



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Greice Itamaro Heiden

**Avaliação da atividade antitumoral do ácido gálico em modelo murino de
sarcoma 180**

Florianópolis
2026

Greice Itamaro Heiden

**Avaliação da atividade antitumoral do ácido gálico em modelo murino de
sarcoma 180**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de mestra em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de
Albuquerque Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Rogério de Oliveira Gondak

Florianópolis

2026

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.
Dados inseridos pelo próprio autor.

Heiden , Greice Itamaro

Avaliação da atividade antitumoral do ácido gálico em
modelo murino de sarcoma 180 / Greice Itamaro Heiden ;
orientador, Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque
Júnio, coorientador, Rogério de Oliveira Gondak, 2026.
90 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2026.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Ácido gálico - Atividade antitumoral.
3. Câncer - Terapia experimental. 4. Sarcoma 180 - Modelos
experimentais. 5. Polifenóis - Propriedades farmacológicas.
I. Júnio, Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque . II.
Gondak, Rogério de Oliveira. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
IV. Título.

Greice Itamaro Heiden

Avaliação da atividade antitumoral do ácido gálico em modelo murino de
sarcoma 180

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 19/12/2025,
pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Elena Riet Correa Rivero (Membro titular interno)

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves (Membro titular externo)

Universidade Estadual de Campina Grande – UEPB

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Diagnóstico Bucal.



Documento assinado digitalmente

Elena Riet Correa Rivero

Data: 17/03/2026 16:07:38-0300

CPF: ***.083.900-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Documento assinado digitalmente

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior

Data: 17/03/2026 15:40:31-0300

CPF: ***.876.344-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior

Florianópolis
2026

“A todos que duvidaram do meu voo.

Eles passarão... eu, passarinho.”

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, pelo amor incondicional; aos amigos, pela presença constante; aos colegas da pós-graduação, pela ajuda, apoio e parceria; e aos professores, pela orientação e pelo conhecimento compartilhado.

RESUMO

Apesar dos avanços terapêuticos, o tratamento do câncer ainda apresenta eficácia limitada e toxicidade significativa. A busca por terapias antitumorais mais eficazes e menos tóxicas permanece um desafio na oncologia. Neste contexto, o ácido gálico (AG), um polifenol de origem natural, tem demonstrado propriedades antitumorais promissoras, entretanto, ainda há lacunas quanto à comprovação de seus efeitos em modelos *in vivo*. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antitumoral do ácido gálico em modelo murino de sarcoma 180. Para tanto, foram implantadas células de tumores S-180 na derme axilar de 50 camundongos *Swiss* machos. Os animais receberam, por via oral, doses de ácido gálico (AG; 10, 25 ou 50 mg/kg/dia), 5-fluorouracil (5-FU; 25 mg/kg, i.p.) ou solução veículo por sete dias, e foram eutanasiados no oitavo dia. A massa ponderal, a porcentagem de inibição do crescimento e histopatologia dos tumores foram avaliados, juntamente com a análise imuno-histoquímica da proliferação (Ki-67), as vias efetora comum (caspase-3 clivada), intrínseca (Bcl2 e Bax) e extrínseca (caspase-8 clivada) da apoptose, e a via de sinalização celular NF-κB. Indicadores hematológicos e análise bioquímica, macro e microscópica de toxicidade hepática, renal e esplênica também foram analisados. Os resultados demonstraram que os grupos AG25 ($p < 0,05$) e AG50 ($p < 0,001$) apresentaram redução significativa da massa tumoral em comparação ao grupo veículo. No entanto, o grupo tratado com 5-FU exibiu a menor massa tumoral média ponderal entre todos os grupos experimentais ($p < 0,001$). Em comparação com o grupo Veículo, o AG50 reduziu significativamente o índice proliferativo (Ki67) ($9,5 \pm 3,79\%$ vs. $14,2 \pm 2,6\%$; $p < 0,001$) e aumentou a imunoexpressão da caspase-3 clivada ($9,0; 6,0-9,0$ vs. $3,5; 2,0-4,0$; $p < 0,001$), além de reduzir a imunoexpressão do Bcl-2 ($1,0; 1,0-4,0$ vs. $4,0; 4,0-6,0$; $p < 0,001$) e aumentar a do Bax ($8,0; 6,0-9,0$ vs. $3,0; 2,0-6,0$; $p < 0,001$). A caspase-8 clivada apresentou aumento apenas no grupo 5FU ($1,0; 1,0-1,25$; $p < 0,01$ vs. Veículo), sem alteração significativa em AG50 ($p > 0,05$). O grupo Veículo apresentou $38,4 \pm 9,2\%$ de positividade para NF-κB, enquanto AG50 reduziu para $16,8 \pm 7,7\%$ ($p < 0,001$). Em conjunto, esses dados sugerem que o AG apresenta atividade antitumoral significativa no modelo murino de S-180, associada à supressão do ciclo celular, a inibição, ao menos parcial, da via MAPK/NF-κB/p65 e principalmente a indução da apoptose pela via intrínseca. Embora o 5-FU tenha promovido maior inibição tumoral, esteve associado à indução de leucopenia e atrofia esplênica. Em contraste, o ácido gálico preservou os parâmetros hematológicos, hepáticos e renais, mantendo um perfil de segurança sistêmica mais favorável. Esses achados reforçam o potencial do AG como candidato promissor à terapia adjuvante do câncer.

Palavras-chave: ácido gálico, antitumoral, modelo sarcoma 180

ABSTRACT

Despite therapeutic advances, cancer treatment still presents limited efficacy and significant toxicity. The search for more effective and less toxic antitumor therapies remains a challenge in oncology. In this context, gallic acid (GA), a naturally occurring polyphenol, has demonstrated promising antitumor properties; however, there are still gaps in the evidence of its effects in in vivo models. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antitumor activity of gallic acid in a murine model of sarcoma 180. To this end, S-180 tumor cells were implanted in the axillary dermis of 50 male Swiss mice. The animals received oral doses of gallic acid (GA; 10, 25 or 50 mg/kg/day), 5-fluorouracil (5-FU; 25 mg/kg, i.p.) or vehicle solution for seven days and were euthanized on the eighth day. Tumor weight, percentage of growth inhibition, and histopathology were evaluated, along with immunohistochemical analysis of proliferation (Ki-67), the common effector (cleaved caspase-3), intrinsic (Bcl2 and Bax), and extrinsic (cleaved caspase-8) apoptosis pathways, and the NF- κ B cell signaling pathway. Hematological indicators and biochemical, macro- and microscopic analysis of hepatic, renal, and splenic toxicity were also analyzed. The results demonstrated that the AG25 ($p < 0.05$) and AG50 ($p < 0.001$) groups showed a significant reduction in tumor mass compared to the vehicle group. However, the group treated with 5-FU exhibited the lowest mean tumor weight among all experimental groups ($p < 0.001$). Compared to the Vehicle group, AG50 significantly reduced the proliferative index (Ki67) ($9.5 \pm 3.79\%$ vs. $14.2 \pm 2.6\%$; $p < 0.001$) and increased the immunoexpression of cleaved caspase-3 (9.0 ; $6.0\text{--}9.0$ vs. 3.5 ; $2.0\text{--}4.0$; $p < 0.001$), in addition to reducing the immunoexpression of Bcl-2 (1.0 ; $1.0\text{--}4.0$ vs. 4.0 ; $4.0\text{--}6.0$; $p < 0.001$) and increasing that of Bax (8.0 ; $6.0\text{--}9.0$ vs. 3.0 ; $2.0\text{--}6.0$; $p < 0.001$). Cleaved caspase-8 showed an increase only in the 5FU group (1.0 ; $1.0\text{--}1.25$; $p < 0.01$ vs. Vehicle), with no significant change in AG50 ($p > 0.05$). The Vehicle group showed $38.4 \pm 9.2\%$ positivity for NF- κ B, while AG50 decreased to $16.8 \pm 7.7\%$ ($p < 0.001$). Taken together, these data suggest that AG has significant antitumor activity in the murine S-180 model, associated with cell cycle suppression, at least partial inhibition of the MAPK/NF- κ B/p65 pathway, and mainly the induction of apoptosis via the intrinsic pathway. Although 5-FU promoted greater tumor inhibition, it was associated with the induction of leukopenia and splenic atrophy. In contrast, gallic acid preserved hematological, hepatic, and renal parameters, maintaining a more favorable systemic safety profile. These findings reinforce the potential of gallic acid as a promising candidate for adjuvant cancer therapy.

Keywords: Gallic acid, antitumor, sarcoma 180 model.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 ASPECTO ÉTICOS E LEGAIS	31
4.2 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTITUMORAL IN VIVO	31
4.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DESCRITIVA DOS TUMORES	33
EXCISADOS	33
4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS ANTÍGENOS	34
<i>Ki67, CASPASE-3 CLIVADA, CASPASE 8 CLIVADA, BCL-2, BAX E</i>	34
<i>NF-κB</i>	34
4.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS PROCEDIMENTOS DE	35
IMUNO-HISTOQUÍMICA	35
4.6 ANÁLISE DOS EFEITOS DO TRATAMENTO EXPERIMENTAL SOBRE	35
A MASSA DOS ANIMAIS E CONSUMO DE RAÇÃO E ÁGUA AO LONGO	35
DO PERÍODO EXPERIMENTAL	35
4.7 ANÁLISE DOS EFEITOS DO TRATAMENTO EXPERIMENTAL	35
SOBRE INDICADORES HEMATOLÓGICOS	35
4.8 ANÁLISE DOS EFEITOS DO TRATAMENTO EXPERIMENTAL SOBRE	36
INDICADORES BIOQUÍMICOS DE FUNÇÃO HEPÁTICA E RENAL	36
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5 RESULTADOS	38
5.1 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTITUMORAL IN VIVO DO ÁCIDO GÁLICO	37
EM MODELO MURINO DE SARCOMA 180 NA INIBIÇÃO DO	37
CRESCIMENTO TUMORAL	37
5.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS TUMORES SÓLIDOS DE	38
SARCOMA 180 EM MODELO MURINO	38
5.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DO ÍNDICE PROLIFERATIVO (EXPRESSÃO	42
IMUNO-HISTOQUÍMICA DO ANTÍGENO <i>Ki67</i>	42
5.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS ENZIMAS	42
<i>CASPASE-3 CLIVADA</i>	42
(ENVOLVIMENTO DA VIA COMUM DA APOPTOSE)	42

5.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS	43
BCL-2 E BAX	43
(ENVOLVIMENTO DA VIA INTRÍNSECA/MITOCONDRIAL DA APOPTOSE)	43
5.6 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DA ENZIMA	44
CASPASE-8 CLIVADA	44
(ENVOLVIMENTO DA VIA EXTRÍNSECA DA APOPTOSE)	44
5.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO ANTÍGENO NF- κ B	45
(ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO MAPK/NF- κ B/p65)	45
5.8 ANÁLISE DO EFEITO DO ÁCIDO GÁLICO SOBRE A MASSA CORPÓREA	46
E CONSUMO DE ÁGUA E RAÇÃO	46
	49
5.9 ANÁLISE DO EFEITO DO ÁCIDO GÁLICO SOBRE INDICADORES	50
HEMATOLÓGICOS	50
5.10 ANÁLISE DO EFEITO DO ÁCIDO GÁLICO SOBRE INDICADORES	50
BIOQUÍMICOS DE FUNÇÃO HEPÁTICA E RENAL	50
5.11 ANÁLISE DO EFEITO DO ÁCIDO GÁLICO SOBRE A MASSA	50
PONDERAL E CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO FÍGADO,	50
RINS E BAÇO	50
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67
ANEXO 1	86

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma importante causa de mortalidade e morbidade mundial. (BRAY, et al., 2024). A estimativa global afirma que ocorreram aproximadamente 19,3 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes por câncer no ano de 2020. No Brasil, para cada ano do triênio 2023-2025, são esperados 704 mil novos casos de câncer (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2022).

A quimioterapia ainda é um dos principais tratamentos para a maioria dos tipos de câncer (SANCHES, et al., 2015). Este processo é realizado pela aplicação de agentes alquilantes, inibidores mitóticos, ou inibidores do metabolismo celular (KNEZEVIC; CLARKE, 2020). Muitos protocolos quimioterápicos convencionais têm sido associados a baixas taxas de resposta terapêutica, desenvolvimento da quimiorresistência e a efeitos colaterais e adversos, como alopecia, diarreia, náuseas, vômitos e imunossupressão (TOLEDO et al., 2023).

Atualmente, diversos estudos utilizam uma nova abordagem para aumentar a eficácia dos tratamentos anticâncer utilizando compostos naturais obtidos de plantas que apresentam efeitos antitumorais menos tóxicos e mais eficazes do que os quimioterápicos tradicionais (GEZICI; ŞEKEROĞLU, 2019).

O ácido gálico (AG) é um composto orgânico pertencente ao grupo dos polifenólicos obtidos através de taninos hidrolisáveis extraído de plantas, que têm suas propriedades amplamente estudadas no tratamento de diversos tipos de câncer (TSAI et al., 2018). Estudos prévios demonstram que o AG apresenta potente atividade citotóxica contra muitos tipos de linhagens de células tumorais, como H44 de carcinoma de pulmão de pequenas células (WANG et al., 2016), K562 de adenocarcinoma gástrico humano (TSAI et al., 2018), A549 de carcinoma pulmonar de células não pequenas (ZHANG et al., 2019), HL60 de leucemia promielocítica humana (MARUSZEWSKA; TARASIUK, 2019), MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano (ABOREHAB et al., 2021), e U251 (JING et al., 2021) e U87MG (YANG, et al., 2022), ambas de glioma humano.

Evidências apontam para um possível papel modulador do AG sobre diferentes vias de sinalização biológica que controlam fenômenos como migração, metástase, apoptose, estancamento do ciclo celular, angiogênese e expressão de oncogenes em células tumorais (JIANG et al., 2022). Esses dados fazem do AG um

agente potencial para realização de estudos em sistemas experimentais mais complexos, como os modelos *in vivo*.

O sarcoma 180 (S-180) é um dos modelos biológicos *in vivo* mais utilizados em estudos experimentais de triagem de atividade antitumoral de diferentes produtos naturais. Nesse modelo, linhagens de células S180 (TIB66) podem ser implantadas em camundongos formando um tumor sólido, cujas características clínicas, macroscópicas e microscópicas podem ser analisadas a partir da utilização de agentes antitumorais, administrados por via oral ou intraperitoneal (SHIRAI et al., 1991). As maiores vantagens desse modelo são a sua eficiência (forma tumores em praticamente 100% dos animais transplantados), facilidade de execução e rapidez (tumores plenamente desenvolvidos em 7 dias) (DAS THAKUR et al., 2014).

Dessa forma, apesar do efeito citotóxico do AG já vir sendo documentado na literatura, dados acerca de seu efeito antitumoral em modelos experimentais *in vivo*, como o S-180, e as potenciais rotas bioquímicas de ação antineoplásica desse composto em organismos mais complexos, como camundongos, ainda são bastante escassos, justificando a realização dessa pesquisa. Portanto, este projeto de pesquisa propõe a realização de ensaios da atividade antitumoral do AG em modelo murino de S-180, avaliando as características anatomopatológicas dos tumores, e potenciais rotas bioquímicas de ação desse polifenol.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O câncer constitui um grupo heterogêneo de doenças de sinalização e metabolismo alterados, que resulta na perda dos mecanismos regulatórios da proliferação e diferenciação celulares, levando à sobrevivência dessas células transformadas (UPADHYAY, 2021). Dentre as suas principais características está a capacidade de se infiltrar nos tecidos adjacentes do organismo espalhando-se para outros órgãos à distância, processo referido como metástase, sendo esta última a principal causa de morte por câncer (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2020).

Os dados de incidência e mortalidade do câncer com base na população podem ser utilizados para concentrar esforços no sentido de diminuir os sintomas e sequelas do câncer por meio de melhorias na prevenção, diagnóstico e gestão do câncer, monitorando regularmente o controle dos fatores de risco, utilização de testes de rastreio, práticas de diagnósticos e avanços no tratamento. (SANTUCCI et al., 2020)

A agência internacional de pesquisa sobre o câncer – GLOBOCAN - fornece dados sobre a incidência e mortalidade do câncer no mundo. Essa estimativa global afirma que ocorreram no ano de 2020, em torno de 19,3 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes por câncer, indicando ser essa uma importante causa de morbidade e mortalidade em todas as regiões do mundo, independentemente do nível do desenvolvimento humano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021). Estima-se que até 2040 ocorra um aumento de 47% nos casos de câncer em relação aos dados obtidos em 2020. Esse fato está provavelmente relacionado ao crescimento e envelhecimento da população mundial e ao aumento da exposição aos fatores de risco (SUNG et al., 2021).

Desde 1995 o Instituto nacional de câncer (INCA) oferece estimativa de novos casos de incidência de câncer no Brasil com objetivo de fornecer informações atualizadas para a gestão e planejamento na área oncológica. Para cada ano do triênio 2023-2025, são esperados 704 mil novos casos de câncer no país, com destaque para as regiões Sul e Sudeste, que concentram cerca de 70% dessa incidência (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2022).

Baseado no desenvolvimento socioeconômico, os países com níveis atualmente de baixo e médio desenvolvimento podem experimentar grandes

aumentos na incidência de diferentes tipos de câncer. Dados os recursos limitados e a falta de infraestrutura, os aumentos nas taxas de incidência em países de baixa renda provavelmente serão paralelos a aumentos nas taxas de mortalidade. Os esforços para planejar, implementar e avaliar programas de prevenção devem, portanto, ser considerados como prioridade. O controle do câncer exigirá um planejamento minucioso dos recursos de saúde levando em conta os custos crescentes dos tratamentos disponíveis com a inclusão de investimentos de longo prazo em medidas preventivas adequadas a esses recursos (LORTET-TIEULENT et al., 2020).

As estratégias terapêuticas para o tratamento dos diversos tipos de câncer envolvem inúmeros tipos de tratamento. Nesse contexto, existem diferentes tipos de tratamento, como quimioterapia, terapia imunológica (imunoterapia), radiação (radioterapia) e terapia hormonal (hormonoterapia), todas essas abordagens com potenciais e substanciais efeitos colaterais/adversos e com índices de sucesso terapêutico variados. (GEZICI et al., 2019). A quimioterapia ainda é um dos principais tratamentos para a maioria dos tipos de câncer (SANCHES et al., 2015). Este tratamento é caracterizado pela aplicação de agentes químicos que atuam na morte de células lábeis. Este processo é iniciado principalmente com a utilização de agentes alquilantes, inibidores mitóticos, ou inibidores do metabolismo celular (KNEZEVIC; CLARKE, 2020). Os agentes quimioterápicos convencionais estão frequentemente associados a efeitos colaterais adversos, podendo causar danos cumulativos às células sadias, levando a efeitos deletérios precoces (0 à 3 dias), como vômitos, náuseas e inquietação; imediatos (7 à 21 dias) como, anemia, mucosites e cistites hemorrágicas; tardios (meses) como, alopecia, miocardiopatia e pneumonia; e ultra tardios (meses ou anos) como, infertilidade e sequelas no sistema nervoso central, o que torna esse tratamento agressivo quando avaliado em curto e longo prazo (MOSSNER, 2022).

Além disso, muitos protocolos quimioterápicos têm sido associados a baixas taxas de resposta terapêutica, além do desenvolvimento da quimiorresistência. De fato, aquisição de resistência à quimioterapia tradicional resultando em recidiva ou metástase quimiorresistente tem papel fundamental no fracasso do tratamento e no mau prognóstico do câncer (TOLEDO et al., 2023).

Desde a última década, HOLOHAN, et al. (2013) já relataram que a resistência aos medicamentos anticâncer tradicionais limitou a eficácia dos

tratamentos existentes para o câncer. A resistência a medicamentos pode se desenvolver como resistência inerente das células neoplásicas, à droga ou adquirida durante o tratamento, onde o crescimento de células resistentes leva à falha no tratamento. Portanto, superar a resistência pode aumentar a eficiência do tratamento quimioterápico.

Devido aos efeitos tóxicos, tanto de natureza degenerativa (reversível) ou perenes (irreversíveis), causados pela quimioterapia, assim como ao aumento da quimiorresistência às drogas anticâncer, é crescente a busca por terapias alternativas com potencial atividade antitumoral, especialmente aquelas direcionadas a alvos terapêuticos mais seletivos e, tão importante quanto, com menos efeitos colaterais/adversos. Tais abordagens são baseadas na identificação de novos compostos menos agressivos capazes de substituir as drogas atuais ou permitir a redução das doses de quimioterápicos convencionais, levando, assim, a melhoria da qualidade de vida dos pacientes (ZRAIK et al., 2021).

Essa nova abordagem para aumentar a eficácia dos medicamentos quimioterápicos pode vir da utilização de compostos naturais (ÁLVAREZ MARTÍNEZ et al., 2020). Muitos medicamentos que contêm compostos obtidos de plantas apresentam efeitos antitumorais e têm sido usados para diferentes estágios da terapia do câncer. De fato, alguns compostos naturais derivados de plantas deram contribuições importantes para o desenvolvimento de medicamentos. Exemplos bem conhecidos de medicamentos anticâncer à base de plantas incluem, por exemplo, camptotecina e o etoposídeo (CRAGG et al., 2005). Além disso, cerca de um quarto de todos os medicamentos aprovados pela *Food and drug administration* (FDA) e pela agência médica europeia (EMA) são à base de plantas, tendo como exemplo o paclitaxel, a morfina e os medicamentos anticâncer como Taxol (*Taxus brevifolia*) e a Vinblastina (*Catharanthus roseus*). (THOMFORD et al., 2018)

Nos últimos anos, várias plantas medicinais foram utilizadas como terapia alternativa a fim de prevenir e tratar pacientes com câncer. Essas plantas têm agentes anticancerígenos, antitumorais e anti-proliferação menos tóxicos do que as terapêuticas tradicionais (GEZICI et al., 2019).

Os polifenóis constituem uma ampla classe de compostos químicos, presentes tanto em fontes naturais quanto sintéticas, que se destacam por possuir uma ou mais unidades fenólicas em sua estrutura. Esses compostos variam de moléculas simples, formadas por pequenos anéis aromáticos, até estruturas

altamente complexas. A classificação dos polifenóis é baseada principalmente no número e na organização dos anéis fenólicos, bem como nas ligações que os conectam, resultando em quatro principais grupos: flavonoides, estilbenoides, lignanas e ácidos fenólicos (COLOMER et al, 2016).

Vários polifenóis derivados de fontes naturais compreendem um grupo diverso de metabólitos secundários abundantes em plantas, sendo encontrados em vegetais e frutas (ISLAM et al, 2021). Mais de 8.000 compostos polifenólicos já foram identificados em várias espécies de plantas (NIEDZWIECKI et al, 2016).

Os polifenóis têm sido consumidos na dieta humana há séculos, com diversos benefícios à saúde amplamente documentados (HADIDI et al., 2024). Em particular, populações asiáticas, cujas dietas são tradicionalmente ricas em alimentos polifenólicos, apresentam menores taxas de incidência e mortalidade por câncer, sugerindo uma correlação entre o consumo desses compostos e a redução do risco oncológico (COLOMER et al., 2017). Estudos laboratoriais e epidemiológicos indicam que os polifenóis podem modular processos biológicos fundamentais para a carcinogênese, incluindo a regulação do estresse oxidativo, detoxificação de xenobióticos, indução de apoptose, modulação da sinalização celular e atividade estrogênica/antiestrogênica (NIEDZWIECKI et al., 2016). Além disso, esses compostos exibem uma ampla gama de propriedades biológicas, como efeitos antialérgicos, antivirais, antibacterianos, anti-inflamatórios, antitrombóticos, vasodilatadores e hepatoprotetores (ISLAM et al., 2021).

Evidências científicas indicam que diversos polifenóis podem atenuar danos ao DNA por meio da modulação da expressão gênica, influenciando diretamente processos epigenéticos fundamentais para a regulação da carcinogênese. Esses compostos atuam em mecanismos como a metilação do DNA, modificações de histonas e regulação de microRNAs, restaurando padrões epigenéticos saudáveis que inibem a proliferação tumoral e a disseminação de células malignas (SELVAKUMAR et al., 2020). Essa capacidade de reverter ou modular alterações epigenéticas posiciona os polifenóis como candidatos promissores para estratégias de terapia epigenética, visando não apenas a prevenção, mas também o controle da progressão e metástase do câncer. (RAJENDRAN et al, 2022).

Os efeitos anticarcinogênicos dos polifenólicos estão associados à sua capacidade de modulação da proliferação celular (via inibição da quinase regulada por sinal extracelular - Erk 1/2, ciclinas do tipo D e quinases dependentes de ciclina -

CDKs), a produção de fatores angiogênicos (fator de crescimento endotelial vascular, VEGF), e a ativação da cascata de sinalização oncogênica (fosfoinositídeo 3-quinase ou PI3K e proteína quinase B, Akt), induzindo apoptose e prevenindo migração celular e metástase (ABOTALEB et al, 2020).

Dentro da classificação dos polifenóis, encontra-se o ácido gálico (AG) ou ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzóico (Identificação PubChem: CID 370), classificado como um ácido fenólico de origem natural. As propriedades biológicas do AG são extensas. Ele pode atuar como um agente antibacteriano, antioxidante, anticancerígeno, antiviral, antialérgico e anti-inflamatório, que também demonstrou eficácia no manejo de doenças cardiovasculares e metabólicas, como obesidade e diabetes, bem como em doenças degenerativas (HADIDI et al, 2024).

O AG é capaz de induzir a parada do ciclo celular nas fases G1, caracterizada pelo crescimento e aumento do volume celular, e M, fase correspondente à divisão celular. Além disso, o AG modula negativamente a via de sinalização JAK/STAT3, ao mesmo tempo em que promove o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem potencializar os efeitos citotóxicos de agentes quimioterápicos convencionais. A elevação dos níveis de ROS também pode estar associada à indução de ferroptose pelo AG, mecanismo que envolve intensa peroxidação lipídica e ativação de vias necróticas, como a necroptose, culminando na indução de apoptose. Esses eventos estão acompanhados da depleção de glutathione (GSH), um tripeptídeo antioxidante essencial para a defesa redox celular (HASSANI et al, 2023).

O AG apresenta propriedades antimetastáticas amplamente documentadas, atuando por meio da modulação de múltiplas vias moleculares envolvidas na invasão e progressão tumoral. Entre seus principais mecanismos, destaca-se a inibição das metaloproteinases de matriz (MMPs), como MMP-1, MMP-2 e MMP-9, enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular e promoção da migração celular. Além disso, o AG reduz a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), limitando a angiogênese tumoral, e suprime a ativação de mediadores inflamatórios como NF-κB, IL-6 e IL-8, atenuando o microambiente inflamatório que favorece o crescimento tumoral. O AG também modula vias de sinalização intracelular críticas, como a regulação positiva de PTEN e a inibição do eixo PI3K/Akt, ambos fundamentais para a sobrevivência e proliferação celular, além de interferir na via p38 MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno - associada

ao controle da proliferação celular, migração, diferenciação, apoptose celular, além de ser ativada em situações de resposta a citocinas inflamatórias e em resistência ao estresse oxidativo (HASSANI et al, 2023). Ainda em relação ao estresse oxidativo, o AG, regula positivamente também a via PERK (proteína quinase semelhante à proteína quinase R), um dos principais eixos de sinalização do retículo endoplasmático (RE) que responde ao acúmulo de proteínas mal dobradas (HAN et al., 2022).

