoferol. Os resultados, expressos em porcentagem (número de células apoptóticas/número de células totais), revelaram taxa apoptótica de 60%, referente às células cultivadas com PSO. À exceção de  $\Delta$ -tocoferol, que demonstrou taxa apoptótica inferior ao PSO, mas ainda significativa, os demais óleos não mostraram atividade.

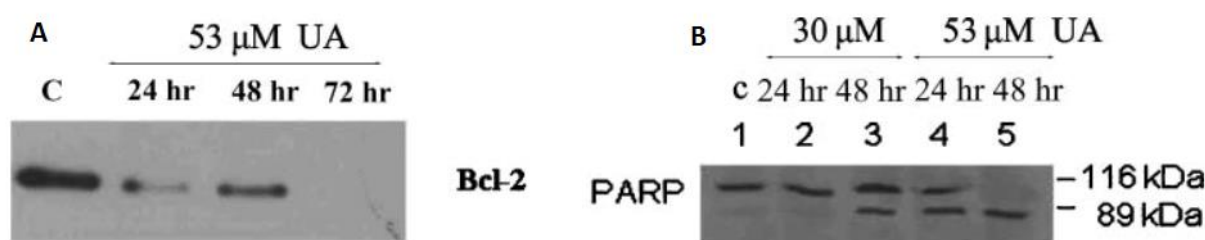
**FIGURA 14** - Indução da apoptose em células MDA-MB-435 pelo tratamento com óleo de semente de romã (PSO)



FONTE: Kim et al., 2002

O ácido ursólico (AU), composto triterpenóide presente na semente da romã, teve sua capacidade pró-apoptótica investigada em células MCF-7 (64). Em 72h de tratamento com AU (53  $\mu$ M), apenas 33,4% das células MCF-7 mantiveram-se viáveis, sendo as demais induzidas à apoptose. Investigando o mecanismo envolvido, os autores demonstraram que AU atua promovendo a clivagem da proteína PARP, evento envolvido no processo apoptótico, além de atuar na regulação negativa da proteína Bcl-2. Assim, AU parece ter ação pró-apoptótica mediada pela via mitocondrial intrínseca.

**FIGURA 15** - Modulação das proteínas (A) Bcl-2 e (B) PARP por ação de UA, em células MCF-7



FONTE: Kassi, E. et al., 2009

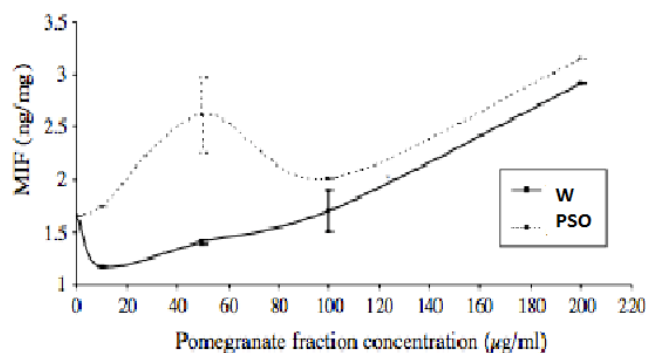
Considerando-se o envolvimento da superprodução de espécies reativas de oxigênio com o processo de iniciação e progressão tumoral, entende-se a importância da atividade antioxidante da romã. Neste âmbito, os compostos polifenólicos do fruto, tem papel antitumoral agindo por dois mecanismos distintos (31). De forma mais esclarecida, atuam como agentes antioxidantes, protegendo o organismo da ação danosa de espécies reativas. A outra forma de atuação dos polifenóis seria como agentes pró-oxidantes, a qual se manifesta em condições nas quais metais redutores, como cobre, estão presentes no meio. Uma vez que células cancerígenas apresentam nível de cobre aumentado em relação a células normais, tal mecanismo pró-oxidante ocorre preferencialmente nelas. Assim, com a produção de radicais livres, favorece-se a apoptose de células cancerígenas, sem se afetar as células saudáveis (65). O ácido púnico, um ácido graxo conjugado, é o principal constituinte do óleo da semente da

romã, representando 65% de sua composição (66). Estruturalmente, é muito similar ao ácido conjugado linoleico (CLA), do qual se tem evidências de sua atividade antitumoral (15), como a pró-apoptótica, provavelmente por atuar na peroxidação lipídica e induzir alteração da composição de ácidos graxos da membrana celular (67). Sendo o ácido púnico semelhante ao CLA, é possível que desempenhe um importante papel na indução do processo apoptótico, assim como os compostos polifenólicos do fruto, agindo de forma pró-oxidante.

#### 4.2.4.4. Atividade Antiangiogênica

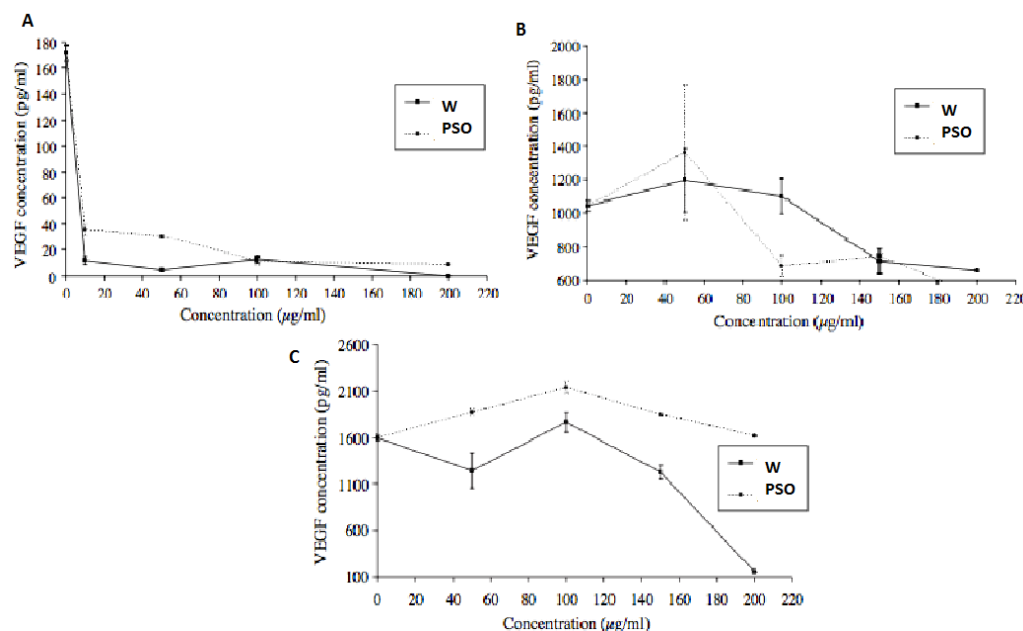
A atividade inibitória da romã frente à formação de novos vasos sanguíneos foi demonstrada por uma sequência de experimentos conduzidos em células mamárias de diferentes linhagens, tratadas com derivados da romã (16). Uma regulação negativa na expressão de VEGF, pró-angiogênico, foi fortemente verificada em células não cancerígenas MCF-10A (FIG.17A), mas foi também significativa em células cancerígenas MCF-7 (E+) (FIG.17B). Tal efeito foi maior no tratamento com polifenóis de W ou com PSO (extraído por fluido supercrítico), em relação ao com polifenóis P. A regulação negativa na expressão de VEGF foi verificada ainda em células MDA-MB-231 (E-) (FIG.17C), mas apenas com W. Outro ponto verificado no estudo foi a regulação positiva e dose dependente de MIF (Fator Inibitório de Migração de Macrófagos), de ação antiangiogênica, em células MDA-MB-231 tratadas com W e PSO (FIG.16).

**FIGURA 16** - Efeito dos polifenóis do suco fermentado de romã (W) e do óleo da semente de romã (PSO) no aumento da expressão de MIF, em MDA-MB-231.



FONTE: Toi et al., 2003

**FIGURA 17** - Efeito dos polifenóis do suco fermentado de romã (W) e do óleo da semente de romã (PSO) na redução da expressão de VEGF em células (A) MCF-10A, (B) MCF-7 e (C) MDA-MB-231



FONTE: Toi et al., 2003

Como mencionado anteriormente, o ácido púnico é estruturalmente similar ao ácido conjugado linoleico (CLA), o qual demonstra atividade antitumoral (15), como a antiangiogênica. Esta é atribuída à ação inibitória do CLA sobre a síntese de prostaglandinas via inibição da COX-2, gerando com isso modulação negativa na produção de VEGF e modulação positiva de MIF (16). Acredita-se que o ácido púnico possa agir desta mesma forma, devendo-se a ele, ao menos em parte, a atividade antiangiogênica do óleo da romã.

