

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

LANA DE SOUZA ROSA

**INFLUÊNCIA DOS ÁCIDOS FENÓLICOS NA PROLIFERAÇÃO E CAPTAÇÃO
CELULAR EM LINHAGEM DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON
HT-29.**

Rio de Janeiro,
2016

LANA DE SOUZA ROSA

**INFLUÊNCIA DOS ÁCIDOS FENÓLICOS NA PROLIFERAÇÃO E CAPTAÇÃO
CELULAR EM LINHAGEM DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON
HT-29.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Rio de Janeiro,
2016

R788 Rosa, Lana de Souza.
Influência dos ácidos fenólicos no crescimento e captação celular em linhagem de células de adenocarcinoma de cólon HT-29 / Lana de Souza Rosa, 2016.
97 f.: 30 cm

Orientador: Anderson Junger Teodoro.
Coorientadora: Mariana da Costa Monteiro.
Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

1. Cólon (Anatomia) - Câncer. 2. Compostos Fenólicos.
3. Citotoxicidade celular. I. Teodoro, Anderson Junger. II. Monteiro, Mariana da Costa. III. Universidade Federal do Estado do Rio Janeiro. Centro de Ciências Biológicas e de Saúde. Curso de Mestrado em Alimentos e Nutrição. IV. Título.

CDD – 616.994347

LANA DE SOUZA ROSA

**INFLUÊNCIA DOS ÁCIDOS FENÓLICOS NO CRESCIMENTO E CAPTAÇÃO
CELULAR EM LINHAGEM DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON
HT-29.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Junger Teodoro

Co-orientador: Prof. Dr^a. Mariana da Costa Monteiro

Aprovado em: ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Dr. Anderson Junger Teodoro
Escola de Nutrição-UNIRIO

Dr. Felipe Leite de Oliveira
Instituto de Ciências Biomédicas- UFRJ

Dr. Leandro Miranda Alves
Instituto de Ciências Biomédicas- UFRJ

DEDICATÓRIAS

*Aos meus pais, que, mesmo em momentos
difíceis, não mediram esforços
na realização dos meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, pela sua infinita graça e misericórdia. Por renovar minhas forças todas as manhãs e me fazer compreender que a jornada com ele fica bem mais fácil. Sem ele eu não teria chegado até aqui.

Aos meus pais Celso e Mirian, pelo cuidado, pelo incentivo, pela educação, por me ensinarem a importância da honestidade, por terem me oferecido seu melhor durante toda minha vida e principalmente pelas recargas do bilhete único e total apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Anderson Junger Teodoro, pelos aprendizados, pelos ensinamentos durante esses anos de vida acadêmica, pela dedicação, pela paciência e por conviver com meu senso de humor acreditando sempre que as palavras têm poder. Obrigada pela oportunidade.

A Prof. Dra. Mariana Costa Monteiro por ter aceitado ser minha co-orientadora, pelos ensinamentos, pela dedicação, pela paciência e pela simplicidade no convívio. Muito obrigada por tudo.

A amiga Deborah Bauer por ter me ensinado sobre cultura de células, pelas orações, pelo apoio em todo o mestrado e principalmente por escutar meus inúmeros áudios no whatsapp. Você foi uma guerreira.

A Nathália Jordão, pelo auxílio nos experimentos e na atividade laboratorial. Sua alegria nos contagia, sem dúvidas a melhor aluna de iniciação que eu poderia ter tido.

A Nathália Pereira Soares, pela paciência e auxílio com os experimentos.

Aos amigos de classe, laboratório e funcionários da UNIRIO.

Ao Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição (PPGAN).

A CAPES pelo apoio financeiro.

E a todos de que alguma forma contribuíram e torceram por este trabalho.

EPÍGRAFE

*“Então a nossa boca se encheu de riso e a nossa língua de cânticos. Então se dizia
entre as nações: Grandes coisas fez o Senhor por eles.
Sim, grandes coisas fez o Senhor por nós, e por isso estamos alegres”.*
(Salmos 126:2,3)

RESUMO

O câncer colorretal é o quarto tipo de câncer mais comum em homens e o terceiro mais comum em mulheres em todo o mundo. A incidência da doença pode estar correlacionada com a dieta, estilo de vida, fatores hereditários e inatividade física. Estudos têm demonstrado que o risco do desenvolvimento de câncer colorretal pode ser prevenido pela dieta, especialmente com a diminuição da ingestão de gordura dietética e aumento da ingestão de cereais e fibras alimentares. Os ácidos fenólicos têm sido relatados na literatura por possuir efeitos biológicos tais como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência dos ácidos 3,4-dihidroxifenilacético (3,4-DHPAA), *p*-cumárico (*p*-CoA), vanílico (VA) e ferúlico (FA) na viabilidade celular, progressão do ciclo celular e apoptose da linhagem de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29), bem como avaliar a captação intestinal desses compostos. As células da linhagem HT-29 foram cultivadas com DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, sob atmosfera com 5% de CO₂ a 37°C e incubadas com diferentes concentrações dos compostos fenólicos supracitados (0,1 a 100 µM) por 24 h, dependendo do experimento. A atividade antioxidante foi mensurada através dos métodos DPPH, FRAP, ABTS e ORAC onde o 3,4-DHPAA apresentou a maior atividade antioxidante, seguido do VA, FA e *p*-CoA. As análises de viabilidade celular e ciclo celular e apoptose foram realizadas, respectivamente, através do método MTT e por citometria de fluxo. Os resultados demonstraram que os compostos utilizados foram capazes de reduzir a viabilidade celular em média de 66% quando incubado com o 3,4-DHPAA, 63% com o FA, 40% com o *p*-CoA e 23% com o VA. O 3,4-DHPAA promoveu um aumento no percentual de células na fase G0/G1, acompanhada de redução de células na fase G2/M, além de promover uma parada do ciclo celular na fase G0/G1. A análise de ciclo celular após incubação com o VA e o FA revelou uma diminuição da proporção de células em fase G0/G1 nas concentrações de 10 µM e 100 µM. Além disso, o VA não promoveu um aumento do percentual de células apoptóticas. Adicionalmente, o FA diminuiu o percentual de células viáveis na concentração de 10 µM e aumentou o percentual de células apoptóticas. Esses resultados abrem uma série de perspectivas sobre a utilização destes compostos na prevenção e tratamento do câncer de cólon.

Palavras-chave: ácidos fenólicos, câncer de cólon, citotoxicidade celular.

ABSTRACT

Colorectal cancer is the fourth most common cancer in men and the third most common cancer in women worldwide. The incidence of the disease can be correlated with diet, lifestyle, hereditary factors, and physical inactivity. Studies have shown that the risk of developing colorectal cancer can be prevented by diet, especially with decreasing dietary fat intake and increased intake of dietary fiber and cereal. Phenolic acids have been reported in the literature to possess biological effects such as antioxidant activity, anti-inflammatory, antimicrobial and anticarcinogenic activities. This study aimed to evaluate the influence of 3,4-dihydroxyphenylacetic (3,4-DHPAA), *p*-coumaric (*p*-CoA), vanillic (VA) and ferulic (FA) acid on the proliferation and uptake of adenocarcinoma lineage human colon (HT-29). The cell line HT-29 was incubated with DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum under an atmosphere of 5% of CO₂ at 37 °C. Cells were incubated with different concentrations of 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA and FA (0.1 a 100 μM) from 24 h, depending on the assay. Antioxidant activity was measured by the DPPH, FRAP, ABTS and ORAC assays, where 3,4-DHPAA showed the highest antioxidant activity, followed by VA, FA and *p*-CoA. The analysis of cell viability and cell cycle and apoptosis were performed, respectively, by MTT and flow cytometry. The results showed that the phenolic compounds are able to reduce cell viability with an average of 66% for 3,4-DHPAA, 63% for FA, 40% for *p*-CoA and 23% for VA. 3,4-DHPAA promoted an increase in the percentage of cells in G₀/G₁ phase, accompanied by a reduction of cells in G₂ /M phase, and promote cell cycle arrest in G₀/G₁ phase. Cell cycle analysis of VA and FA showed a decrease in the proportion of cells in G₀/G₁ phase in concentrations of 10 μM and 100 μM. Furthermore, VA did not cause an increase in the percentage of apoptotic cells. Results also showed that FA decreased the percentage of viable cells at the concentration of 10 μM and increased the percentage of apoptotic cells. Our results open a series of views on the use of these compounds in the prevention and treatment of colon cancer.

Keywords: phenolic acid, colon cancer, cell cytotoxicity

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Representação anatômica do intestino grosso
- Figura 2 Múltiplas etapas do desenvolvimento do câncer de Cólon e a sequência da mutação dos genes envolvidos
- Figura 3 Progressão da doença
- Figura 4 Exemplo de compostos fitoquímicos presentes em alimentos vegetais com a classificação dos compostos polifenólicos
- Figura 5 Estrutura química dos derivados do ácido benzóico (A) e do ácido hidroxicinâmico(B)
- Figura 6 Possíveis caminhos para o metabolismo de ácidos fenólicos
- Figura 7 Percentual de redução do radical DPPH pelo 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA
- Figura 8 Atividade antioxidante, avaliada pelo método ORAC, do 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA
- Figura 9 Concentração ($\mu\text{mol/L}$) do *p*-CoA no conteúdo intracelular de células HT-29 após a incubação com 10 μM de *p*-CoA (1 h a 6 h)
- Figura 10 Concentração ($\mu\text{mol/L}$) do *p*-CoA no meio de cultura de células HT-29 após a incubação com 10 μM de *p*-CoA (1 h a 6h).
- Figura 11 Concentração ($\mu\text{mol/L}$) do VA no conteúdo intracelular de células HT-29 após a incubação com 10 μM de *p*-CoA (1 h a 6 h)
- Figura 12 Concentração ($\mu\text{mol/L}$) do VA no no meio de cultura de células HT-29 após a incubação com 10 μM de *p*-CoA (1 h a 6 h)

- Figura 13 Concentração ($\mu\text{mol/L}$) do FA no meio de cultura de células HT-29 após a incubação com $10 \mu\text{M}$ de FA (1 h a 6 h).
- Figura 14 Efeito do 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA na quantificação na quantificação de células (HT-29) 24 horas após a incubação
- Figura 15 Efeito do 3,4-DHPAA (A), FA (B), *p*-CoA (C) e VA (D) sobre a viabilidade de células HT- 29 24 horas após a incubação
- Figura 16 Efeito do 3,4-DHPAA sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 24 horas após a incubação
- Figura 17 Efeito do ácido *p*-CoA sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 24 horas após a incubação
- Figura 18 Efeito do FA sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 24 horas após a incubação
- Figura 19 Efeito do VA sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 24 horas após a incubação
- Figura 20 Efeito do 3,4-DHPAA e *p*-CoA sobre o processo de morte programada em células HT-29 24 h após a incubação
- Figura 21 Efeito do FA e VA sobre o processo de morte programada em células HT-29 24 h após a incubação