Os mecanismos bioquímicos e moleculares subjacentes à atividade antitumoral do AG ainda não foram completamente elucidadas. Foi previamente demonstrado que o AG é capaz de inibir a formação do complexo CARM1PELP1. O CARM (arginina metiltransferase 1 associada ao coativador) é uma metiltransferase que modifica histonas e cofatores transcricionais por metilação de arginina, enquanto PELP1 é um coativador nuclear multifuncional. Ambos regulam, portanto, fenômenos de transcrição gênica, incluindo genes relacionados ao ciclo celular e à apoptose (WANG et al., 2020).

Mais recentemente, foi demonstrado que o AG promove inibição da expressão das proteínas SLC7A11 e GPX4, fenômeno que determina o bloqueio do transporte de β -catenina nuclear para o citoplasma em linhagens de células HepG2 (carcinoma hepatocelular), inativando a via Wnt/ β -catenina. Esse fenômeno levaria as células tumorais à ferroptose, uma forma de morte celular programada altamente dependente do ferro e associada à peroxidação lipídica. Isso ocorreria porque a ativação dessa via de sinalização está fortemente ligada ao controle do metabolismo lipídico, da regulação da homeostase redox e do metabolismo do ferro intracelular (XIE et al., 2024).

Estudos prévios confirmaram que o AG apresenta potente atividade pró apoptótica em muitos tipos de linhagens de células tumorais (WANG et al., 2016; TSAI et al., 2018). Existem evidências de que esse polifenol parece ser capaz de modular diferentes vias de sinalização biológica que regulam a migração, metástase, apoptose, estancamento do ciclo celular, angiogênese e expressão de oncogenes em células tumorais (JIANG et al., 2022).

GIFTSON et al. (2010) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a eficácia da suplementação de AG na peroxidação lipídica tecidual e no sistema de defesa antioxidante em câncer de cólon induzida por 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em camundongos *Wistar*. Os camundongos foram divididos em seis grupos, os

camundongos controle do grupo 1 receberam dieta granulada modificada; os camundongos do grupo 2 receberam AG (50 mg/kg de peso corporal) por via oral; os camundongos do grupo 3 receberam DMH (20 mg/kg de peso corporal) por via subcutânea uma vez por semana durante as primeiras 15 semanas; os camundongos dos grupos 4, 5 e 6 receberam AG junto com DMH durante os estágios de iniciação, pós-iniciação e todo o período do estudo, respectivamente. Todos os camundongos foram sacrificados ao final de 30 semanas e os tecidos foram avaliados bioquimicamente. Os resultados sugeriram que o AG poderia exercer um efeito quimiopreventivo significativo na carcinogênese do cólon induzida pelo DMH.

WANG et al. (2016) realizaram um estudo com o objetivo de explorar os efeitos anticâncer do AG no carcinoma de pulmão de pequenas células (SCLC), em células da linhagem H446. Os resultados do presente estudo revelaram que a AG exibiu um efeito anticâncer nas células humanas (H446) e melhorou as atividades antitumorais da cisplatina através da via apoptótica mitocondrial dependente de espécies reativas de oxigênio.

TSAI et al. (2018) realizaram estudo para determinar a atividade anticâncer da planta *Galla chinensis* e o seu principal componente, o AG. O tratamento de células da linhagem K562 de adenocarcinoma gástrico humano com AG 5 μ M por 48 ou 72 horas onde ocorreu a indução da morte celular. O tratamento com baixa concentração (5 μ M) de AG resultou em aumento da concentração de fragmentos apoptóticos ao longo do tempo, indicando a ocorrência de apoptose. Além disso, as células tornaram-se menores e mais arredondadas ao longo do tempo. Estes dados sugerem que o AG induz a morte celular em células de adenocarcinoma gástrico através de um mecanismo apoptótico, sugerindo que o AG tem um papel potencial no tratamento do câncer gástrico.

ZHANG et al. (2019) realizaram um estudo para investigar os efeitos anticancerígenos do AG nas células de carcinoma pulmonar de células não pequenas A549 e seus efeitos auxiliares na atividade anticancerígena com a cisplatina. As células foram tratadas com AG dose variada (0–52 μ g/ml de AG por 24 horas, ou 12, 20 e 28 μ g/ml AG por 6, 24 e 48 horas, dose variada (0–32 μ g/ml) de cisplatina por 24 horas ou os dois compostos combinados (2,5 μ g/ml de cisplatina, 28 μ g/ml de AG ou os dois combinados por 6, 12, 24 e 48 horas). Em conclusão, o presente estudo confirmou, que o AG suprimiu a proliferação e induziu a apoptose

em células NSCLC A549 de maneiras dependentes da dose e do tempo. Os resultados do estudo sugeriram que o AG exerceu um efeito auxiliar na atividade anticancerígena da cisplatina. No entanto, concluiu-se que estudos adicionais ainda são necessários para ilustrar o papel do AG em outras associações potenciais da via de apoptose.

MARUSZEWSKA et al. (2019) fizeram um estudo com o objetivo de examinar os efeitos antitumorais dos ácidos fenólicos vegetais - AG e ácido elágico (AE) - na linhagem celular HL60 (leucemia promielocítica humana) e suas sub-linhagens resistentes exibindo dois fenótipos MDR: HL60/VINC e HL60/MX2. Os efeitos de AG (dissolvido em água) e EA (dissolvido a 5 mM em 0,1 M NaOH), com 11 concentrações destes compostos (variando em faixa de 10–500 μ M para AG ou 5–200 μ M para AE). Verificou-se que AG e AE modulam o nível celular de espécies reativas de oxigênio de maneira dependente da dose e do tempo.

ABOREHAB et al. (2021) realizaram um ensaio para comparar os efeitos anticancerígenos do Paclitaxel, Carboplatina e o AG individualmente e em combinação, no crescimento e apoptose em células de câncer cervical humano (HeLa), foram realizados ensaio de inibição do crescimento, análise do ciclo celular, ensaio RT-PCR e análise Western blot para alguns marcadores apoptóticos. Foram utilizadas diluições em série de Paclitaxel (600, 300, 150, 75, 37,5, 18,75, 9,37, 4,68, 2,34, 1,17 μ g/ml), Carboplatina (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81 μ g/ml), AG (10.000, 5.000, 2.500, 1.250, 625, 312,51 μ g/ml). Em conclusão foi sugerido que a combinação de Paclitaxel e AG pode ser um protocolo promissor para o tratamento do câncer cervical e pode ser uma possível substituição do quimioterápico comumente usado o Paclitaxel/Carboplatina. A combinação Paclitaxel/AG oferece uma série de vantagens sobre os protocolos existentes, tais como maior eficácia, menor dose e menos efeitos colaterais.

REZAEI-SERESHT et al. (2019) avaliaram o ácido caféico e o AG quanto aos seus possíveis efeitos na expressão de genes apoptóticos na linhagem celular de câncer de mama (MCF-7) *in vitro*. Essas células foram tratadas com diferentes concentrações de ácido caféico e AG (5, 10, 30, 50, 75, 100, 130, 170 e 200 μ g/ml). Através da indução da apoptose, o ácido caféico e o AG induzem efeitos tóxicos e alterações morfológicas nas células do câncer de mama, sugerindo sua possível aplicação futura como agentes antitumorais.

WANG et al. (2020) realizaram um estudo com células de câncer de pulmão não pequenas (NSCLC), identificando o padrão regulatório do AG no NSCLC. A linhagem de célula epitelial pulmonar BEAS-2B e as linhas celulares de NSCLC humanas A549 e NCI-H1299 foram tratadas com diferentes doses de AG, o papel do AG no crescimento tumoral foi avaliado em camundongos. Foram utilizadas as doses 30 μ M, 50 μ M e 75 μ M de AG com apoptose elevada nas células de NSCLC. A pesquisa confirmou que o AG contribuiu para a inibição do crescimento tumoral *in vitro*, destacando uma nova terapia para atenuar a progressão do NSCLC.

ZENG et al. (2020) realizaram um estudo em células de câncer de bexiga linhagem T24. As células T24 foram tratadas com diferentes concentrações de AG (0, 6,25, 12,5, 25 μ g/ml) durante 24 horas. Este estudo revelou que o AG inibiu significativamente a viabilidade das células T24 de maneira dependente da concentração e do tempo. O AG induziu a apoptose de células T24 ($p < 0,001$), acompanhada de acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e despolarização do potencial de membrana mitocôndria.

KHORSANDI et al. (2020) em estudo utilizando linhagem de células de câncer de mama (MDA-MB-231), células de câncer melanoma (A375) e fibroblastos dérmicos humanos (HDF) foram incubadas utilizando meio de cultura celular contendo diferentes concentrações de AG (0, 10, 25, 50, 75, 100 e 200 μ g/ml). Os efeitos do AG isolado ou em combinação com irradiação com laser de baixa intensidade. Em conclusão, a pré-irradiação seguida do tratamento com AG não alterou significativamente a viabilidade das células humanas normais, mas reduziu a sobrevivência celular das células cancerosas mais do que com o tratamento com AG sozinho.

JIANG et al. (2022) realizaram um estudo utilizando células de glioma humano U251 GBM - um dos tumores cerebrais adultos mais comuns. Foram preparados AG com nanopartículas de ouro (GNPs) utilizadas como portadores não tóxicos versáteis para a entrega de medicamentos anticâncer. A solução de GNPs (5 ml de cada) foi misturada com 5 ml de água deionizada, 22,4, 44,8, 89,6, 134,4 ou 179,2 μ g/ml de solução de AG. Este trabalho estabeleceu que os AG-GNPs aumentam a morte celular U251 induzida pela radiação e a parada do ciclo celular, sendo assim um promissor reagente antitumoral e de aprimoramento de radiação para o tratamento de glioblastoma multiforme.

PRIYADARSHI et al. (2021) submeteram linhagem de células de carcinoma colorretal (HCT 116), células de carcinoma de mama humano (MCF7), células de adenocarcinoma colorretal humano (HT29) e fibroblastos embrionários de camundongo (NIH3T3) ao conjugado de AG com os dendrímeros PAMAM - que são biopolímeros, que têm sido considerados nanocarreadores versáteis para distribuição de medicamentos e podem incluir a capacidade de melhorar a solubilidade, biodisponibilidade e a permeabilidade de medicamentos ou moléculas desejadas. As concentrações utilizadas foram de 2.5mM, 5mM e 10mM de AG e de PAMAM-GA. Em conclusão, as descobertas deste estudo revelaram que o conjugado PAMAM-GA melhora a biodisponibilidade do AG e a especificidade em relação às células cancerígenas para manifestar a morte celular apoptótica. Essa abordagem indispensável pode ser benéfica para a revolução da terapia anticâncer.

ARSIANTI et al. (2020), realizaram um estudo que teve como objetivo sintetizar o revestimento de nanopartículas de AG com alginato quitosana e avaliar sua citotoxicidade contra células cancerígenas de mama T47D. Métodos: Nanopartículas de AG foram sintetizadas pelo método de gelificação iônica até atingir a concentração final de 51,2; 25,6; 12,8; 6,4; 3,2; 1,6; 0,8; 0,4 µg/mL. Os resultados confirmaram claramente que o revestimento de nanopartículas de AG com alginato-quitosana mostrou uma forte citotoxicidade para células de câncer de mama T47D, que tem potencial para ser desenvolvido como candidato a novo agente anticâncer de mama.

ABOREHAB et al. (2021) investigaram os efeitos potenciais do AG, em estudo *in vivo*, como terapia de suporte no tratamento do câncer de mama. A atividade anticancerígena com AG isoladamente ou em combinação com paclitaxel e/ou carboplatina (quimioterápicos tradicionais). Foram utilizadas células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano e realizado o tratamento com a quantidade mínima não tóxica de AG (2500 µg/mL) sozinha ou em combinação com ciclo celular induzido por paclitaxel e carboplatina. Foi mostrado que uma concentração mínima não tóxica de AG causou a apoptose na linha celular de câncer de mama MCF-7 e aumentou a eficácia do paclitaxel e da carboplatina. O AG melhorou sinergicamente a eficácia deste protocolo de tratamento.

YANG, et al. (2022) realizaram testes na linhagem celular U87MG de glioma onde as células foram incubadas primeiramente somente em AG e somente em temozolomida (TMZ) - agente quimioterápico. As concentrações utilizadas de AG

foram de (50 ou 100 μ M), TMZ 200 μ M ou ambos TMZ/AG por 48 horas. O resultado encontrado foi que a combinação temozolomida e AG aumentou a inibição da citotoxicidade celular e o nível apoptótico na linha celular de glioma, oferecendo uma nova abordagem para o tratamento após ressecção cirúrgica do glioma maligno que tem prognóstico sombrio no tratamento convencional.

JIANG et al. (2022), em revisão bibliográfica discutiram o potencial anticancerígeno do AG contra diferentes tipos de câncer. Os resultados indicam que os estudos com o AG possuem evidências de que é um candidato promissor a um novo, potente e seguro tratamento para o câncer. Estudos *in vitro* aprofundados delinearam várias vias importantes associadas à atividade do AG, incluindo estimulação de MAPK, inibição de NF- κ B, regulação negativa de TNF α , fosforilação de ERK1/2, etc. Também relataram estudos *in vivo* que evidenciam fortemente o potencial do AG na prevenção do crescimento de vários tumores. Além disso, a revisão pontuou que a biodisponibilidade do AG pode ser melhorada com a ajuda de muitos medicamentos, como cisplatina, doxorrubicina e em combinação com outros medicamentos que podem elevar sua eficácia.

Ainda que escassos, estudos *in vivo* envolvendo a administração de AG em camundongos submetidos a xenotransplantes de células tumorais foram previamente descritos na literatura, com resultados bastante promissores. No estudo realizado por Raina et al. (2008) em modelo de adenocarcinoma transgênico da próstata de camundongo (TRAMP), soluções de AG a 0,3% e 1% (m/v) administradas em água potável levaram uma maior incidência de tumores bem diferenciados de baixo grau, às expensas de uma forte diminuição (aproximadamente 60%; $p < 0,01$) dos tumores pouco diferenciados.

Adicionalmente, Kaur et al. (2009) relataram que o crescimento de xenoenxerto de células DU145 e 22Rv1 de adenocarcinoma prostático foi significativamente inibido em BALB/cnu/nu que receberam AG a 0,3% ou 1,0% (m/v) *ad libitum* em água. Segundo os autores, essa resposta pode ser explicada pela alta taxa de proliferação das células 22RV1, sugerindo que a eficácia do AG pode depender da cinética de crescimento celular, com maior efeito em tumores de proliferação rápida.

Phan et al. (2016), também observaram diferenças na redução do volume tumoral entre os xenoenxerto derivados das linhagens HCC827 e H1650 (adenocarcinoma pulmonar humano). Após a administração intraperitoneal de 200

mg/kg de AG, foi constatada uma regressão tumoral acentuada nos tumores H1650, enquanto a redução observada nos tumores HCC827 foi menos expressiva.

Em estudo realizado por Varela-Rodríguez et al. (2020) com células SKOV-3 de câncer de ovário, observou-se uma inibição significativa do crescimento dos tumores xenotransplantados por meio de administração de 50 mg/kg de AG. Mais recentemente, Hanieh et al. (2022) investigaram os efeitos do AG em tumores xenotransplantados de câncer de mama, utilizando células MDAMB-231 e T47D. Nos tumores das células MDA-MB-231, tanto doses baixas quanto altas de AG (1 mg, 3 mg e 6 mg) reduziram a massa tumoral de forma significativa. No entanto, em tumores das células T47D, apenas as doses mais altas de AG foram eficazes.

Ji et al. (2009) demonstraram que a administração intraperitoneal de AG (20mg/kg) inibiu o crescimento tumoral em camundongos BALB/cnu/nu portadores de tumores de xenoenxerto de células de câncer de pulmão NCIH460 por meio da ativação da via mitocondrial caspase-3 dependente da apoptose. Similarmente, no experimento conduzido por Liang et al. (2012), o crescimento de tumores de osteossarcomas MNNG/HOS xenoenxertado em modelo murino (BALB/c) foi significativamente inibido por AG a 0,3% e 1,0% administrado na água *ad linitum*, por ativação da via intrínseca da apoptose.

Abdullah et al. (2023), em estudo semelhante utilizando AG, relatou a presença de apoptose pela via intrínseca e trouxe a evidência de aumento da expressão da caspases-8, sugerindo que a atividade antitumoral do AG decorreria também da ativação da via extrínseca da apoptose. A ativação concomitante das vias intrínseca e extrínseca observada neste estudo reforça a complexidade dos mecanismos de regulação da apoptose, e pode representar uma resposta adaptativa à terapia ou ao microambiente tumoral.

Por outro lado, estudos realizados por Ko et al. (2022) propuseram que, além de ativar a apoptose majoritariamente pela via intrínseca, o tratamento com AG em linhagem de células A549 (câncer de pulmão) promoveu estancamento do ciclo celular e consequente inibição da proliferação. Esse fenômeno seria resultado da inibição da via PI3K/Akt, induzindo regulação positiva de p53 (proteína supressora de tumor), que por sua vez, modula a expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular, estimulando reguladores negativos (proteína p21 e p27) e inibindo positivos (Ciclina D1 e E1).

Nos modelos *in vivo* com AG em camundongos xenotransplantados, observa-se uma lacuna na literatura quanto à definição de parâmetros padronizados e robustos para a avaliação dos efeitos sistêmicos da substância, o que dificulta comparações entre estudos e a consolidação de evidências.

No que se refere à massa corporal e ao consumo alimentar, um estudo piloto conduzido por Gingrich et al. (1996) demonstrou que a administração de AG em camundongos não resultou em alterações significativas na ingestão de alimento ou de água em comparação ao grupo controle. De maneira semelhante, os estudos realizados por Kaur et al. (2009) e Ji et al. (2009) também relataram manutenção da massa corporal nos animais tratados.

Quanto a toxicidade do AG em camundongos, em estudo sobre toxicidade subaguda, camundongos albinos tratados com doses diárias de 100, 300 e 900 mg/kg de AG (via oral) por 28 dias não apresentaram alterações significativas nos parâmetros de homeostase sanguínea (avaliados por exames hematológicos) ou nas características anatomopatológicas, incluindo macroscopia durante necropsia e análise histopatológica de órgãos e tecidos (VARIYA et al., 2019). Segundo Ashrafizadeh et al. (2021), a toxicidade aguda em camundongos é observada somente em doses iguais ou superiores a 2000 mg/kg.

Uma análise abrangente dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos dos camundongos submetidos a estudos *in vivo* é essencial para a avaliação dos potenciais efeitos mielossupressores. Nesse contexto, exames hematológicos, são fundamentais para identificar possíveis alterações na medula óssea e no sistema imunológico, onde devem ser criteriosamente considerados na análise da eficácia e da toxicidade dos tratamentos. Alterações nesses parâmetros podem comprometer funções fisiológicas essenciais, como a manutenção da massa corporal, a imunocompetência e a capacidade de regeneração tecidual (TANG et al., 2024).

Além disso, ensaios bioquímicos para determinação dos níveis séricos de ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) são cruciais para detectar possíveis efeitos tóxicos hepáticos e renais, uma vez que fígado e rins são órgãos-chave nos processos de metabolização e excreção de fármacos. (ZHANG; MENG, 2022).

A interpretação dos dados de cada estudo deve levar em consideração os intervalos de normalidade estabelecidos para camundongos, já que os resultados obtidos fortalecem a necessidade de estabelecimento de valores de referência para

cada biotério/instituição, uma vez que a caracterização destes parâmetros por sexo, idade e linhagem dos animais permitem uma correta validação dos experimentos ao mesmo tempo em que auxilia na promoção do sucesso da criação destes animais em biotério (ARAÚJO et al., 2015).

No estudo das células cancerígenas, a análise molecular do desenvolvimento tumoral em pacientes é bastante complexa, pois necessita da disponibilidade de biópsias em diversos estágios de transformação. Além disso, os estudos dos processos de metástase, angiogênese e da resposta imune contra os tumores *in vitro* não imitam o que ocorre *in vivo*. Por esta razão, os modelos murinos experimentais de câncer têm desempenhado papel vital na compreensão da tumorigênese e suas relações com o ambiente *in vivo*, em que existe a dificuldade de avaliação de novos métodos diagnósticos e ações terapêuticas de drogas contra tumores em pacientes. A utilização de células animais como modelo para o entendimento da patogênese de diversas doenças humanas é essencial para pesquisas biomédicas (ADISESHAIAH et al., 2018).

Um dos modelos biológicos que vem sendo constantemente adotado em estudos experimentais de triagem de atividade antitumoral de diferentes biocompostos, incluindo produtos naturais, tem sido o do S-180, por sua eficiência e robustez (DAS THAKUR et al., 2014). O S-180 é uma linhagem tumoral proveniente de camundongos e está disponível em banco de células para formação de tumor murino (PANTALEÃO et al., 2010).

O modelo experimental S-180 é usado desde a década de 50 como estratégia de triagem de potenciais drogas com atividade antitumoral. Nesse modelo, linhagens de células S180 (TIB-66) obtidas pela ATCC (American Type Culture Collection) podem ser implantadas em camundongos, tanto na cavidade peritoneal, onde se desenvolvem sob a forma de tumor ascítico, quanto em derme, onde formam tumor sólido (STOCK et al., 1960). As principais vantagens práticas que determinaram a opção por sua utilização são: *i*) facilidade de execução do protocolo de implantação tumoral; *ii*) ocorrência de crescimento tumoral em 90% a 100% dos animais após transplantação intradérmica de células neoplásicas; e *iii*) evolução tumoral rápida, reduzindo o tempo de experimento (LIEHR; RINCIC, 2025).

Diversos estudos já demonstraram a eficácia da atividade antitumoral de biocompostos no modelo murino de sarcoma 180 (S-180). No que se refere às características histopatológicas desses tumores, a literatura descreve proliferação

sólida e difusa de células neoplásicas, com padrão infiltrativo capaz de comprometer e destruir tecidos adjacentes, incluindo músculo estriado esquelético e tecido adiposo da hipoderme. Observam-se ainda infiltrações perineurais, em alguns casos claramente evidenciadas, além da presença de êmbolos tumorais. Áreas de necrose coagulativa também são frequentemente relatadas, organizadas em trabéculas ou blocos no interior do parênquima neoplásico (REZENDE et al., 2021; ALVES et al., 2023; SANTOS et al., 2023; PEREIRA-FILHO et al., 2024).

Contudo, mesmo utilizando modelos complexos *in vivo*, como o S-180, o grande desafio que os cientistas enfrentam no estudo de novas terapias de combate e controle do câncer é o entendimento incompleto da sua base genética, molecular e bioquímica. Sabe-se que o desenvolvimento do câncer envolve várias etapas, que muitas vezes se superpõem: sustentação da sinalização proliferativa, bloqueio de genes supressores de crescimento, permitindo imortalidade replicativa, resistência à morte celular, indução de angiogênese, ativação de invasão e metástase, instabilidade e mutações no genoma e evasão do sistema (BOUSSIOUS et al., 2023). Nesse sentido, a compreensão dos mecanismos e vias de sinalização associados ao desenvolvimento e progressão de tumores, incluindo o S-180, pode contribuir para o melhor entendimento de sua patogenia e, por consequência, para o estudo de novas propostas terapêuticas (KONTOMANOLIS et al., 2021).

Nos últimos anos, os principais alvos de estudos para a identificação de novas terapias contra o câncer têm sido a desregulação da expressão de genes envolvidos na proliferação (e.g. proteína Ki-67) (YUNUSOVA et al., 2018) e na morte celular, por fenômenos de apoptose (e.g. genes da família bcl-2 e caspases) (SODERQUIST et al., 2018), ou ferroptose, como o gene NRF2 (WANG et al., 2022). Quanto aos genes envolvidos na proliferação, como a proteína Ki-67, expressa em diferentes fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M), mas não marcam células quiescentes (G0) e no início do G1, e tem sido amplamente utilizado como indicador de proliferação celular (LI et al., 2015). Sabe-se que o Ki-67 tem meia-vida muito curta, de 1 hora ou até menos após a mitose, o que garante que células que já saíram do ciclo celular não apresentem o antígeno. A análise quantitativa da imunomarcagem do Ki-67 resulta, portanto, numa avaliação bastante aproximada da fração de crescimento de uma população celular tumoral.

A apoptose é uma forma de morte celular programada que resulta na remoção ordenada e eficiente de células geneticamente danificadas e/ou

disfuncionais, como aquelas com danos no DNA ou células que perdem sua função durante o desenvolvimento. A apoptose pode ser desencadeada por sinais intrínsecos, como o estresse genotóxico, ou por sinais extrínsecos, como a interação entre ligantes e receptores de morte da superfície celular (ELMORE, 2007). Muitas drogas anticancerígenas usadas atualmente na oncologia clínica exploram as vias de sinalização apoptótica para desencadear a morte das células tumorais malignas. Para promover seu efeito apoptóticos, muitas dessas drogas parecem modular a expressão de genes antiapoptóticos (como as proteínas Bcl-2 e Bcl-x) e pró apoptóticos (como as proteínas Bax e Bad, e a família das caspases), que representam os agentes reguladores da via mitocondrial ou intrínseca da apoptose (KETELUT-CARNEIRO et al., 2022).

Os membros da família de genes Bcl-2 (linfoma de células B 2) têm um papel central na regulação dos sinais intracelulares pró-apoptóticos e antiapoptóticos. Dentre eles, o Bcl-2 e Bcl-x regulam negativamente a permeabilidade da membrana mitocondrial, enquanto o Bax, Bad e Bak exercem a função oposta. O aumento da permeabilidade mitocondrial é fundamental para a liberação citosólica do citocromo C mitocondrial, agente essencial para ativação enzimática em efeito cascata que representa a via intrínseca da apoptose, culminando com a morte celular e formação de corpos apoptóticos (ASHKENAZI et al., 2017). Considerando que a evasão da apoptose, através da desregulação de genes específicos da família Bcl-2, é um evento recorrente na biologia do desenvolvimento e progressão do câncer, a inibição seletiva de proteínas antiapoptóticas específicas da família Bcl-2 representaria uma excelente oportunidade terapêutica (HASSAN et al., 2014, SAHOO et al., 2023).

As caspases são uma família de cisteína aspartil proteases envolvidas principalmente na execução da morte celular apoptótica. Essas enzimas estão constitutivamente presentes no citoplasma celular em uma forma inativa, podendo ser ativadas por clivagem tanto por reações enzimáticas derivadas da via intrínseca (mitocondrial) ou extrínseca (ativação de receptores de morte faz/faz-ligante) (OBENG, 2021). A ativação da via intrínseca depende da alteração da permeabilidade mitocondrial, permitindo a liberação do citocromo C, que se completa ao Fator Ativador de Peptidase Apoptótica 1 (APAF-1) e a enzima Caspase 9. Esse complexo estável (citocromo c/Apaf-1/caspase-9) representa o principal agente envolvido na apoptose induzida pela quimioterapia anticâncer (SELVAKUMAR et al., 2020).