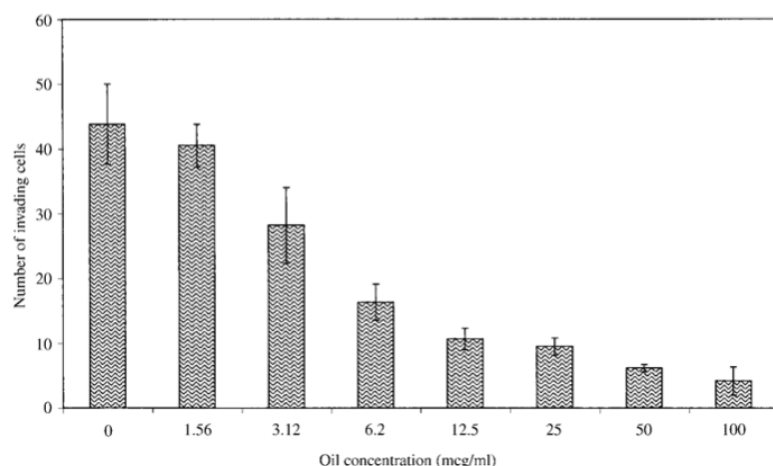
Estando a angiogênese atrelada a via de sinalização do NF-kB e, sendo este um fator de transcrição intimamente relacionado ao estresse oxidativo, acredita-se também que o efeito antiangiogênico da romã envolva a modulação negativa de NF-kB (16), sobretudo pela fração relativa a W, tão rica em polifenóis de efeito antioxidante.

#### 4.2.4.5. Atividade Anti-invasiva

Para avaliar a atividade inibitória da invasão celular, estudou-se a passagem de células mamárias cancerígenas MCF-7 através de uma membrana de

Matrigel™ artificial, tratadas ou não (controle negativo) com PSO, prensado das sementes (15). Utilizou-se como indutor de invasão, fator de crescimento de hepatócitos (10ng/ml). Os resultados, após 72h de reação, demonstram que o PSO é capaz de reduzir significativamente a capacidade invasiva de células cancerígenas, mesmo a baixas concentrações. Os autores relacionam tal efeito à inibição da enzima COX-2 por parte de PSO.

**FIGURA 18** - Atividade anti-invasiva do óleo de semente de romã (PSO) em células MCF-7



FONTE: Kim et al., 2002

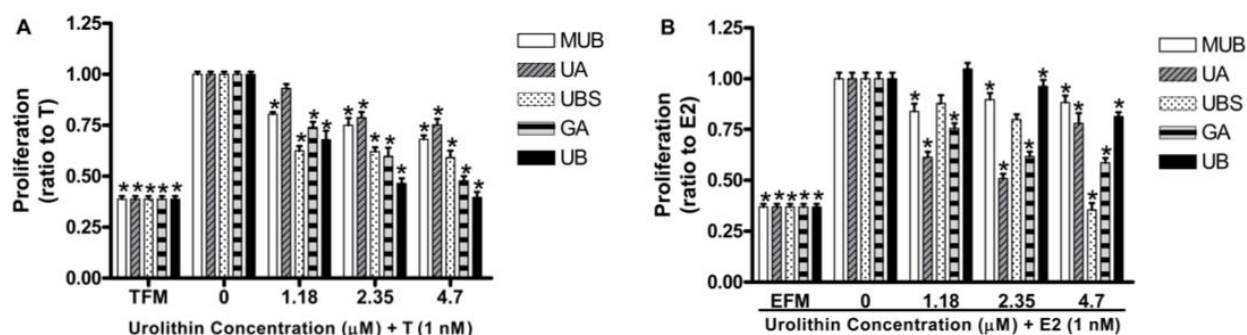
#### 4.2.4.6. Atividade Inibidora da Aromatase

A aromatase é a enzima envolvida na síntese do hormônio estrógeno, sendo um importante alvo para a modulação do câncer de mama estrógeno dependente. Um estudo foi conduzido com microsomos de placenta humana, tratados com polifenóis de W (da expressão do fruto) e de P (da decocção do pericarpo), para verificar o efeito inibitório destes sobre a aromatase, utilizando-se como controle positivo aminoglutatimida, conhecido inibidor da enzima (15). A relação entre as substâncias testadas e o controle positivo foi de 0.02 µg/ml de polifenóis da romã para 100 µM de aminoglutatimida. Os resultados demonstraram uma potência inibitória enzimática dos polifenóis de W equivalente a 51% da potência da aminoglutatimida, enquanto que para os polifenóis de P, essa mesma potência foi de 24%.

Em estudo semelhante, com microsomos de placenta humana, testou-se a atividade anti-aromatase individual de compostos elagitanínicos isolados da romã

(68). Os que demonstraram maior atividade inibitória foram urolitina A e B (UA e UB), as formas metiladas das urolitinas (MUA e MUB), a forma sulfatada de UB (UBS) e a forma acetilada de UA (AUB). Procedeu-se à investigação desta mesma atividade em células cancerígenas MCF-7. Aqui, apenas UB e o ácido gálico (GA) mostraram-se bons inibidores da aromatase, o que sugere que, possivelmente, os compostos ativos no ensaio anterior em microsossomos não foram bem absorvidos pelas células. Também se avaliou a ação antiproliferativa dos compostos em questão em células MCF-7, tendo-se uma cultura com testosterona e outra com estrógeno adicionados. No meio rico em testosterona, apenas UB e GA mostraram-se eficazes na redução da taxa proliferativa celular e, no meio rico em estrógeno, UBS e GA mostraram-se bons agentes antiproliferativos. Os autores sugerem que UB tenha sua capacidade antiproliferativa atrelada à inibição da enzima aromatase, pois quando já se tem estrógeno em cultura, sua ação é insignificante. GA, por outro lado, mostrou-se bom agente em ambos os meios, devendo agir tanto pela inibição da enzima, quanto por meios paralelos como, talvez, antagonizando o receptor de estrógeno.

**FIGURA 19** - Atividade antiproliferativa de compostos isolados da romã em células MCF-7, em meios contendo (A) testosterona e (B) estrógeno



FONTE: Adams et al., 2010

#### 4.2.4.7. Atividade Inibitória da 17β-hidroxiesteroide-desidrogenase

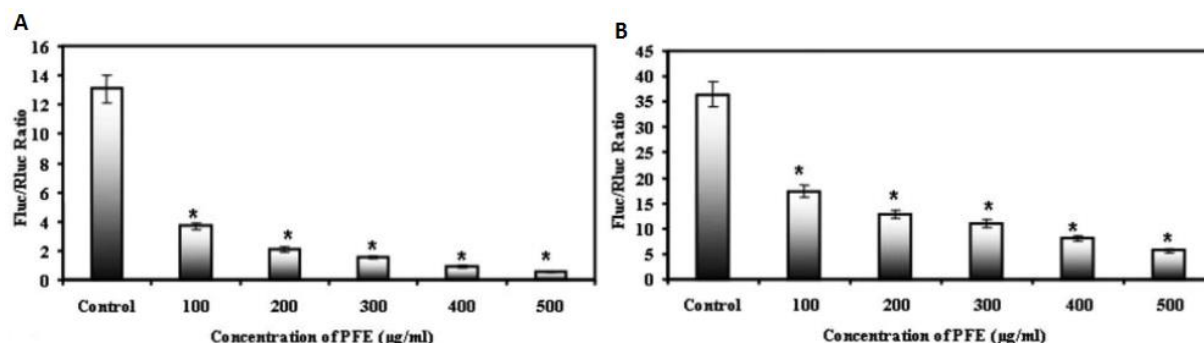
A inibição da enzima 17β-hidroxiesteroide-desidrogenase foi testada com os polifenóis de W e de P e com PSO, obtidos por expressão do fruto, decocção do pericarpo e prensagem das sementes, respectivamente (15). Como controle positivo, usou-se EM-251 (16-α-bromopropil-estradiol), inibidor da enzima estudada, e como

controle negativo, DMSO (dimetilsulfóxido). Verificou-se que a 100 µg/ml apenas PSO foi capaz de inibir a enzima, em cerca de 30%, enquanto que a 1000 µg/ml, todas as frações testas exibiram efeito inibitório, de 60% (P) a 80% (PSO).

#### 4.2.4.8. Atividade Moduladora de Genes

A ativação constitutiva de NF-κB em células ER(-), MDA-231 e SUM 149 foi revertida pelo tratamento com PFE. O efeito em questão foi concentração dependente, e foi verificado utilizando-se células MCF-10A, não cancerígenas, como controle (14). No mesmo estudo, os autores investigaram se tal supressão da ativação de NF-κB relacionava-se a uma menor expressão celular das subunidades que o constituem, p65 e p50. Como esperado, verificou-se que PFE causou modulação negativa dos componentes, em especial de p50, sendo que p65 foi afetado apenas a concentrações mais elevadas de PFE.