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Genes envolvidos na carcinogênese colorretal
Tabela 2	Sistema de classificação de tumores malignos (TNM) para o estadiamento do câncer colorretal
Tabela 3	Estadiamento clínico do câncer de cólon
Tabela 4	Estágios do câncer de cólon
Tabela 5	Fontes alimentares com teores elevados de ácidos hidroxicinâmicos
Tabela 6	Programação do gradiente de concentração da fase móvel utilizada na análise dos meios de culturas de células e dos precipitados celulares de linhagem celular de adenocarcinoma de cólon incubadas com 3,4-DHPAA, <i>p</i> -CoA, VA e FA.
Tabela 7	Atividade Antioxidante de ácidos fenólicos pelo ensaio FRAP expresso ($\mu\text{Mol Sulfato Ferroso} / \mu\text{Mol}$).
Tabela 8	Atividade antioxidante de ácidos fenólicos pelo ensaio ABTS expresso em $\mu\text{M Trolox} / \mu\text{Mol}$ e $\mu\text{Mol Ácido ascórbico} / \mu\text{Mol}$
Tabela 9	Valor do IC_{50} (μM) do 3,4-DHPAA e FA
Tabela 10	Efeito do 3,4-DHPAA, <i>p</i> -CoA, VA e FA (10 μM e 100 μM) sobre o processo de morte celular por apoptose nas células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) 24 h após a incubação.

LISTA DE SIGLAS

AAPH	Iniciador radical azo (2,2'-azinobis(2-amidinopropano) dihidrocloro).
ANOVA	Análise de variância
APC	Gene Supressor tumoral (do inglês, Adenomatous polyposis coli)
AUC	Área abaixo da curva
B16F0	Linhagem de melanoma em camundongos
BSS-CMF	Solução salina balanceada livre de cálcio e magnésio
Caco-2	Linhagem celular humana de adenocarcinoma de cólon humano
CD44 v	Glicoproteína de superfície celular
CEA	Antígeno carcinoembrionário
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
C-myc	Oncogene c-myc
COX-1	Ciclo-oxigenase-1
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DCC	Molécula de adesão celular
DMEM	Meio base de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês, <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FA	Ácido ferúlico
FRAP	Capacidade ferri-redutora
G0	Estado de quiescência das células durante o ciclo celular
G1	Primeira fase do ciclo celular
G2	Segunda fase do ciclo celular
GSTT2	Gene Glutathione S-transferase T2
HL-60	Células da linhagem de leucemia promielocítica aguda
HCT 15	Linhagem celular humana de adenocarcinoma de cólon humano
HCT 116	Linhagem celular humana de adenocarcinoma de cólon humano
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HT-29	Linhagem celular humana de adenocarcinoma de cólon humano
hMLH1	Gene humano mutL homolog 1
hMSH2	Gene humano mutS homolog 2
hMSH6	Gene human mutS homolog 6
hPMS 1	Gene reparo DNA (do inglês, <i>mismatch repair genes</i>)
hPMS2	Gene reparo DNA (do inglês, <i>mismatch repair genes</i>)
IC ₅₀	Concentração necessária para inibir 50% da atividade de um composto
IEC6	Células normais do epitélio do intestino
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
K-ras	Proteína k-ras
LDL	Lipoproteína de baixa densidade

LOX	Lipoxigenase
MAPK	Proteína-quinase Ativada por Mitógenos
MCT	Transportador de ácido monocarboxílico
MC1R	Receptor de melanocortina 1
MITF	Fator de transcrição associado a microftalmia
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NCI	Nacional Cancer Institute
ORAC	Capacidade de absorção de radical de oxigênio
PBS	Solução salina tamponada (do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>)
<i>p</i> -CoA	Ácido <i>p</i> -cumárico
pH	Potencial de hidrogênio
PSOF	Pesquisa de sangue oculto nas fezes
p53	Proteína citoplasmática supressora de tumor
RNA _m	RNA Mensageiro
src	Enzima tirosina quinase
S	Fase de replicação do DNA durante o ciclo celular
SFB	Soro fetal bovino
Sw480	Linhagem celular humana de adenocarcinoma de cólon humano
TC	Tomografia computadorizada
TPTZ	Reagente 2,3,5-cloreto trifeniltetrazolium
TRP-1	Proteína Relacionada a Tirosinase 1

TRP-2 Proteína Relacionada a Tirosinase 2

VA Ácido vanílico

3,4-DHPAA Ácido 3,4-dihidroxifenilacético

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1. INTESTINO GROSSO: O CÓLON	21
2.2. CÂNCER DE CÓLON	22
2.2.1. Sinais, sintomas e fatores de risco	26
2.2.2. Screening e diagnóstico	27
2.2.3. Estadiamento	29
2.2.4. Bases do tratamento	34
2.2.5. Modelos de estudo de câncer cólon	36
2.3. CÂNCER DE CÓLON E FATORES DIETÉTICOS	37
2.4. COMPOSTOS FENÓLICOS	38
2.4.1. ÁCIDOS FENÓLICOS	39
2.4.1.1. Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	42
2.4.1.2. Ácido <i>p</i> -cumárico	43
2.4.1.3. Ácido ferúlico	44
2.4.1.4. Ácido vanílico	45
2.5. Absorção, biodisponibilidade e distribuição dos ácidos fenólicos no organismo	46
3. OBJETIVOS	50
3.1. Objetivo geral	50
3.2. Objetivos específicos	50
4. MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1. Reagentes	51
4.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	51
4.2.1. Avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH	51
4.2.2. Análise determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do Ferro (FRAP)	52
4.2.3. Análise de atividade antioxidante total pela captura do radical abts	52
4.2.4. Ensaio ORAC	53
4.3. CULTURA DE CÉLULAS	54

4.4. INCUBAÇÃO DOS COMPOSTOS EM LINHAGEM DE CÉLULA HT-29	54
4.5. DOSAGEM DO DHPAA, <i>p</i>-CoA, VA e FA E METABÓLITOS EM CULTURA DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON (HT-29)	55
4.5.1. Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	55
4.6. ENSAIO DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR	57
4.6.1. Quantificação celular: câmara de Neubauer	57
4.6.2. Ensaio de MTT	57
4.7. ENSAIO DE CICLO CELULAR	58
4.8. ENSAIO DE APOPTOSE	58
4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	59
5. RESULTADOS	60
5.1. Atividade antioxidante do 3,4-DHPAA, <i>p</i> -CoA, VA e FA	60
5.2. Cinética de captação do 3,4-DHPAA, <i>p</i> -CoA, VA e FA pelas células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29)	63
5.2.1. Incubação com o <i>p</i> -CoA	63
5.2.2. Incubação com o VA	64
5.2.3. Incubação com o FA	65
5.3. ENSAIO DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR	66
5.3.1. Quantificação celular: câmara de Neubauer	66
5.3.2. Ensaio de MTT	67
5.4. EFEITO DO 3,4-DHPAA, <i>p</i>-CoA, VA e FA SOBRE A PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR	70
5.5. EFEITO DO 3,4-DHPAA, <i>p</i>-CoA, VA e FA SOBRE A TAXA DE APOPTOSE EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO (HT-29)	75
6. DISCUSSÃO	79
7. CONCLUSÃO	87
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

ANEXO A - ARTIGO INTITULADO “Anticancer Properties of Phenolic Acids in Colon Cancer – A Review”, PUBLICADO NA REVISTA Nutrition & Food Sciences, EM FEVEREIRO DE 2016.

97

1. INTRODUÇÃO

A estimativa para o Brasil, biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. Estimam-se, 16.660 casos novos de câncer de cólon e reto em homens e de 17.620 em mulheres, o câncer de cólon e reto em homens é o segundo mais frequente na Região Sudeste (24,27/100 mil) e terceiro nas Regiões Sul (22,35/100 mil). Para as mulheres, é o segundo mais frequente nas Regiões Sudeste (22,66/100 mil) e Sul (23,27/100 mil) (INCA, 2015).

O câncer de cólon se desenvolve através de um processo de múltiplos estágios que pode ser reconhecido em um nível histopatológico pela progressão da mucosa para carcinoma invasivo (Latifah *et al.*, 2010).

Dados epidemiológicos sugerem que a dieta é um fator importante na etiologia do câncer de cólon. O alto consumo de carne vermelha, gordura animal, chocolate, álcool e cereais refinados estão ligados a maior incidência deste câncer nas sociedades ocidentais, enquanto que têm sido relatados efeitos protetores de frutas, verduras e grãos integrais (Gunasekaranm *et al.*, 2014).

Uma variedade de frutas e vegetais oferece uma gama de nutrientes e diferentes compostos bioativos incluindo fitoquímicos (compostos fenólicos, flavonóides e carotenóides), vitaminas (vitamina C, ácido fólico, e pró-vitamina A), minerais (potássio, cálcio e magnésio) e fibras (LIU, 2013).

Os compostos fenólicos têm sido relatados por possuir propriedades biológicas como: anticarcinogênica, antiviral, antioxidante e anti-inflamatórias (Senawong *et al.*, 2014).

Eles são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (Malacrida *et al.*, 2005). São geralmente classificados em subgrupos de ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos, cumarinas e taninos (LIU, 2013).

Uma variedade de evidências suporta a teoria das propriedades anticarcinogênica dos ácidos fenólicos, apesar dos mecanismos ainda não serem completamente compreendidos, mas, pode-se incluir a eliminação de radicais livres, a indução das enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos, regulação da expressão gênica, modulação de vias de sinalização celular incluindo aquelas que

estão envolvidas na reparação dos danos no DNA, proliferação celular, apoptose e invasão (Rosa *et al.*, 2016).

Há relatos de que os ácidos fenólicos atuam inibindo os fatores de transcrição ligados à inflamação, citocinas pró-inflamatórias, ciclo-oxigenase (COX-2), lipoxigenase (LOX) e óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) (Rosa *et al.*, 2016).

A partir do exposto acima, justifica-se a realização de pesquisas direcionadas ao estudo da captação intestinal dos ácidos fenólicos e o efeito dos mesmos sobre células de câncer de cólon humano, no intuito de avaliar a implicação desses compostos fenólicos na prevenção e tratamento do desenvolvimento do câncer colorretal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Intestino Grosso: Cólon

O intestino grosso, cuja principal função é a absorção de água e eletrólitos, possui cerca de 1,5 metros de comprimento, apresentando-se fixo na sua quase totalidade e emoldurando o intestino delgado. É formado pelo cólon, que é situado no abdômen, e pelo reto e ânus, localizados na pelve e períneo (Brasil, 2003).