A caspase-8, por outro lado, desempenha papel importante na clivagem e ativação de caspases efetoras da apoptose pela via extrínseca. A ativação desta enzima pode ocorrer pela interação de seu domínio efetor de morte terminal com as proteínas adaptadoras de sinalização de receptores de domínio de morte, como a interação entre o receptor de superfície Fas e o seu ligante (Fas-ligante). Essa interação promove a formação de um complexo de sinalização indutor de morte (DISC), composto pela cauda citoplasmática de Fas, a proteína adaptadora FADD e a caspase-8. As caspases iniciadoras dentro do DISC ativam caspases executoras (caspase 3) e induzem a apoptose (FRITSCH et al., 2019). A indução de apoptose pela via extrínseca pela ativação da caspase-8 vem sendo descrita em algumas formas de terapia antineoplásica (JIANG et al., 2022).

A caspase-3, por sua vez, tem papel de destaque na execução da apoptose. Esta enzima está inativa no citosol ativada até que seja clivada por caspases iniciadoras durante o fluxo apoptótico, como o complexo citocromo c/Apaf-1/caspase-9 (ASADI et al., 2022) ou pelo complexo DISC (FRITSCH et al., 2019). A caspase-3-clivada tem função proteolítica chave na execução da apoptose, e constitui um dos principais biomarcadores desse fenômeno em resposta a indutores extrínsecos ou intrínsecos específicos de morte celular programada (ESKANDARI, EAVES, 2022).

Do ponto de vista biológico, a via intrínseca desempenha papel crucial na eliminação de células com danos irreparáveis ao genoma, atuando como uma barreira contra a oncogênese. Além disso, constitui um dos principais alvos de terapias antitumorais, como a quimioterapia, que induz estresse celular para ativar a apoptose (IGNEY; KRAMMER, 2002)

Outra via que tem sido implicada na regulação da apoptose é a modulação da expressão do fator nuclear *kappa* B (NF- κ B), que é uma família de fatores de transcrição induzíveis que regulam de maneira central a resposta imune e inflamatória, além de proteger as células da apoptose induzida por danos ao DNA ou citocinas, que estão envolvidos na regulação de uma ampla variedade de respostas biológicas. a estímulos como o estresse, radicais livres, radiação ultravioleta, oxidação de LDL e antígenos virais e bacterianos (GUO et al., 2024). Sua ativação ocorre por múltiplas vias de sinalização que convergem na fosforilação das proteínas inibidoras I κ B pelas quinases IKK α/β , levando à ubiquitinação e degradação dessas proteínas. A perda de I κ B permite a translocação do NF- κ B ao núcleo, onde são

induzidos genes antiapoptóticos (c-IAP1, c-IAP2, XIAP), moléculas relacionadas ao receptor de TNF (TRAF1, TRAF2) e o homólogo de Bcl-2 A1/Bfl1, promovendo sobrevivência celular. Além disso, o NF- κ B estimula a expressão da ciclina D1 por ligação direta ao seu promotor, contribuindo para a progressão da fase G1 para S e favorecendo a proliferação célula (CHEN et al., 2024).

Tem sido estabelecido que o NF- κ B pode desempenhar um papel importante nos processos de oncogênese (GAO et al., 2019). Adicionalmente, alguns estudos têm se concentrado em elucidar as consequências funcionais da ativação do NF- κ B, bem como seus mecanismos de sinalização, tornando-o um alvo terapêutico interessante para o tratamento do câncer (GAPTULBAROVA et al., 2020; DIÉGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2022).

A ferroptose é uma forma de morte celular programada associada ao acúmulo intracelular de ferro, que vem sendo relacionada a fenômenos de peroxidação lipídica, com consequente ruptura da membrana mitocondrial (DIXON et al., 2012; DIXON, STOCKWELL, 2019). O fator 2 relacionado ao fator nuclear E2 (NRF2) é um regulador de transcrição essencial da homeostase celular cujos genes alvo a jusante estão envolvidos na prevenção ou correção de desequilíbrios redox na célula (TONELLI et al., 2018). A inibição da expressão NRF2 tem sido associada a uma diminuição da capacidade de resposta aos estressores celulares e ao aumento da morte celular, particularmente devido à ferroptose (DODSON et al., 2019).

Também foi demonstrado que a regulação negativa da expressão de NRF2 induz a morte celular ferroptótica em células de câncer de pulmão (CHEN et al., 2025), de modo que a ativação dessa via de morte celular pode estar implicada e, portanto, investigada, quanto aos mecanismos de indução de efeitos antitumorais de drogas com ação quimioterápica. (ZHANG et al., 2022).

Tomadas em conjunto, essas evidências trazidas pela literatura apontam para uma provável ação multifacetada do AG. Desta forma, essa molécula poderia atuar na modulação de diferentes vias de sinalização, promovendo a morte celular por mecanismos diversificados, incluindo apoptose (deflagrada por ambas as vias intrínseca e extrínseca) e ferroptose, ou poderia promover parada do ciclo celular e consequente bloqueio proliferativo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antitumoral do ácido gálico (AG) em modelo murino de sarcoma 180 (S-180).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do AG sobre a massa tumoral e na inibição do crescimento tumoral após transplantação intradérmica de S-180 em modelo murino;
- Analisar o efeito do AG sobre o índice proliferativo tumoral por meio da imunoexpressão do antígeno Ki67;
- Analisar o efeito do AG sobre a potencial ativação da via comum da apoptose, por meio da imunoexpressão da Caspase-3 clivada;
- Analisar o efeito do AG sobre a potencial ativação da via intrínseca (mitocondrial) da apoptose, por meio da imunoexpressão das proteínas Bcl-2 e Bax;
- Analisar o efeito do AG sobre a potencial ativação da via extrínseca da apoptose, por meio da imunoexpressão da Caspase-8 clivada;
- Analisar o efeito do AG sobre a potencial modulação da via de sinalização MAPK/NF- κ B/p65, por meio da imunoexpressão do antígeno NF- κ B;
- Analisar o efeito do AG sobre o consumo de água e ração e a variação da massa corpórea em modelo murino de S-180 durante o período experimental;
- Analisar o efeito do AG sobre os indicadores imuno-hematológicos (série eritrocítica e leucocitária do hemograma) em modelo murino de S-180;
- Analisar o efeito do AG sobre indicadores bioquímicos de função hepática e renal em modelo murino de S-180.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTO ÉTICOS E LEGAIS

Este projeto de pesquisa foi submetido à apreciação técnica da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Tiradentes (UNIT) para obtenção do registro de aprovação nº 010824 de aprovação dos experimentos *in vivo* (**Anexo 1**) Todos os procedimentos foram realizados rigorosamente de acordo com as normativas vigentes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2023).

4.2 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO*

Cinquenta camundongos Swiss machos adultos jovens (*Mus musculus*, pesando 28 ± 5 g), foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (n=10), de acordo com o tratamento (Tabela 1). Os animais experimentais foram mantidos em caixas de polipropileno com grades metálicas e camas de maravalha trocadas diariamente. As referidas gaiolas foram mantidas em salas de experimentação sob condições controladas de temperatura (22 ± 3 °C), umidade relativa (30% a 70%), e ciclo claro-escuro de 12 h, com água e alimento (Labina® diet Purina, São Paulo, Brasil) ad libitum.

Tabela 1. Distribuição dos animais após transplantação intradérmica de células de S-180 nos diferentes grupos experimentais de acordo com o tratamento.

Grupo (n=10)	Tratamento
Veículo	Salina, 0,28 mL/dia (i.p.) e 0,28 mL de água com 5% DMSO (v.o.)
5-FU	5-Fluorouracil, 25 mg/kg/dia (0,28 mL de solução a 2,5 mg/mL, i.p.) e 0,28 mL de água com 5% DMSO (v.o.)
AG10	Salina, 0,28 mL/dia (i.p.) e 10 mg/kg/dia de Ácido Gálico (v.o.)
AG25	Salina, 0,28 mL/dia (i.p.) e 25 mg/kg/dia de Ácido Gálico (v.o.)
AG50	Salina, 0,28 mL/dia (i.p.) e 50 mg/kg/dia de Ácido Gálico (v.o.)

*A dosimetria para administração do AG foi definida com base em Ashrafizadeh, et al. (2021).

Inicialmente, um animal doador portador da forma ascítica do sarcoma 180 (S-180) foi submetido à anestesia inalatória com isoflurano a 1,5%. Posteriormente,

foram coletados 0,5 mL de líquido ascítico da cavidade abdominal, contendo células tumorais, os quais foram transferidos para um tubo contendo 5 mL de solução de Ringer lactato suplementada com 0,2 mL de gentamicina (5 mg/mL). Para a análise de viabilidade celular, a suspensão foi centrifugada a $770 \times g$ por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensionado e corado com azul de tripano a 0,025%. A contagem das células viáveis (não coradas) foi realizada em câmara de Neubauer, sob aumento de 400 $\times$. A concentração celular foi ajustada para obtenção de 2×10^6 células tumorais viáveis em um volume final de 500 μ L. Esse volume foi inoculado por via subcutânea na região axilar dos camundongos, conforme descrito por Zheng et al. (2010). Os camundongos foram distribuídos em cinco grupos experimentais, conforme descrito na Tabela 1. O grupo veículo e o grupo tratado com 5-fluorouracil (5-FU, pureza > 99%; Sigma Chemical Co.) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente.

Para a administração oral do AG em camundongos adultos Swiss, três doses foram utilizadas: 10, 25 e 50 mg/kg, sendo cada dose aplicada em um grupo distinto contendo 10 camundongos, com peso médio de 28 ± 5 g. Devido à baixa solubilidade do AG em água, inicialmente foi preparada uma solução estoque concentrada de 100 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO). Para cada grupo experimental, a solução estoque foi diluída imediatamente antes da administração em água destilada para obtenção das concentrações finais correspondentes às doses desejadas, garantindo que o volume total administrado por animal não ultrapassasse 10 mL/kg, considerado seguro para gavagem oral em camundongos.

Especificamente, para o grupo de 10 mg/kg, a solução final foi preparada a uma concentração de 1,0 mg/mL; para o grupo de 25 mg/kg, a concentração final foi de 2,5 mg/mL; e para o grupo de 50 mg/kg, a concentração final foi de 5,0 mg/mL. Em cada caso, o volume total da solução preparada para o grupo foi de aproximadamente 3,36 mL, considerando-se 0,28 mL por camundongo e um acréscimo de 20% para compensar perdas durante a pipetagem. O volume individual administrado a cada camundongo foi calculado com base no peso corporal medido no dia da administração, seguindo a regra de 10 mL/kg, resultando em volumes próximos a 0,28 mL para um camundongo de cerca de 28 g (Tabela 1).

As soluções foram submetidas à agitação até completa homogeneização e administradas imediatamente por gavagem oral, utilizando seringa apropriada para o procedimento. Em todos os grupos experimentais, manteve-se a concentração final

de DMSO $\leq 5\%$ (v/v), de modo a assegurar segurança e minimizar possíveis efeitos tóxicos do solvente. Foi incluído um grupo controle tratado exclusivamente com o veículo, constituído por DMSO diluído em água destilada na mesma proporção utilizada nos grupos tratados. Todas as soluções foram preparadas no dia da administração e mantidas protegidas da luz até o momento do uso.

Os tratamentos dos animais tiveram início 24 horas após os procedimentos de implantação subcutânea das células tumorais e foram repetidos durante sete dias consecutivos. Os animais foram pesados diariamente durante todo o período experimental. No oitavo dia, os camundongos foram anestesiados com administração intraperitoneal de xilazina/cetamina (1:1, 5 mg/kg) e 0,5 mL de sangue periférico foi coletado do plexo orbital e transferido para tubos de coleta pediátricos contendo EDTA para posterior análise hematológica. Posteriormente, os animais foram eutanasiados com dose letal de anestésico xilazina/cetamina (1:1, 20 mg/kg). Os tumores, bem como o fígado, baço e rins dos animais, foram removidos cirurgicamente, pesados (dados expressos em mg/100 g de peso dos camundongos) e fixados em formalina a 10% (pH 7,4) por 48 horas para posterior análise. A taxa de inibição do crescimento tumoral (%) foi avaliada utilizando a Equação 2:

$$\text{Equação 2: } ICT(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100$$

No qual ICT (%) é o percentual de inibição do crescimento tumoral; A é o peso médio dos tumores (mg/100g) dos animais do grupo veículo; e B é o peso do tumor de cada animal dos demais grupos experimentais.

4.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DESCRITIVA DOS TUMORES EXCISADOS

Todos os espécimes cirúrgicos (tumores e órgãos removidos) foram processados histologicamente e emblocados em parafina. Seis secções histológicas (5 μm) coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) foram obtidas de cada caso para análise das características histopatológicas dos tumores excisados dos diferentes grupos experimentais. Nos tumores S-180, foram observadas as seguintes

variáveis histopatológicas: padrão de crescimento tumoral (bordas tumorais irregulares infiltrando dos tecidos adjacentes ou bordas regulares promovendo compressão dos tecidos adjacentes); grau de atipia das células tumorais (leve, moderada ou intensa); e pela presença de sinais morfológicos de agressividade (invasão intravascular tumoral ou invasão perineural).

4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS ANTÍGENOS Ki67, CASPASE-3 CLIVADA, CASPASE 8 CLIVADA, BCL-2, BAX E NF-κB

Inicialmente, cortes histológicos de 3 µm de espessura de cada bloco de parafina foram obtidas utilizando um micrótomo semiautomático (Modelo MRPSA, Luptec, São Carlos, Brasil) e montadas em lâminas de vidro Starfrost (Knittel, Braunschweig, Alemanha) previamente limpas e desengorduradas e silanizadas. Em seguida, as lâminas foram incubadas em tampão de citrato de sódio a 100 °C por 20 min para recuperação antigênica. Após a lavagem, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 30% (10 min, 25°C). Os cortes foram, então, incubados em câmara umidificada por 8 h à temperatura ambiente com os anticorpos primários (Tabela 2), seguindo as especificações do fabricante para tempo de incubação e diluição. A reação foi revelada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich) e a contracoloração efetuada com Hematoxilina de Meyer (3 min). Para o controle da reação (sem anticorpo primário), os tecidos foram incubados com tampão de bloqueio, sem a inclusão do anticorpo primário. Em seguida, foi procedida a desidratação em etanol, limpeza em xilol e montagem com Permount (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA).

Tabela 2. Anticorpos utilizados para o ensaio de imuno-histoquímica

Anticorpo	Fabricante	Diluição	Função do antígeno
Anti-Ki67 (monoclonal)	FastBio	1:100	Proliferação celular
Anti-Bcl-2 (monoclonal)	FastBio	1:100	Anti-apoptose (via intrínseca)
Anti-Bax (monoclonal)	FastBio	1:200	Pró-apoptose (via intrínseca)
Anti-Caspase 3 clivada (policlonal)	FastBio	1:200	Efector da apoptose
Anti-Caspase 8 clivada (policlonal)	FastBio	1:50	Pró-apoptose (via extrínseca)
Anti-NF-κB p65 (monoclonal)	FastBio	1:200	Regulador de transcrição gênica

4.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS PROCEDIMENTOS DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Para análise quantitativa das células imunocoradas, 10 campos histológicos por lâmina (400 ×; 0,0625 mm²) foram selecionados por casualização sistemática (para cada campo selecionado, seguiam-se dois campos desprezados, da esquerda para a direita e de cima para baixo) e fotomicrografados em microscópio óptico modelo 0500R acoplado com sistema digital de captura de imagem OPTHD 20.3 MP (Opticam, São Paulo, Brasil). As reações imuno-histoquímicas foram avaliadas independentemente por dois observadores cegos sob microscopia óptica, com o auxílio do software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD EUA, versão 1.54k). Para marcadores nucleares (Ki-67 e NF-κB/p65), a porcentagem de núcleos corados positivamente foi determinada em cinco campos de alta potência (400×) dentro das áreas mais reativas. O índice de marcação foi calculado como a razão entre núcleos positivos e núcleos totais × 100. Marcadores citoplasmáticos (caspase-3 clivada, caspase-8 clivada, Bcl-2 e Bax) foram avaliados semiquantitativamente, considerando tanto a intensidade quanto a extensão da imunocoloração. A intensidade foi graduada de 0 (ausente) a 3 (forte), enquanto a extensão foi categorizada em quatro grupos de acordo com a proporção de células positivas: 0 (<5%), 1 (5–25%), 2 (26–50%) e 3 (>50%). A pontuação final foi obtida multiplicando-se intensidade e extensão (Anvari et al., 2012).

4.6 ANÁLISE DOS EFEITOS DO TRATAMENTO EXPERIMENTAL SOBRE A ASSA DOS ANIMAIS E CONSUMO DE RAÇÃO E ÁGUA AO LONGO DO PERÍODO EXPERIMENTAL

Durante todo o período experimental, os camundongos foram pesados e suas massas registradas diariamente. Foram registrados também os consumos diários de água e ração.

4.7 ANÁLISE DOS EFEITOS DO TRATAMENTO EXPERIMENTAL SOBRE INDICADORES HEMATOLÓGICOS

No oitavo dia, e antes da eutanásia, foram coletadas amostras sanguíneas por meio do plexo orbital sob efeito anestésico, e utilizados capilares internamente revestidos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), evitando assim a coagulação da amostra até o tubo coletor, preservando a integridade do material. Amostras sanguíneas de cerca de 0,25ml foram coletadas e transferidas para tubos coletores pediátricos contendo EDTA, uma vez que a quantidade se apresenta limitada por se tratar de camundongos. Os parâmetros hematológicos avaliados foram: contagem de leucócitos totais, contagem de eritrócitos totais, dosagem de hemoglobina e hematócrito. O exame hematológico foi realizado através de automação com Analisador Hematológico URIT® 3000 Plus, previamente calibrado. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada através de esfregaço sanguíneo previamente elaborado com as amostras frescas, através de uma gota do sangue total em lâmina de vidro, com borda fosca e identificada. Após os esfregaço estarem prontos, eles foram coradas com corantes panópticos e realizada a contagem diferencial em 100 células utilizando microscopia de luz em aumento de 40x.

4.8 ANÁLISE DOS EFEITOS DO TRATAMENTO EXPERIMENTAL SOBRE INDICADORES BIOQUÍMICOS DE FUNÇÃO HEPÁTICA E RENAL

Foram realizadas avaliações bioquímicas por meio da amostra de sangue obtida pelo plexo orbital, destinadas a investigar as funções renais e hepáticas. Foram coletadas amostras de 0,5 ml de sangue que foram transferidas para tubos coletores pediátricos sem anticoagulante para obtenção de soro após a centrifugação a 3000 RPM por 10 minutos. Os parâmetros bioquímicos mensurados foram aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), para avaliação de função hepática, bem como a ureia e creatinina, para avaliar as funções renais, utilizando-se kits comerciais Labtest® respectivos para cada análise. A determinação das dosagens foi realizada por aparelho semiautomatizado Bioplus 200 e automatizado Labmax 240.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis quantitativas foram submetidas a teste de homocedasticidade e normalidade de distribuição de valores. Para teste de normalidade, foi aplicado o

teste de Shapiro-Wilk, enquanto para análise de homocedasticidade foram aplicados os testes de Bartlett (supõe que a variável tem distribuição normal) e Levene (supõe que os dados têm qualquer distribuição contínua). Os dados com distribuição normal e com homocedasticidade foram expressos sob a forma de média $\pm$ erro padrão da média e comparados entre si utilizando o teste ANOVA One-Way seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados que não obedeceram a estes pressupostos (distribuição normal e/ou homocedasticidade) foram expressos como mediana e amplitude interquartil e comparados pelo teste Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando os valores de $p < 0,05$. Em ambos os casos, o programa estatístico utilizado para as análises será o Graphpad Prism (versão 5.0, San Diego, EUA).

5 RESULTADOS

Conforme demonstrado na **Figura 1A**, os grupos tratados com ácido gálico AG25 e AG50 apresentaram redução significativa da massa tumoral em comparação ao grupo controle tratado com solução veículo ($p<0,05$ e $p<0,001$, respectivamente). O grupo 5-FU, por sua vez, apresentou massa tumoral ponderal média menor que todos os demais grupos ($p<0,001$). O percentual médio de inibição do crescimento tumoral dos grupos experimentais em relação à massa ponderal média do grupo (controle negativo) está apresentado na **Figura 1B**. Apesar de, como esperado, o grupo AG10 ter apresentado inibição significativamente menor que o do grupo 5FU ($p<0,05$), não houve diferença significativa entre esse último e os grupos AG25 e AG50 ($p>0,05$).

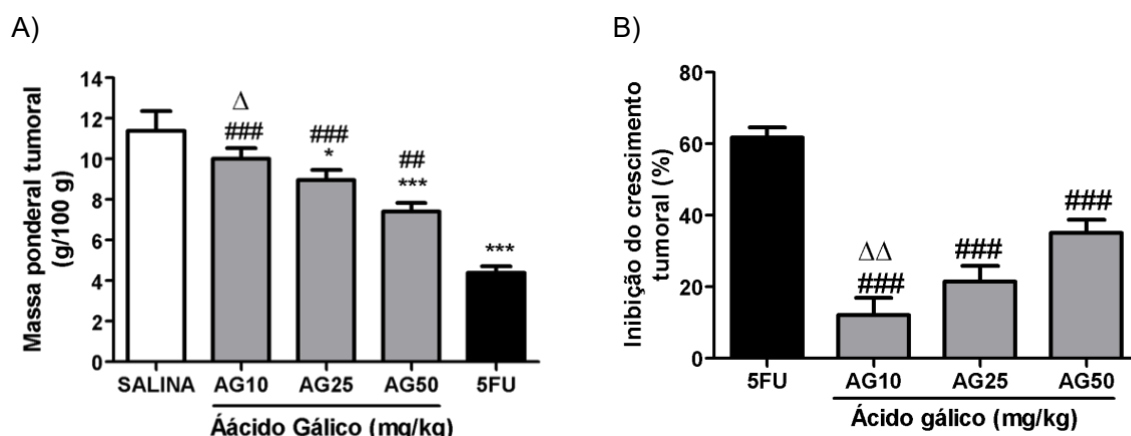


Figura 1. (A) Determinação da massa ponderal tumoral (g/100g) nos grupos experimentais tratados com solução veículo, ácido gálico nas concentrações de 10, 25 e 50 mg/kg (AG10/22/50) e 5 fluorouracil (5FU, 25 mg/kg). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. **(B)** Percentual médio de inibição do crescimento tumoral em relação à média do grupo veículo (controle negativo). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Diferenças significativas em comparação com o grupo veículo são apresentadas como * $p<0,05$ e *** $p<0,001$; em comparação com o grupo 5FU como ## $p<0,01$ e #### $p<0,001$; e em comparação com AG50, como Δ $p<0,05$ (ANOVA e teste *post-hoc* de comparações múltiplas de Tukey).

As principais características histopatológicas dos tumores S-180 foram similares entre os grupos estudados e, por isso, descritas conjuntamente. Foi observada proliferação sólida e difusa de células neoplásicas que infiltravam e destruíam os tecidos adjacentes, incluindo músculo estriado esquelético e tecido adiposo da hipoderme. Infiltração perineural evidente era facilmente identificada, embora não tenham sido detectados êmbolos tumorais nos grupos avaliados. Os

tumores produziam extensas áreas de necrose coagulativa, organizadas em trabéculas ou blocos irregulares dentro do parênquima neoplásico. Os principais achados anteriormente mencionados estão apresentados na **Figura 2**. Um achado de especial interesse foi que a extensão das áreas de necrose foi menor nos grupos 5-FU e AG50 em comparação com os outros grupos experimentais.

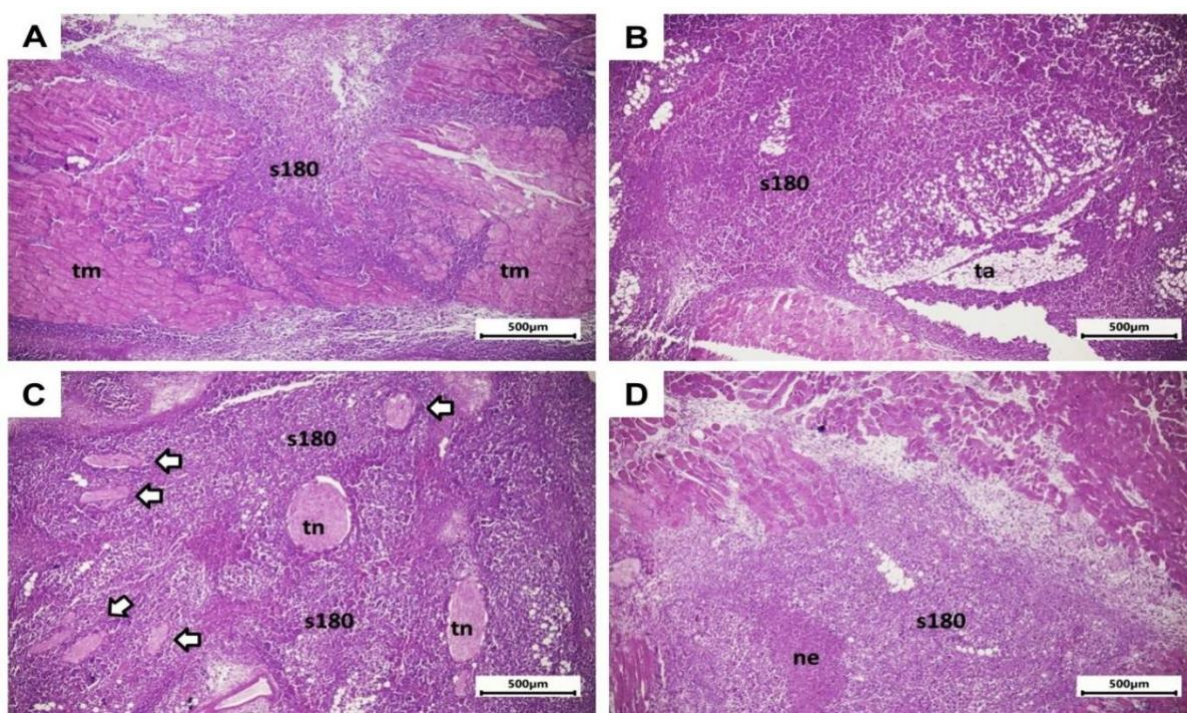


Figura 2. Fotomicrografias panorâmicas de secções histológicas coradas em HE representativas dos principais achados histopatológicos observados nos tumores de S-180. **(A)** Células tumorais em arranjo difuso invadindo, e dissociando feixes de fibras musculares estriadas esqueléticas **(B)** tecido adiposo lobular hipodérmicos (40 ×). **(C)** Extensa invasão da bainha perineural de nervos periféricos (40 ×). **(D)** Áreas focais de necrose coagulativa intraparenquimatosa (40 ×). **Legendas:** s180 – células tumorais de S-180; tm – tecido muscular estriado esquelético; ta – tecido adiposo maduro; tn – tecido nervoso (fibras nervosas periféricas) mais calibradas; setas brancas – fibrilas nervosas periféricas; ne – necrose coagulativa de células tumorais.