**FIGURA 20** - Ação da combinação de suco fermentado e de óleo de semente de romã (PFE) na supressão da ativação de NF-κB, em células MDA 231 e SUM 149

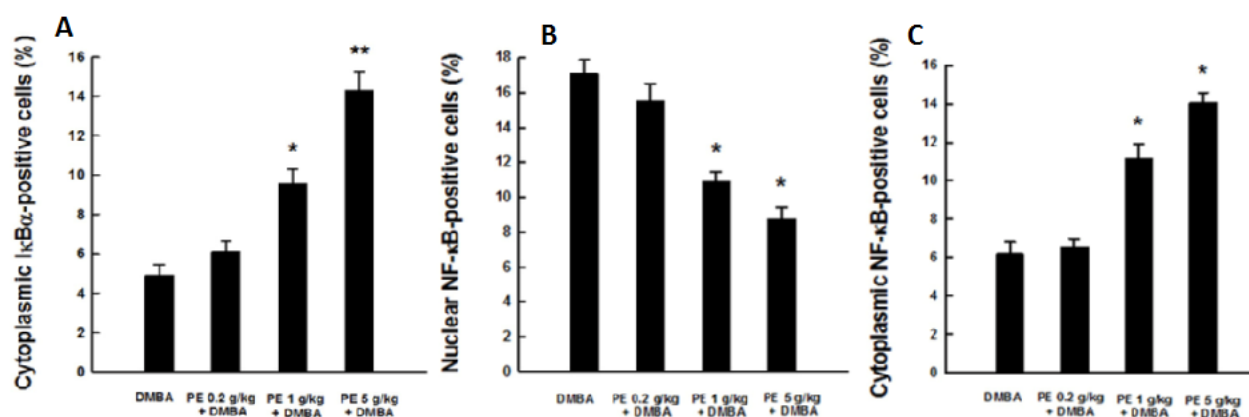


FONTE 29: Khan et al., 2009

Efeito similar pôde ser verificado agora in vivo, em ratos com carcinogênese mamária induzida por DMBA (34). No estudo, os animais foram tratados com uma emulsão (PE) a base de extrato aquoso fermentado (suco e casca de romã, e folha e flor de romãzeira) e de óleo de semente do fruto. O efeito observado foi aumento na expressão de NF-κB p65 no citossol (FIG.21C), e redução de sua expressão no núcleo (FIG.21B), indicando supressão de sua ativação. Também foi verificado aumento na expressão citossólica da subunidade inibitória de NF-κB, IκBα (FIG.21A).

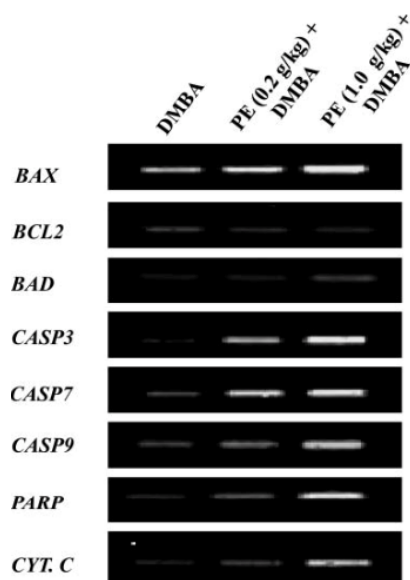
Ainda, reduzida expressão da enzima COX-2 foi constatada, em comparação com o grupo controle. Os efeitos mencionados ocorreram moderadamente a uma concentração de 1g/kg e acentuadamente a 5 g/kg de emulsão a base de romã. O tratamento com PE também revelou modulação de genes envolvidos no processo apoptótico (FIG.22), com elevação da expressão da proteína Bax (FIG.23A) e redução da expressão da proteína Bcl2 em células tumorais (FIG.23B) (69).

**FIGURA 21** - Células imunopositivas para (A) I $\kappa$ B $\alpha$  citossólico, (B) NF- $\kappa$ B nuclear e (C) NF- $\kappa$ B citossólico, em grupo controle e em grupos tratados com diferentes concentrações de emulsão à base de romã (PE)



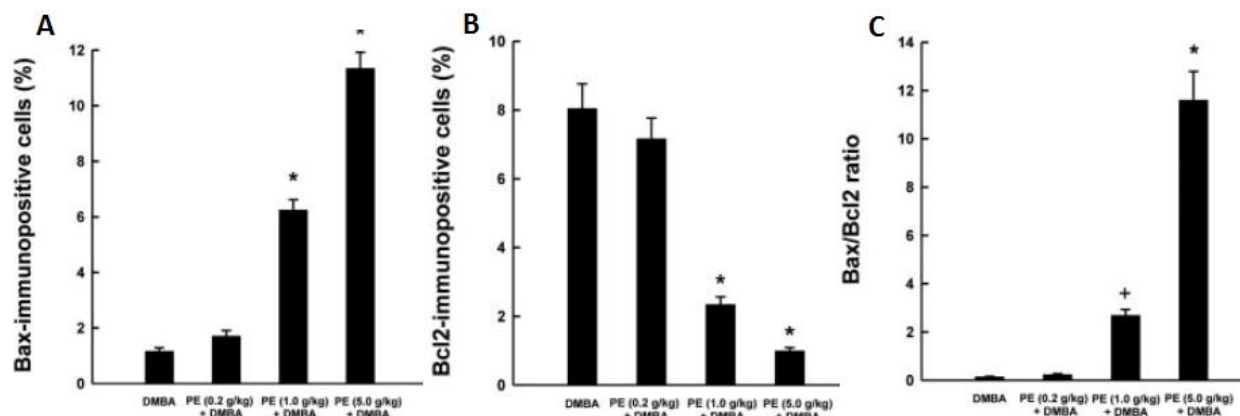
FONTE: Mandal et al., 2017

**FIGURA 22** - Modulação a nível transcricional (de mRNA) de genes envolvidos no processo apoptótico



FONTE: Bishayee, A. et al., 2016

**FIGURA 23** - Células imunopositivas para (A) Bax e (B) Bcl2 e (C) relação Bax/Bcl2, em grupo controle e em grupos tratados com emulsão a base de romã (PE)

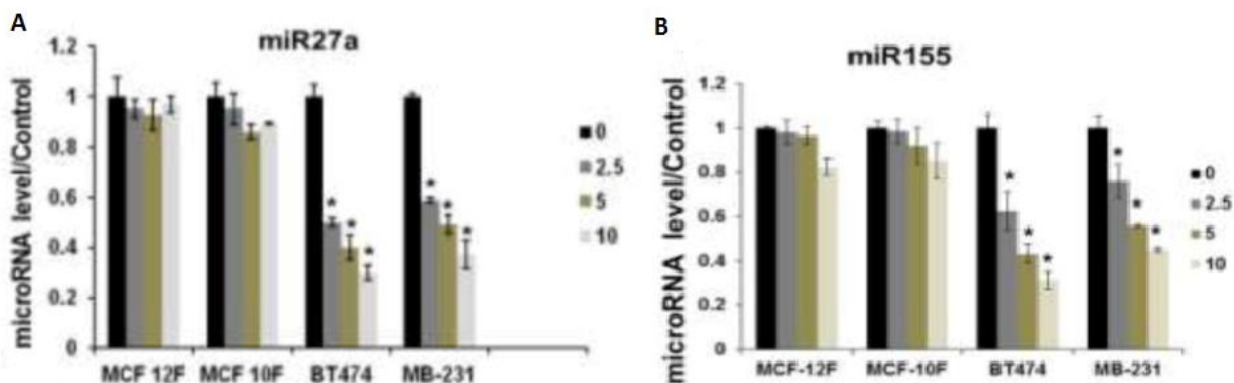


FONTE: Bishayee, A. et al., 2016

O estudo em questão revela o envolvimento da via intrínseca apoptótica (via mitocondrial). Esta é regulada pelas proteínas da família Bcl-2, reguladoras da permeabilidade mitocondrial. Enquanto as proteínas Bax e Bad, pró-apoptóticas, agem de modo a causar poros na membrana mitocondrial, permitindo a liberação do citocromo c (Cyt c), a proteína Bcl-2 age de forma contrária, sendo antiapoptótica. A liberação de Cyt c leva à ativação de efetores da apoptose, como as caspases casp-3, casp-7 e casp-9 (69).