A primeira e mais longa parte do intestino grosso é o cólon. O cólon está dividido em quatro segmentos: O primeiro segmento é chamado de cólon ascendente, ele começa subindo junto à parede abdominal direita, em direção ao fígado. O segundo segmento é chamado o cólon transversal, ele atravessa o abdômen, com uma curva inferior para a maior curvatura do estômago. O terceiro segmento, o cólon descendente, continua para baixo no lado esquerdo. O quarto segmento é conhecido como o cólon sigmóide devido à sua forma "S". O cólon sigmóide junta-se ao reto, o qual por sua vez, junta-se ao ânus (Alteri *et al.*, 2011).

Os segmentos transversais e ascendentes são denominados como cólon proximal, enquanto o descendente e sigmóide são referidos como cólon distal (Alteri *et al.*, 2014).

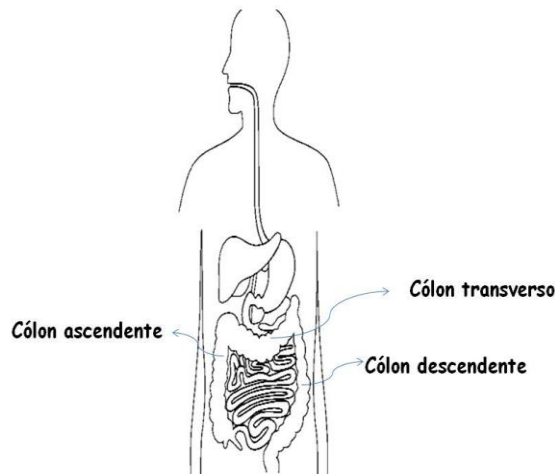


Figura 1. Representação anatômica do intestino grosso.

Há necessidade de se dividir o intestino desta maneira para que se possa individualizar cada uma de suas partes com seus conjuntos de artérias, veias e drenagem linfática, e assim, explicar o funcionamento especializado em partes distintas da digestão e absorção de alimentos. Além disso, as doenças que acometem o intestino podem produzir sintomas diversos de acordo com a sua localização períneo (Brasil, 2003).

2.2. Câncer de cólon

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras partes do corpo (Brasil, 1996).

Usualmente, um conjunto de alterações moleculares em diferentes níveis de regulação é responsável pelo estabelecimento do câncer, de modo que uma simples modificação numa célula normal raramente é suficiente para deflagrar o processo tumorigênico. Todavia, a alteração de alguns genes com papel central em múltiplos canais regulatórios revela o potencial impacto de uma única desordem molecular para a promoção da neoplasia (Faria & Rabenhorst, 2006).

A transformação neoplásica consiste num processo multicausal no qual os controles normais da proliferação celular e da interação célula-célula são perdidos. A ativação aberrante dos proto-oncogenes em conjunto com a inibição não regulada

dos genes supressores tumorais representam os fundamentos desse processo (Alberts *et al.*, 2002).

Ao contrário de lesões benignas, o câncer é morfologicamente diferente do tecido normal de origem, têm a capacidade de invadir e destruir tecidos vizinhos, metástases para órgãos distantes e se não for tratado, pode levar à morte (Machado *et al.*, 2016).

Os tumores ou neoplasias malignas originadas dos epitélios de revestimento externo e interno são denominados carcinomas. Quando o epitélio de origem for glandular, passam, contudo, a ser chamadas de adenocarcinomas (INCA, 1999).

O cólon, incluindo o reto é o sítio mais frequente de neoplasias primárias do que qualquer outro órgão em todo o corpo humano (Robbins *et al.*, 1998) .

O desenvolvimento do câncer colorretal ocorre pelo resultado da transformação do epitélio colônico normal em lesões benignas, denominadas pólipos adenomatosos, que posteriormente evoluem para lesões malignas, os adenocarcinomas. A progressão é lenta, geralmente envolvendo vários anos e com um número considerável de alterações genéticas (Zandoná *et al.*, 2011).

Os pólipos adenomatosos são divididos em três subtipos: I) adenomas tubulares: apresentam mais de 75 % de sua arquitetura composta por glândulas tubulares e são a grande maioria dos adenomas; II) adenomas vilosos: apresentam mais de 50 % de projeções vilosas, representando apenas 1% do total de adenomas; III) adenomas túbulo vilosos: constituindo entre 5 a 10 % dos adenomas colorretais, são constituídos por um misto de glândulas tubulares e projeções vilosas, onde estas últimas compõe entre 25 e 50 % do total da arquitetura da lesão. O risco de malignidade em um pólipo adenomatoso correlaciona-se com três fatores independentes: tamanho do pólipo, arquitetura histológica e grau de displasia epitelial (Cotti *et al.*, 2000) .

Em 1976, Morson *et al.* descreveram pela primeira vez associação entre carcinoma e pólipos colorretais baseando-se nas observações clínicas, epidemiológicas e anátomo patológicas sendo conhecida hoje como sequência "adenoma-carcinoma".

O evento mutacional é o passo inicial na sequência denominada adenoma-carcinoma e envolve genes como APC (Adenomatous Polyposis Coli), K-ras, DCC

(Deleted in Colorectal Cancer) e p53 (Figura 2), e é caracterizada por três fases: I) iniciação envolvendo exposição ou ingestão de substâncias cancerígenas resultando em danos permanente no DNA; II) promoção envolvendo um longo processo de replicação anormal de células formando uma lesão pré-neoplásica e iii.) Progressão da tumorigênese envolvendo conversão gradual de células pré-neoplásicas para as células malignas (Brown *et al.*, 2012) .

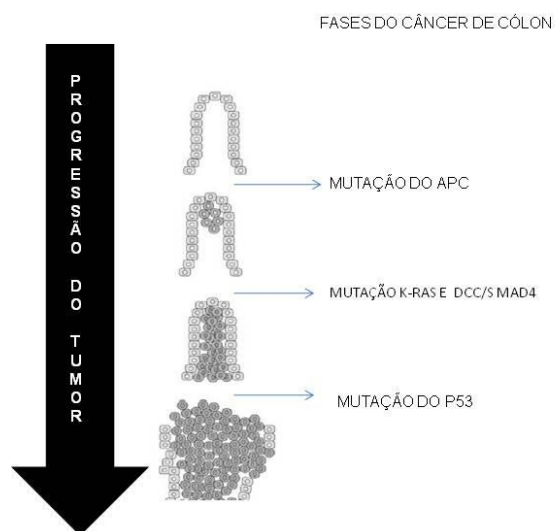


Figura 2. Múltiplas etapas do desenvolvimento do câncer de Cólon e a sequência da mutação dos genes envolvidos (Rosa *et al.*,2016).

As atividades celulares são determinadas pela ação de proteínas, as quais podem atuar a partir de sua presença no interior da célula ou mediante contato externo a esta, com receptores existentes em sua membrana, os quais, por seu turno podem desencadear efeitos intracelulares através de uma seqüência de reações em cascata. O grande número de estudos a respeito dos aspectos biomoleculares do câncer colorretal e seus precursores têm permitido a identificação de diversas proteínas, as quais exercem um importante controle sobre a atividade proliferativa das células da mucosa colônica (Pinho, 2005).

Alguns exemplos das proteínas envolvidas na carcinogênese colorretal e suas respectivas funções estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. Genes envolvidos na carcinogênese colorretal.

Categoria	Nome	Função do gene na patogênese do câncer
Supressores tumorais	APC	Sua perda afeta a regulação do ciclo celular e da apoptose; controla os níveis citoplasmáticos da proteína b-catenina, que funciona como um ativador da transcrição de DNA.
	DCC	Molécula de adesão celular; perda de função é estímulo para comportamento metastático.
	p53	Regula o ciclo celular e a apoptose após dano ao DNA; perda de função leva à replicação celular mesmo em face de mutações no DNA.
Oncogenes	K-ras	Proteína de ligação com o GTP e intermediária na via de sinalização de fatores de crescimento; mutação leva à sua ativação constante e estimulação irrefreada à replicação do DNA.
	src	Enzima tirosina quinase; tem atividade elevada em adenomas e carcinomas, porém os mecanismos que levam à sua ativação são desconhecidos.
	<i>c-myc</i>	Ativador de transcrição; expressão aumentada em neoplasias do cólon, porém os mecanismos de amplificação são desconhecidos.
Genes Mismatch Repair	hMSH2 hMLH1 hMSH6 hPMS1 hPMS2	Fazem parte do sistema de reparo do DNA; perda leva ao fenótipo de instabilidade de microssatélites e à hipermutabilidade do DNA.
Outros Genes	CD44v	Glicoproteína de superfície celular; molécula de adesão celular relacionada com doença metastática.
	COX-2	Gene da enzima Ciclo-oxigenase induzível; inibe diferenciação celular no epitélio intestinal e diminui a apoptose.

Fonte: Cotti *et al.* (2000).

2.2.1. Sinais, Sintomas e Fatores de Risco

O câncer colorretal pode não causar sintomas imediatamente, mas se isso acontecer, ele pode causar um ou mais destes sintomas: mudança nos hábitos intestinais como diarreia, constipação ou estreitamento das fezes que dure mais do que alguns dias; sensação de que você precisa ter um movimento no intestino que não é aliviada ao fazê-lo; sangramento retal, sangue nas fezes o que pode fazer com que ela pareça escura; Cãibras ou dor abdominal; fraqueza; fadiga e perda de peso não intencional. Quando o câncer de cólon não vir a ser a causa, muitas vezes os sintomas só aparecem depois que o câncer já tenha crescido ou se espalhado (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

Os principais fatores de risco relacionados ao desenvolvimento do câncer do intestino são: idade maior ou igual a 50 anos ;alimentação pobre em frutas, vegetais e fibras (Inca,2003) ;consumo excessivo de bebidas alcoólicas e gordura animal; tabagismo e obesidade (Brasil,2003).

Além destes, outros fatores de risco também podem estar relacionados como: história de parentes de primeiro grau com adenomas diagnosticados antes dos 60 anos de idade; história pessoal progressiva de adenomas ou câncer de mama, ovário ou endométrio; história de colite ulcerativa crônica ou Doença de Crohn; algumas condições hereditárias como a polipose adenomatosa familiar e o câncer colorretal hereditário sem polipose (Inca, 2003).

Howard *et al.* (2008), em um estudo observou que a atividade física de qualquer intensidade está associada com a redução do risco de câncer colorretal e em contraste, o comportamento sedentário (tempo gasto assistindo televisão / vídeos) foi positivamente associado com câncer de cólon.