Individualmente, as células tumorais apresentaram morfologia extremamente heterogênea (**Figura 3**). A maior parte do componente parenquimatoso era composta de células poligonais, com citoplasma eosinofílico amplo, e núcleos escuros centrais ou excêntricos, conferindo-lhes aparência rabdoide. Contudo, em muitas áreas, as células assumiam morfologia epiteloide, com núcleos grandes, de cromatina mais dispersa e, por vezes nucléolos proeminentes. Mais raramente, era possível notar tanto uma diferenciação mais fusocelular e arranjo fascicular, de aspecto tipicamente sarcomatoide, quanto em células arredondadas de citoplasma escasso e núcleos cêntricos, frouxamente dispostas, apresentação morfológica e arranjo arquitetural que lembrava um padrão leucemoide. Finalmente, um último

espectro morfológico identificado foi de células grandes, com citoplasma vacuolizado e granuloso, septados por traves irregulares eosinofílicas que pareciam irradiar dos núcleos centralmente localizados. Essas células lembravam as chamadas “células em aspecto vegetal”, tipicamente vistos em hepatócitos exibindo acúmulo intracitoplasmático de glicogênio. A atividade mitótica era elevada em todos os casos analisados (> 04 mitoses/ 10 campos histológicos, 400 ×).

De especial interesse, foi o fato de que as dimensões médias dos tumores pareceram influenciar sobremaneira seu padrão de crescimento e relação com os tecidos hipodérmicos dos animais hospedeiros (**Figura 4**). Dessa forma, nos grupos veículo e AG10, nos quais os tumores apresentaram maiores dimensões, as células tumorais que se infiltravam de forma mais profunda e intensa no tecido muscular estriado esquelético e no tecido adiposo. Esse padrão de crescimento resultou em uma significativa dissociação e destruição desses tecidos, além de uma invasão peri e endoneural pronunciada de fibras nervosas periféricas.

Em contraste, os tumores dos grupos AG25, AG50 e 5FU, significativamente menores, exibiram margens com um padrão de crescimento predominantemente expansivo/compressivo, com menor penetração no tecido muscular estriado esquelético e tecido adiposo. Embora a invasão perineural também estivesse presente nesses grupos, sua extensão foi consideravelmente reduzida em comparação aos grupos veículo e AG10.

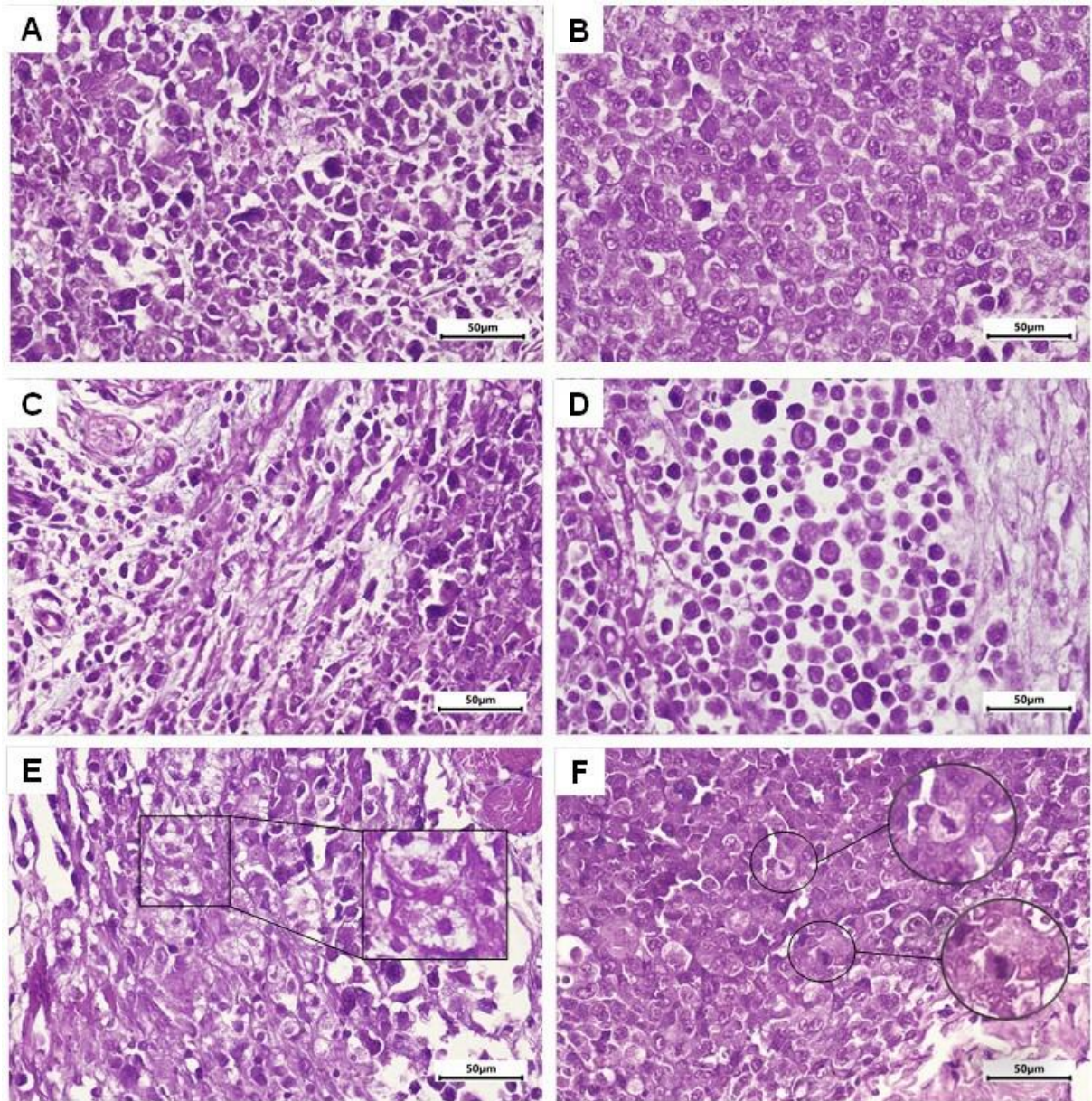


Figura 3. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE representativas dos principais aspectos morfológicos assumidos pelas células do S-180. **(A)** Células poligonais pleomórficas de aspecto rabdoide. **(B)** Células epitelioides de núcleos grandes de cromatina dispersa e nucléolos evidentes. **(C)** Células fusiformes tipicamente sarcomatoides em arranjo fascicular. **(D)** Células de aspecto “leucemoide” frouxamente dispostas exibindo morfologia arredondada e citoplasma escasso e núcleos hipercromáticos. **(E)** Células volumosas com citoplasma vacuolizado e granuloso (aspecto de “célula vegetal”). No detalhe, célula vacuolizadas ampliadas (800 ×). **(F)** Atividade mitótica expressiva (mitoses em metáfase). No detalhe, figuras mitóticas ampliadas (800 ×).

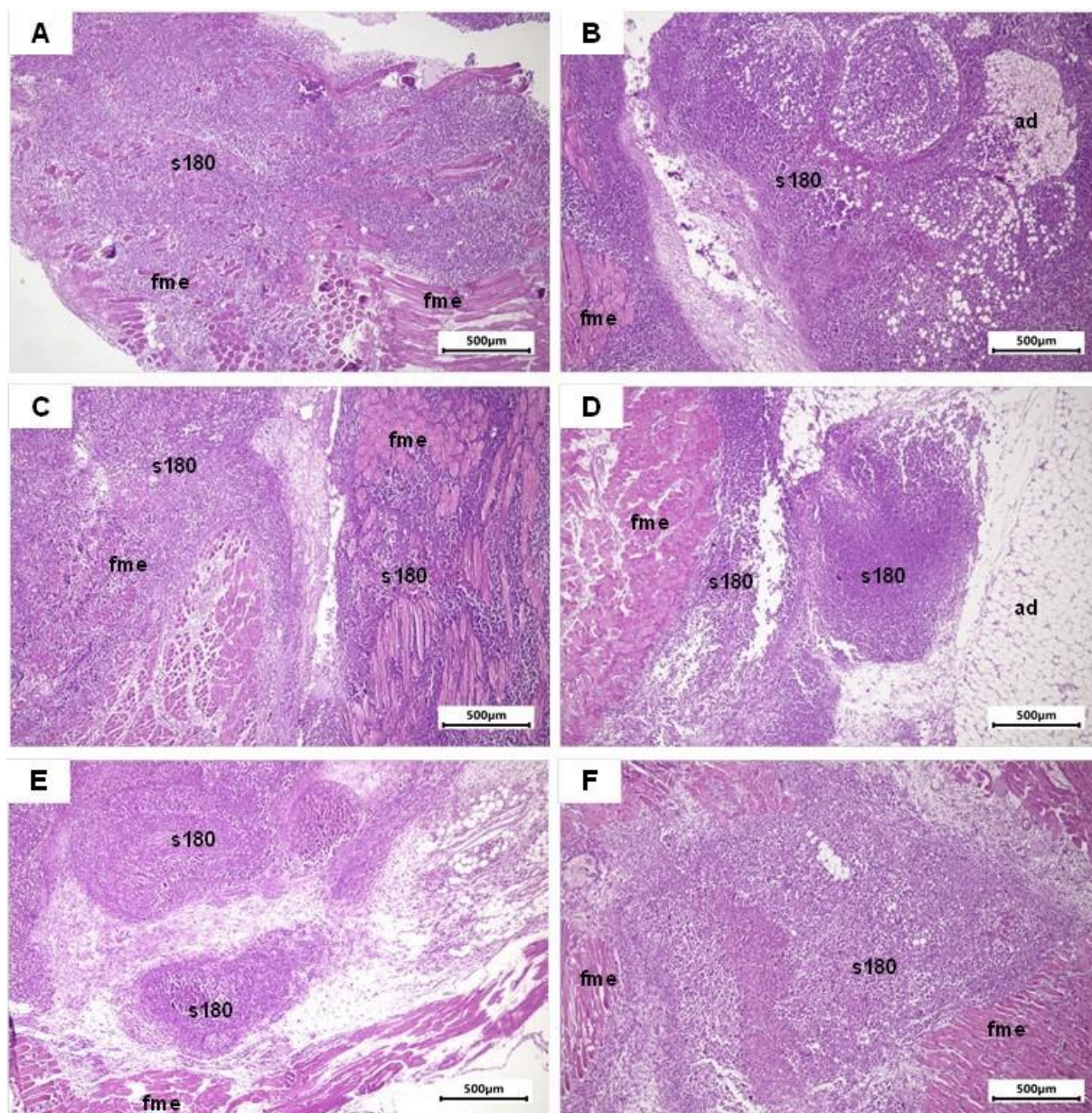


Figura 4. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE (40 ×) representativas dos padrões de invasão do S-180 nos tecidos hipodérmicos dos animais hospedeiros. Observar intensa invasão, dissociação e destruição de fibras musculares e tecido adiposo observadas nos grupos (A/B) veículo e (C) AG10 em contraste com ao padrão mais expansivo/compressivo da relação das células tumorais com as fibras musculares circunjacentes ao tumor visto nos grupos (D) AG25, (E) AG50 e (F) 5FU. **Legenda:** s180 – células tumorais do S-180; fme – fibras musculares estriadas esqueléticas; ad – tecido adiposo.

5.1 ANÁLISE QUANTITATIVA DO ÍNDICE PROLIFERATIVO (EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO ANTÍGENO Ki67)

Para análise do índice proliferativo, o percentual de células ciclantes de cada tumor foi obtido por meio da análise quantitativa do percentual de células Ki67 positivas. O antígeno Ki67 exibiu padrão de imunomarcacão tipicamente nuclear,

expressão essa se mostrando relativamente heterogênea, mas bem distribuída pelos tumores. A análise quantitativa de células Ki67 positivas revelou diferenças significativas entre as médias dos diferentes grupos analisados ($F= 33,53$; $p<0,0001$). Dessa forma, o percentual de células Ki67 positivas no grupo Veículo ($14,2 \pm 2,6\%$) foi significativamente maior que nos grupos AG50 ($9,5 \pm 3,79\%$) ($p<0,001$) e 5FU ($7,3 \pm 8,9\%$) ($p<0,001$). Além disso, o índice proliferativo do grupo 5FU foi significativamente menor que no AG50 ($p<0,05$) (**Figura 5**).

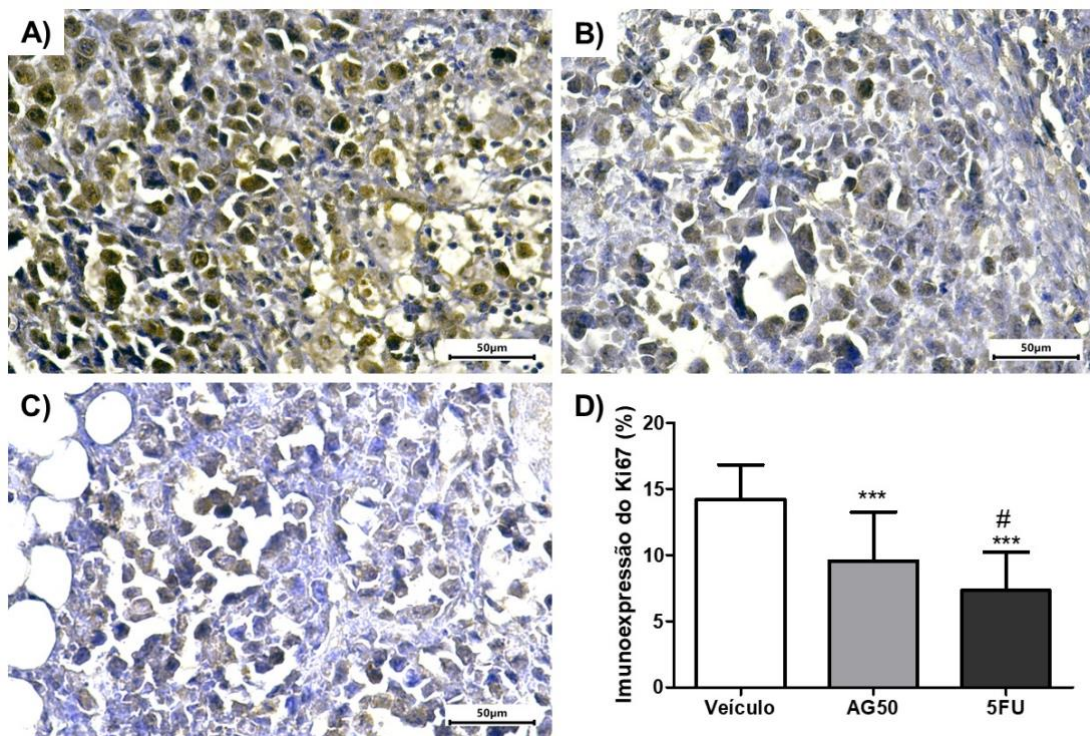


Figura 5. Fotomicrografias representativas do padrão de expressão nuclear do antígeno Ki67 nos grupos (A) Veículo, (B) AG50 e (C) 5FU (SABC, 400 x). (D) Análise quantitativa do percentual médio de células Ki67-positivas nos diferentes grupos experimentais. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Diferenças significativas Vs. Veículo: *** $p<0,001$; vs. AG50: # $p<0,05$ (Anova e teste *post-hoc* de comparações múltiplas de Tukey).

Para investigar a potencial ativação da via executora comum da cascata de apoptose foi analisada a imunoposição da enzima caspase 3 clivada. Foi observada uma expressão difusa, eminentemente citoplasmática, usualmente em blocos irregulares de células tumorais, e menos comumente em células isoladas. A análise semiquantitativa revelou diferença significativa nas medianas dos escores de intensidade/distribuição da imunomarcagem entre os grupos ($p<0,0001$). Dessa forma, a mediana dos escores dos grupos AG50 (9,0; 6,0 - 9,0; $p<0,001$) e 5FU (9,0;

6,0 - 12,0; $p < 0,001$) foi significativamente maior que no grupo Veículo (3,5; 2,0 - 4,0). Não houve diferença significativa entre os grupos AG50 e 5FU ($p > 0,05$) (**Figura 6**).

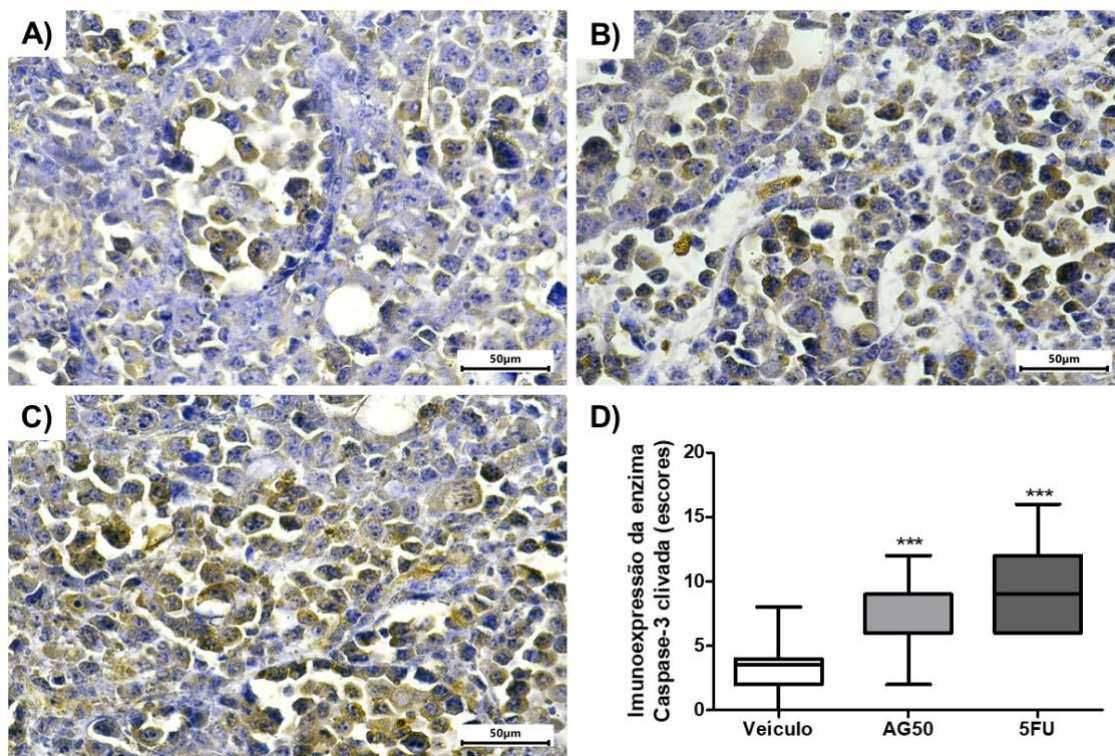


Figura 6. Fotomicrografias representativas do padrão de expressão citoplasmático da enzima caspase-3 clivada nos grupos (A) Veículo, (B) AG50 e (C) 5FU (SABC, 400 x). (D) Análise semiquantitativa da intensidade/distribuição da imunomarcagem positiva nos diferentes grupos experimentais. Dados expressos como valores máximos e mínimos, mediana e intervalo interquartil. Diferenças significativas Vs. Veículo: *** $p < 0,001$ (Teste de Kruskal-Wallis e teste *post-hoc* de comparações múltiplas de Dunn).

Para investigar a possível ativação da via intrínseca (mitocondrial) da apoptose, foi avaliada a imunoexpressão das proteínas Bcl-2 (antiapoptótica) e Bax (pró-apoptótica) em células tumorais. Observou-se padrão de marcação predominantemente citoplasmático e de distribuição irregular para ambos os antígenos.

A análise semiquantitativa demonstrou diferença significativa nas medianas dos escores de intensidade/distribuição da imunomarcagem entre os grupos experimentais, tanto para Bcl-2 quanto para Bax ($p < 0,0001$), porém com padrões de resposta opostos. Verificou-se redução significativa na imunoexpressão de Bcl-2 nos grupos tratados com ácido gálico na dose de 50 mg/kg (AG50: 1,0; 1,0–4,0; $p <$

0,001) e 5-fluorouracil (5-FU: 3,0; 1,0–3,0; $p < 0,001$), em comparação ao grupo Veículo (4,0; 4,0–6,0). Em contraste, observou-se aumento significativo na imunopressão de Bax nos grupos AG50 (8,0; 6,0–9,0; $p < 0,001$) e 5-FU (8,0; 6,0–9,0; $p < 0,001$), quando comparados ao grupo Veículo (3,0; 2,0–6,0). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos AG50 e 5-FU ($p > 0,05$) (**Figura 7**).

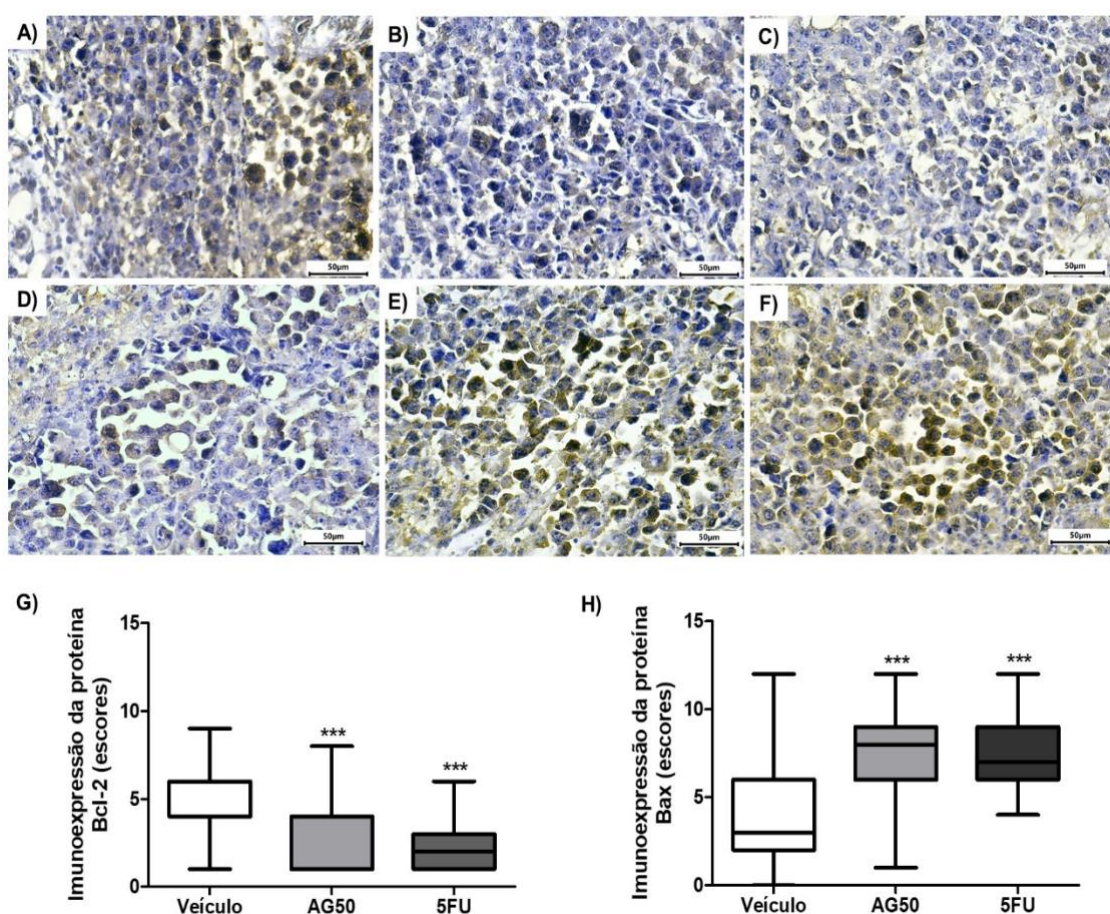


Figura 7. Fotomicrografias representativas do padrão de expressão citoplasmática das proteínas Bcl-2 (A/B/C) e Bax (D/E/F) nos grupos (A/D) Veículo, (B/E) AG50 e (C/F) 5FU (SABC, 400 x). (D) Análise semiquantitativa da intensidade/distribuição da imunomarcagem positiva nos diferentes grupos experimentais. Dados expressos como valores máximos e mínimos, mediana e intervalo interquartil. Diferenças significativas Vs. Veículo: *** $p < 0,001$ (Teste de Kruskal-Wallis e teste *post-hoc* de comparações múltiplas de Dunn).

Para investigar a potencial ativação da via iniciadora extrínseca da cascata de apoptose foi analisada a imunopressão da enzima caspase-8 clivada. Foi observada uma expressão irregular e de intensidade bastante heterogênea, com baixo índice de imunopositividade, predominantemente citoplasmática, nas células isoladas. A análise semiquantitativa revelou diferença significativa nas medianas dos

escores de intensidade/distribuição da imunomarcção entre os grupos ($p < 0,01$). Dessa forma, a mediana dos escores do grupo 5FU (1,0; 1,0 - 1,25) foi significativamente maior que no grupo Veículo (1,0; 0,0 - 1,0; $p < 0,01$) e AG50 (1,0; 0,0 - 1,0; $p < 0,05$). Contudo, não houve diferença significativa entre a mediana dos escores do grupo e os demais grupos ($p > 0,05$) (**Figura 8**).

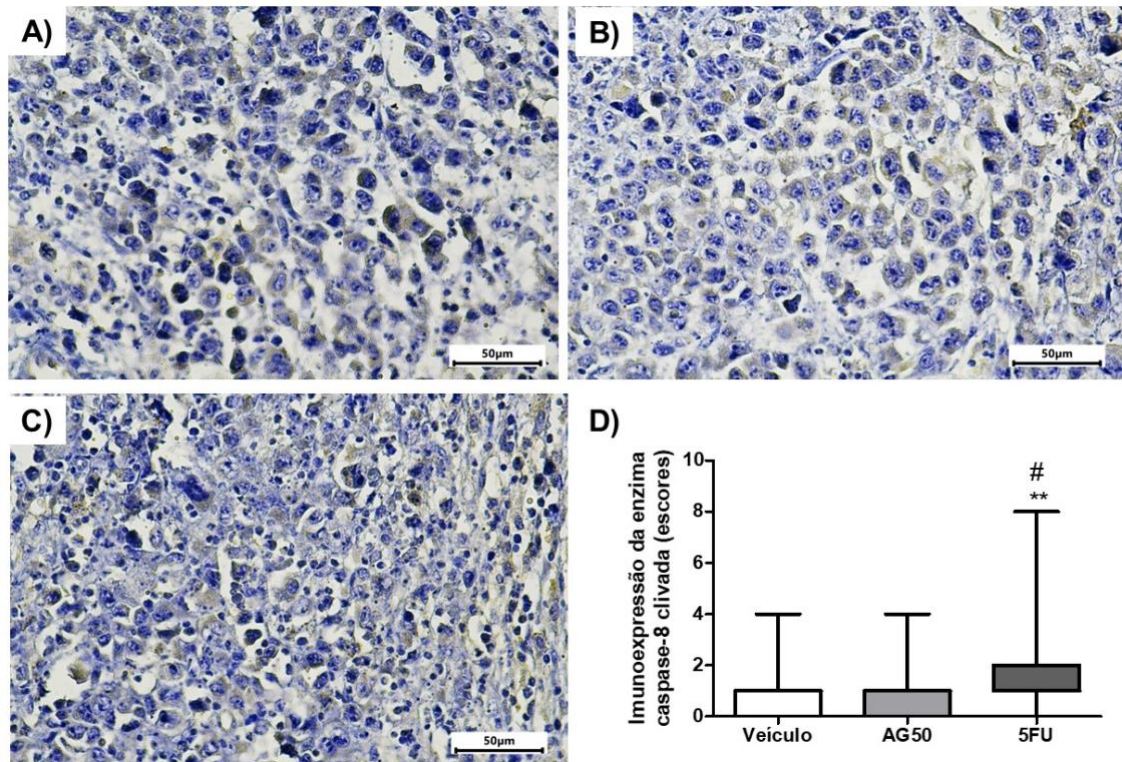


Figura 8. Fotomicrografias representativas do padrão de expressão citoplasmática da enzima caspase-8 clivada nos grupos (A) Veículo, (B) AG50 e (C) 5FU (SABC, 400 x). (D) Análise semiquantitativa da intensidade/distribuição da imunomarcção positiva nos diferentes grupos experimentais. Dados expressos como valores máximos e mínimos, mediana e intervalo interquartil. Diferenças significativas Vs. Veículo: ** $p < 0,01$; vs. AG50 # $p < 0,05$ (Teste de Kruskal Wallis e teste *post-hoc* de comparações múltiplas de Dunn).