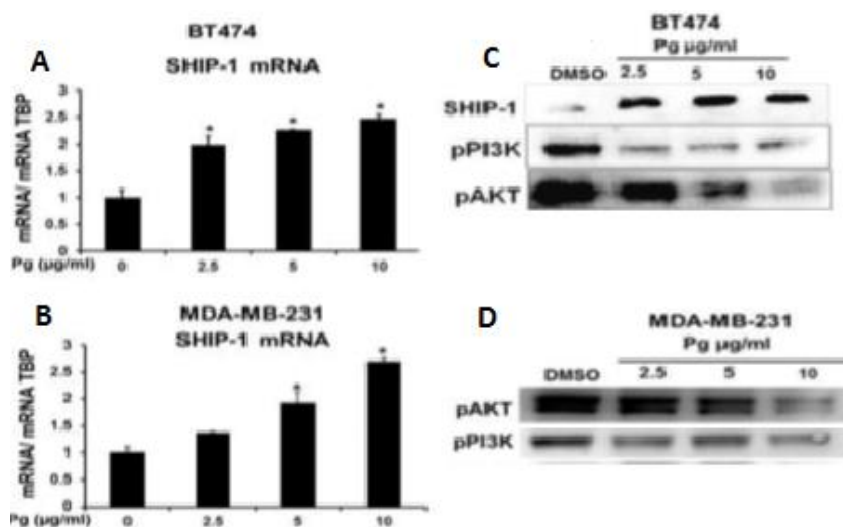
O mecanismo de ação pelo qual a romã exerce sua atividade citotóxica foi estudado pelo tratamento de células mamárias humanas cancerígenas BT474 e MDA-MB-231 com extrato metanólico de polifenóis do suco de romã (Pg), avaliando-se também seu efeito em células não cancerígenas, MCF-10F e MCF-12F (70). Constatou-se decréscimo na expressão de miR-27A e miR-155, microRNAs superexpressos em células cancerígenas, sendo que este efeito não foi verificado nas células normais. Nas células cancerígenas, houve regulação positiva da proteína repressora de Sp, ZBTB10, e dos fatores VEGF e VEGFR-1 (receptor de VEGF), além de regulação negativa na expressão das proteínas Sp1, Sp3 e Sp4, e de seus mRNAs. De forma concordante com a menor expressão de miR-155, houve maior expressão de SHIP-1, e menor expressão das proteínas PI3K e AKT. Por fim, a supressão da ativação de NF-KB foi constatada, o que foi relacionado à capacidade do extrato de romã em reduzir a expressão tanto de miR-27a quanto de miR-155.

**FIGURA 24** – Ação dos polifenóis do suco de romã (Pg) na expressão de (a) miR27a e (b) miR155



FONTE: Banerjee et al., 2012

**FIGURA 25** - Ação dos polifenóis do suco de romã (Pg) na modulação do mRNA de SHIP-1 em células (a) BT474 e (b) MDA-MB-231, e na expressão das proteínas SHIP-1, PI3K e AKT em células (c) BT474 e (d) MDA-MB-231

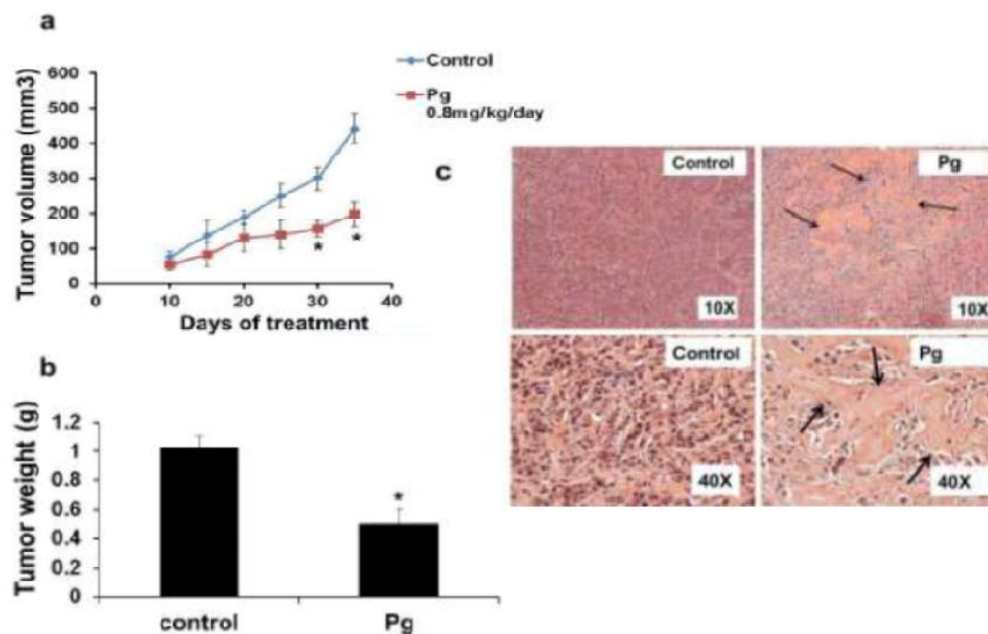


FONTE: Banerjee et al., 2012

Aqui novamente com um ensaio *in vivo*, os mesmos autores verificaram o efeito da romã em ratas fêmeas receptoras de células BT474 xenoenxertadas. Estas foram estudadas após tratamento com Pg, a concentrações equivalentes a 0,8 mg/kg/dia de ácido gálico, por 35 dias. Pôde-se verificar expressiva contenção de volume e peso tumoral nos animais tratados. A avaliação histopatológica revelou expressiva prevalência de lesões apoptóticas nos animais que receberam o extrato de romã,

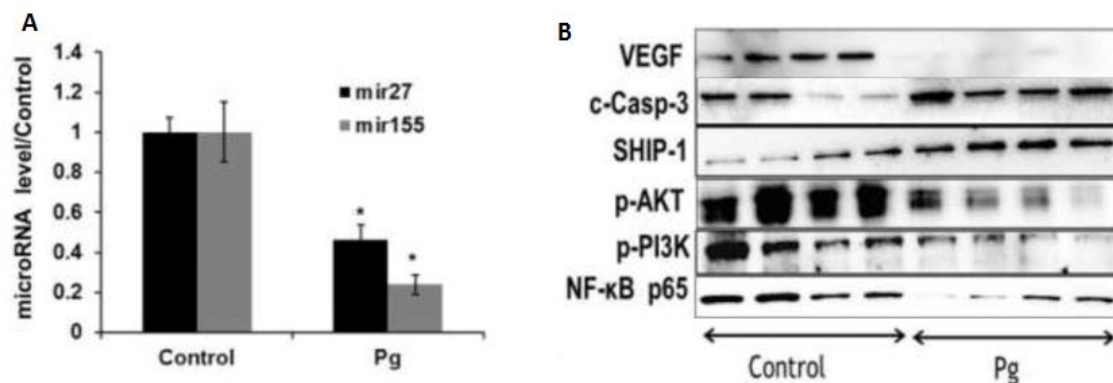
comparado ao grupo controle. Em nível de modulação genética, as mesmas verificações puderam ser feitas em relação ao estudo *in vitro* realizado pelos autores, sendo que a ativação da enzima caspase-3, envolvida na apoptose celular, foi adicionalmente constatada.

**FIGURA 26** - Contenção de (a) volume e (b) peso tumoral em animais tratados com suco de romã (Pg) e (c) prevalência de lesões apoptóticas em animais de animais controle e em tratamento



FONTE: Banerjee et al., 2012

**FIGURA 27** - Expressão de (A) mRNAs e (B) proteínas em animais tratados com polifenóis do suco de romã (Pg) e em grupo controle



FONTE: Banerjee et al., 2012

#### 4.2.5. Cinética

Os parâmetros cinéticos relativos à ingestão de frações da romã são importantes de serem investigados para que se compreenda a potencialidade de se utilizar o fruto na terapêutica humana. Tem-se que os principais polifenóis da romã são os compostos elagitaninos, os quais sofrem hidrólise no intestino delgado, liberando EA e glicose. Assim como sua absorção, a eliminação de EA ocorre de maneira rápida. Já seus metabólitos, mostram persistir no organismo por um tempo prolongado, de aproximadamente dois dias (71). Tais metabólitos são as urolitinas A e B, que derivam da biotransformação de EA pela microflora intestinal (68).

A análise da biodisponibilidade de EA e seus metabólitos foi feita por estudo da administração oral de 180 ml do suco comercial de romã (Pom Wonderful) em 18 voluntários. O suco apresenta em sua constituição 318 mg de punicalaginas e 12 mg de EA livre (71). Os seguintes dados foram obtidos:

**TABELA 3** - Parâmetros cinéticos de plasma e urina relativos ao ácido elágico (EA) e seus metabólitos, após ingestão de suco de romã comercial

| <b>Análise de Ácido Elágico no Plasma</b>                   |                                       |
|---|---------------------------------------|
| <b>Parâmetros</b>   | <b>Valores</b>                        |
| Concentração Máxima ( $C_{max}$ ), após 1h                  | 0.06 +- 0.01 mmol/L                   |
| Área sob a Curva (AUC)                                      | 0.17 +- 0.02 (mmol h) L <sup>21</sup> |
| Tempo para Concentração Máxima ( $T_{max}$ )                | 0.98 +- 0.06 h                        |
| Tempo de Meia Vida ( $T_{1/2E}$ )                           | 0.71 +- 0.08 h                        |
| <b>Análise de Urolitinas no Plasma</b>                      |                                       |
| <b>Parâmetros</b>   | <b>Valores</b>                        |
| Concentração Máxima ( $C_{max}$ ) UA, após 6h               | 0.14 +- 0.01 mmol/L                   |
| Concentração Máxima ( $C_{max}$ ) UB, após 6h               | 0.01 +- 0.01 mmol/L                   |
| <b>Análise do Ácido Elágico e seus Metabólitos na Urina</b> |                                       |
| <b>Composto</b>   | <b>Deteção</b>                        |

|               |  |
|---------------|--|
| Ácido Elágico | Em 5 de 18 indivíduos, 1 <sup>a</sup> coleta de 12h  |
| Urolitina A   | Em 11 de 18 indivíduos, 2 <sup>a</sup> coleta de 12h e em 16 de 18 indivíduos, após 24h do consumo |
| Urolitina B   | Em 3 de 18 indivíduos, 2 <sup>a</sup> coleta de 12h e em 5 de 18 indivíduos, após 24h do consumo   |