Os mecanismos pelos quais a atividade física reduz o risco de câncer não estão completamente elucidados, Gingras & Béliveau (2011) propuseram que o aumento na motilidade do cólon pode ser responsável pelo efeito preventivo da atividade física sobre o risco de câncer de cólon. Além disso, reduções nos níveis de insulina, inflamação sistêmica e da adiposidade abdominal também estão relacionados com os efeitos preventivos da atividade física (Chan & Giovannucci, 2010).

2.2.2. Screening e diagnóstico

Uma redução da incidência e mortalidade do câncer colorretal pode ser alcançada se uma maior proporção de adultos recebeu rastreio regular. O objetivo do rastreio do câncer é diminuir a mortalidade através de uma redução na incidência de doença avançada. Para este fim, uma moderna triagem do câncer colorretal pode alcançar este objetivo através da detecção de adenocarcinomas em estágio inicial e a detecção e remoção de pólipos adenomatosos, este último geralmente aceito como precursor não obrigatório da lesão (Levin *et al.*,2008).

O câncer colorretal é freqüentemente encontrado depois que os sintomas aparecem, mas a maioria dos casos é assintomática. Por isso que é importante a realização dos testes de rastreio recomendados antes que os sintomas se desenvolvem. Se o médico encontra algo suspeito durante um exame de triagem ou se o paciente apresentar possíveis sintomas de câncer colorretal o médico irá recomendar exames e testes para descobrir a causa (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

O rastreamento para câncer do intestino é realizado de acordo com a estimativa de risco para a neoplasia de cada população. O protocolo de rastreamento para o câncer do intestino mais utilizado para população de risco baixo e moderado é a realização anual da pesquisa de sangue oculto nas fezes (PSOF), seguida pela colonoscopia ou retossigmoidoscopia nos indivíduos com resultado positivo. As evidências científicas até o momento apontam para o início do rastreamento para o câncer do intestino com pesquisa de sangue oculto nas fezes a partir dos 50 anos de idade (Brasil, 2003).

A PSOF, devido ao caráter intermitente das microhemorragias, deverá ser efetuada num total de seis amostras: duas amostras efetuadas em três evacuações consecutivas ou de três dias seguidos. Considera-se que o teste é positivo desde que pelo menos uma das seis amostras seja positiva. A presença de um teste positivo implica preferencialmente a realização de colonoscopia total (Melo & Braga, 2003).

A sensibilidade do teste varia entre os 30% - 80% para câncer colorretal e os 0% - 40% para adenomas, podendo falhar na detecção de adenomas de risco e

mesmo para câncer colorretal numa porcentagem que pode ir até 70%. A especificidade para pólipos e para câncer colorretal varia entre os 95%-98% (Melo & Braga, 2003).

Nos tumores do reto, a ocorrência de falsos negativos é mais alta por ser menor o sangramento e de ser mais curto o tempo de permanência das fezes nesta localização (Brasil, 2003). Uma alternativa de rastreamento é combinar a pesquisa anual de sangue oculto nas fezes com a retossigmoidoscopia a cada cinco anos, como defendem Segnan *et al.* (2005) em estudo multicêntrico, realizado na Itália, entre 1999 e 2001.

As vantagens da retossigmoidoscopia em relação à pesquisa de sangue oculto nas fezes são: a visualização direta da mucosa colorretal; detecção de lesões e possibilidade de biopsia durante o exame (LAU & SUNG, 2004).

Na sigmoidoscopia, o reto e cólon sigmóide são examinados utilizando um sigmoidoscópio de um tubo flexível iluminado com uma lente de visualização e uma ferramenta para a remoção de tecido. Estudos têm mostrado que as pessoas que têm o rastreio regular com sigmoidoscopia após os 50 anos têm um risco de 60 a 70 % menor de morte por câncer de cólon e reto do que as pessoas que não têm triagem . Um ensaio clínico controlado randomizado constatou que mesmo apenas um rastreio com sigmoidoscopia entre 55 e 64 anos de idade pode reduzir substancialmente a incidência e mortalidade do câncer colorretal (NCI, 2014).

A colonoscopia é recomendada para todos aqueles com um PSOF positivo (Winawer *et al.*,2003) . É um método adequado na investigação das doenças colorretais, com destaque para os pólipos e neoplasias sendo considerada diagnóstica e terapêutica. Permite a identificação precoce de lesões em pessoas de grupos de risco, investiga os sinais e sintomas (dor abdominal, sangramento digestivo, alteração do hábito intestinal, diarreia crônica, anemia, massas abdominais), visualiza a mucosa do íleo terminal, cólons, reto e faz a análise macroscópica das lesões encontradas (Batista *et al.*, 2001).

No entanto, a colonoscopia tem limitações. O procedimento perde aproximadamente 20% de todos os adenomas e 10% de grandes dimensões ou adenomas avançados. A colonoscopia também tem um maior risco de complicações em comparação com outros testes de triagem, incluindo lágrimas

intestinais e hemorragias especialmente quando um pólipó é removido (Alteri *et al.*, 2014).

O rastreamento do câncer colorretal, portanto, presta-se tanto à prevenção primária, ao se detectar e remover lesões precursoras (pólipos adenomatosos), como à prevenção secundária, ao se detectar as lesões malignas. Devido a estas características, a análise da incidência como desfecho torna-se atrativa (INCA, 2002).

2.2.3 Estadiamento

O estadiamento é definido como um sistema de classificação de neoplasias, cujo objetivo é estabelecer um modo de determinação da extensão anatômica da mesma. Depois do diagnóstico, o estadiamento é considerado o passo mais importante, pois permite a avaliação do prognóstico do paciente e definição do tratamento a ser empregado.

As características anatomopatológicas do tumor são importantes para o estadiamento e a definição da terapêutica a ser empregada. O nível de infiltração da parede do órgão, assim como invasão de veias, acometimento de nervos e metástases linfonodais ou em órgãos à distância, está intimamente relacionado com pior prognóstico da doença. O estadiamento convencional é feito pelas classificações de Dukes e Astler-Coller e TNM, sendo a última cada vez mais utilizada (Fonseca *et al.*, 2011).

Tabela 2. Sistema de classificação de tumores malignos (TNM) para o estadiamento do câncer colorretal.

TNM		
Tumor Primário (T)	Linfonodos Regionais (N)	Metástases à distância (M)
(TX) Tumor primário inacessível.	(NX) Linfonodos regionais inacessíveis	(MX) Presença de metástases a distância não pode ser observada
(TO) Sem evidência do tumor primário	(NO) Sem evidências de linfonodos regionais	(MO) Sem metástases à distância
(Tis) Carcinoma <i>in situ</i> intraepitelial ou invasão da lâmina própria	(N1) Metástases em um até três linfonodos pericólicos ou perirretais	(M1) Metástases à distância
(T1) Tumor invadindo submucosa	(N2) Metástases em quatro ou mais linfonodos pericólicos ou perirretais	
(T2) Tumor invadindo a muscular própria	(N3) Metástase em qualquer linfonodo ao longo da cadeia vascular principal e/ou metástase no linfonodo apical desta cadeia	
(T3) Tumor invadindo através da muscular própria até subserosa ou nos tecidos pericólicos não peritonizados ou perirretais		
(T4) Tumor invadindo diretamente outros órgãos ou estruturas e/ou perfurando vísceras peritoneais		

Fonte: Cordeiro *et al.* (2001).

Conforme mostra a tabela 2, o sistema TNM para descrever a extensão anatômica e fazer o estadiamento clínico da doença baseia-se na avaliação de três componentes: (T) a extensão do tumor primário, (N) a ausência ou a presença e extensão de metástase em linfonodos regionais, (M) a ausência ou presença de metástases a outros órgãos (Sobin *et al.*,2010).

Tabela 3: Estadiamento Clínico do câncer de cólon.

AJCC/UICC ESTÁGIO	TUMOR PRIMÁRIO	LINFONODOS REGIONAIS	METÁSTASES À DISTÂNCIA	DUKES	ASTLER COLLER
Estádio 0	Tis	N0	M0		
Estádio I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
Estádio II	T3	N0	M0	B	B2
	T4	N0	M0	B	B3
Estádio III	Qualquer T	N1	M0	C	C1
	Qualquer T	N2	M0	C	C2
	Qualquer T	N3	M0	C	C3
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1	C	D

Fonte: Cordeiro *et al.* (2001).

Os números ou letras após T, N e M fornecem detalhes sobre cada uma dessas categorias, números mais altos significam o estado avançado do câncer. Usualmente, após a cirurgia a determinação das categorias T, N, e M é combinada num processo denominado agrupamento fase e uma fase global de 0, I, II, III, ou IV é atribuída(tabela 3). Alguns estágios são subdivididos com letras (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

O câncer de cólon está dividido diversos estágios e/ou fases, que são classificados de acordo com o sistema TNM, conforme mostra a tabela 4.

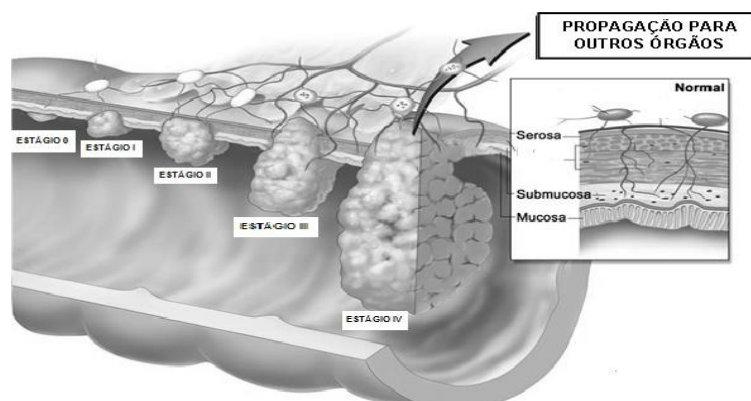


Figura 3. Progressão da doença (estágios 0-4) (NCI, 2006).

Tabela 4: Estágios do câncer de cólon.