Para análise do potencial envolvimento da modulação da via de sinalização MAPK/NF- κ B/p65, foi mensurado o percentual de células tumorais exibindo expressão nuclear do antígeno NF- κ B. Foi considerada ativação funcional (marcação positiva) a identificação de imunorreatividade nuclear, independentemente da presença ou não de marcação citoplasmática. A análise quantitativa de células NF- κ B-positivas revelou diferenças significativas entre as médias dos diferentes grupos analisados ($F = 94,72$; $p < 0,0001$). Dessa forma, o percentual de células NF- κ B-positivas no grupo Veículo ($38,4 \pm 9,2\%$) foi

significativamente maior que nos grupos AG50 ($16,8 \pm 7,7\%$) ($p < 0,001$) e 5FU ($9,9 \pm 7,6\%$) ($p < 0,001$). Contudo, a redução na expressão desse antígeno foi significativamente maior no grupo 5FU que no AG50 ($p < 0,05$) (**Figura 9**).

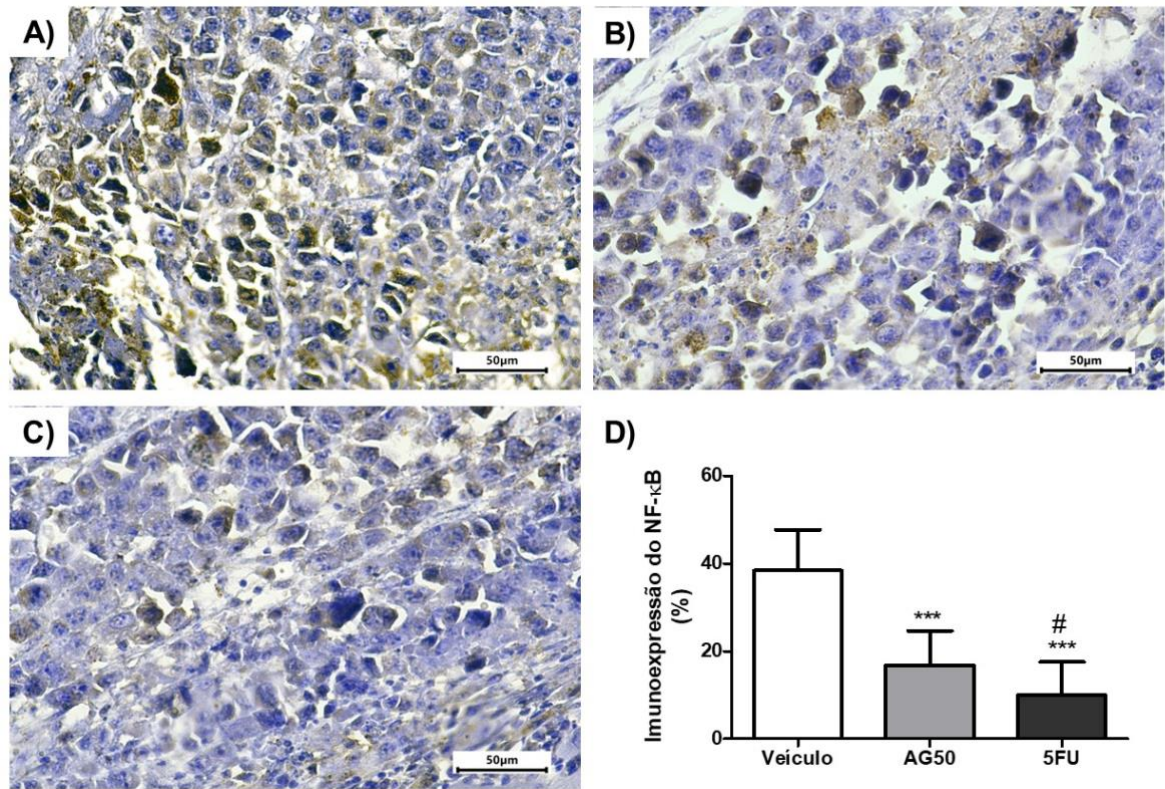


Figura 9. Fotomicrografias representativas do padrão de expressão nuclear do antígeno NF-κB nos grupos (A) Veículo, (B) AG50 e (C) 5FU (SABC, 400 x). (D) Análise quantitativa do percentual médio de células NF-κB -positivas nos diferentes grupos experimentais. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Diferenças significativas Vs. Veículo: *** $p < 0,001$; vs. AG50: # $p < 0,05$ (Anova e teste *post-hoc* de comparações múltiplas de Tukey)

A análise do perfil de variação significativa na massa corporal média dos camundongos dos diferentes grupos, ao longo dos oito dias de período experimental, está representada na **Figura 10**. Não foi observada variação significativa na massa corporal média dos animais tratados com veículo ou AG, nem entre os grupos, nem dentro de cada grupo ($p > 0,05$). Contudo, entre os dias seis, sete e oito, foi evidenciada uma redução progressiva da massa corporal dos espécimes do grupo 5FU em relação ao grupo veículo ($p < 0,001$)

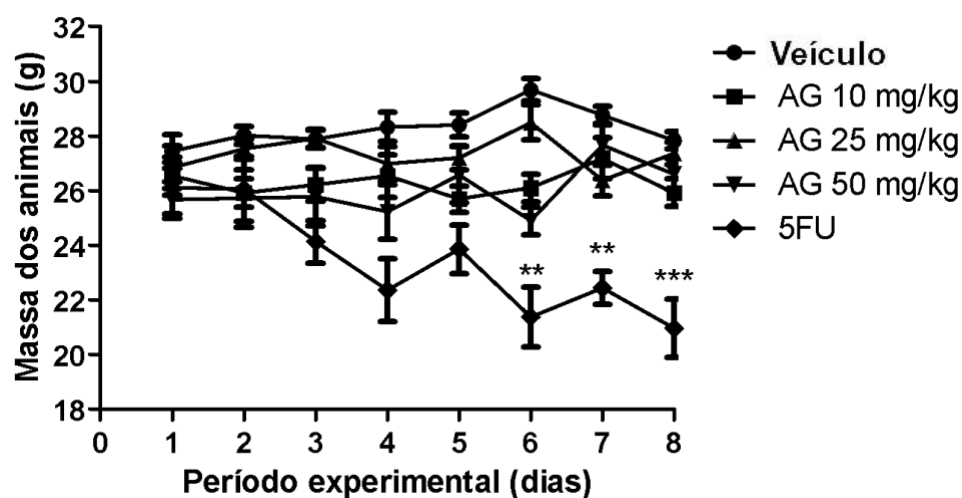
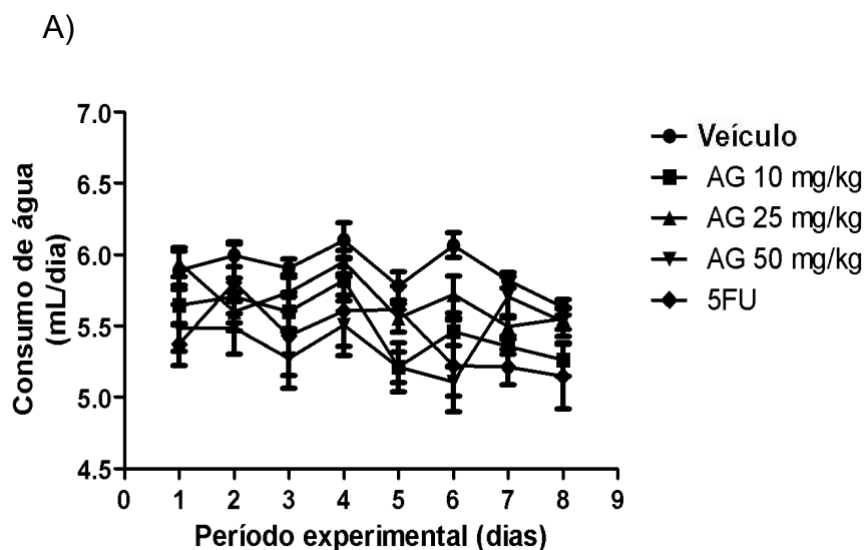


Figura 10. Determinação do perfil de ganho/perda de massa dos animais que compunham os grupos tratados com solução veículo, ácido gálico nas concentrações de 10, 25 e 50 mg/kg (AG10/25/50) e 5 fluorouracil (5-FU, 25 mg/kg) ao longo dos oito dias do período experimental. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Diferenças significativas entre o grupo 5-FU e os demais grupos estão expressas como ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA de duas vias e teste *post-hoc* de comparações múltiplas de Tukey)

Como demonstrado na **Figura 11A**, o consumo de água não exibiu variações significativas ($p > 0,05$) entre os grupos ao longo do período experimental. Contudo, a partir do quinto dia, houve uma redução significativa do consumo de ração em todos os grupos analisados ($p < 0,05$) (**Figura 11B**). Além disso, essa redução foi notadamente mais expressiva no grupo 5-FU, que apresentou consumos médios de ração significativamente mais baixos que os demais grupos nos dias cinco, seis, sete e oito ($p < 0,001$).



B)

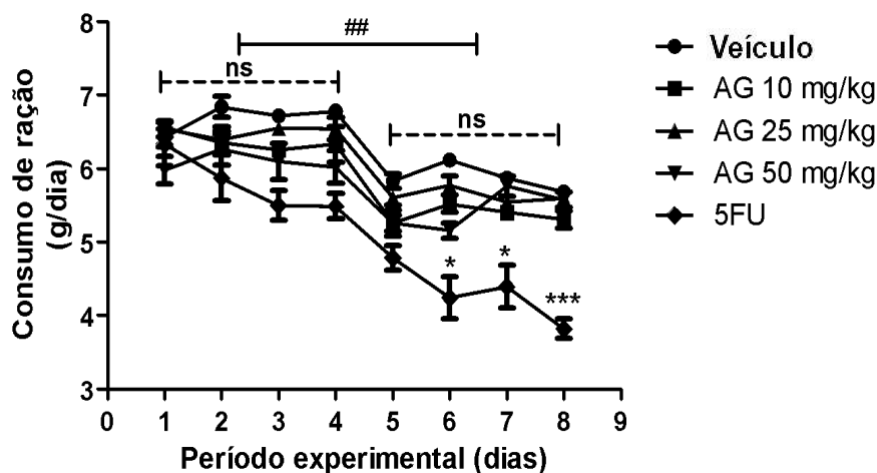


Figura 11. Determinação do consumo diário médio de (A) água (mL/dia) e (B) ração (g/dia) pelos animais que compunham os grupos tratados com solução veículo, ácido gálico nas concentrações de 10, 25 e 50 mg/kg (AG10/25/50) e 5 fluorouracil (5FU, 25 mg/kg) ao longo dos oito dias do período experimental. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Diferenças significativas entre o grupo 5FU e os demais grupos estão expressas como * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$; diferenças significativas entre as médias dos quatro primeiros dias e dos quatro últimos estão expressas como ## $p < 0,01$; sem diferenças estatisticamente significativa entre os grupos, $p > 0,05$ (ANOVA de duas vias e teste *post-hoc* de comparações múltiplas de Tukey).

A análise da massa ponderal média do fígado, rins e baço dos animais que compunham os diferentes grupos experimentais está representada na **Figura 12**. Não houve diferença significativa na massa média hepática ou renal entre os grupos submetidos aos distintos tratamentos. ($p > 0,05$). Contudo, assim como demonstrado na **Figura 12C**, o grupo tratado com 5-FU apresentou massa esplênica significativamente menor que todos os demais grupos experimentais ($p < 0,05$).

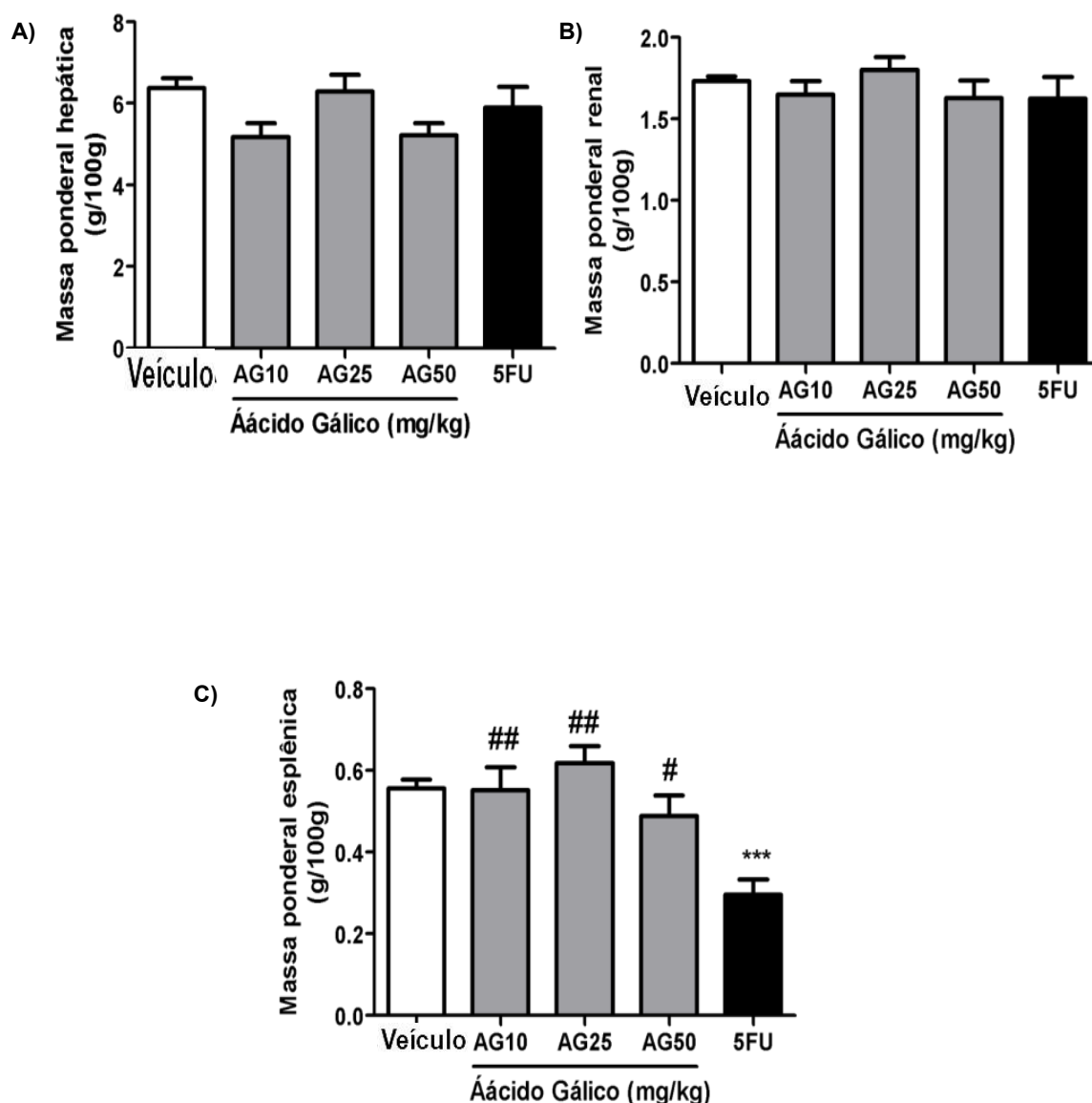


Figura 12. Determinação da massa ponderal média (g/100g) dos espécimes **(A)** hepáticos, **(B)** renais e **(C)** esplênicos dos animais dos grupos tratados com solução salina, ácido gálico nas concentrações de 10, 25 e 50 mg/kg (AG10/25/50) e 5 fluorouracil (5FU, 25 mg/kg) oito dias após o início do período experimental. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Diferenças significativas em comparação com o grupo Salina são apresentadas como *** $p < 0,001$; e em comparação com o grupo 5FU como # $p < 0,05$ e ### $p < 0,01$ (ANOVA e teste *post-hoc* de comparações múltiplas de Tukey).

Os principais dados hematológicos e bioquímicos dos camundongos Swiss portadores de S-180 submetidos aos diferentes tratamentos estão apresentados na **Tabela 3**. Não houve diferença significativa entre os grupos nos valores da série vermelha (eritrocítica) do hemograma ($p > 0,05$), com variação discreta entre os tratamentos. No entanto, comparando-se com os valores de referência (ARAÚJO et al., 2015), os animais do grupo AG10 exibiram discreta redução dos eritrócitos totais.

Da mesma forma, a hemoglobina corpuscular média (HCM) apresentou discreta elevação em relação aos valores de referência nos grupos tratados com AG.

A contagem de leucócitos foi significativamente reduzida no grupo 5FU ($2,07 \pm 0,83 \times 10^3/\text{mm}^3$; $p < 0,01$), abaixo dos valores de referência, indicando um efeito mielossupressor desse tratamento, mas não houve alteração significativa entre os grupos tratados com AG ($p > 0,05$). As contagens de plaquetas variaram amplamente entre os grupos, mas sem diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$) e com valores médios dentro do intervalo de referência.

Em relação aos marcadores de função hepática, a alanina aminotransferase (ALT) apresentou menores níveis médios dentro do intervalo de referência, sem diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Por outro lado, o grupo 5-FU apresentou uma redução significativa nos níveis de aspartato aminotransferase (AST) ($97,66 \pm 28,33 \text{ U/L}$; $p < 0,01$) em comparação ao grupo veículo. Os níveis de ureia e creatinina permaneceram dentro dos limites de normalidade para a espécie em todos os grupos (**Tabela 3**).

A análise histopatológica demonstrou que as amostras de fígado e rins dos animais experimentais não exibiram diferença significativa na sua massaponderal ($p > 0,05$), e apresentaram aspectos morfológicos consistentes com anormalidade (**Figuras 13 e 14**). Contudo, as amostras esplênicas do grupo 5FU apresentaram redução significativa da massa ponderal em relação a todos os demais grupos analisados ($p < 0,05$). Apresentaram, ainda, atrofia da polpa branca, expressa por redução no diâmetro médio e desorganização dos folículos linfoides, em contraste com o aspecto convencional identificado nos demais grupos (**Figura 15**).

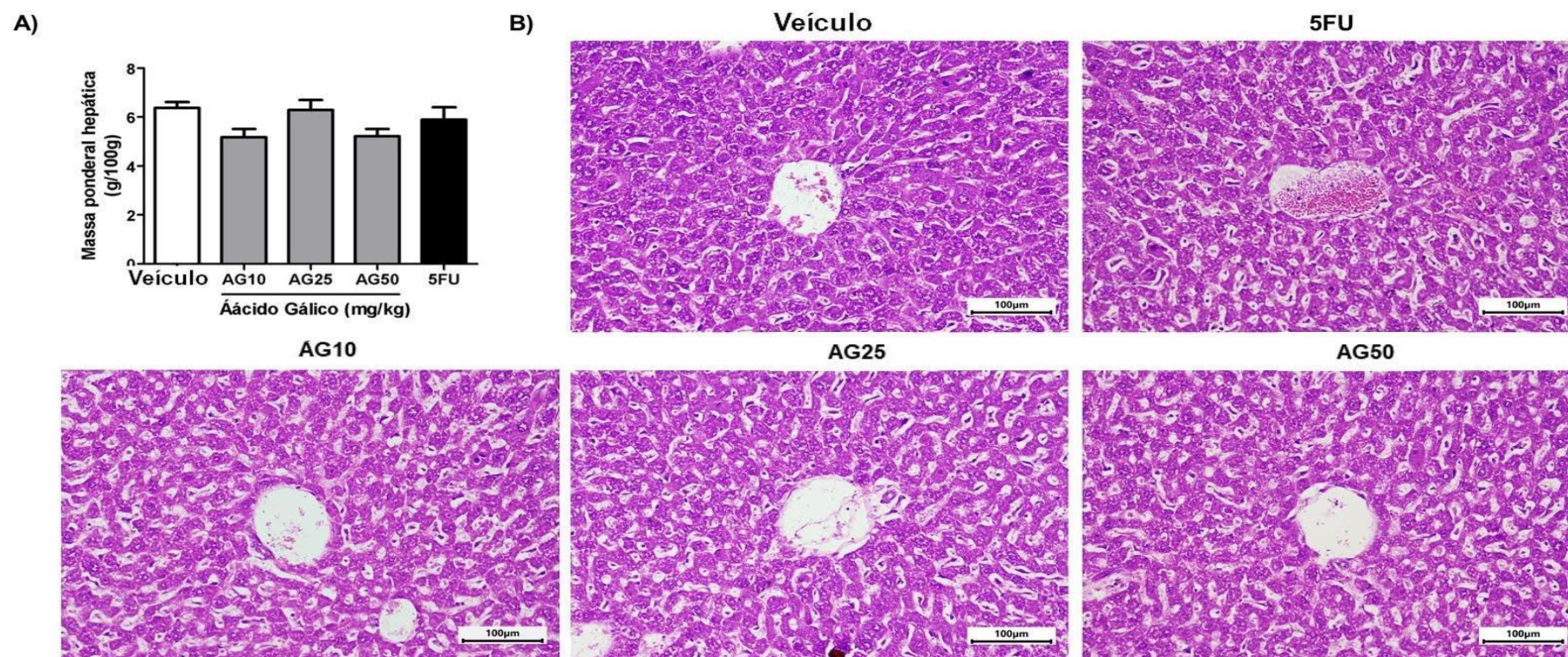


Figura 13. (A) Determinação da massa ponderal média (g/100g) dos espécimes hepáticos dos animais dos grupos tratados com solução veículo, ácido gálico nas concentrações de 10, 25 e 50 mg/kg (AG10/22/50) e 5 fluorouracil (5FU, 25 mg/kg) oito dias após o início do período experimental. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$, ANOVA). **(B)** Histologicamente, a morfologia hepática foi preservada em todos os grupos, com manutenção da arquitetura lobular, conservação dos cordões de hepatócitos, ausência de infiltrado inflamatório e integridade dos sinusóides (HE, 200 $\times$).

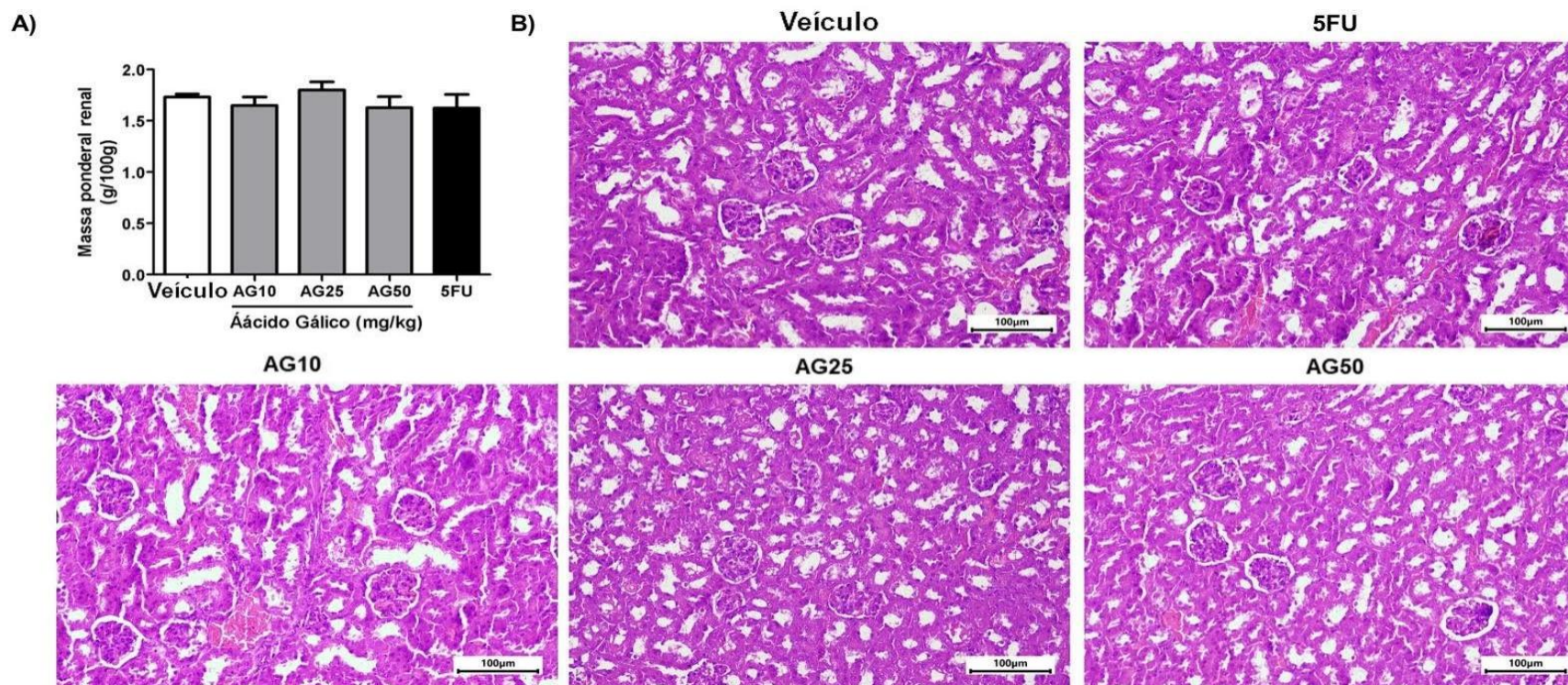


Figura 14 (A) Determinação da massa ponderal média (g/100g) dos espécimes renais dos animais dos grupos tratados com solução veículo, ácido gálico nas concentrações de 10, 25 e 50 mg/kg (AG10/25/50) e 5 fluorouracil (5FU, 25 mg/kg) oito dias após o início do período experimental. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$, ANOVA). **(B)** Histologicamente, a morfologia renal foi preservada em todos os grupos, com glomerulos e túbulos renais sem sinais histológicos de degeneração, necrose ou inflamação (HE, 200 $\times$).