FONTE: Seeram, N. P. et al., 2006

O metabolismo dos compostos elagitaninos foi avaliado também através do consumo de três diferentes formulações de extrato de romã: extrato polifenólico em pó (POMxp), extrato polifenólico líquido (POMxl) e suco comercial extraído do fruto inteiro (72). Tais preparações revelaram um conteúdo polifenólico equivalente a 755mg, 776mg e 857mg de GA, respectivamente. Contou-se com 16 voluntários, que tomaram as formulações uma por vez, com intervalo de uma semana entre cada. Para as formulações líquidas, observou-se rápida absorção e eliminação de EA, que teve máxima concentração dentro de 1h após administração das preparações. Já para POMxp, EA mostrou ter absorção mais demorada, tendo dois picos de concentração máxima, 2h e 3h após consumo da preparação. Apesar desta diferença entre fórmulas líquidas e em pó, a área sob a curva dos três casos foi próxima, indicando equivalência na biodisponibilidade de EA. Dentre os metabolitos evidenciados na urina dos participantes, o principal foi a urolitina A glucuronizada (UAG), eliminada dentro de 48h, para todas as formulações.

#### 4.2.6. Toxicidade

Foi conduzido um estudo (73), no qual se avaliou a toxicidade do extrato de romã (padronizado a 30% de punicalagina) em ratos. Para avaliar-se a toxicidade aguda, fez-se administração oral do extrato de romã por 14 dias. Durante esse período, não foi verificado qualquer sinal de toxicidade, assim como nenhuma anormalidade histopatológica após eutanásia dos animais, ao 15o dia do estudo.

O estudo de toxicidade subcrônica foi conduzido durante 90 dias, sendo que todos os animais participantes mantiveram-se vivos até o termino do estudo

recebendo uma dose de 600 mg/kg/dia do extrato (74). Os parâmetros avaliados foram ganho/perda de peso, hábitos alimentares, tendências comportamentais e parâmetros clínicos, os quais envolveram análise urinária, sorológica e hematológica. Nenhum efeito adverso ao tratamento foi estabelecido em relação a tal análise. Modificações em alguns parâmetros hematológicos (redução do volume celular e do volume corpuscular médio e aumento da concentração corpuscular de hemoglobina) foram observadas. Tais parâmetros, no entanto, mantiveram-se próximos aos do grupo controle. Alterações de parâmetros sorológicos, como redução de ALT, AST e ALP, foram constatadas. O aumento de tais parâmetros é indicativo de disfunção hepática, enquanto que a redução destes não foi tida como de significância toxicológica. Por último, verificou-se aumento de sódio, potássio e fósforo, apenas em ratas fêmeas, o que não refletiu em nenhuma alteração histopatológica renal. As variações verificadas foram consideradas acidentais, e não efeitos adversos ao tratamento, por um ou mais dos seguintes motivos: não fugiram dos valores de normalidade, foram limitadas apenas a um sexo, ou não foram sustentadas por variações histopatológicas.

Outro estudo foi conduzido, para investigar a segurança de um suplemento nutricional polifenólico à base de extrato concentrado de romã (75), que consiste na combinação de oligômeros de GA, EA e glicose (77%), punicalaginas e punicalinas (19%) e EA livre (4%). O perfil polifenólico do suplemento corresponde a 61% de equivalentes de GA. Neste estudo, o consumo do suplemento não levou ao descontinuação de nenhum participante por motivos de efeitos adversos, durante os 28 dias em que foi conduzido. Nenhuma alteração foi registrada, relacionada a testes laboratoriais bioquímicos, hematológicos e de urina, assim como não houve nenhuma reação alérgica por parte dos 86 participantes. O estudo concluiu ser seguro o consumo de equivalentes de GA, em doses de até 1420mg/dia.

#### **4.2.7. Interações Medicamentosas**

A romã contém compostos que interagem com as enzimas do Citocromo P450, tendo o suco do fruto mostrado forte ação inibidora das enzimas CYP2C9 e CYP3A em modelo microsomal hepático humano. A tolbutamida, metabolizada por CYP2C9

(76) e a carbamazepina, metabolizada por CYP3A (77), tiveram biodisponibilidade aumentada significativamente em ratos tratados com suco de romã. Deve, portanto, ser considerado com cautela o consumo de romã por pacientes que façam uso de fármacos metabolizados por estas enzimas.

## 5. DISCUSSÃO

Diversos estudos foram conduzidos nas duas últimas décadas, com o intuito de investigar, aprofundar e estabelecer a relação da romã com a terapia do câncer de mama. Os trabalhos aqui reunidos evidenciam diversas formas de atuação do fruto e de seus componentes neste âmbito, algumas das quais já possuem um mecanismo de ação estabelecido, enquanto que outras ainda restam sem a compreensão deste. A atividade antitumoral da romã se manifesta por meios como antiproliferativos (15), pró-apoptóticos (14), antiangiogênicos (16) e anti-invasivos (15), sendo que a modulação de diversos genes (15, 34, 69, 70) e enzimas (15, 68) configura o mecanismo de ação das frações do fruto. Considerando-se tais frações, vê-se pelos estudos reportados que todas mostram algum tipo de atividade frente ao câncer, o que leva ao entendimento de que mais de um composto relaciona-se aos mecanismos antitumorais. Destacam-se as atividades do suco fermentado de romã (W) e do óleo da semente de romã (PSO). Estes se mostraram particularmente envolvidos na inibição das enzimas aromatase, COX-2 e 17 $\beta$ -hidroxiesteróide-desidrogenase e na modulação de NF-kB, que participa de diversas respostas tumorais, e de uma série de outros fatores envolvidos em processos inflamatórios e oxidativos, angiogênicos (VEFG e MIF), apoptóticos (Bcl-2, Bax, Bad e caspases), proliferativos (TGF- $\beta$ ), entre outros. Em relação aos componentes químicos da romã, torna-se difícil atribuir papéis quanto às atividades verificadas. No entanto, é clara a importância dos compostos polifenólicos, como os elagitaninos presentes, sobretudo no pericarpo da romã (52). Destaca-se aqui o ácido elágico (EA) e seus metabólitos, de fortes evidências antiproliferativas e pró-apoptóticas, atuando na via de sinalização TGF- $\beta$ /Smads (62). Já no óleo da semente de romã (PSO), evidencia-se a importância do ácido púnico (AP) e do ácido ursólico (AU) (15, 64), com indícios de atuação nos processos apoptótico (AP e AU) e angiogênico (AP). Tendo-se atividades antitumorais

relacionadas a mais que uma substância, compreende-se que a capacidade da romã na terapêutica do câncer de mama é potencializada pela utilização do fruto como um todo, ou ainda por frações deste (pericarpo, suco ou semente). Assim, o uso de seus compostos isolados, embora traga benefícios, exclui a ação sinérgica que parece existir entre os componentes da romã.

Analisando-se a toxicidade relativa ao consumo da romã, não há evidências significativas de reações adversas (73, 74, 75) Tal ponto é importantíssimo, pois tão fundamental quanto a eficácia de uma terapia é a segurança desta. Já em relação às interações medicamentosas envolvendo o fruto, algumas podem ser levantadas, devido ao fato da romã interagir com as enzimas do Citocromo P450, de modo que a possibilidade de utilização da romã para fins terapêuticos deve ser precedida por uma avaliação do histórico medicamentoso do paciente.

Por fim, cabe considerar-se como se pode dar a aplicação da romã no campo terapêutico do câncer de mama. Os benefícios são claros, tanto para a prevenção quanto para o tratamento da patologia. Os estudos conduzidos neste campo são, no entanto, ainda muito restritos a ensaios in vitro ou em animais, sendo que a resposta metabólica humana frente ao consumo da romã ainda necessita de maior sustentação. Ressalta-se aqui a necessidade de maiores investigações sobre como se dá o metabolismo da romã no organismo humano, algo necessário para que se entenda como pode ser feito o uso farmacêutico do fruto.