Fases	Agrupamento do estágio	Descrição
0	Tis, N0, M0	O câncer está em seu estágio inicial. Esta fase também é conhecida como carcinoma in situ ou carcinoma intramucoso (TIS). Não cresce além da camada interna (mucosa) do cólon ou do reto.
I	T1 ou T2, N0, M0	O tumor cresce através da mucosa muscular na submucosa (T1), e também pode ter crescer para a camada muscular própria (T2). Ele não se espalhou para os linfonodos próximos (N0) e nem para os locais distantes (M0).
IIA	T3, N0, M0	O câncer cresceu nas camadas mais externas do cólon ou do reto, mas não passou por eles (T3) e não atingiu órgãos próximos. Ainda não se espalhou para os gânglios linfáticos próximos (N0) ou para locais distantes (M0).
IIB	T4a, N0, M0	O câncer cresce através da parede do cólon ou do reto, mas não em outros tecidos ou órgãos adjacentes (T4A). Ainda não se espalhou para os gânglios linfáticos próximos (N0) ou para locais distantes (M0).
IIC	T4b, N0, M0	O câncer cresce através da parede do cólon ou do reto e está ligado ou tem crescido em outros tecidos ou órgãos adjacentes (T4B). Ainda não se espalhou para os gânglios linfáticos próximos (N0) ou para locais distantes (M0).
IIIA	T1 ou T2, N1, M0	O tumor cresce através da mucosa para a submucosa (T1), e também pode ter crescer para a camada muscular própria (T2). Se espalha para 1 a 3 nódulos linfáticos próximos (N1A / N1B) ou em áreas de gordura perto dos gânglios linfáticos, mas não para os próprios nodos (N1c). E não se espalhou para locais distantes (M0).
	T1, N2a, M0	O câncer cresce através da mucosa para a submucosa (T1). Se espalha para 4 a 6 gânglios linfáticos próximos (N2a) e não se espalha para locais distantes (M0).
IIIB	T3 ou T4a, N1, M0	O câncer cresce nas camadas mais externas do cólon ou do reto (T3) ou através do peritônio visceral (T4a), mas não atinge órgãos próximos. Se espalha para 1 a 3 gânglios linfáticos próximos (N1A ou N1B) ou em áreas de gordura perto dos gânglios linfáticos, mas não os próprios nodos (N1c). Não se espalha para locais distantes (M0).
		OU

	T2 ou T3, N2a, M0	O câncer cresce na camada muscular própria (T2) ou para as camadas mais externas do cólon ou do reto (T3). Ele se espalha para 4 a 6 gânglios linfáticos próximos (N2a) e não se espalha para locais distantes (M0).
	OU	
	T1 ou T2 N2b, M0	O tumor cresce através da mucosa para a submucosa (T1), e também pode ter crescer para a camada muscular própria (T2). Ele se espalha para 7 ou mais gânglios linfáticos próximos (N2b). E não se espalha para locais distantes (M0).
IIIC	T4a, N2a, M0	O câncer cresce através da parede do cólon ou do reto (incluindo peritônio visceral), mas não atinge os órgãos vizinhos (T4A). Se espalha para 4 a 6 gânglios linfáticos próximos (N2a) e não se espalha para locais distantes (M0).
	OU	
	T3 ou T4a, N2b, M0	O câncer cresce nas camadas mais externas do cólon ou do reto (T3) ou através do peritônio visceral (T4a), mas não atinge órgãos próximos. Se espalha para 7 ou mais gânglios linfáticos próximos (N2b) e não se espalha para locais distantes (M0).
	OU	
	T4b, N1 ou N2, M0	O câncer cresce através da parede do cólon ou do reto e está ligado ou cresce em outros tecidos ou órgãos adjacentes (T4B). Espalha-se em pelo menos um gânglio linfático próximo ou em áreas de gordura próximos dos gânglios linfáticos (N1 ou N2). E não se espalhou para locais distantes (M0).
IVA	Qualquer T, qualquer N, M1a	O câncer pode ou não ter crescido através da parede do cólon ou do reto (Qualquer T). Ele pode ou não ter se espalhado para os gânglios linfáticos próximos. (Qualquer N). Espalha-se para um órgão distante (tal como o fígado ou pulmões) ou para gânglios linfáticos distantes (M1a).
IVB	Qualquer T, qualquer N, M1b	O câncer pode ou não ter crescido através da parede do cólon ou do reto. Ele pode ou não ter se espalhado para os gânglios linfáticos próximos. Espalha-se em mais de um órgão distante (tais como o fígado ou pulmão) ou em gânglios linfáticos distante, ou se espalha para partes distantes do peritônio (o revestimento da cavidade abdominal) (M1b).

Fonte: AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016.

A mensuração do antígeno carcinoembrionário (CEA) tem grande importância, porém apenas prognóstica. A investigação de eventuais metástases intra-abdominais e pélvicas deve ser feita por meio de exame ultrassonográfico e/ou por tomografia computadorizada (TC). Já a investigação de metástases pulmonares deve ser efetuada por meio de exame radiológico simples de tórax. Como a extensão da ressecção colônica está associada à outras eventuais lesões, o exame colonoscópico também faz parte da pesquisa de eventuais lesões sincrônicas (Cordeiro *et al.*,2001).

2.2.4. Bases de tratamento

O câncer do intestino é uma doença tratável e frequentemente curável, sendo a cirurgia o seu tratamento primário. O tratamento depende principalmente do tamanho, localização e extensão do tumor e da saúde geral do paciente (Brasil, 2003).

O tipo de cirurgia a ser usada depende da extensão do tumor e dos objetivos que se pretende alcançar.

Pode-se ter os seguintes tipos de cirurgia: I) Excisão local ou ressecção local: é usado principalmente para remover pólipos ou tumores em fase inicial que estão na superfície da mucosa do cólon ou do reto (chamados de tumores superficiais) ;II) Ressecção intestinal: é o tipo mais comum de cirurgia para o câncer colorretal, remove parte do intestino e gânglios linfáticos próximos. Dependendo da localização do tumor, pode ser do tipo hemicolectomia, colectomia ou proctocolectomia; III) Colostomia ou ileostomia: pode ser feita após uma ressecção intestinal e também para ultrapassar ou evitar um bloqueio na obstrução do intestino. A colostomia cria um estoma a partir do cólon para o lado de fora do corpo através da parede abdominal. A Ileostomia cria um estoma do íleo para o exterior do corpo através da parede abdominal. A colostomia ou ileostomia podem ser temporária ou permanente; IV) Exenteração pélvica: pode ser feito para tratar estágio IV ou câncer retal recorrente que se espalhou para órgãos próximos (Canadian Cancer Society, 2016).

Um tratamento cirúrgico é considerado curativo quando promove a remoção completa do tumor primário, órgãos e estruturas localmente comprometidas e de metástases identificadas, observados os preceitos técnicos oncológicos. É considerado paliativo quando tem por finalidade aliviar ou reduzir os sintomas em pacientes que não tenham condições de cura por ressecção (metástases irressecáveis à distância ou localmente disseminadas e invasão de estruturas vitais) (Brasil, 2003).

A quimioterapia é um tratamento comum para o câncer colorretal. Ela é frequentemente usada após a cirurgia para câncer de cólon no estágio II e III. Pode ser usada como o principal tratamento para o estágio IV ou na recidiva no cólon ou reto que não pode ser removido por cirurgia (Canadian Cancer Society, 2016).

O emprego da radioterapia ainda não é rotineiro para o câncer de cólon, ele envolve o uso de raios-X de alta energia para destruir as células cancerosas. A radioterapia tem ação local, atingindo as células cancerosas localizadas apenas nas regiões que estão sendo tratadas. Tanto a radioterapia como a quimioterapia podem ser usadas antes da operação (terapia neoadjuvante) para redução da massa tumoral e assim facilitar a retirada cirúrgica do tumor, ou após a cirurgia (terapia adjuvante) para destruir células cancerosas que tenham permanecido na área tratada. A radioterapia também é utilizada para o alívio de sintomas (Brasil, 2003).

2.2.5. Modelos de estudo de câncer cólon

Existem diversos modelos para estudos da ação de diferentes substâncias sobre as células cancerígenas, incluindo modelos animais e celulares. Dentre eles, destaca-se a utilização de cultura de células por apresentar vantagem do controle de condições ambientais, a análise independente de parâmetros, elevado número de testes em um reduzido intervalo de tempo, redução dos ensaios com animais e técnica menos dispendiosa que a experimentação animal (Coimbra, 2008).

Com relação ao câncer de cólon, diversos trabalhos utilizam como modelo a linhagem HT-29 (Jaganathan *et al.*,2013). Esta linhagem foi originalmente isolada por Fogh e Trempe a partir de um carcinoma de cólon humano, onde foram mantidas as características do tecido normal e dos receptores hormonais (Forgue-Lafitte *et al.*,1989).

A célula HT-29 oferece um sistema experimental favorável para o estudo dos fatores envolvidos na diferenciação de células epiteliais. Quando estas células crescem debaixo de uma condição padrão, formam uma multicamada de célula não polarizada que exibem um fenótipo indiferenciado. A morfologia das células HT29 pode ser modulada de modo a expressar diferentes vias de diferenciação do enterócito, seguida do crescimento em condições de cultura adequadas ou tratamento com vários indutores (Cohen *et al.*,1990).

O processo de diferenciação em células HT-29 é aparentemente semelhante ao observado durante desenvolvimento embrionário do intestino. Portanto, células HT-29 representam um sistema modelo útil para estudar diferenciação epitelial *in vitro* (Bivic *et al.*,1988).

Em nosso estudo foi escolhida a linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano HT-29 para o estudo da captação intestinal dos ácidos 3,4-dihidroxifenilacético (3,4-DHPAA), *p*-cumárico (*p*-CoA), vanílico (VA) e ferúlico (FA) e o efeito dos mesmos sobre células de câncer de cólon humano, no intuito de avaliar a implicação desses compostos fenólicos na prevenção do desenvolvimento do câncer colorretal.

A origem da linhagem HT-29 e a escassez de trabalhos em relação a mesma e ao 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA foram determinantes na escolha desta linhagem para o estudo.

2.3. Câncer de cólon e fatores dietéticos

Muitos componentes da alimentação têm sido associados com o processo de desenvolvimento do câncer. A relação entre o consumo de certos alimentos e o risco de desenvolver câncer possui evidência científica apesar da complexidade dos fatores que estão associados à ingestão dos alimentos, conservação, o preparo, o tipo e quantidade de alimento consumido. De todos os casos de câncer, cerca de 80% a 90% estão associados a fatores ambientais. O desenvolvimento de várias formas mais comuns de câncer resulta de uma interação entre fatores endógenos e ambientais, sendo a dieta o mais notável desses fatores. É possível identificar, por meio de estudos epidemiológicos, associações relevantes entre alguns padrões alimentares observados em diferentes regiões do mundo e a prevalência de câncer (Haas *et al.*, 2006).

Estudos relatam que o alto consumo de carne vermelha pode aumentar o risco de desenvolvimento do câncer colorretal. Várias teorias vêm sendo propostas para explicar essa associação, como a presença de ácidos graxos específicos e substâncias formadas durante o preparo das carnes em altas temperaturas. Outros estudos têm proposto que seria devido às altas concentrações de ferro na carne vermelha, por este mineral estar envolvido na síntese de radicais hidroxilas que podem causar danos às células do intestino (Hendges *et al.*, 2013).