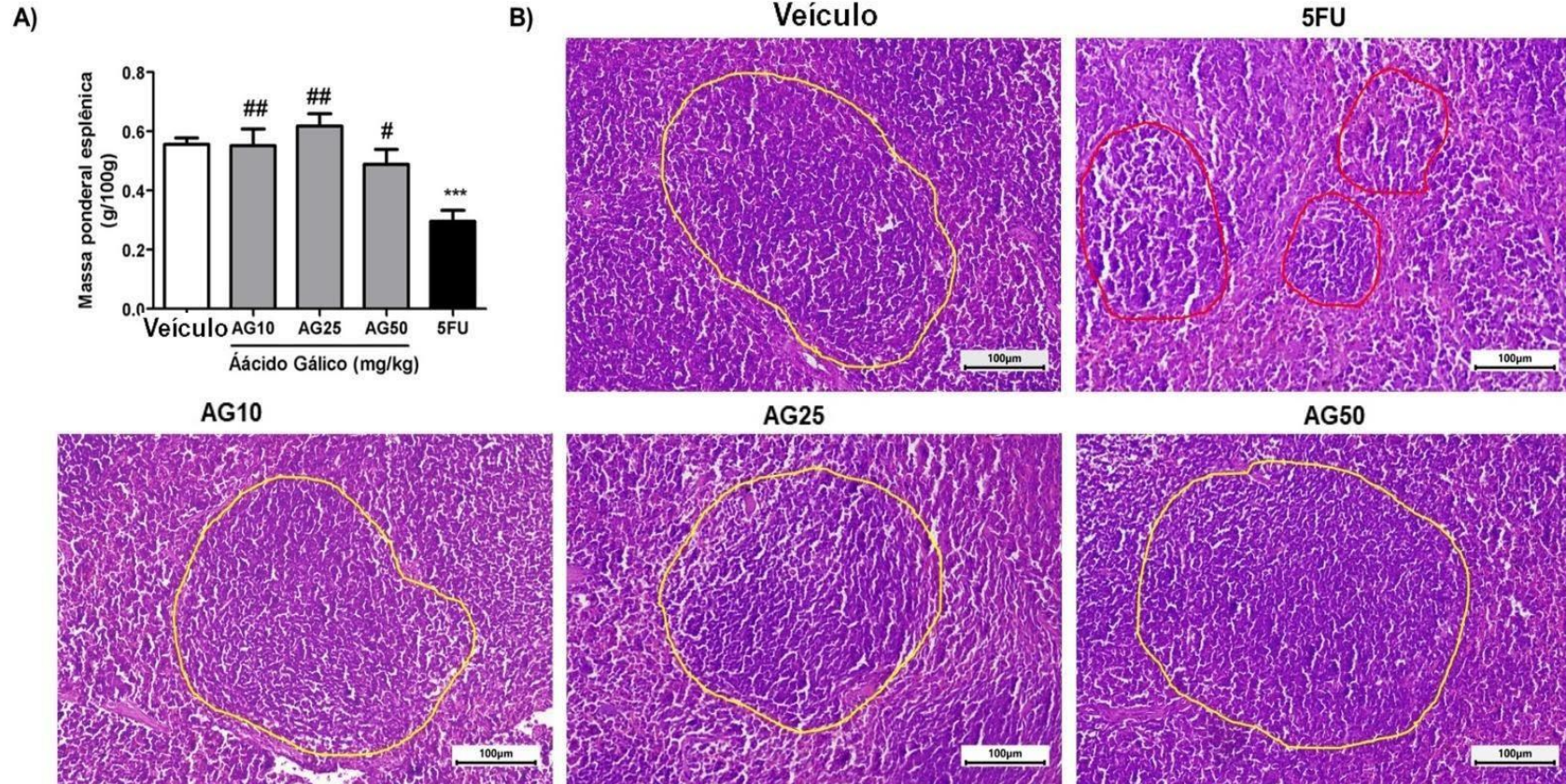


Figura 15. (A) Determinação da massa ponderal média (g/100g) dos espécimes esplênicos dos animais dos grupos tratados com solução veículo, ácido gálico nas concentrações de 10, 25 e 50 mg/kg (AG10/22/50) e 5 fluorouracil (5FU, 25 mg/kg) oito dias após o início do período experimental. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Diferenças significativas em comparação com o grupo veículo são apresentadas como *** $p < 0,001$; e em comparação com o grupo 5FU como # $p < 0,05$ e ### $p < 0,01$ (ANOVA e teste *post-hoc* de comparações múltiplas de Tukey). **(B)** Histologicamente, apenas o grupo 5FU exibiu atrofia da polpa branca, com redução do tamanho dos folículos linfoides (círculos vermelhos), enquanto nos demais grupos a arquitetura do tecido linfóide se mostrou homogênea (círculos amarelos) (HE, 200x)

Tabela 3. Determinação dos Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos de Camundongos *Swiss* Portadores de S-180 Submetidos a Tratamento com solução veículo, ácido gálico nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg (AG10, AG25 e AG50, respectivamente) e 5-Fluorouracil (25 mg/kg, 5FU).

Parâmetro	Veículo	AG10	AG25	AG50	5FU	Referência ¹
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	7,74 ± 1,32	6,02 ± 1,07	7,39 ± 0,71	7,88 ± 1,75	7,74 ± 1,32	7,2 - 10,3
Hematócrito (%)	43,94 ± 9,22	41,72 ± 9,55	47,18 ± 4,31	45,43 ± 12,50	43,62 ± 11,86	35,4 - 51,2
VCM (fL) ²	56,30 ± 1,73	55,08 ± 1,55	55,77 ± 1,62	55,98 ± 1,62	52,53 ± 3,63	49 - 58
Hemoglobina total (g/dL)	14,40 ± 2,92	11,90 ± 2,04	15,18 ± 1,35	15,06 ± 13,59	13,88 ± 3,29	11,8 - 16,5
HCM (pg) ³	17,30 ± 1,23	18,90 ± 0,78	18,93 ± 0,52	18,67 ± 0,60	17,60 ± 2,31	13,6 - 18,6
CHCM (g/dL) ⁴	⁴ 30,92 ± 2,48	34,25 ± 1,41	33,95 ± 0,97	33,30 ± 1,79	35,08 ± 5,97	30,4 – 36,4
Leucócitos totais (10 ³ /mm ³)	4,91 ± 1,66	4,67 ± 1,82	4,72 ± 1,46	4,73 ± 1,29	2,07 ± 0,83**	3,4 - 9,8
Plaquetas (g/L)	871,03 ± 203,22	743,06 ± 382,00	855,67 ± 370,37	735,52 ± 222,23	693,67 ± 179,83	491,0 - 117,0
Alanina aminotransferase (ALT)	133,33 ± 22,77	91,79 ± 22,15	95,65 ± 22,22	92,98 ± 23,52	93,51,15,93	70,0 - 140,0
Aspartato aminotransferase (AST)	141,15 ± 23,79	124,05 ± 30,39	118,67 ± 24,81	106,33 ± 18,43	97,66 ± 28,33**	73,3 - 188,0
Ureia	46,69 ± 9,37	41,96 ± 10,01	46,28 ± 7,93	46,56 v 9,31	43,46 ± 9,55	20,0 - 65,0
Creatinina	0,34 ± 0,14	0,30 ± 0,06	0,31 ± 0,06	0,30 ± 0,05	0,31 ± 0,05	0,2 - 0,4

(1) Araújo et al. 2015. ⁽²⁾ VCM – volume corpuscular médio. ⁽³⁾ HCM – hemoglobina corpuscular média. ⁽⁴⁾ CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média. Diferenças significativas em comparação com o grupo veículo estão expressas como **p<0,01 (ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey)

6 DISCUSSÃO

A ciência já reconhece amplamente que o AG pode mediar vários efeitos biológicos envolvidos em atividades anticancerígenas (JIANG et al., 2022). Utilizado, em sua maioria, em modelos experimentais *in vitro*, esses estudos têm demonstrado a atividade citotóxica desse composto em muitas linhagens tumorais humanas, incluindo adenocarcinoma gástrico e intestinal, como Kato III e COLO 205, respectivamente (YOSHIOKA et al., 2000), mamário, como MDAMD-231 (JABBARI et al., 2022) e MCF-7 (HONG et al., 2023), e pulmonar, como A549 (MAIMAITI et al., 2018; JAFARINEJAD et al., 2024).

No entanto, apesar dos avanços obtidos em modelos *in vitro*, evidências provenientes de estudos *in vivo* dos efeitos antitumorais do AG ainda são limitadas quanto aos mecanismos moleculares específicos envolvidos. Essa lacuna no conhecimento enseja a realização de estudos adicionais, como o realizado no presente estudo, que validem sua eficácia e segurança em modelos animais e, futuramente, em ensaios clínicos.

Nas últimas décadas, modelos experimentais *in vivo* têm sido amplamente desenvolvidos e utilizados não apenas para avaliar a eficácia terapêutica, mas também para investigar biomarcadores e aspectos da biologia tumoral, sendo os modelos murinos os mais empregados (GUO et al., 2019). Entre eles, destacasse o S-180, modelo presente em nosso estudo, também conhecido como Tumor de Crocker, originalmente derivado de um tumor axilar espontâneo em camundongo Swiss macho (STOCK et al., 1960).

No presente estudo, sete dias após a inoculação das células tumorais de S-180, observou-se formação de tumor intradérmico em todos os camundongos, achados clínicos/macroscópicos também observados por outros estudos de atividade antitumoral de biocompostos em modelo murino de S-180 (ALVES et al., 2023; SANTOS et al., 2023). Esses resultados confirmam a eficiência do protocolo de implantação e a rápida progressão tumoral, favorecendo a condução ágil do experimento (LIEHR, RINCIC, 2025).

O AG demonstra toxicidade seletiva para células cancerígenas em comparação às células normais humanas, uma característica incomum entre compostos fenólicos (LIU et al., 2012). Essa seletividade citotóxica, observada em nosso estudo e corroborada a literatura, confere ao AG um potencial terapêutico

superior no contexto do tratamento oncológico, destacando-o em relação a outros fenóis comumente estudados.

A avaliação da massa tumoral e do percentual médio de inibição do seu crescimento, em comparação aos grupos não tratados ou tratados com substâncias inertes, como solução veículo, constitui um dos principais indicadores da atividade antitumoral em modelos experimentais *in vivo*. Esses parâmetros clínicos e macroscópicos são utilizados em estudos com camundongos para investigar a eficácia de compostos frente ao crescimento do S-180 (PEREIRA-FILHO et al., 2024; ALVES et al., 2023; SANTOS et al., 2023; REZENDE et al., 2021).

Os dados obtidos no presente estudo relativos à análise da massa tumoral ponderal e inibição do crescimento neoplásico demonstram que o AG exerce atividade antitumoral significativa em modelo murino de S-180, com efeitos dose dependentes. Apesar de o presente estudo ser o primeiro a testar o AG utilizando o modelo experimental de S-180, esses resultados corroboram trabalhos anteriores atestando o efeito antineoplásico do AG em modelos *in vivo* de tumores específicos xenotransplantados, especialmente na última década (PHAN et al., 2016; VARELA-RODRÍGUEZ et al., 2020; HANIEH et al., 2022).

As alterações histopatológicas identificadas nos tumores de S-180 neste estudo são compatíveis com aquelas descritas em trabalhos anteriores (REZENDE et al., 2021; ALVES et al., 2023; SANTOS et al., 2023; PEREIRA-FILHO et al., 2024). Desde a década de 1980, parâmetros morfológicos como atividade mitótica, presença de necrose e grau de atipia celular, têm sido utilizados como marcadores do comportamento biológico de neoplasias malignas (TROJANI et al., 1984). No presente trabalho, não se observou atipia celular entre os grupos experimentais, o que sugere que os tratamentos administrados não interferiram substancialmente no grau de diferenciação celular tumoral.

No presente estudo também se observou que as dimensões médias dos tumores estão fortemente relacionadas com seu padrão de invasão tecidual, um aspecto crítico para a progressão tumoral e agressividade biológica (QUAIL et al., 2013). Nos grupos veículo e AG10, onde os tumores exibiram maiores volumes, observou-se uma infiltração mais profunda e extensa das células tumorais no tecido muscular estriado esquelético e no tecido adiposo. Esse padrão de crescimento agressivo resultou em significativa dissociação e destruição das fibras musculares e adipócitos, acompanhada por invasão perineural das fibras nervosas periféricas.

Essa tendência é consistente com o comportamento típico de tumores maiores, que, devido à maior massa celular e elevada pressão intratumoral, frequentemente desenvolvem maior capacidade invasiva, favorecendo a quebra de barreiras teciduais e a disseminação para estruturas adjacentes. Esses achados reforçam a importância de estratégias terapêuticas que visem não apenas a redução do volume tumoral, mas também a modulação do fenótipo invasivo, com vistas a limitar a agressividade local e as complicações associadas à invasão neural.

Os estudos *in vivo* que avaliam a administração de AG em camundongos submetidos a xenotransplantes de células tumorais, como os conduzidos por Raina et al. (2008), Kaur et al. (2009), Phan et al. (2016), Varela-Rodríguez et al. (2020) e Hanieh et al. (2022), reforçam a hipótese de que o AG possui um potencial antitumoral significativo. No entanto, a eficácia observada nesses modelos parece ser modulada por variáveis como a cinética de crescimento das células neoplásicas e o tipo histológico do tumor. De forma semelhante, os resultados obtidos em nosso estudo sugerem que os mecanismos parecem variar de acordo com esses mesmos parâmetros. Dessa forma, ainda são necessários estudos *in vivo* que concorram para o ajuste e otimização das dosagens e da via de administração do AG, assim como para a identificação dos mecanismos subjacentes à sua ação antitumoral.

Considerando suas amplas atividades biológicas, versatilidade terapêutica e elevado potencial farmacológico, o AG desponta como um candidato promissor para estudos *in vivo* de atividade antitumoral. Além de suas bem documentadas propriedades antitumorais, antioxidantes e anti-inflamatórias, o AG se destaca por sua estrutura química relativamente simples, baixo custo e ampla disponibilidade, características que favorecem sua utilização em pesquisas pré-clínicas e no desenvolvimento de novos agentes farmacológicos (TSAI et al., 2018).

Embora os mecanismos por trás da ação citotóxica do AG contra células tumorais ainda não estejam totalmente esclarecidos, existem evidências de modulação de diferentes vias de sinalização biológica que regulam a migração, metástase, apoptose, estancamento do ciclo celular, angiogênese e expressão de oncogenes em células tumorais (JIANG et al., 2022).

No presente estudo, o tratamento com AG reduziu significativamente a imunexpressão do antígeno ki67. A análise quantitativa da imunomarcagem do Ki-67 resulta numa avaliação bastante aproximada da fração de crescimento de uma população celular tumoral, e vem sendo utilizada como metodologia de avaliação de

atividade antitumoral em modelos de S-180 (SANTOS et al., 2023; ALVES et al., 2023; PEREIRA-FILHO et al., 2024). Dessa forma, os resultados sugerem que a atividade antitumoral do AG poderia estar associada, pelo menos em parte, à redução no índice proliferativo das células neoplásicas do S-180. Essa teoria é reforçada pelo fato já demonstrado de que o AG é capaz de bloquear a progressão do ciclo celular da em células tumorais (HE et al., 2021). Essa modulação é possivelmente resultado da inibição da via de sinalização PI3K/Akt pelo AG, levando a redução da expressão e/ou estabilidade de ciclinas (como ciclina D1), aumento na expressão de proteínas antiproliferativas, como p21 e p27, e consequente estancamento do ciclo celular entre as fases G1 e S (KO et al., 2022).

Contudo, a interpretação destes dados deve ser parcimoniosa, posto que a redução no percentual de células proliferativas poderia resultar tanto de um possível bloqueio do ciclo celular quanto de um potencial incremento na morte de células ciclantes, ou mesmo de ambos (GAO et al., 2019). Como a modulação da apoptose representa uma das principais vias mecanicistas de ação de agentes com ação quimioterápica (CHAUDHRY et al., 2022), a análise da expressão histoquímica e imuno-histoquímica de marcadores desse processo poderia fornecer informações importantes para esclarecer melhor as possíveis rotas bioquímicas de atividade antitumoral em modelo murino de S-180.

A expressão imuno-histoquímica da caspase-3 clivada foi avaliada neste estudo para investigar a ativação da via apoptótica associada ao efeito antitumoral do AG no modelo de S-180. No presente estudo, foi observado que o AG aumentou a expressão de caspase-3 clivada em células de S-180, indicando a ativação da principal caspase executora da apoptose. Esse achado sugere que o composto induz morte celular programada em células tumorais *in vivo*, confirmando sua atividade pró apoptótica antitumoral já relatada em modelo *in vitro* (ABDULLAH et al., 2023; HAGSHENAS et al., 2023).

O AG tem demonstrado uma importante ação sob a apoptose celular, mecanismo fisiológico essencial para a homeostase tecidual e para a eliminação seletiva de células danificadas, senescentes ou com comportamento anormal (KERR; et al, 1972).

No presente estudo o aumento significativo da imunoexpressão Bax, em contraste com a redução de Bcl-2, e ausência de alteração na caspase-8, juntamente com o aumento da caspase-3, foram achados observados no grupo

AG50 são coerentes com a ativação preferencial da via intrínseca (mitocondrial) da apoptose induzida por AG. A elevação de Bax juntamente com a queda de Bcl-2 desloca o balanço da família Bcl-2 em direção ao estado pró-apoptótico, favorecendo a oligomerização de Bax/Bak, a permeabilização da membrana mitocondrial externa e a liberação de fatores como o citocromo c; isso leva à formação do apoptossomo e à ativação da caspase-9, culminando na ativação da caspase-3 e na execução da apoptose. A manutenção dos níveis de caspase-8, por outro lado, sugere que a via extrínseca (mediada por receptores de morte) não é o mecanismo primário neste modelo, o que reforça a interpretação de que o AG atua por um mecanismo mitocondrial (KASHYAP et al., 2021).

Segundo estudo anteriores, as vias de sinalização moduladas pelo AG, CARM1-PELP1, p38-MAPK e PERK, são classicamente associadas à ativação da via intrínseca da apoptose, (SAREDDY et al., 2016; CARNEIRO et al., 2020). Em consonância com esse mecanismo, Abdullah et al. (2023) demonstraram que o tratamento com AG em células HeLa (carcinoma cervical) induz o aumento da expressão da proteína pró-apoptótica BAX e a redução da proteína antiapoptóticas BCL-2, responsáveis pela regulação positiva e negativa, respectivamente, da permeabilidade mitocondrial. Esse desequilíbrio favorece a liberação citosólica do citocromo c mitocondrial, onde se associa à proteína Apaf-1, promovendo a formação do apoptossoma. Essa estrutura ativa a caspase-9, que por sua vez ativa a caspase-3, culminando na execução do processo apoptótico (HENGARTNER, 2000). Resultados semelhantes foram observados por Jang et al. (2020), que reportaram elevação da expressão de BAX e supressão de BCL2 em linhagens de câncer de próstata tratadas com AG, reforçando a hipótese de indução da apoptose pela via intrínseca.

Quando se trata da via extrínseca da apoptose o mecanismo de ação desses receptores promove o recrutamento de proteínas responsáveis pela ativação da caspase-8 (ABDULLAH; et al., 2023). Esta, por sua vez, pode ativar diretamente a caspase-3 que executa a apoptose, ou pode indiretamente, atuar sobre a via intrínseca por meio das proteínas BAX, estabelecendo uma comunicação entre as duas vias (ELMORE, 2007). A via extrínseca tem papel essencial na eliminação de células com comportamento tumoral, sendo fundamental para a regulação da resposta do sistema imunológico.

No presente estudo, foi demonstrado que o AG promoveu redução na expressão do NF- κ B. Esse resultado é suportado pela literatura, que mostra que esse composto químico é capaz de inibir a via de sinalização da MAPK/NF- κ B (BAI et al., 2021). Estudos realizados em Células de núcleo pulposo (*in vitro*) sugerem que esse fenômeno parece estar associado com uma potencial redução na fosforilação e altera acetilação da subunidade p65, tornando- menos ativo (HUANG et al., 2017). Portanto, a diminuição da expressão imuno-histoquímica de NF κ B pelo AG reforça a hipótese de que esse composto atua modulando negativamente vias pró-sobrevivência celular, contribuindo para o predomínio dos sinais pró-apoptóticos observados no S-180. Em conjunto, esses dados indicam que a inibição do NF- κ B pode representar um mecanismo molecular relevante para a atividade antitumoral do AG.

Em síntese, os resultados obtidos sugerem que a atividade antitumoral do AG no modelo murino de S-180 está associada principalmente à indução de apoptose pela via intrínseca. Paralelamente, a diminuição da expressão do NF κ B sugere que o composto também atua suprimindo essa via de sinalização pró-sobrevivência e pró-proliferação celular, favorecendo o predomínio de sinais apoptóticos.

Contudo, ainda é importante comentar que, a despeito dos resultados promissores do AG, a redução na massa ponderal tumoral obtida pelo quimioterápico 5FU foi efetivamente superior. Isso poderia ser explicado pela redução significativamente maior da expressão do antígeno Ki67 e NF- κ B, resultando em maior efeito antiproliferativo em comparação com o AG. Adicionalmente, o 5FU também parece ativar, pelo menos parcialmente, mecanismos de apoptose associados a clivagem da caspase 8, sugerindo uma dupla ativação das vias intrínseca e extrínseca da apoptose das células tumorais.

Alguns quimioterápicos consagrados, como o 5-fluorouracil (5-FU), são agentes reconhecidamente eficazes na terapia anticâncer, mas apresentam importantes limitações. Dentre essas limitações e desvantagens se destacam os seguintes aspectos: i) baixa seletividade, não diferenciando células tumorais de células saudáveis com alta taxa de proliferação (e.g. células da medula óssea, mucosa gastrointestinal e folículos pilosos); ii) toxicidade sistêmica, que determina a ocorrência frequente de efeitos adversos (e.g. náuseas, vômitos, alopecia, mielossupressão - inibição da atividade funcional da medula óssea - e imunossupressão) que comprometem a qualidade de vida dos pacientes e, muitas

vezes, limitam a continuidade ou a dose do tratamento; iii) eficácia limitada em tumores sólidos avançados; iv) possibilidade de indução de mutações secundárias e, por consequência, aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias secundárias; e v) eventual possibilidade de desenvolvimento de resistência tumoral, reduzindo a eficácia da terapia (NURGALI et al., 2018).

Diante dessas limitações, a busca por terapias adjuvantes ou alternativas mais eficazes e menos tóxicas que os tratamentos convencionais têm se concentrado em compostos de baixa toxicidade como o AG. Visando substituir os quimioterápicos tradicionais ou, ao menos, permitir a redução de suas doses, oferecendo tratamentos mais seguros ao paciente sem comprometer a eficácia terapêutica (ISLAM et al, 2021).

Uma relevante vantagem do AG que respalda sua utilização estudos *in vivo* reside em sua baixa toxicidade, observada em modelos experimentais de análise toxicológica. Variya et al. (2019). Seus estudos sobre toxicidade subaguda corroboram os resultados do presente demonstrando que camundongos não apresentaram alterações significativas nos parâmetros de homeostase sanguínea ou nas características anatomopatológicas que indicassem toxicidade nas doses de AG. De fato, Ashrafizadeh et al. (2021) afirmam que a toxicidade aguda do AG em camundongos é observada somente em doses iguais ou superiores a 2000 mg/kg, o que deixa o presente experimento realizado no presente estudo dentro de uma excelente faixa de segurança.

Como a segurança no uso do AG é um aspecto fundamental para sua potencial aplicação terapêutica, especialmente em modelos *in vivo*, no presente estudo, a avaliação da toxicidade do AG incluiu uma análise abrangente de parâmetros fisiológicos e bioquímicos para determinar seus possíveis efeitos adversos. Foram monitoradas as variações na massa corpórea dos animais ao longo do período experimental, como indicador geral de bem-estar e toxicidade sistêmica.

No presente estudo, a ausência de variação significativa na massa corporal média e no consumo médio de ração e água dos camundongos tratados com AG, ao longo do período experimental, sugere que o composto não induz efeitos tóxicos sistêmicos aparentes, como anorexia ou caquexia, frequentemente associados ao tratamento com agentes quimioterápicos. Esses achados reforçam o perfil de segurança do AG e sua potencial aplicação como adjuvante terapêutico capaz de preservar o estado nutricional dos animais durante o tratamento oncológico.

Corroborando esse resultado, o estudo piloto conduzido por Gingrich et al. (1996) demonstrou que a administração de AG em camundongos não resultou em alterações significativas no consumo de alimentos ou água, sugerindo que o AG, isoladamente, não interfere no comportamento alimentar dos animais. Adicionalmente, Kaur et al. (2009); Ji et al. (2009) também relataram estabilidade na massa corporal dos animais em estudos utilizando administração de AG em camundongos, o que indica a segurança do seu uso.

Em contraste, os camundongos do grupo 5-fluorouracil (5-FU) apresentaram redução progressiva e significativa da massa corporal e do consumo de ração ao longo do período experimental, sugerindo possível toxicidade. Esses resultados são compatíveis com os efeitos adversos amplamente descritos para esse agente quimioterápico, como anorexia e toxicidade gastrointestinal, que podem impactar negativamente o apetite e a absorção de nutrientes. Nesse sentido, a restrição alimentar observada no grupo 5-FU pode ter promovido implicações substanciais no estado nutricional dos animais, afetando parâmetros fisiológicos essenciais, como massa corporal, imunocompetência e capacidade de regeneração tecidual (TANG et al., 2024). Tais efeitos secundários devem ser cuidadosamente considerados na análise da eficácia e toxicidade, reforçando a necessidade de monitoramento dos animais em modelos pré-clínicos.

No presente estudo, foi investigado o possível efeito mielossupressivo por meio da análise anatomopatológica do baço e da avaliação completa do perfil hematológico dos animais, considerando que a supressão da medula óssea é uma complicação frequentemente associada a terapias antitumorais. A redução significativa na contagem de leucócitos observada no grupo 5FU, abaixo do intervalo de referência para camundongos Swiss (ARAÚJO et al., 2015), é consistente com o perfil mielossupressor, sendo corroborado pela redução na massa ponderal e atrofia da polpa branca esplênica. Achados similares foram amplamente documentados em outros estudos (REZENDE et al., 2021; ALVES et al., 2023, SANTOS et al., 2023; PEREIRA-FILHO et al., 2024).

Em contraste, os grupos tratados com o AG não apresentaram alterações significativas nas contagens de leucócitos, sugerindo ausência de defeito leucotóxico relevante nas doses avaliadas. Essa preservação da função hematopoiética pode representar uma vantagem importante para o uso do AG como agente adjuvante em

protocolos quimioterápicos, potencialmente mitigando os efeitos adversos hematológicos comumente observados em pacientes submetidos à quimioterapia.