## **6. CONCLUSÕES**

Em um momento histórico no qual a população acometida pelo câncer é imensa, e no qual, ainda que com avanços, a terapia oncológica é de certa forma tão impotente, é curioso pensar no poder imenso que um único fruto concentra em si. Apesar de um consumo não tão inserido nos hábitos brasileiros e de um custo relativamente alto, a contribuição que a romã pode trazer ao cenário do câncer é gigantesca. Sendo esta uma patologia de tamanha complexidade, torna-se necessário um agente terapêutico que não se limite a atuar apenas sobre um mecanismo tumoral. A romã é extremamente valiosa neste aspecto, pois age contornando mais de um mecanismo de sobrevivência e desenvolvimento da célula cancerígena, como visto

pelas inúmeras atividades antitumorais demonstradas, permitindo assim otimização da terapia. Para sua utilização neste campo, é necessário aprofundar o conhecimento que se tem das atividades de cada um de seus componentes e, ainda mais importante, esclarecer a que concentrações cada um destes traz benefícios à terapêutica. Para tal, deve-se conduzir um maior número de estudos em seres humanos.

Fundamental é estabelecer como estruturar uma terapia oncológica com base na romã. A simples recomendação de inserção do fruto na dieta pode não ser ideal, pois é imprescindível que se ofereça uma terapia padronizada. Já a utilização de seus extratos em formas farmacêuticas, é algo a ser explorado e levado à frente, para fins tanto preventivos quanto curativos. Ainda que adjuvante à terapia convencional, o uso da romã pode ser interessante, por talvez permitir certa redução de dose dos fármacos de uso padrão, reduzindo seus efeitos adversos e potencializando a eficácia terapêutica, rendendo melhora na qualidade de vida do paciente.

Da mesma forma que a escolha por hábitos saudáveis no estilo de vida individual é fundamental para se afastar as mais diversas doenças, fundamental é aplicar esta mesma escolha no âmbito da terapia, explorando opções terapêuticas de baixa toxicidade e naturalmente disponíveis.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- (1) DE KOK, T. M. C. M., et al. Antioxidative and antigenotoxic properties of vegetables and dietary phytochemicals: The value of genomics biomarkers in molecular epidemiology. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 54, p. 208–217, 2010.
- (2) LI, Y. et al. Dietary Natural Products for Prevention and Treatment of Breast Cancer. **Nutrients**, v. 9, n. 7, p. 728, 2017.
- (3) FITZMAURICE C. et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015. **JAMA Oncol.**, v. 3, n. 4, p. 524-548, 2017.
- (4) MARAFON C. M. Genética do Câncer de Mama Hereditário. **Journal of Medical and Biological Sciences**, v. 6, n. 1, p. 86-87, 2007.
- (5) VIEIRA, S. C. et al. **Oncologia Básica**. 1. ed. Teresina, PI: Fundação Quixote, 2012.
- (6) SIDDIQUI, M. and RAJKUMAR, S. V. The High Cost of Cancer Drugs and What We Can Do About It. **Mayo Clin Proc.**, v. 87, n. 10, p. 935-943, 2012.
- (7) RASHID, N. et al. Economic burden related to chemotherapy-related adverse events in patients with metastatic breast cancer in an integrated health care system. **Breast Cancer (Dove Med Press)**, v. 8, p. 173–181, 2016.
- (8) LI, Y. et al. Dietary Natural Products for Prevention and Treatment of Breast Cancer. **Nutrients**, v. 9, n. 7, p. 728, 2017.
- (9) ADAMS, L. S. et al. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, n. 3, p. 980–985, 2006.
- (10) SEERAM, N. P. et al. Pomegranate ellagitannin-derived metabolites inhibit prostate cancer growth and localize to the mouse prostate gland. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 19, p. 7732–7737, 2007.
- (11) JEUNE, M. A. KUMI-DIAKA J, BROWN J. Anticancer activities of pomegranate extracts and genistein in human breast cancer cells. **Journal of Medical Food**, v. 8, n. 4, p. 469-475, 2005.
- (12) AFAQ, F. et al. Anthocyanin-and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. **Int J Cancer**, v. 113, n. 3, p. 423-433, 2005.
- (13) KAWAI S. e LANSKY E. P. Differentiation-promoting activity of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. **Journal of Medical Food**, v. 7, n. 1, p. 13-18, 2004.
- (14) KHAN, G. N. et al. Pomegranate fruit extract impairs invasion and motility in human breast cancer. **Int. Cancer Therapies**, v. 8, n. 3, p. 242–53, 2009.
- (15) KIM, N. D. et al. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 71, n. 3, p. 203–217, 2002.
- (16) TOI, M. et al. Preliminary studies on the anti-angiogenic potential of pomegranate fractions in vitro

and in vivo. **Angiogenesis**, v. 6, n. 2, p. 121–128, 2003.

(17) KHAN, N., AFAQ, F., MUKHTAR, H. Cancer Chemoprevention Through Dietary Antioxidants: Progress and Promise. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 3, p. 475-510, 2008.

(18) HANAHAN, D. e WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cancer Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

(19) SHERR, C. J. e MCCORMICK, F. The RB and p53 Pathways in Cancer. **Cancer Cell**, v. 2, n. 2, p. 103–112, 2002.

(20) BLASCO, M. A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. **Nat. Rev. Genet.**, v. 6, n. 8, p. 611–622, 2005.

(21) BAERISWYL, V. e CHRISTFORI, G. The angiogenic switch in carcinogenesis. **Semin Cancer Biol.**, v. 19, n. 5, p. 329-37, 2009.

(22) BERX, G. e van ROY, F. Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 1, n. 6, a003129, 2009.

(23) PINHO, A. C. e de ASSIS, M. Câncer de Mama: O que a Mulher Precisa Saber? **Correio Braziliense**. Artigo de Opinião, 31 de outubro, 2016.

(24) INCA. **Câncer de Mama**. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home+/mama/cancer\\_mama](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home+/mama/cancer_mama)>. Acesso em: 12 de junho, 2018.

(25) INCA. **Estimativa 2018: Incidências de câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-taxas-brasil.asp>>. Acesso em: 14 de junho, 2018.

(26) IARC/WHO. **Cancer today**. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/home>. Acesso em: 20 ago, 2018.

(27) INCA. **Câncer de mama: Fatores de Risco**. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/fatores\\_de\\_risco\\_1](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/fatores_de_risco_1)>. Acesso em: 15 de junho, 2018.

(28) MA, H., BERNSTEIN, L., PIKE, M. C., URSIN, G. Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies. **Breast Cancer Res.**, v. 8, n. 4, p. R43, 2006.

(29) INUMARU, L. E., da SILVEIRA, E. A. e NAVES, M. M. V. Fatores de risco e de proteção para câncer de mama: uma revisão sistemática. **Cad. Saúde Pública**, v. 27, n. 7, p. 1259-1270, 2011.

(30) MCPHERSON, K., STEEL, C. M. e DIXON, J. M. Breast cancer: epidemiology, risk factors, and genetics. **BMJ**, v. 321, n. 7261, p. 624–628, 2000.

(31) ECHEBERRÍA, M. L. et al. Polyphenols as Promising Drugs against Main Breast Cancer Signatures. **Antioxidants**, v. 6, n. 4, p. 88, 2017.

(32) LI, X. et al. MicroRNA-27a Indirectly Regulates Estrogen Receptor {alpha} Expression and Hormone Responsiveness in MCF-7 Breast Cancer Cells. **Endocrinology**, v. 151, n. 6, p. 2462–2473, 2010.

(33) STURGEON, S. e RONNENBERG, A. Pomegranate and breast cancer: possible mechanisms of prevention. **Nutrition Reviews**, v. 68, n. 2, p. 122–128, 2010.