Ao contrário, o alto consumo de frutas, verduras e fibras pode ter um papel protetor no desenvolvimento do câncer de intestino. Isso devido ao seu alto teor de nutrientes e outras substâncias que podem inibir a formação de carcinógenos (Spence & Johnston, 2003). Segundo Anjo (2004), o consumo desses alimentos pode ainda reter substâncias tóxicas ingeridas ou produzidas no trato gastrointestinal durante processos digestivos, reduzir o tempo do trânsito intestinal promovendo uma rápida eliminação do bolo fecal com redução do tempo de contato

do tecido intestinal com substâncias mutagênicas e carcinogênicas e formação de substâncias protetoras pela fermentação bacteriana dos compostos da alimentação.

Há evidências também de uma possível atuação do cálcio e da vitamina D como anticarcinógenos no cólon e reto (Holt, 2008).

Uma das hipóteses do cálcio para redução do risco do câncer colorretal é a capacidade do cálcio em se ligar aos sais biliares e aos ácidos graxos ionizados, reduzindo o efeito desses compostos de proliferação celular da mucosa colônica. Outra hipótese descrita consiste na atuação do cálcio promovendo a diferenciação de células colônicas através da conexão de receptores sensíveis ao cálcio, resultando em várias ações biológicas tais como a ativação da proteína C quinase. Acredita-se que a vitamina D, que exerce uma ação de regulação de proliferação celular, em sua forma mais ativa, 1,25-dihidroxitamina D, foi apontada como regulador da proliferação e diferenciação de células cancerígenas de humanos (Cabral & Gruezo, 2010).

2.4. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são formados a partir do metabolismo secundário das plantas, proporcionando funções essenciais na reprodução e crescimento das plantas, na qualidade de mecanismos de defesa contra agentes patogênicos, parasitas e predadores (Liu, 2004).

A síntese dos compostos fenólicos ocorre através de duas vias diferentes: a via do chiquimato e do acetato. A via do chiquimato é por onde ocorre a síntese da maior parte dos compostos fenólicos de plantas, ao passo que a via de malonato possui menor significância nas plantas, embora seja uma fonte importante de compostos fenólicos em fungos e bactérias (Taiz & Zeiger, 2002).

Além dos seus papéis nas plantas, em nossa dieta os compostos fenólicos possuem efeitos protetores contra algumas doenças crônicas não transmissíveis tais como catarata, degeneração macular, doenças neurodegenerativas, diabetes mellitus, câncer e doenças cardiovasculares (Scalbert *et al.*, 2005).

Os compostos fenólicos são importantes para a qualidade de alimentos de origem vegetal, sendo responsáveis pela coloração dos alimentos, envolvidos com o sabor e substratos para a reação de escurecimento enzimático (Cheynier, 2012).

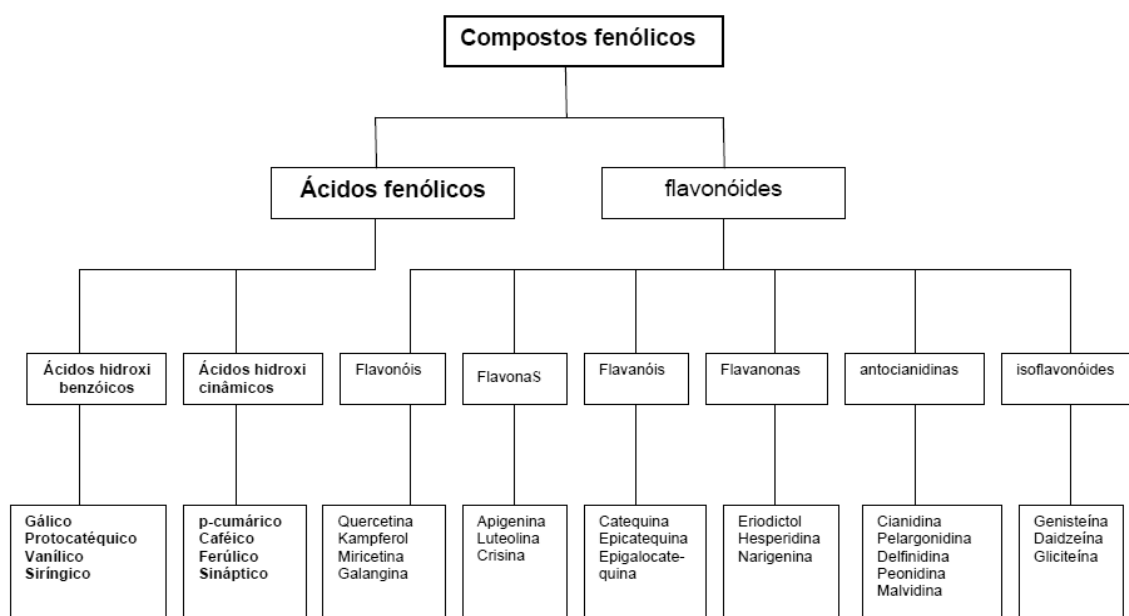


Figura 4. Exemplo de compostos fitoquímicos presentes em alimentos vegetais com a classificação dos compostos polifenólicos. Extraído de Karakaya, 2004.

2.4.1. Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos são um conjunto de substâncias que formam um subgrupo dos compostos fenólicos e estão subdivididos em dois subgrupos, os derivados dos ácidos hidroxibenzóico e ácidos hidroxicinâmico. São derivados do ácido hidroxibenzóico os ácidos *p*-hidroxibenzóico, gálico, protocatecuico, VA e siríngico. Os derivados do ácido hidroxicinâmico incluem os ácidos *p*-CoA, cafeico, FA e sináptico que, de maneira geral, estão presente na forma ligada a componentes estruturais da parede celular tais como celulose, lignina e proteínas (Liu, 2004).

Estudos epidemiológicos, clínicos e *in vitro* mostram múltiplos efeitos biológicos relacionados a estes compostos tais como: atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica (Abe *et al.*, 2007).

As principais estruturas dos derivados dos ácidos benzóicos e dos ácidos hidroxicinâmicos podem ser observadas na figura 5.

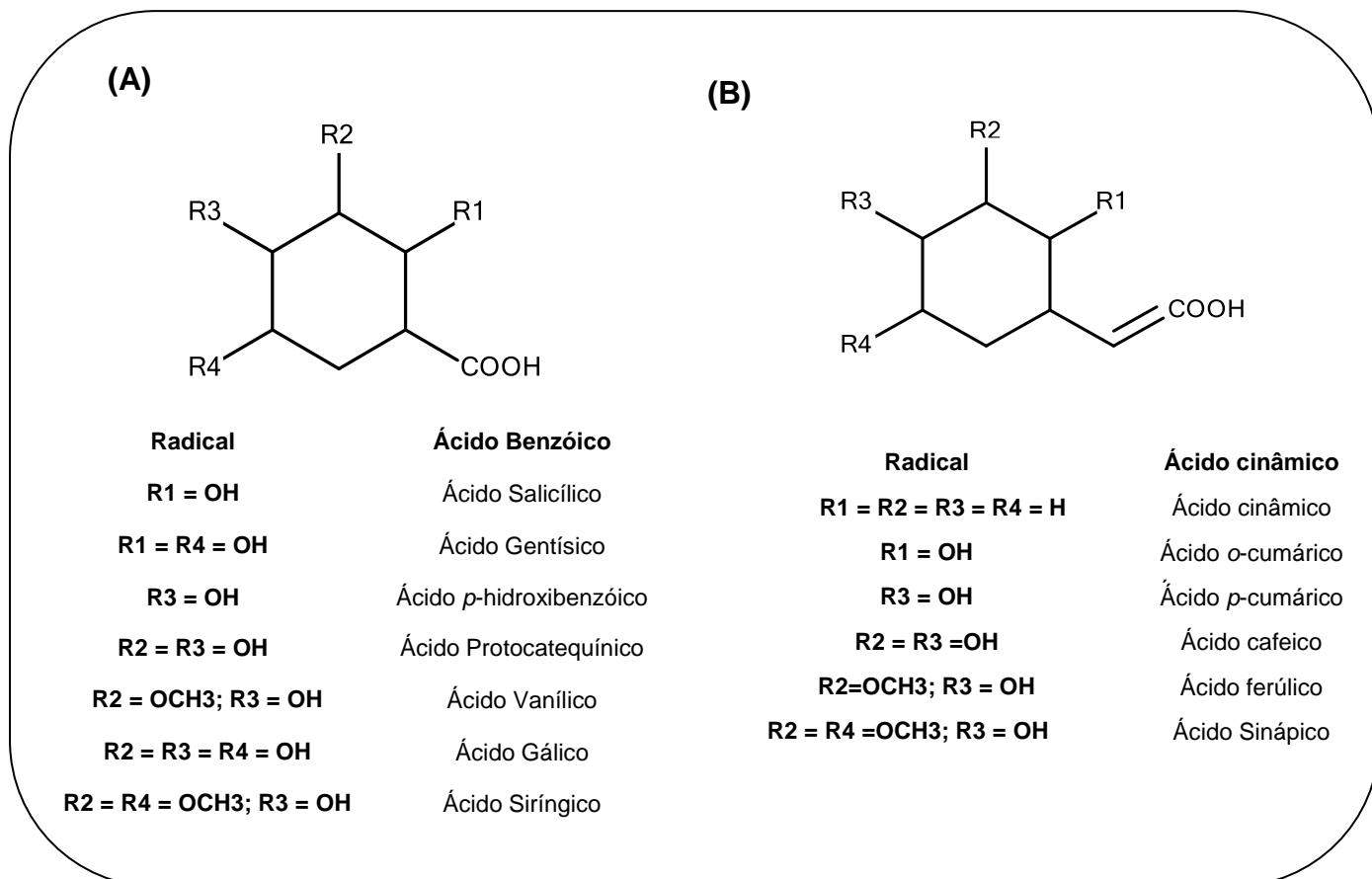


Figura 5. Estrutura química dos derivados do ácido benzóico (A) e do ácido hidroxicinâmico(B) (Adaptado Rosa *et al.*,2016).

Os ácidos hidroxicinâmicos estão presentes em uma grande variedade de alimentos e bebidas de origem vegetal como legumes, cacau, frutas, óleos, ervas, especiarias, nozes, vegetais, cereais, cerveja e vinho. Alguns alimentos são particularmente ricos em ácidos hidroxicinâmicos (tabela 5) como o café e azeitonas verdes (Russell & Duthie, 2011).