Por outro lado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros eritrocitários e plaquetários entre os grupos experimentais, com exceção de uma discreta redução no número total de hemácias e na concentração de hemoglobina no grupo AG10. No entanto, para uma interpretação mais precisa desses achados, é essencial considerá-los no contexto de outros indicadores hematológicos, conforme recomendado por Celkan (2020). Nesse sentido, a ausência de alterações significativas nos demais parâmetros da série eritrocítica sugere que essas flutuações observadas no grupo AG10 sejam provavelmente aleatórias e sem relevância clínico patológica. Essa interpretação é reforçada pelo fato de que os valores médios de hemácias e hemoglobina permaneceram dentro dos intervalos de normalidade estabelecidos para camundongos *Swiss* machos (ARAÚJO et al., 2015). Nesse contexto, tais variações parecem refletir a variabilidade fisiológica intrínseca dessa linhagem, que pode ser influenciada por fatores como idade, sexo, estado nutricional, manejo e até mesmo estresse durante o experimento.

Para avaliação da função renal e hepática, no presente estudo, foram realizadas análises histopatológicas dos rins e fígado, complementadas por ensaios bioquímicos dos níveis séricos de ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), respectivamente, visando identificar possíveis efeitos tóxicos nesses órgãos, que são críticos para metabolização e excreção de fármacos.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que as doses de AG testadas não causaram hepatotoxicidade, uma vez que os níveis séricos das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) permaneceram dentro do intervalo de normalidade (ARAÚJO et al., 2015) e não apresentaram diferenças significativas em comparação ao grupo veículo. Esses achados ainda foram amplamente corroborados pela ausência de alterações na massa ponderal e caracterização anatomopatológica dos espécimes hepáticos, sugerindo que o AG não exerce efeitos adversos relevantes sobre a função hepática, dentro dos parâmetros avaliados.

Entretanto, uma tendência à redução progressiva dos valores de AST foi observada com o aumento da dose de AG, semelhante à redução significativa

observada no grupo 5FU, ainda que esses valores tenham se mantido dentro dos limites de normalidade. Esse perfil bioquímico pode sugerir um possível reflexo do tratamento sobre o crescimento tumoral. Isso porque a elevação isolada, e muitas vezes discreta, dos níveis séricos de AST pode ocorrer em resposta à danos em células musculares estriadas esqueléticas (MANDATO; VAJRO, 2022, HAN et al., 2022). Assim, a redução progressiva de seus níveis séricos nos grupos AG e 5FU poderia estar associada ao menor crescimento tumoral e, por consequência, menor lesão muscular decorrente da invasão tumoral nos tecidos hipodérmicos. Essa hipótese é corroborada pelos resultados da análise da massa ponderal e da avaliação histopatológica dos tumores, apontando para uma relação entre a redução do crescimento tumoral e a diminuição dos níveis séricos de AST.

Como não foram observadas diferenças significativas nos níveis séricos de ureia e creatinina e nem na análise da massa ponderal média e caracterização anatomopatológica dos espécimes renais, sugere-se ausência de nefrotoxicidade induzida pelos compostos testados (BAZZANO et al., 2015). Em face ao conjunto desses achados, sugere-se que as doses de AG não demonstraram hemato, hepato ou nefrotoxicidade, sendo candidatos promissores para associação terapêutica com agentes quimioterápicos como o 5FU, visando reduzir efeitos adversos como a mielotoxicidade, preservando a função hepática e renal.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam que o ácido gálico (AG) apresenta atividade antitumoral significativa em modelo murino portador de S180, com efeitos dependentes da dose administrada. A redução da massa tumoral, associada à menor extensão de áreas necróticas nos grupos tratados com AG50 e 5-FU, sugere que o composto pode atuar na inibição da proliferação celular, possivelmente por meio da modulação de vias de morte celular programada.

As análises da imuno-histoquímica sugerem que a atividade antitumoral do AG no modelo murino de S-180 está associada principalmente à indução de apoptose pela via intrínseca. A diminuição da expressão de NF- κ B sugere que o composto também favorece o predomínio de sinais apoptogênicos.

Os achados do presente estudo reforçam a hipótese de que a eficácia do AG pode variar conforme o tipo de tumor e a cinética de crescimento celular, o que destaca a necessidade de ajustes quanto à dose e à via de administração mais adequada.

Apesar dos dados promissores sobre os efeitos do AG, a literatura carece de estudos robustos *in vivo* que elucidem de forma mais precisa seus mecanismos de ação, especialmente em diferentes tipos tumorais e em contextos fisiológicos mais complexos.

Adicionalmente, a ausência de sinais de hemato, hepato ou nefrotoxicidade nos grupos tratados com AG sugere um perfil de segurança compatível com o uso terapêutico, especialmente em associação com agentes quimioterápicos como o 5-fluorouracil (5-FU). Essa associação pode representar uma estratégia promissora para potencializar a atividade antitumoral e, simultaneamente, mitigar os efeitos adversos da quimioterapia convencional, como a mielotoxicidade.

Dessa forma, recomenda-se a realização de novos estudos experimentais e clínicos que explorem diferentes modelos tumorais, ampliem a caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos e avaliem o potencial translacional do AG, tanto em monoterapia quanto em regime combinado com outras drogas antineoplásicas.

REFERÊNCIAS

ABDELWAHAB, S. I. Protective mechanism of gallic acid and its novel derivative against ethanol-induced gastric ulcerogenesis: Involvement of immunomodulation markers, Hsp70 and Bcl-2-associated X protein. **International Immunopharmacology**, v. 16, n. 2, p. 296–305, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.04.005>

ABDULLAH, H.; ISMAIL, I.; SUPPIAN, R.; ZAKARIA, N. M. Natural Gallic acid and methyl gallate induces apoptosis in Hela cells through regulation of intrinsic and extrinsic protein expression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 10, p. 8495, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24108495>

ABOREHAB, N. M.; ELNAGAR, M. R.; WALY, N. E. Gallic acid potentiates the apoptotic effect of paclitaxel and carboplatin via overexpression of Bax and P53 on the MCF-7 human breast cancer cell line. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 35, n. 2, p. 22638, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jbt.22638>

ABOTALEB, M.; LISKOVA, A.; KUBATKA, P.; BÜSSELBERG, D. Therapeutic potential of plant phenolic acids in the treatment of cancer. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, p. 221, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom10020221>

ADISESHAIAH, P. P.; STERN, S. T. Designing an in vivo efficacy study of nanomedicines for preclinical tumor growth inhibition. **Methods Mol Biol**, v. 1682, p. 241–253, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-49397352-1_20

AGARWAL, C.; TYAGI, A.; AGARWAL, R. Gallic acid causes inactivating phosphorylation of cdc25A/cdc25C-cdc2 via ATM-Chk2 activation, leading to cell cycle arrest, and induces apoptosis in human prostate carcinoma DU145 cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 12, p. 3294–3302, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0483>

AHN, M.-J.; KIM, C. Y.; LEE, J. S.; KIM, T. G.; KIM, S. H.; LEE, C.-K.; LEE, B.B.; SHIN, C.-G.; HUH, H.; KIM, J. Inhibition of HIV-1 integrase by galloyl glucoses from *Terminalia chebula* and flavonol glycoside gallates from *Euphorbia pekinensis*. **Planta Med**, v. 68, n. 5, p. 457–459, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2002-32070>

ALUM, E. U.; AKWARI, A. A.; OKOROH, P. N.; ANIOKETE, U. C.; ABBA, J. N.; UTI, D. E. Phytochemicals as modulators of ferroptosis: a novel therapeutic avenue in cancer and neurodegeneration. **Molecular Biology Reports**, v. 52, n. 1, p. 636, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11033-025-10752-4>

ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; MICOL, V. Tackling antibiotic resistance with compounds of natural origin: A comprehensive review. **Biomedicines**, v. 8, n. 10, p. 405, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biomedicines8100405>

ALVES, Â. V. F.; MELO, C. R.; CHAGAS-NETO, J. L.; AMARAL, R. G.; AMBRÓSIO, S. R.; MOREIRA, M. R.; VENEZIANI, R. C. S.; CARDOSO, J. C.; SEVERINO, P.; GONDAK, R. O.; SOUTO, E. B.; DE ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C. Entkaurenoic acid-enriched *Mikania glomerata* leaves–complexed β cyclodextrin: Pharmaceutical development and *in vivo* antitumor activity in a sarcoma 180 mouse model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 631, p. 122497, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122497>.

ANVARI, K.; TOUSSI, M. S.; KALANTARI, M.; NASERI, S.; SHAHRI, M. K.; AHMADNIA, H.; KATEBI, M.; PASHAKI, A. S.; DAYANI, M.; BROUMAND, M. Expression of Bcl-2 and Bax in advanced or metastatic prostate carcinoma. **Urology Journal**, v. 9, n. 1, p. 381–388, 2012. PMID: 22395836.

ARAÚJO, F. T. M.; TEIXEIRA, A. C. P.; ARAÚJO, M. S. S.; SILVA, C. H.; NEGRÃO-CORRÊA, D. A.; MARTINS-FILHO, O. A.; PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. Establishment of reference values for hematological and biochemical parameters of mice strains produced in the animal facility at Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ - Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Ciênc. Anim. Lab.**, v. 3, n. 2, p. 95–102, 2015. Disponível em: <https://arca.fiocruz.br/items/a5c45bc8-61eb-4bba-85d1-06e5d7886e49>

ARSIANTI, A.; BAHTIAR, A.; FADILAH, F.; WANGSAPUTRA, V. K.; PARAMITA, R. I.; AZIZAH, N. N.; NADAPDAP, L. D.; FAJRIN, A. M.; TANIMOTO, H.; KAKIUCHI, K. Synthesis, characterization, and cytotoxicity evaluation of Gallic acid nanoparticles towards breast T47D cancer cells. **Pharmacognosy Journal**, v. 12, n. 2, p. 321–327, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.51>

ARUNKUMAR, S.; ILANGO, K.; MANIKANDAN, R.; SUDHA, M.; RAMALAKSHMI, N. Synthesis, characterisation and biological evaluation of some novel 2, 5-disubstituted-1, 3, 4-oxadiazole derivatives of gallic acid. **Int J ChemTech Res**, v. 1, n. 4, p. 1094–1099, 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/242690830_Synthesis_Characterisati_Ch_and_BiologicalEvaluation_of_some_novel_25-Disubstituted-_134oxadiazole_derivatives_of_Gallic_acid

ASADI, M.; TAGHIZADEH, S.; KAVIANI, E.; VAKILI, O.; TAHERI-ANGANEH, M.; TAHAMTAN, M.; SAVARDASHTAKI, A. Caspase - 3: Structure, function, and biotechnological aspects. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 4, p. 1633–1645, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bab.2233>

ASHKENAZI, A.; FAIRBROTHER, W. J.; LEVERSON, J. D.; SOUERS, A. J. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nature reviews. Drug Discovery*, v. 16, n. 4, p. 273–284, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.253>

ASHRAFIZADEH, M.; ZARRABI, A.; MIRZAEI, S.; HASHEMI, F.; SAMARGHANDIAN, S.; ZABOLIAN, A.; HUSHMANDI, K.; ANG, H. L.; SETHI, G.; KUMAR, A. P.; AHN, K. S.; NABAVI, N.; KHAN, H.; MAKVANDI, P.; VARMA, R. S. Gallic acid for cancer therapy: Molecular mechanisms and boosting efficacy by nanoscopical delivery. *Food and Chemical Toxicology*, v. 157, p. 112576, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112576>.

AYE, K.; WATTANAPONGPITAK, S.; SUPAWAT, B.; KOTHAN, S.; UDOMTANAKUNCHAI, C.; TIMA, S.; PAN, J.; TUNGJAI, M. Gallic acid enhances pirarubicin induced anticancer in living K562 and K562/Dox leukemia cancer cells through cellular energetic state impairment and P glycoprotein inhibition. *Oncology Reports*, v. 46, n. 4, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/or.2021.8178>

BAI, J.; ZHANG, Y.; TANG, C.; HOU, Y.; AI, X.; CHEN, X.; ZHANG, Y.; WANG, X.; MENG, X. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 133, p. 110985, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110985>.

BASTOS, T.S.; DA COSTA, D.B.N.; VALOIS, R.B.V.; THOMAZZI, S.M.; DO NASCIMENTO, M. F.; DORIA, G.A.A.; AMARAL, R.G.; GOMES, S.V.F.; LIMAVERDE, I.B.; CARDOSO, C.A.L.; PADILHA, F.F.; GOMES, M.Z.; CARDOSO, J.C.; CARVALHO, A.A.; DE ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C. *In vivo* antitumor effect of the aqueous extract of *Punica granatum* in the sarcoma 180 murine model. *Journal of Medicinal Plant Research*, v. 12, n. 26, p. 415–426, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/JMPR2018.6654>

BAZZANO, T.; RESTEL, T. I.; PORFIRIO, L. C.; SOUZA, A. S. de; SILVA, I. S. Renal biomarkers of male and female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) undergoing renal ischemia and reperfusion. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 30, n. 4, p. 277– 288, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0102-865020150040000007>

BHUIA, S.; RAHAMAN, M.; ISLAM, T.; BAPPI, M.H.; SIKDER, I.; HOSSAIN, K. N.; AKTER, F.; PROTTAY, A.A.S.; ROKONUZZMAN, GURER, E.S.; CALINA, D.; ISLAM, M.T.; SHARIFI-RAD, J. Neurobiological effects of gallic acid: current perspectives. *Chinese Medicine*, v. 18, n. 1, p. 27, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13020-023-00735-7>

BOUSSIOS, S.; SANCHEZ, E.; SHERIFF, M. Frontiers of molecular biology of cancer. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 24, n. 24, p. 17187, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms242417187>

BRAY, F.; LAVERSANNE, M.; SUNG, H.; Y, J.; SIEGEL, R.L.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin.**, v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21834>

BREDHOLT, G.; MANNELQVIST, M.; STEFANSSON, I.M.; BIRKELAND, E.; BO, T.H.; OYAN, A.M.; TROVIK, J.; KALLAND, K.-H.; JONASSEN, I.; SALVESEN, H.B.; WIK, E.; AKSLEN, L.A.; Tumor necrosis is an important hallmark of aggressive endometrial cancer and associates with hypoxia, angiogenesis and inflammation responses. **Oncotarget**, v. 6, n. 37, p. 39676– 39691, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5344>

BUNN-JR, P. A.; KELLY, K. New combinations in the treatment of lung cancer: a time for optimism. **Chest**, v. 117, n. 4, p.138S–143S, 2000. Disponível em: https://doi.org/10.1378/chest.117.4_suppl_1.138s

CARNEIRO, B. A.; EL-DEIRY, W. S. Targeting apoptosis in cancer therapy. Nature reviews. **Clinical Oncology**, v. 17, n. 7, p. 395–417, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>

CELKAN, T.T. What does a hemogram say to us? **Turk pediatri ars.** v. 55, p.103–116, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32684755/>

CHAUDHRY, G.-E.-S.; AKIM, A. M.; SUNG, Y. Y.; MUHAMMAD, T. S. T. Cancer and apoptosis. **Methods in Molecular Biology**, v. 2543, p. 191–210, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2553-8_16.

CHEN, X.; CUI, H.; QIN, L.; LIU, R.; FANG, F.; WANG, Z. Soybean lecithin-Gallic acid complex sensitizes lung cancer cells to radiation through ferroptosis regulated by Nrf2/SLC7A11/GPX4 pathway. **Nutrients**, v. 17, n. 7, p. 1262, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu17071262>

COLOMER, R.; SARRATS, A.; LUPU, R.; PUIG, T. Natural polyphenols and their synthetic analogs as emerging anticancer agents. **Current Drug Targets**, v. 18, n. 2, p. 147–159, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389450117666160112113930>

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA. Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. **Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação**, ed.1, 2023. Disponível em: https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/publicacoesdoconcea/guia_concea_1ed_animais-ensino_ou_pesquisa_2023.pdf. Acesso em: 19 fev. 2026.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 72–79, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.011>

DA SILVA, S. L.; CHAAR, J. da S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *Casearia sylvestris* Sw (*Flacourtiaceae*). **European Journal of Pharmacology**, v. 608, n. 1–3, p. 76–83, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.02.004>

DAS THAKUR, M.; PRYER, N. K.; SINGH, M. Mouse tumour models to guide drug development and identify resistance mechanisms. **The Journal of Pathology**, v. 232, n. 2, p. 103–111, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/path.4285>

DIÉGUEZ-MARTÍNEZ, N.; ESPINOSA-GIL, S.; YOLDI, G.; MEGÍAS-RODA, E.; BOLINAGA-AYALA, I.; VINAS-CASAS, M.; GORGISEN, G.; DOMINGO-ORTÍ, I.; PÉREZ-MONTOYO, H.; BAYASCAS, J.R.; COLAS, E.; DOLCET, X.; LIZCANO, J.M. The ERK5/NF-κB signaling pathway targets endometrial cancer proliferation and survival. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 79, n. 10, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04541-6>

DIXON, S.J.; LEMBERG, K.M.; LAMPRECHT, M.R.; SKOUTA, R.; ZAITSEV, E.M.; GLEASON, C.E.; PATEL, D.N.; BAUER, A.J.; CANTLEY, A.M.; YANG, W.S.; MORRISON, B.; STOCKWELL, B.R. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. **Cell**, v. 149, n. 5, p. 1060–1072, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>

DIXON, S. J.; STOCKWELL, B. R. The hallmarks of ferroptosis. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 3, n. 1, p. 35–54, 2019. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-cancerbio030518-055844>

DODSON, M.; CASTRO-PORTUGUEZ, R.; ZHANG, D. D. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. **Redox Biology**, v. 23, n. 101107, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101107>

DOWD, P. F.; DUVICK, J. P.; ROOD, T. Comparative toxicity of allelochemicals and their enzymatic oxidation products to maize fungal pathogens, emphasizing *Fusarium graminearum*. **Natural Toxins**, v. 5, n. 5, p. 180–185, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/nt.2>

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol.** v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

ESKANDARI, E.; EAVES, C. J. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. **The Journal of Cell Biology**, v. 221, n. 6, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.202201159>

FERRO, Y.; MAUROTTO, S.; TARSITANO, M. G.; LODARI, O.; PUJIA, R.; MAZZA, E.; LASCALA, L.; RUSSO, R.; PUJIA, A.; MONTALCINI, T. Therapeutic fasting in reducing chemotherapy side effects in cancer patients: A systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, v. 15, n. 12, p. 2666, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu15122666>

FRITSCH, M.; GUNTHER, S.D.; SCHWARZER, R.; ALBERT, M.-C.; SCHORN, F.; WERTHENBACH, J.P.; SCHIFFMANN, L.M.; STAIR, N.; STOCKS, H.; SEEGER, J.M.; LAMKANFI, M.; KRONKE, M.; PASPARAKIS, M.; KASHKAR, H. Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis. **Nature**, v. 575, n. 7784, p. 683–687, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1770-6>

GAO, L.; CAI, S.; CAI, A.; ZHAO, Y.; XU, T.; MA, Y.; XU, Y.; WANG, Y.; HU, Y. The improved antitumor efficacy of continuous intratumoral chemotherapy with cisplatin-loaded implants for the treatment of sarcoma 180 tumor-bearing mice. **Drug Delivery**, v. 26, n. 1, p. 208–215, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1574938>

GAO, W.; GAO, J.; CHEN, L.; REN, Y.; MA, J. Targeting XIST induced apoptosis of human osteosarcoma cells by activation of NF-κB/PUMA signal. **Bioengineered**, v. 10, n. 1, p. 261–270, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1631104>

GAPTULBAROVA, K. A.; TSYGANOV, M. M.; PEVZNER, A. M.; IBRAGIMOVA, M. K.; LITVIAKOV, N. V. NF-κB as a potential prognostic marker and a candidate for targeted therapy of cancer. **Exp Oncol**, v. 42, n. 4, p. 263–269, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol42-no4.15414>

GEZICI, S.; ŞEKEROĞLU, N. Current perspectives in the application of medicinal plants against cancer: Novel therapeutic agents. **Anti-cancer Agents in Medicinal**

Chemistry, v. 19, n. 1, p. 101–111, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1871520619666181224121004>

GIFTSON, J. S.; JAYANTHI, S.; NALINI, N. Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. **Investigational New Drugs**, v. 28, n. 3, p. 251–259, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10637-009-92419>

GINGRICH, J. R.; GREENBERG, N. M. A transgenic mouse prostate cancer model. **Toxicologic Pathology**, v. 24, n. 4, p. 502–504, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/019262339602400414>

GONZÁLEZ, J.; CRUZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Production of antioxidants from Eucalyptus globulus wood by solvent extraction of hemicellulose hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 243–251, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(03\)00208-5](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(03)00208-5)

GUAN, C.; ZHOU, X.; LI, H.; MA, X.; ZHUANG, J. NF-κB inhibitors gifted by nature: The anticancer promise of polyphenol compounds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 156, n. 113951, p. 113951, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113951>

GUO, Q.; JIN, Y.; CHEN, X.; YE, X.; SHEN, X.; LIN, M.; ZENG, C.; ZHOU, T.; ZHANG, J. NF-κB in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01757-9>

GUO, S.; JIANG, X.; MAO, B.; LI, Q.-X. The design, analysis and application of mouse clinical trials in oncology drug development. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5907-7>

HADIDI, M.; LIÑÁN-ATERO, R.; TARAHI, M.; CHRISTODOULOU, M. C.; AGHABABAEI, F. The potential health benefits of Gallic acid: Therapeutic and food applications. **Antioxidants**, v. 13, n. 8, p. 1001, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox13081001>

HAGHSHENAS, M.; FIROUZABADI, N.; AKBARIZADEH, A. R.; RASHEDINIA, M. Combination of metformin and gallic acid induces autophagy and apoptosis in human breast cancer cells. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 6, p. 663–675, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/1735-5362.389956>

HANIEH, H.; IBRAHIM, H.-I.M.; MOHAMMED, M.; ALWASSIL, O.I.; FARHAN, M. Activation of aryl hydrocarbon receptor signaling by gallic acid suppresses progression of human breast cancer *in vitro* and *in vivo*. **Phytomedicine**, v. 96, n. 153817, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153817>

HAN, J.-H.; KWAK, J.-Y.; LEE, S.-S.; KIM, H.-G.; JEON, H.; CHA, R.-R. Markedly elevated aspartate aminotransferase from non-hepatic causes. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 1, p. 310, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jcm12010310>

HANIEH, H.; IBRAHIM, H.-I. M.; MOHAMMED, M.; ALWASSIL, O. I.; ABUKHALIL, M. H.; FARHAN, M. Activation of aryl hydrocarbon receptor signaling by gallic acid suppresses progression of human breast cancer in vitro and in vivo. **Phytomedicine**, v. 96, n. 153817, p. 153817, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153817>

HASSAN, M.; WATARI, H.; ABUALMAATY, A.; OHBA, Y.; SAKURAGI, N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–23, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/150845>

HASSANI, S.; GHANBARI, F.; LOTFI, M.; ALAM, W.; ASCHNER, M.; POPOVIĆ-DJORDJEVIĆ, J.; SHAHCHERAGHI, S. H.; KHAN, H. How gallic acid regulates molecular signaling: role in cancer drug resistance. **Medical Oncology**, v. 40, n. 11, p. 308, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12032-023-02178-4>

HE, Z.; LIU, X.; WU, F.; WU, S.; RANKIN, G.O.; MARTINEZ, I.; ROJANASAKUL, Y.; CHEN, Y.C. Gallic acid induces S and G2 phase arrest and apoptosis in human ovarian cancer cells *in vitro*. **Applied Sciences**, v. 11, n. 9, p. 3807, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app11093807>

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35037710>

HIROSE, M.; ITO, T.; TAKAHASHI, S.; OZAKI, M.; OGISO, T.; NIHRO, Y.; MIKI, T.; SHIRAI, T. Prevention by synthetic phenolic antioxidants of 2-amino 3,8dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)- or activated MeIQx-induced mutagenesis and MeIQx-induced rat hepatocarcinogenesis, and role of antioxidant activity in the prevention of carcinogenesis. **European Journal of Cancer Prevention**, n. 3, p. 233–241, 1998. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/45050526>

HOLOHAN, C.; VAN SCHAEYBROECK, S.; LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Cancer drug resistance: An evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 10, p. 714–726, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc3599>

HONG, R.; LIM, S.-C.; LEE, T.-B.; HAN, S.-I. Anticancer effect of Gallic acid on acidity-induced invasion of MCF7 breast cancer cells. **Nutrients**, v. 15, n. 16, p. 3596, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu15163596>

HSU, C.-L.; LO, W.-H.; YEN, G.-C. Gallic acid induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes via a Fas-and mitochondrial-mediated pathway. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 18, p. 7359–7365, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf071223c>

HUANG, Y.; CHEN, J.; JIANG, T.; ZHOU, Z.; LV, B.; YIN, G.; FAN, J. Gallic acid inhibits the release of ADAMTS4 in nucleus pulposus cells by inhibiting p65 phosphorylation and acetylation of the NF-κB signaling pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 29, p. 47665–47674, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17509>

IGNEY, F.H.; KRAMMER, P.H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Ver Cancer*. v.2, n. 4, p. 277-288, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc776>

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER (INCA). INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casosde-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025> Acesso em: 1 jun. 2024.