- (34) MANDAL, A., BHATIA, D., BISHAYEE, A. Anti-Inflammatory Mechanism Involved in Pomegranate-Mediated Prevention of Breast Cancer: the Role of NF- $\kappa$ B and Nrf2 Signaling Pathways. **Nutrients**, v. 9, n. 5, p. 436, 2017.
- (35) SETHI, G., SUNG, B. e AGGARWAL, B. B. Nuclear factor- $\kappa$ B activation: From bench to bedside. **Exp. Biol. Med.**, v. 233, n. 1, p. 21–31, 2008.
- (36) WANG, D. e DUBOIS, R. N. Prostaglandins and cancer. **Gut**, v. 55, n. 1, p. 115-122, 2006.
- (37) BRASIL. PORTARIA CONJUNTA Nº 04, DE 23 DE JANEIRO DE 2018. Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Carcinoma de Mama. Ministério da Saúde Secretaria de Atenção à Saúde e Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Disponível Em: <[Http://Portalms.Saude.Gov.Br/Protocolos-E-Diretrizes](http://Portalms.Saude.Gov.Br/Protocolos-E-Diretrizes)>. Acesso Em: 20 de junho, 2018.
- (38) Sumário Executivo. Políticas e Ações para Prevenção do Câncer no Brasil: Alimentos, Nutrição e Atividade Física. Rio de Janeiro, **INCA**, 2009. 16p.inc
- (39) STEWARD, W. P. e BROWN, K. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. **British Journal of Cancer**, v. 109, n. 1, p. 1-7, 2013.
- (40) **BREAST CANCER CARE UK**. Disponível em: <<https://www.breastcancercare.org.uk/>>. Consultado em 6 de setembro, 2018.
- (41) GIORDO, P. **Prevenire e curare il cancro con l'alimentazione e le terapie naturali**. 1. ed. Florença: Terra Nuova Edizioni, 2012, 190p.
- (42) MORGAN, G., WARDT, R. e BARTON, M. The contribution of cytotoxic chemotherapy to 5-year survival in adult malignances. **Clinical Oncology**, v. 16 n. 8, p. 549-560, 2004.
- (43) INCA. **Tratamento Cirúrgico**. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=98](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=98)>. Acesso em: 12 de junho, 2018.
- (44) da SILVA, L. C. Câncer de mama e sofrimento psicológico: aspectos relacionados ao feminino. **Psicologia em Estudo**, Maringá, v. 13, n. 2, p. 231-237, 2008.
- (45) CANCER RESEARCH UK. **Breast cancer statistics**. Disponível em: <<https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/breast-cancer#heading-Five>>. Acesso em: 27 de agosto, 2018.
- (46) NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Hormone therapy to treat cancer**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/hormone-therapy>>. Consultado em 7 de setembro, 2018.
- (47) AMERICAN CANCER SOCIETY. **Hormone therapy for breast cancer** Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/hormone-therapy-for-breast-cancer.html>>. Consultado em 7 de setembro, 2018.
- (48) BANERJEE, S. et al. Pomegranate sensitizes Tamoxifen action in ER- $\alpha$  positive breast cancer cells. **J. Cell Commun. Signal**, v. 5, n. 4, p. 317–324, 2011.
- (49) The Plant List. ***Punica granatum* L.** 2013. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em: 20 fevereiro, 2018.

- (50) NEW WORLD ENCYCLOPEDIA. **Pomegranate**. 2015. Disponível em: <http://www.newworldencyclopedia.org/entry/Pomegranate>. Acesso em: 30 de maio, 2018.
- (51) ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. **Pomegranate Plant**. 2018. Disponível em: <https://www.britannica.com/plant/pomegranate>. Acesso em: 02 de junho, 2018.
- (52) LANSKY, E. P., NEWMAN, R. A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 177–206, 2007.
- (53) ISMAIL, T, SESTILI, P., AKHTAR, S. Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 397-405, 2012.
- (54) LI, Y. et al. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. **Food Chem.**, v. 96, n. 2, p. 254–260, 2006.
- (55) MARTOS, M. V. et al. Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 6, p. 635-654, 2010.
- (56) TEZCAN, F et al. Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. **Food Chem.**, v. 115, n. 3, p. 873–7, 2009.
- (57) LI Y., et al. Comparison of amino acid profile in the juice of six pomegranate cultivars from two cultivation regions in China. **J Food Process Preserv.**, v. 41, n. 5, e13197, 2017.
- (58) MIRDEHGHAN, S. H. e RAHEMI, M. Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. **Sci Hort.**, v. 111, n. 2, p. 120–127, 2007.
- (59) MEHTA, R., LANSKY, E.P., 2004. Breast cancer chemopreventive properties of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in a mouse mammary organ culture. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 4, p. 345–348, 2004.
- (60) SEIDI, K. et al. Anti Tumoral Properties of *Punica granatum* (Pomegranate) Seed Extract in Different Human Cancer Cells. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 17, n. 3, p. 1119-1122., 2016.
- (61) SHIRODE, A. B. et al. Antiproliferative Effects of Pomegranate Extract in MCF-7 Breast Cancer Cells are Associated with Reduced DNA Repair Gene Expression and Induction of Double Strand Breaks. **Molecular Carcinogenesis**, v. 53, n. 6, p. 458-470, 2014.
- (62) CHEN, H. S. et al. Ellagic acid induces cell cycle arrest and apoptosis through TGF-beta/Smad3 signaling pathway in human breast cancer MCF-7 cells. **Int. J. Oncol.**, v. 46, n. 4, p. 1730–1738, 2015.
- (63) de CAESTECKER, M. P., PIEK, E. e ROBERTS, A. B. Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer. **J Natl Cancer Inst.**, v. 92, n. 17, p. 1388-1402, 2000.
- (64) KASSI, E. et al. Ursolic Acid Triggers Apoptosis and Bcl-2 Downregulation in MCF-7 Breast Cancer Cells. **Cancer Investigation**, v. 27, n. 7, p. 723–733, 2009.
- (65) KHAN, H. Y. et al. Plant polyphenol induced cell death in human cancer cells involves mobilization of intracellular copper ions and reactive oxygen species generation: A mechanism for cancer chemopreventive action. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 58, n. 3, p. 437–446, 2014.

- (66) ZARFESCHANY, A., ASGARY, S., JAVANMARD, S. H. Potent health effects of pomegranate. **Adv Biomed Res.**, v. 3, n. 100, 2014.
- (67) IGARASHI, M. e MIYAZAWA, T. Newly recognized cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on cultured human tumor cells. **Cancer Lett.**, v. 148, n. 2, p. 173–179, 2000.
- (68) ADAMS, L. S. et al. Pomegranate ellagitannin-derived compounds exhibit antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells in vitro. **Cancer Prev Res.**, v. 3, n. 1, p. 108–113, 2010.
- (69) BISHAYEE, A. et al. Pomegranate exerts chemoprevention of experimentally induced mammary tumorigenesis by suppression of cell proliferation and induction of apoptosis. **Nutrition and Cancer**, v. 68, n. 1, p. 120–130, 2016.
- (70) BANERJEE, N. et al. Cytotoxicity of Pomegranate Polyphenolics in Breast Cancer Cells in Vitro and Vivo - Potential Role of miRNA-27a and miRNA-155 in Cell Survival and Inflammation. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 136, n. 1, p. 21–34, 2012.
- (71) SEERAM, N. P. et al. Pomegranate Juice Ellagitannin Metabolites Are Present in Human Plasma and Some Persist in Urine for Up to 48. **J Nutr.**, v. 136, n. 10, p. 2481–2485, 2006.
- (72) SEERAM, N. P. et al. Pomegranate Juice and Extracts Provide Similar Levels of Plasma and Urinary Ellagitannin Metabolites in Human Subjects. **J Med Food**, v. 11, n. 2, p. 390–394, 2008.
- (73) PATEL, C. et al. Safety assessment of pomegranate fruit extract: Acute and subchronic toxicity studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2728–2735, 2008.
- (74) HEBER, D. et al. Safety and antioxidant activity of a pomegranate ellagitannin-enriched polyphenol dietary supplement in overweight individuals with increased waist size. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 24, p. 10050–10054, 2007.
- (75) DAMIANI, E. et al. A. Pomegranate (*Punica granatum*) allergy: clinical and immunological findings. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 103, n. 2, p. 178–180, 2009.
- (76) NAGATA, M. et al. Effects of pomegranate juice on human cytochrome P450 2C9 and tolbutamide pharmacokinetics in rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 2, p. 302–305, 2007.
- (77) HIDAKA, M. et al. Effects Of Pomegranate Juice on Human Cytochrome P450 3a (Cyp3a) and Carbamazepine Pharmacokinetics in Rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 33, n. 5, p. 644–648, 2005.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Anexo 1 – tabela resumo dos estudos *in vitro* relatados