Os ácidos hidroxibenzóico geralmente são encontrados em concentrações mais baixas em alimentos quando comparado com os ácidos hidroxicinâmicos. Suas fontes alimentares incluem bebidas (suco de fruta, chá, cerveja, vinhos), frutas vermelhas, ervas e especiarias. Já foi reportado na literatura que 100 g de

manjeriço pode conter até 14 mg de VA, enquanto as nozes são ricas em ácido siríngico (57,45 mg / 100 g) e 100 g de chá pode conter até 10,35 mg de ácido gálico (Russell & Duthie , 2011).

Tabela 5: Fontes alimentares com teores elevados de ácidos hidroxicinâmicos

Alimento	Ácido p-cumárico (mg/Kg)	Ácido ferúlico (mg/Kg)	Ácido cafeico (mg/Kg)	Ácido sinápico (mg/Kg)
Maçã	10	≤5	30-200	NR
Alcachofra	NR	NR	830	NR
Cevada	70-230	320-530	5-20	NR
Blueberry	≤5	30-50	330-790	NR
Arroz integral	20	160	≤5	≤5
Cenoura	≤5	5-40	20-270	NR
Café	10	140	830	NR
Berinjela	NR	10	260-750	NR
Toranja	≤5	30	10	≤5
Alface	NR	NR	800-1600	NR
Grão de aveia	40-60	140-150	20	≤5
Suco de laranja	≤5	30	≤5	10
Pêssego	≤5	≤5	40-200	NR
Ameixa	20	10	50-440	NR
Batata	5-40	5	20-450	NR
Centeio	30-60	780-1110	110-970	60-120
Couve	10-60	≤5	5-40	10-20
Espinafre	100-130	10	10	20-30
Polpa de beterraba	NR	1000-4000	NR	NR
Cereja	100-650	≤5	110-970	NR

* NR: Não reportado

Fonte: (Riihinem, 2005).

2.4.1.1. Ácido 3,4-dihidroxifenilacético

O 3,4-DHPAA é um metabolito de polifenol derivado da flora microbiana do cólon, encontrado em alta concentração no plasma, excretada na urina e fezes após o consumo de café ou uma dieta onívora, incluindo frutas e vegetais (Larrosa *et al.*, 2009). Exerce efeitos biológicos no organismo tais como atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória. Dentre os metabólitos dos flavonóides, é o composto que possui maior atividade de eliminação de radicais livres e diminui a peroxidação lipídica (Carrasco-Pozo *et al.*, 2015).

Possui estrutura análoga ao do ácido cafeico, porém, não tem uma dupla ligação na cadeia alifática e também exerce atividade antioxidante em lipídios. A absorção diária de 3,4-DHPAA com a alimentação é 7,27 mg (Raneva *et al.*, 2001).

Raneva *et al.* (2001) mostraram em seu estudo que o 3,4-DHPAA e o ácido cafeico em concentrações micromolares foram inibitórias para a peroxidação lipídica em plasma de rato. Este resultado é relevante porque o 3,4-DHPAA e o ácido cafeico estão presentes em plasma humano em concentrações nanomolares.

Outros autores têm analisado o impacto de metabólitos intestinais de polifenóis, como o 3,4-DHPAA (metabólito da quercetina e dos ácidos clorogênicos) e ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) propiônico (metabólito do ácido cafeico) na modulação de enzimas envolvidas na desintoxicação e inflamação de células de adenoma de cólon. Esses compostos mostraram uma regulação positiva de GSTT2 e COX-2, que poderia possivelmente contribuir para o potencial quimiopreventivo de polifenóis após a metabolização intestinal (Miene, 2011).

2.4.1.2.Ácido *p*-cumárico

O *p*-CoA é um isômero abundante do ácido cinâmico e amplamente encontrado em plantas comestíveis como amendoim, tomate e cenoura (Jaganathan *et al.*, 2013).

Recentemente foi demonstrado que o *p*-CoA diminui a peroxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL), apresentando atividades antimutagênica, antigenotóxica e antimicrobianas. O trabalho mostrou ainda inibição da melanogênese celular e papel importante na regulação imune em seres humanos pela ação do ácido *p*-CoA. Além disso, é amplamente utilizado nas indústrias químicas, de alimentos, cosméticos e farmacêuticas (Kiliç & Yesiloglu, 2013).

Torres & Rosazza (2001) relataram que o *p*-CoA e outros ácidos hidroxicinâmicos atuam como agentes quimioprotetores por diminuir a ação de agentes de nitrosação em vários compartimentos biológicos, incluindo saliva e fluidos gástricos.

Hudson *et al.* (2000), observaram que o *p*-CoA reduziu a viabilidade celular das células cancerígenas do cólon (HT29) e das células epiteliais do cólon humano (HCEC).

Em outro estudo, células HT-29 que foram tratadas com *p*-CoA teve redução no crescimento celular e a eliminação de radicais livres induzida (Ferguson *et al.*,2005).

Em células Caco-2, o *p*-CoA inibiu a proliferação celular e alterou as fases do ciclo celular, mas, não o aumentou a fase S o que implica em outras fases do ciclo celular (Janicke *et al.*,2005) .

Bouzaiene *et al.* (2015), mostrou que o ácido cafeico, *p*-CoA e FA são potentes inibidores de ânion superóxido e metástases e reduzem a proliferação, adesão e migração de células do pulmão (A549) e cólon (HT29-D4) .Entretanto, é necessário explorar o mecanismo e a via de sinalização molecular desses achados , a fim de que se possa compreender os efeitos farmacológicos desses ácidos.

Em outro estudo, também foi estudado o efeito do *p*-CoA em células epiteliais do cólon (Caco-2) e foi observado que uma concentração de 1500 µmol/L inibiu em 43% a 75% a proliferação de células Caco-2 após 24 a 72 h de tratamento (Janicke

et al., 2005). Entretanto, a literatura disponível não descreve o mecanismo pelo qual o *p*-CoA induz a apoptose em células cancerígenas do cólon.

2.4.1.3.Ácido ferúlico

O FA é um potente antioxidante fenólico encontrado em altas concentrações em plantas e principalmente no farelo de arroz e de milho. Possui um alto potencial fotoprotetor, age como uma barreira de membrana celular impedindo a atividade de radicais livres e minimizando os efeitos dos dímeros de timina que são agentes carcinogênicos resultantes da exposição da pele à radiação UV (Kawabata *et al.*, 2000).

Juntamente com os seus ésteres, possui propriedades antioxidantes que são potencialmente úteis não só para impedir a oxidação de lipídica no alimento, mas também, para prevenção de doenças induzidas por radicais livres tais como o câncer e aterosclerose ou envelhecimento causado por danos oxidativos. Suas propriedades antioxidantes contam com a eliminação de radicais e como consequência, é o ácido mais eficaz entre os ácidos hidroxicinâmico devido à estabilização da ressonância do radical fenoxi por uma conjugação da cadeia lateral estendida (Anselmi *et al.*, 2005).

Jayaprakasam *et al.* (2006) sintetizaram uma série de ésteres de FA e cafeico e testou em células com proliferação tumoral, nas enzimas COX-1 e COX-2 e na atividade de inibição da peroxidação lipídica *in vitro*. No ensaio de proliferação de células tumorais, alguns destes ésteres mostraram excelente inibição no crescimento de células de câncer de cólon. Entre os ésteres de compostos fenólicos utilizados no ensaio, estão os compostos (C12-cafeato), (C16- cafeato), (C8-FA), (C12-FA) que mostraram uma forte inibição com valores de IC₅₀ de 7,6 a 18,7 µg/mL em células de linhagem de câncer de mama; de 4,4 a 17,1 µg/mL em células de linhagem de câncer de pulmão; de 2,5 a 5,8 µg/mL em células de linhagem de câncer de cólon; de 8,1 a 14,6 µg/mL em células de linhagem de câncer do sistema nervoso central; e de 5,4 a 11,0 µg/mL em células de linhagem de câncer gástrico. Além disso, foi observado que os ésteres do ácido cafeico e FA inibiram significativamente as enzimas COX-1 e COX-2.

2.4.1.4.Ácido vanílico

O VA é a forma oxidada da vanilina e é encontrado em altas concentrações nos grãos de baunilha e nas raízes de *Angélica sinensis*, uma planta usada na medicina tradicional chinesa. Tem sido associado com diversas atividades farmacológicas, tais como inibição da carcinogênese, inflamação e apoptose. É licenciado como um aditivo alimentar e também um dos principais metabolitos encontrados em humanos após o consumo de chá verde (Gitzinger *et al.*, 2012).

É um produto valioso para aplicações biotecnológicas, uma vez que é utilizado como o ponto de partida na síntese química de vanilina um dos compostos aromatizantes mais importantes do mundo (Priefert *et al.*, 2001). Pozo-Insfran *et al.* (2006) estudaram os efeitos antiproliferativos e apoptóticos de uma mistura de compostos fenólicos extraídos da *Euterpe oleracea Mart* (açai). Células da linhagem de leucemia promielocítica aguda (HL-60) tratadas com os ácidos *p*-hidroxibenzóico, gálico, FA, VA e *p*-CoA exibiram um efeito dose e tempo-dependente de inibição do crescimento, com aumento da atividade apoptótica que foi precedida por ativação da caspase-3.

Chou *et al.* (2010) realizaram um estudo em que considerou a possibilidade de que a atividade antioxidante da vanilina e do VA na eliminação de EROS poderia estar relacionada com a inibição da melanogênese. Neste estudo, células B16F0 (linhagem de melanoma em camundongos), foram expostas ao VA numa concentração de 20 µg/mL durante 72 horas, onde o objetivo foi avaliar os níveis de expressão das proteínas MC1R, MITF, tirosinase, TRP-2 TRP-1 e determinar se a atividade inibidora do VA estaria relacionada com a melanogênese. Os resultados encontrados demonstraram que as expressões dessas proteínas foram reprimidas pelo VA e, que a morfologia nuclear das células não foram danificadas depois de serem tratadas. Os dados sugeriram que o ácido VA suprimiu a atividade da tirosinase e da dopa-oxidase, bem como reduziu a síntese de melanina, e que os efeitos poderiam estar relacionados com a redução dos níveis de proteína de MC1R, MITF, tirosinase, TRP-2 e de TRP-1.

2.5. Absorção, biodisponibilidade e distribuição dos ácidos fenólicos no organismo

Um amplo conhecimento de biodisponibilidade do ácido fenólico é essencial para compreender as conjugações e bioatividades no organismo. Os ácidos fenólicos é um considerável grupo dentro da família dos polifenóis e há evidências que quando eles são absorvidos sob a forma livre, sua absorção e conjugação (especialmente a glucuronidação) seguem as mesmas vias que a dos flavonóides e outros polifenóis (Cremin *et al.*, 2001).