ISLAM, B. ul; SUHAIL, M.; KHAN, M. K.; ZUGHAIIBI, T. A.; ALSERIHI, R. F.; ZAIDI, S. K.; TABREZ, S. Polyphenols as anticancer agents: Toxicological concern to healthy cells. **Phytotherapy Research: PTR**, v. 35, n. 11, p. 6063– 6079, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr.7216>

JABBARI, N.; FEGHHI, M.; ESNAASHARI, O.; SORAYA, H.; REZAIIE, J.; Inhibitory effects of gallic acid on the activity of exosomal secretory pathway in breast cancer cell lines: A possible anticancer impact. **BiolImpacts**, v.12, n. 6, p. 549-559, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.34172/bi.2022.23489>

JAFARINEJAD, S.; MARTIN, W. H. C.; RAS, B. A.; ISREB, M.; JACOB, B.; AZIZ, A.; ADOUL, Z.; LAGNADO, R.; BOWEN, R. D.; NAJAFZADEH, M. The anticancer/cytotoxic effect of a novel gallic acid derivative in non-small cell lung carcinoma A549 cells and peripheral blood mononuclear cells from healthy individuals and lung cancer patients. **BioFactors**, v. 50, n. 1, p. 201–213, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/biof.2003>

JANG, Y.-G.; KO, E.-B.; CHOI, K.-C. Gallic acid, a phenolic acid, hinders the progression of prostate cancer by inhibition of histone deacetylase 1 and 2

expression. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 84, n. 108444, p. 108444, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108444>

Jl, B.-C. et al. Gallic acid induces apoptosis via caspase-3 and mitochondriondependent pathways *in vitro* and suppresses lung xenograft tumor growth *in vivo*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 16, p.7596–7604, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf901308p>

JIANG, M.; QI, L.; LI, L.; WU, Y.; SONG, D.; LI, Y. Caspase-8: A key protein of cross-talk signal way in “PANoptosis” in cancer. **International Journal of Cancer**. Journal international du cancer, v. 149, n. 7, p. 1408–1420, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.33698>

JIANG, Y.; PEI, J.; ZHENG, Y.; MIAO, Y.-J.; DUAN, B.-Z.; HUANG, L.-F. Gallic acid: A potential anti-cancer agent. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 28, n. 7, p. 661–671, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11655-0213345-2>

JIN, H.; WANG, L.; BERNARDS, R. Rational combinations of targeted cancer therapies: background, advances and challenges. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 22, n. 3, p. 213–234, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00615-z>

JING, Z.; LI, M.; WANG, H.; YANG, Z.; ZHOU, S.; MA, J.; MENG, E.; ZHANG, H.; LIANG, W.; HU, W.; WANG, X.; FU, X. Gallic acid-gold nanoparticles enhance radiation-induced cell death of human glioma U251 cells. **IUBMB life**, v. 73, n. 2, p. 398–407, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/iub.2436>

KANG, D. Y.; SP, N.; JO, E. S.; RUGAMBA, A.; HONG, D. Y.; LEE, H. G.; YOO, J.-S.; LIU, Q.; JANG, K.-J.; YANG, Y. M. The inhibitory mechanisms of tumor PDL1 expression by natural bioactive Gallic acid in non-small-cell lung cancer (NSCLC) cells. **Cancers**, v. 12, n. 3, p. 727, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers12030727>

KANG, N.; LEE, J.-H.; LEE, W.; KO, J.-Y.; KIM, E.-A.; KIM, J.-S.; HEU, M.-S.; KIM, G. H.; JEON, Y.-J. Gallic acid isolated from *Spirogyra* sp. improves cardiovascular disease through a vasorelaxant and antihypertensive effect. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 764–772, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.02.006>

KASHYAP, D.; GARG, V.K.; GOEL, N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. **Adv Protein Chem Struct Biol**, v. 125, p. 73-120, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2021.01.003>

KAUR, M.; VELMURUGAN, B.; RAJAMANICKAM, S.; AGARWAL, R., AGARWAL, C. Gallic acid, na active constituent of grape seed extract, exhibits anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects Against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice. **Pharm Res**, v. 26, n. 9, p. 2133-2140, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9926-y>

KAUR, R.; BHARDWAJ, A.; GUPTA, S. Cancer treatment therapies: traditional to modern approaches to combat cancers. **Molecular Biology Reports**, v. 50, n. 11, p. 9663–9676, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11033-02308809-3>

KAWADA, M. et al. Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. **Anti-Cancer Drugs**, v. 12, n. 10, p.847–852, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00001813-200111000-00009>

KETELUT-CARNEIRO, N.; FITZGERALD, K. A. Apoptosis, pyroptosis, and necroptosis oh my! The many ways a cell can die. **Journal of Molecular Biology**, v. 434, n. 4, p. 167378, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167378>

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**. v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>

KHORSANDI, K.; KIANMEHR, Z.; HOSSEINMARDI, Z.; HOSSEINZADEH, R. Anti-cancer effect of gallic acid in presence of low level laser irradiation: ROS production and induction of apoptosis and ferroptosis. **Cancer Cell Int**, v. 20, n. 18, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12935-020-1100-y>

KNEZEVIC, C.E.; CLARKE, W. Cancer chemotherapy: The case for therapeutic drug monitoring. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 42, n. 1, p. 6–19, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/ftd.0000000000000701>

KO, E.B.; JANG, Y.G.; KIM, C.W.; GO, R.E.; LEE, H.K.; CHOI, K.C. Gallic acid hindered lung cancer progression by inducing cell cycle arrest and apoptosis in A549 lung cancer cells via PI3K/Akt pathway. **Biomol Ther (Seoul)**, v. 30, n. 2, p. 151–161, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.4062/biomolther.2021.074>

KONTOMANOLIS, E.N.; KOUTRAS, A.; SYLLAIOS, A.; SCHIZAS, D.; KALAGASIDOU, S.; PAGKALOS, A.; ALATZIDOU, D.; KANTARI, P.; NTOUNIS, T.; FASOULAKIS, Z. Basic principles of molecular biology of câncer cellmolecular câncer indicators. **J BUON**, v. 26, n. 5, p. 1723-1734, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34761575/>

LI, L.T.; JIANG, G.; CHEN, Q.; ZHENG, J. N. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). **Mol Med Rep**, v. 11, n. 3, p. 1566–1572, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2914>

LI, Y.; ZHAO, B.; PENG, J.; TANG, H.; WANG, S.; PENG, S.; YE, F.; WANG, J.; OUYANG, K.; LI, J.; CAI, M.; CHEN, Y. Inhibition of NF-κB signaling unveils novel strategies to overcome drug resistance in cancers. **Drug Resist Updat**, v. 73, n. 101042, p. 101042, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2023.101042>

LIEHR, T.; RINCIC, M. Cytogenomic characterization of Murine cell line sarcoma 180 = S-180. **Int. J. Mol. Sci.** v. 26, n. 3, p. 1127, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms26031127>

LIU, Z.; LI, D.; YU, L.; NIU, F. Gallic acid as a cancer-selective agent induces apoptosis in pancreatic cancer cells. **Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 185–194, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000337103>

LORTET-TIEULENT, J.; GEORGES, D.; BRAY, F.; VACCARELLA, S. Profiling global cancer incidence and mortality by socioeconomic development. **International Journal of Cancer**, v. 147, n. 11, p. 3029–3036, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.33114>

MAIMAITI, A.; KUERBAN, H.; LI, X.; VDAC1 mediated anticancer activity of Gallic acid in human lung adenocarcinoma A549 cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 255–262, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2174/1871520617666170912115441>

MANDATO, C.; VAJRO, P.; Isolated aspartate aminotransferase elevation: Is it liver disease or what else? **Acta Paediatrica**, v. 111, n. 3, p. 459–461, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/apa.16213>

MARUSZEWSKA, A.; TARASIUK, J.; Antitumour effects of selected plant polyphenols, gallic acid and ellagic acid, on sensitive and multidrug-resistant leukaemia HL60 cells: Antileukaemic effect of plant compounds, gallic acid and ellagic acid. **Phytotherapy Research: PTR**, v. 33, n. 4, p. 1208–1221, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr.6317>.

MENON, S.S.; GURUVAYOORAPPAN, C.; SAKTHIVEL, K.M.; RASMI, R.R. Ki67 protein as a tumour proliferation marker. **Clin Chim Acta**. v. 491, p. 39–45, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.01.011>

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem** Compound Summary for CID 370: *Gallic Acid*. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/370>. Acesso em: 01 jun. 2024.

NEWTON, K.; STRASSER, A.; KAYAGAKI, N.; DIXIT, V.M. Cell death. **Cell**, v. 187, n. 2, p. 235–256, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.11.044>

NURGALI, K.; JAGOE, R.T.; ABALO, R. Editorial: Adverse effects of cancer chemotherapy: Anything new to improve tolerance and reduce sequelae? **Front Pharmacol.** v. 9, p. 245, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00245>

OBENG, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals: a review. *Braz J Biol*, v. 81, n. 4, p.1133–1143, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/KrGnBZTqg9cbPCMZ9ZHWfzx/?format=pdf&lang=en>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE - OPAS/OMS. Brasil. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/brasil>. Acesso em: 30 nov. 2025.

PANTALEÃO, C.; LUCHS, A. Cancer and experimental models of mouse tumor. *Ver. Inst. Adolfo Lutz*. v. 69, n. 4, p. 439-445, 2010. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-595163f>

PEREIRA-FILHO, R.N.; GONÇALVES-JÚNIOR, W.D.; DOS SANTOS-NETO, A.G.; CUNHA, J.L.S.; DE ALMEIDA, O.P.; ANDRADE, L.N.; DROPPAALMEIDA, D.; AMARAL, R.G.; DARIVA, C.; CARDOSO, J.C.; SEVERINO, P.; SOUTO, E.B.; DE ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C.; *Himatanthus bracteatus* stem bark ethanolic extract obtained by sequential pressurized liquid extraction: Chromatographic characterization and profiling of cytotoxic, antitumoral and immunopharmacological properties. **J Tradit Complement Med.** v. 15, n. 3, p. 319-329, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2024.06.004>

PHAN, A.N.; HUA, T.N.; KIM, M.K.; VO, V.T.; CHOI, J.W.; KIM, H.W.; RHO, J.K.; KIM, K.W.; JEONG, Y. Gallic acid inhibition of Src-Stat3 signaling overcomes acquired resistance to EGF receptor tyrosine kinase inhibitors in advanced nonsmall cell lung cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 34, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10581>

PRIYADARSHI, K.; SHIRSATH, K.; WAGHELA, N. B.; SHARMA, A.; KUMAR, A.; PATHAK, C. Surface modified PAMAM dendrimers with gallic acid inhibit cell proliferation, cell migration and inflammatory response to augment apoptotic cell death in human colon carcinoma cells. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, n. 18, p. 6853-6869, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32752940/>

QUAIL, D.F.; JOYCE, J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423–1437, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm.3394>

RAINA, K.; RAJAMANICKAM, S.; DEEP, G.; SINGH, M.; AGARWAL, R.; AGARWAL, C. Chemopreventive effects of oral gallic acid feeding on tumor growth and progression in TRAMP mice. *Mol Cancer Ther*, v. 7, n. 5, p. 1258-1267, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-07-2220>

RAU, A.; LIEB, W. S.; SEIFERT, O.; HONER, J.; BIRNSTOCK, D.; RICHTER, F.; ASCHMONEIT, N.; OLAYIOYE, M. A.; KONTERMANN, R. E. Inhibition of tumor cell growth and cancer stem cell expansion by a bispecific antibody targeting EGFR and HER3. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 19, n. 7, p. 1474–1485, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-19-1095>

RAJENDRAN, K.; SUDALAIMUTHU, M.; GANAPATHY, S. Cytological grading of breast carcinomas and its prognostic implications. **Cureus**, v. 14, n. 9, p. 29385, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.7759/cureus.29385>

STOCK, C. C.; CLARKE, D. A.; PHILIPS, F. S.; BARCLAY, R. K.; MYRON, S. A. Sarcoma 180 screening data. **Cancer Research**, v. 20, n. 5, pt. 2, p. 193-381, 1960. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13834725/>

REZAEI-SERESHT, H.; CHESHOMI, H.; FALANJI, F.; MOVAHEDI-MOTLAGH, F.; HASHEMIAN, M.; MIRESKANDARI, E. Cytotoxic activity of caffeic acid and gallic acid against MCF-7 human breast cancer cells: An *in silico* and *in vitro* study. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 9, n. 6, p. 574–586, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.22038/AJP.2019.13475>

REZENDE, A.A.; SANTOS, R.S.; ANDRADE, L.N.; AMARAL, R.G.; PEREIRA, M.M.; BANI, C.; CHEN, M.; PRIEFER, R.; DA SILVA, C.F.; DE ALBUQUERQUE, R.L.C.; SOUTO, E.B.; SEVERINO, P. Anti-tumor efficiency of perillyl alcohol/ β -cyclodextrin inclusion complexes in a sarcoma S180-induced mice model. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 2, p. 245, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020245>

MOSSNER, R. Severe side effects of targeted therapies. JDDG: **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 20, n. 6, p. 747-748, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ddg.14827>

NIEDZWIECKI, A.; ROOMI, M.W.; KALINOVSKY, T.; RATH, M. Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. **Nutrients**, v. 8, n.9, p. 552, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu8090552>

SAHOO, G.; SAMAL, D.; KHANDAYATARAY, P.; MURTHY, M.K. A review on caspases: Key regulators of biological activities and apoptosis. **Molecular Neurobiology**, v. 60, n. 10, p. 5805–5837, 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-023-03433-5>

SAJADIMAJD, S.; BAHRAMSOLTANI, R.; IRANPANAH, A.; PATRA, J.K.; DAS, G.; GOUDA, S.; RAHIMI, R.; REZAEIAMIRI, E.; CAO, H.; GIAMPIERI, F.; BATTINO, M.; TUNDIS, R.; CAMPOS, M.G.; FARZAEI, M.H.; XIAO, J. Advances on natural polyphenols as anticancer agents for skin cancer. *Pharmacological Research*, v. 151, n. 104584, p. 104584, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104584>

SANCHES, P. R. S.; CARNEIRO, B. M.; BATISTA, M. N.; BRAGA, A. C. S.; LORENZÓN, E. N.; RAHAL, P.; CILLI, E. M. A conjugate of the lytic peptide Hecate and gallic acid: structure, activity against cervical cancer, and toxicity. **Amino Acids**, v. 47, n. 7, p. 1433–1443, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1980-7>

SANTOS, S.A.; AMARAL, R.G.; GRAÇA, A.S.; GOMES, S.V.F.; SANTANA, F.P.; OLIVEIRA, I.B.; ANDRADE, L.N.; SEVERINO, P.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C.; SANTOS, S.L.; SOUTO, E.B.; CARVALHO, A.A. Antitumor profile of combined *Matricaria recutita* flower extract and 5-fluorouracil chemotherapy in sarcoma 180 in vivo model. **Toxics**, v. 11, n. 4, p. 375, 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/toxics11040375>

SANTUCCI, C.; CARIOLI, G.; BERTUCCIO, P., et al. Progress in cancer mortality, incidence, and survival: a global overview. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 29, n. 5, p. 367–381, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000594>

SAREDDY, G. R.; VADLAMUDI, R. K. PELP1: Structure, biological function and clinical significance. **Gene**, v. 585, n. 1, p. 128–134, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.03.017>

SARI, U.; ZAMAN, F.; OZDEMIR, I.; TUNCER, M.C. Gallic acid induces HeLa cell lines apoptosis via the P53/Bax signaling pathway. **Biomedicines**, v. 12, n. 11, p. 2632, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biomedicines12112632>

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 4, p. 287–306, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/1040869059096>

SELVAKUMAR, P.; BADGELEY, A.; MURPHY, P.; ANWAR, H.; SHARMA, U.; LAWRENCE, K.; LAKSHMIKUTTYAMMA, A. Flavonoids and other polyphenols act as epigenetic modifiers in breast cancer. **Nutrients**, v. 12, n. 3, p. 761, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu12030761>

SHELEF, L. A.; CHIN, B. Effect of phenolic antioxidants on the mutagenicity of aflatoxin B1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 1039–1043, 1980. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.40.6.1039-1043.1980>

SHIRAI, M.; IZUMI, H.; YAMAGAMI, T. Experimental transplantation models of mouse sarcoma 180 in ICR mice for evaluation of anti-tumor drugs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 53, n. 4, p. 707–713, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1292/jvms.53.707>

SODERQUIST, R. S.; CRAWFORD, L.; LIU, E.; LU, M.; AGARWAL, A.; ANDERSON, G. R.; LIN, K. H.; WINTER, P. S.; CAKIR, M.; WOOD, K. C. Systematic mapping of BCL-2 gene dependencies in cancer reveals molecular determinants of BH3 mimetic sensitivity. **Nat Commun**, v. 9, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-01805815-z>

TANG, D.; QIU, R.; QIU, X.; SUN, M.; SU, M.; TAO, Z.; ZHANG, L.; TAO, S. Dietary restriction rescues 5-fluorouracil-induced lethal intestinal toxicity in old mice by blocking translocation of opportunistic pathogens. **Gut Microbes**, v. 16, n. 1, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2355693>

THOMFORD, N. E.; SENTHEBANE, D. A.; ROWE, A.; MUNRO, D.; SEELE, P.; MAROYI, A.; DZOBO, K. Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms19061578>

TOLEDO, B.; GONZÁLEZ-TITOS, A.; HERNÁNDEZ-CAMARERO, P.; PERÁN, M. A brief review on chemoresistance; Targeting cancer stem cells as an alternative approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 4487, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24054487>

TONELLI, C.; CHIO, I. I. C.; TUVESON, D. A. Transcriptional regulation by Nrf2. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 29, n. 17, p. 1727–1745, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>

TROJANI, M.; CONTESSO, G.; COINDRE, J. M.; ROUESSE, J. Soft-tissue sarcomas of adults: study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. **Int J Cancer**, v. 33, n. 1, p. 37–42, 1984. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.2910330108>

TSAI CL, CHIU YM, HO TY, HSIEH CT, SHIEH DC, LEE YJ, TSAY GJ, WU YY. Gallic acid induces apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. **Anticancer Research**, v. 38, n. 4, p. 2057–2067, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.21873/anticanres.12445>

UPADHYAY, A. Cancer: An unknown territory; rethinking before going ahead. **Genes & Diseases**, v. 8, n. 5, p. 655–661, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.09.002>

VAGADEVI, H.; JOSHI, S.; VAIDYA, V.; GADAGINAMATH, G. Synthesis of new 4-pyrrol-yl benzoic acid hydrazide analogs and some derived oxadiazole, triazole and pyrrole ring system: a novel class of potential antibacterial and antitubercular agents. **Eur J Med Chem**, v. 43, p. 1989–1996, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.11.016>

VARELA-RODRÍGUEZ, L.; SÁNCHEZ-RAMÍREZ, B.; HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, V. I.; VARELA-RODRÍGUEZ, H.; CASTELLANOS-MIJANGOS, R. D.; GONZÁLEZ-HORTA, C.; CHÁVEZ-MUNGUÍA, B.; TALAMÁS-ROHANA, P. Effect of Gallic acid and Myricetin on ovarian cancer models: a possible alternative antitumoral treatment. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12906-02002900-z>

VARIYA, B. C.; BAKRANIA, A. K.; MADAN, P.; PATEL, S. S. Acute and 28-days repeated dose sub-acute toxicity study of gallic acid in albino mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP**, v. 101, p. 71–78, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.11.010>

VELURI, R.; SINGH, R. P.; LIU, Z.; THOMPSON, J. A.; AGARWAL, R.; AGARWAL, C. Fractionation of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active constituents causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 7, p. 1445–1453, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi347>

VIMALA, S.; BALAJI, V.; ANUSHA, T. Topical application of gallic acid suppresses the 7,12-DMBA/croton oil induced two-step skin carcinogenesis by modulating anti-

oxidants and MMP-2/MMP-9 in swiss albino mice. **Food Chem Toxicol**, v. 66, p. 44–55, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.017>

WANG, D.; BAO, B. Gallic acid impedes non-small cell lung cancer progression via suppression of EGFR-dependent CARM1-PELP1 complex. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 14, p. 1583–1592, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S228123>

WANG, R.; MA, L.; WENG, D.; YAO, J.; LIU, X.; JIN, F. Gallic acid induces apoptosis and enhances the anticancer effects of cisplatin in human small cell lung cancer H446 cell line via the ROS-dependent mitochondrial apoptotic pathway. **Oncology Reports**, v. 35, n. 5, p. 3075–3083, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/or.2016.4690>

WANG, Y.; YAN, S.; LIU, X.; DENG, F.; WANG, P.; YANG, L.; HU, L.; HUANG, K.; HE, J. PRMT4 promotes ferroptosis to aggravate doxorubicin-induced cardiomyopathy via inhibition of the Nrf2/GPX4 pathway. **Cell Death and Differentiation**, v. 29, n. 10, p. 1982–1995, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00990-5>

XIE, J.; WANG, H.; XIE, W.; LIU, Y.; CHEN, Y. Gallic acid promotes ferroptosis in hepatocellular carcinoma via inactivating Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 397, n. 4, p. 2437–2445, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02770-5>

YAMASAKI, H.; UOZAKI, M.; KATSUYAMA, Y.; UTSUNOMIYA, H.; ARAKAWA, T.; HIGUCHI, M.; HIGUTI, T.; KOYAMA, A. H. Antiviral effect of octyl gallate against influenza and other RNA viruses. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 19, n. 4, p. 685–688, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ijmm.19.4.685>

YANG, J.-T.; LEE, I.-N.; CHEN, C.-H.; LU, F.-J.; CHUNG, C.-Y.; LEE, M.-H.; CHENG, Y.-C.; CHEN, K.-T.; PENG, J.-Y.; CHEN, C.-H. Gallic acid enhances the anti-cancer effect of temozolomide in human glioma cell line via inhibition of Akt and p38-MAPK pathway. **Processes**, v. 10, n. 3, p. 448, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pr10030448>

YOSHIOKA, K.; KATAOKA, T.; HAYASHI, T.; HASEGAWA, M.; ISHI, Y.; HIBASAMI, H. Induction of apoptosis by gallic acid in human stomach cancer KATO III and colon adenocarcinoma COLO 205 cell lines. **Oncology Reports**, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/or.7.6.1221>

YUNUSOVA, N. V.; KONDAKOVA, I. V.; KOLOMIETS, L. A.; AFANAS'EV, S. G.; CHERNYSHOVA, A. L.; KUDRYAVTSEV, I. V.; TSYDENOVA, A. A. Molecular targets

for the therapy of cancer associated with metabolic syndrome (transcription and growth factors). **Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology**, v. 14, n. 3, p. 134–140, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ajco.12780>

ZENG, M.; SU, Y.; LI, K.; JIN, D.; LI, Q.; LI, Y.; ZHOU, B. Gallic acid inhibits bladder cancer T24 cell progression through mitochondrial dysfunction and PI3K/akt/NF-κB signaling suppression. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. 1222, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01222>

ZHANG, T.; MA, L.; WU, P.; LI, W.; GU, R.; DAN, X.; LI, Z.; FAN, X.; XIAO, Z. Gallic acid has anticancer activity and enhances the anticancer effects of cisplatin in non-small cell lung cancer A549 cells via the JAK/STAT3 signaling pathway. **Oncology Reports**, v. 41, n. 3, p. 1779-1788, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3892/or.2019.6976>

ZHANG, C.; LIU, X.; JIN, S.; CHEN, Y.; GUO, R. Ferroptosis in cancer therapy: a novel approach to reversing drug resistance. **Molecular Cancer**, v. 21, n. 1, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01530-y>

ZHANG, S.; HU, R.; GENG, Y.; CHEN, K.; WANG, L.; IMAM, M. U. The regulatory effects and the signaling pathways of natural bioactive compounds on ferroptosis. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 12, p. 2952, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods10122952>

ZHANG, Y.-Y.; MENG, Z.-J. Definition and classification of acute-on-chronic liver diseases. **World J Clin Cases**, v. 10, n. 15, p. 4717-4725, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.12998/wjcc.v10.i15.4717>

ZRAIK, I. M.; HESS-BUSCH, Y. Management von Nebenwirkungen der Chemotherapie und deren Langzeitfolgen. **Die Urologie**, v. 60, n. 7, p. 862–871, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00120-021-01569-7>

ANEXO 1

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE TIRADENTES
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da Atividade Antitumoral do Ácido Gálico (AG) em Modelo Murino de Sarcoma 180", registrada com o nº010824, sob a responsabilidade de Felipe Mendes de Andrade de Carvalho, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi Aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, em reunião de 28/08/2024.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Vigência da autorização	01/10/2024 a 01/08/2027
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> / Swiss (camundongo albino)
Nº de Animais	30
Peso/idade	30g / 3 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério da Universidade Tiradentes

Aracaju, 28 de agosto de 2024


UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT
Prof. Dra. Maria Júlia Nardelli
CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL
COORDENADORA
CRMV/SE 00752

Prof. Dra. Maria Júlia Nardelli
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso Animal - CEUA
Universidade Tiradentes - UNIT



UNIVERSIDADE TIRADENTES
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

PROPOSTA DO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

FORMULÁRIO DE PARECER CONSUBSTANCIADO

Proposta nº: 010824	Data de Entrada: 21/08/24	Data do Parecer: 26/08/24
---------------------	---------------------------	---------------------------

Registro de Aprovação nº: 010824A

Proponente Responsável: Felipe Mendes de Andrade de Carvalho
--

Instituição/Setor: Unit / Núcleo Interdisciplinar de Extensão (NIEX)
--

Título do Proposta: Avaliação da Atividade Antitumoral do Ácido Gálico (AG) em Modelo Murino de Sarcoma 180

Período de vigência da autorização	01/10/24 a 01/08/27
------------------------------------	---------------------

1- Equipe envolvida no projeto/experimento: ☒ De acordo ☐ Pendência Observação:

2- Qualificação do(s) executor(es): ☒ De acordo ☐ Pendência Observação:

3- Resumo do projeto: ☒ De acordo ☐ Pendência Observação:

4- Objetivos do projeto: ☒ De acordo ☐ Pendência Observação:
--

5- Justificativa do projeto: ☒ De acordo ☐ Pendência Observação:
--

UNIVERSIDADE TIRADENTES
 AV. MURILO DANTAS Nº 300 B.FAROLÂNDIA
 CEP: 49.032-490 | ARACAJU - SE - BRASIL

TELEFONE (79) 3324.1100
 FAX (79) 3324.1101
 UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT
 Prof.ª Dra. Maria Júlia Nardelli
 CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL
 COORDENADORA
 CRMV/SE 00752



UNIVERSIDADE TIRADENTES
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

6- Informações sobre o Modelo Animal:

(X) De acordo () Pendência

Observação:

7- Espécie(s) animal(is):

() Bovino (X) Camundongo () Coelho () Rato () Suíno

Outros:

8- Nº de animais por espécie e sexo:

Bovinos () macho () fêmea

Camundongos (30) macho () fêmea

Cobaías () macho () fêmea

Coelhos () macho () fêmea

Ratos () macho () fêmea

Suínos () macho () fêmea

Outros:

Observação:

9- Faixa etária e peso aproximado:

Idade / peso: 3 meses com peso de 30g

Observação:

10- Procedência do(s) animal(is):

(X) Biotério () Criatórios

Observação:

11- Planejamento estatístico/delineamento experimental:

(X) De acordo () Pendência

Observação:

12- As condições de alojamento e a alimentação dos animais:

(X) De acordo () Pendência

Observação:

13- Procedimentos que minimizem ou evitem a dor, o estresse e sofrimento dos animais:

(X) De acordo () Pendência

Observação:

14- Destino dos animais:

UNIVERSIDADE TIRADENTES
 AV. MURILO DANTAS Nº 300 B.FAROLÂNDIA
 CEP: 49.032-490 | ARACAJU - SE - BRASIL

2

TELEFONE: (79) 3218 2206
 FAX: (79) 3218 2100
 UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT
 Prof.ª Dra. Maria Júlia Nardelli
 CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL
 COORDENADORA



UNIVERSIDADE TIRADENTES
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

(X) De acordo () Pendência
 Observação:

15-Protocolo de eutanásia:

(X) De acordo () Pendência () Não se aplica
 Observação:

16-Resumo do procedimento experimental, incluindo a justificativa da finalidade do uso de animais:

(X) De acordo () Pendência () Não se aplica

17-Forma de descarte da carcaça:

(X) De acordo () Pendência () Não se aplica
 Observação: Não se aplica

18-Parecer:

(X) Aprovado () Reencaminhar aos autores () Não Aprovado
 Observação: A proposta atende aos requisitos: éticos, técnicos e regulatórios, indicados na Lei n. 11.794/2008.

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, da Universidade Tiradentes, na sua reunião de 28 de agosto de 2024, emitiu o parecer.


 UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT
 Prof.ª. Dra. Maria Julia Nardelli
 CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL
 COORDENADORA
 CRMV/SE 00752

Assinatura: _____

Prof. Dra. Maria Julia Nardelli
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso Animal – CEUA
 Universidade Tiradentes - UNIT