| ESTUDOS IN VITRO  |   |  |                            |   |   |            |
|---|---|--|----------------------------|---|---|------------|
| Composto Estudado   | Material Estudado                           | Concentração                             | Tempo de Incubação         | Atividade Verificada  | Mecanismo Envolvido   | Referência |
| Suco fermentado de romã (W) e Óleo de semente de romã (PSO)                               | Órgão mamário de ratas                      | -  | 10 dias                    | Redução da ocorrência tumoral   | Inibição da COX-2, das enzimas aromatase e 17 $\beta$ -hidroxiesteróide-desidrogenase                                   | 59         |
| Óleo de semente de romã (PSO)   | Células MCF-7 (E+)                          | 0-100000 $\mu$ g/ml                      | 24h, 72h, 120h, 168h, 216h | Inibição do crescimento celular   | Ação anti-estrogênica e de inibição da COX-2  | 15         |
| Polifenóis do suco da romã fresco (S), do suco fermentado (W) e do pericarpo da romã (P)  | Células MCF-7 (E+) e MDA-MB-231 (E-)        | 0-250 $\mu$ g/ml                         | 4h                         | Inibição do crescimento celular   | Inibição da aromatase e/ou antagonismo do receptor de estrógeno   | 15         |
| Extrato metanólico da semente da romã (PSM)   | Células MCF-7 (E+)                          | 0, 5, 20, 100, 250, 500, 1000 $\mu$ g/ml | 72h                        | Inibição do crescimento celular   | Ação antioxidante de compostos fenólicos e flavonoidicos  | 60         |
| Suco de romã comercial (fruta inteira)  | Células MCF-7 (E+)                          | 0-100 $\mu$ g/ml                         | 96h                        | Inibição do crescimento celular   | Ação antioxidante e de interferência na regulação do ciclo celular (G2/M)   | 61         |
| Suco de romã comercial (fruta inteira)  | Células MCF-7 (E+)                          | 50 $\mu$ g/ml                            | 72h                        | Atraso do crescimento celular   | Ação antioxidante e, possivelmente, interferência na regulação do ciclo celular (G2/M)                                  | 61         |
| Suco de romã comercial (fruta inteira)  | Células MCF-7 (E+)                          | 50 $\mu$ g/ml                            | 24, 48 e 72h               | Interferência na regulação do ciclo celular (G2/M)  | Regulação negativa dos genes de reparo do DNA e de regulação do ciclo celular   | 61         |
| Ácido elágico (EA)  | Células MCF-7 (E+)                          | 10-40 $\mu$ g/ml                         | 24h                        | Interferência na regulação do ciclo celular (G1)  | Regulação negativa de componentes necessários à progressão do ciclo e regulação positiva de inibidores do ciclo celular | 62         |
| Suco fermentado de romã (W)   | Células ER (-) MDA 231 e SUM 149            | 50 - 200 mg/mL                           | 5 dias                     | Redução tempo e concentração dependente da taxa proliferativa   | Modulação da ativação de NF-kB  | 14         |
| MUB, UA, UBS, GA, UB  | Células MCF-7 cultivadas com testosterona   | 0 - 4,7 $\mu$ M                          | 48h                        | Significativa inibição da proliferação celular somente por UB e GA                                      | Inibição da aromatase e/ou antagonismo do receptor de estrógeno   | 68         |
| MUB, UA, UBS, GA, UB  | Células MCF-7 (E+) cultivadas com estrógeno | 0 - 4,7 $\mu$ M                          | 48h                        | Significativa inibição da proliferação celular somente por UBS e GA; leve inibição por parte de UA e UB | Inibição da aromatase e/ou antagonismo do receptor de estrógeno   | 68         |
| Suco fermentado de romã (W)   | Células ER (-) MDA-231 e SUM 149            | 100 - 300 mg/mL                          | 72h                        | Indução concentração dependente da taxa apoptótica  | Possivelmente pela modulação da via de sinalização NF-kB / Bcl2/Bax   | 14         |
| Óleo de semente de romã (PSO)   | Células ER (-) MDA-MB-435                   | 25, 50 e 100 $\mu$ g/ml                  | 3 dias                     | Indução da apoptose   | Possível ação do ácido púrico na peroxidação lipídica   | 15         |
| Ácido ursólico (UA)   | Células MCF-7 (E+)                          | 53 $\mu$ M                               | 72h                        | Indução da apoptose   | Regulação negativa de Bcl-2 e promoção da clivagem de PARP  | 64         |
| Polifenóis do suco fermentado de romã (W) e óleo da semente de romã (PSO) prensado a frio | Células MCF-7 (E+)                          | 0-200 $\mu$ g/ml                         | 72h                        | Regulação negativa na expressão de VEGF   | Possivelmente via inibição de NF-kB e da COX  | 16         |
| Polifenóis do suco fermentado de romã (W)   | MDA-MB-231 (E-)                             | 0-200 $\mu$ g/ml                         | 72h                        | Regulação negativa na expressão de VEGF   | Possivelmente via inibição de NF-kB e da COX-2  | 16         |
| Polifenóis do suco fermentado de romã (W) e óleo da semente de romã (PSO) prensado a frio | MDA-MB-231 estrógeno negativas              | 0-200 $\mu$ g/ml                         | 72h                        | Regulação positiva de MIF   | Possivelmente via inibição de NF-kB E da COX  | 16         |
| Óleo de semente de romã (PSO)   | Células MCF-7 (E+)                          | 0-100 $\mu$ g/ml                         | 72h                        | Inibição da invasão celular   | Inibição da COX-2   | 15         |
| Suco fermentado de romã (W)   | Células ER (-) MDA-231                      | 100 - 300 mg/mL                          | 72h                        | Redução da motilidade e da taxa de invasão  | —   | 14         |
| Polifenóis do suco fermentado (W) e do pericarpo (P) de romã                              | Microsossomos de placenta humana            | 0.02 $\mu$ g/ml                          | —                          | Limitação da síntese de estrógeno   | Inibição da aromatase   | 15         |
| MUB, UBS, UB, AUB, UA, MUA, AMUA, DMUA, GA, EA  | Microsossomos de placenta humana            | 0 - 4,7 $\mu$ M                          | 20min                      | Significativa inibição da atividade da aromatase somente por MUB, UBS, UB, AUB, UA, MUA                 | —   | 68         |

| ESTUDOS IN VITRO   |   |                 |                    |  |  |            |
|--|---|-----------------|--------------------|--|--|------------|
| Composto Estudado  | Material Estudado                               | Concentração    | Tempo de Incubação | Atividade Verificada   | Mecanismo Envolvido  | Referência |
| UB, GA, UA, UBS, MUB   | Células MCF-7                                   | 0 - 4,7µM       | 3h                 | Significativa inibição da atividade da aromatase somente por UB e GA | —  | 68         |
| Polifenóis do suco fermentado da romã (W) e do pericarpo da romã (P) e óleo de semente de romã (PSO) | Células renais (HEK)- 293, embrionárias humanas | 1-1000 µg/ml    | -                  | Inibição da enzima 17β-hidroxiesteroide-desidrogenase                | -  | 15         |
| Suco fermentado de romã (W)  | Células ER (-) MDA-231 e SUM 149                | 100 - 400 mg/mL | 72h                | Supressão da Ativação constitutiva de NF-κB                          | Redução na expressão das subunidades p50 and p65 de NF-κB  | 14         |
| Extrato metanólico da porção polifenólica do suco de romã (Pg)                                       | Células BT474 e MDA-MB-231                      | 2,5-10 µg/ml    | 24h                | Antiproliferativa e Pró-apoptótica                                   | Regulação negativa de miR-27A, miR-155, Sp1, Sp3, Sp4, PI3K e AKT e regulação positiva de ZBTB10, VEGF, VEGFR-1 e SHIP-1 | 70         |

## 8.2. Anexo 2 – tabela resumo dos estudos *in vivo* relatados

| ESTUDOS IN VIVO   |   |               |                      |                             |                       |  |  |            |
|---|---|---------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------|--|--|------------|
| Composto Estudado   | Organismo Estudado                                      | Dose          | Via de Administração | Frequência de Administração | Duração de Tratamento | Efeito   | Mecanismo Envolvido  | Referência |
| Emulsão (extrato aquoso + óleo semente)                   | Retas fêmeas  | 0,2g/kg       | Oral                 | 3x dia                      | 18 semanas            | -  | COX-2: leve redução na expressão;<br>IκBα: leve aumento na expressão citossólica   | 34         |
| Emulsão (extrato aquoso + óleo semente)                   | Ratas fêmeas  | 1 g/kg        | Oral                 | 3x dia                      | 18 semanas            | -  | COX-2: moderada redução na expressão;<br>NF-κB p65: maior expressão citossólica e menor expressão nuclear;<br>IκBα: significativo aumento na expressão citossólica   | 34         |
| Emulsão (extrato aquoso + óleo semente)                   | Retas fêmeas  | 5 g/kg        | Oral                 | 3x dia                      | 18 semanas            | -  | COX-2: expressiva redução na expressão;<br>NF-κB p65: maior expressão citossólica e menor expressão nuclear;<br>IκBα: significativo aumento na expressão citossólica | 34         |
| Emulsão (extrato aquoso + óleo semente)                   | Retas fêmeas  | 0,2-5 g/kg    | Oral                 | 3x dia                      | 18 semanas            | Redução da incidência tumoral e aumento da taxa apoptótica         | Modulação de fatores apoptóticos (Bcl-2, Bad, Cyt c Casp-4, Casp-7, Casp-9)  | 69         |
| Extrato metanólico da porção polifenólica do suco de romã | Ratas fêmeas receptoras de células BT474 xenoenxertadas | 0,8 mg/kg/dia | Oral                 | 1 x dia                     | 35 dias               | Contenção do volume e peso tumoral e aumento de lesões apoptóticas | Regulação negativa de miR-27A, miR-155, Sp1, Sp3, Sp4, PI3K e AKT e regulação positiva de ZBTB10, VEGF, VEGFR-1, SHIP-1 e Casp-3                                     | 70         |

26 de setembro de 2018

*Carlos Henrique*

Data e assinatura do aluno(a)

26 de setembro de 2018

*Ulrich Bacchi*

Data e assinatura do orientador(a)