A biodisponibilidade de polifenóis é crucial para as suas propriedades biológicas, por isso diversos pesquisadores medem as suas concentrações no plasma e na urina após a ingestão de um teor conhecido de compostos puros ou incorporado em alimentos, a fim de estudar a biodisponibilidade destas moléculas (Pérez-Jiménez *et al.*, 2010).

Vários fatores alteram a biodisponibilidade de compostos bioativos presentes nos alimentos: a complexidade da matriz alimentícia, a forma química do composto de interesse, estrutura e quantidade de outros compostos ingeridos concomitantemente (fatores exógenos) e ainda o tempo de trânsito intestinal, esvaziamento gástrico, metabolismo do composto e grau de conjugação, possíveis interações com proteínas na circulação sanguínea e tecidos, composição da microflora intestinal e o perfil genético do indivíduo (fatores endógenos). Avaliados em conjunto, estes fatores respondem pelas variações intra e inter-individuais na biodisponibilidade de uma determinada substância (Oliveira & Bastos, 2011).

Ensaio em animais com infusão gástrica *in situ* de ácido 5 cafeoilquínico(5-CQA) e outros ácidos hidroxicinâmicos isolados (FA, *p*-CoA e cafeico) indicam que a absorção inicia no estômago, onde uma pequena parcela é absorvida intacta (Konish *et al.*,2006; Lafay *et al.*,2006). Os compostos não absorvidos no estômago seguem para o intestino delgado, onde os ácidos hidroxicinâmicos livres provenientes dos alimentos são rapidamente absorvidos (Olthof *et al.*,2001; Adam *et al.*,2002).

O metabolismo de vários polifenóis é pouco elucidado. Geralmente as formas agliconas podem ser absorvidas a partir do intestino delgado, no entanto a maioria dos polifenóis está presentes em alimentos em forma de ésteres, glicosídeos ou

polímeros que não podem ser absorvidos na sua forma nativa. Antes da absorção, estes compostos devem ser hidrolisados por enzimas intestinais ou pela microflora do cólon. Durante o curso da absorção os polifenóis sofrem longas modificações, eles são conjugados nas células intestinais e depois no fígado por metilação, sulfatação e / ou glucuronidação por enzimas específicas que catalisam estas etapas (figura 6). Como consequência, as formas que atingem o sangue e os tecidos são diferentes daqueles presentes em alimentos e é muito difícil de identificar todos os metabolitos e avaliar a sua atividade biológica (Archivio *et al.*,2007).

As reações de glucuronidação, sulfatação e metilação são descritas por terem um impacto significativo sobre a bioatividade de polifenóis. Estas reações de conjugação reduzem significativamente a atividade antioxidante dos polifenóis, uma vez que a sulfatação e glucuronidação reduz o grupo hidroxila da estrutura fenólica. Este grupo é o principal responsável pelas propriedades antioxidante dos polifenóis (Piazzon *et al.*, 2012).

Os ácidos hidroxicinâmicos quando ingerido na forma livre são rapidamente absorvidos pelo intestino delgado e são conjugados da mesma forma que os flavonóides. No entanto, estes compostos são naturalmente esterificados em produtos vegetais e este prejudica sua absorção pelo fato da mucosa intestinal, fígado e plasma não possuírem esterases capazes de hidrolisar estes ácidos e a hidrólise pode ser realizada apenas pela microflora do cólon (Archivio *et al.*,2007). Quando estas moléculas são hidrolisadas pela microflora do cólon, a eficiência de absorção é reduzida, pois a flora pode degradar as agliconas liberando ácidos aromáticos simples (Scalbert & Williamson, 2000). Portanto, a eficiência de absorção de ácidos fenólicos é marcadamente reduzida quando eles estão presentes sob a forma esterificada, ao invés da forma livre (Azuma *et al.*, 2000; Olthof *et al.*.,2001).

O FA é o principal ácido hidroxicinâmico presente nos cereais, no qual é esterificado para arabinosilanos na parede celular de grãos. Kern *et al.* mediram excreção urinária e a concentração plasmática de metabólitos do FA após a ingestão de cereais do café da manhã e a partir dos dados cinéticos, eles concluíram que a absorção de FA dos cereais ocorre principalmente no intestino delgado a partir da fração solúvel presente nos cereais. Apenas uma pequena

quantidade de FA ligado a arabinosilanos foi absorvida após hidrólise no intestino grosso (Manach *et al.*,2005).

Em ratos, a concentração máxima no plasma deste ácido fenólico intacto e de metabólitos foi atingida após 30 min da ingestão e a excreção urinária representou aproximadamente 40% da dose ingerida na forma do composto puro (Rondini *et al.*, 2002).

Em cultura de células intestinais humanas Caco-2, observou-se que o fluxo transepitelial do 5-CQA é significativamente menor que o fluxo do ácido cafeico que por sua vez é menor que o do FA, o que pode ser explicado em parte pela via de transporte dos compostos através das membranas celulares. Os ácidos clorogênicos são absorvidos apenas por transporte paracelular, enquanto os ácidos hidroxicinâmicos livres são absorvidos também por transporte ativo mediado por transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCT). Estes transportadores estão presentes na mucosa gastrointestinal e em diversos tecidos corporais e, portanto, poderiam participar também do transporte dos ácidos fenólicos em tecidos alvo (Oliveira & Bastos, 2011).

Para compreender os mecanismos de ação dos compostos fenólicos em geral, além de identificar e quantificar os metabólitos formados é necessário identificar os tecidos alvos em que se depositam (Crozier *et al.*,2009).

Os polifenóis são capazes de penetrar os tecidos, particularmente àqueles em que eles são metabolizados (intestino e fígado). A determinação da biodisponibilidade de metabólitos dos polifenóis em tecidos pode ser mais importante do que o conhecimento de suas concentrações no plasma. No entanto, os dados ainda são muito escassos não só em seres humanos, mas em animais também uma vez que há poucos estudos reportando sobre concentrações de polifenóis em tecidos humanos (Archivio *et al.*,2007).

Os polifenóis e os seus derivados são excretados principalmente na urina e na bile. Os metabólitos extensivamente conjugados são mais susceptíveis de serem eliminados na bile, enquanto os pequenos conjugados tais como os monossulfatos são preferencialmente excretados na urina. A quantidade total de metabólitos excretados na urina é aproximadamente correlacionada com as concentrações plasmáticas máximas (Manach *et al.*2004).

Muito pouco se sabe sobre a absorção e metabolismo de ácidos hidroxibenzoico devido a sua distribuição limitada em alimentos. No entanto, poucos estudos sobre a biodisponibilidade do ácido gálico em humanos revelaram que este composto é extremamente bem absorvido, comparado com outros polifenóis. As concentrações plasmáticas de formas livres e glucuronizadas de ácido gálico e seu principal metabólito o ácido 4-O-metil gálico foi de 4mol / L após a ingestão de 50 mg de ácido gálico puro. Tal ingestão não é difícil de se obter, pois o vinho tinto geralmente contém 10-60 mg / L de ácido gálico (Manach *et al.*,2005).

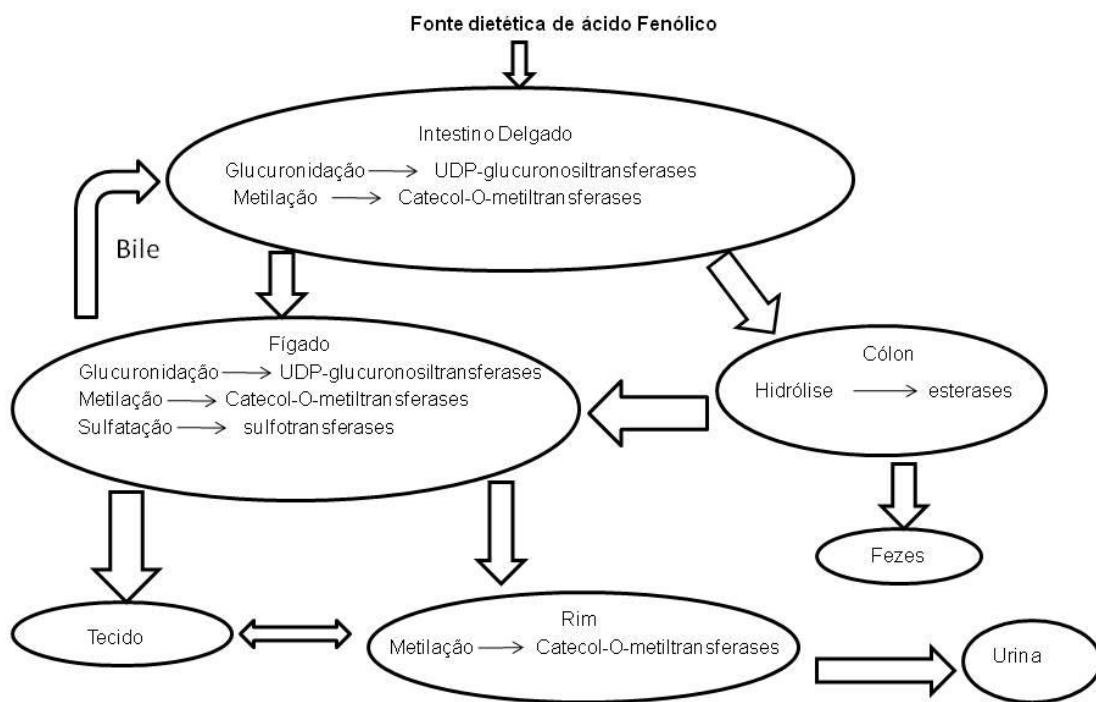


Figura 6. Possíveis caminhos para o metabolismo de ácidos fenólicos (Heleno *et al.*, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Investigar a influência de ácidos fenólicos na proliferação e captação celular em linhagem de células de adenocarcinoma de cólon humano HT-29.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar a atividade antioxidante do 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA em diferentes concentrações;
- Avaliar a cinética de captação, em função do tempo de incubação, dos padrões do 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA, em culturas de células HT-29;
- Avaliar o efeito da incubação isolada do 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA, em função do tempo de incubação e da concentração, sobre a viabilidade celular de linhagem de células HT-29;
- Avaliar os efeitos dos ácidos 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA sobre as modificações no ciclo celular e no processo de morte celular em linhagem de células HT-29.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Os padrões comerciais do 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA, foram adquiridos da Sigma-Aldrich®, bem como, meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), tripsina e tampão hepes .

O soro fetal bovino (SFB) foi adquirido da LaborClin® (Campinas, SP, Brasil) e, os frascos de cultura de células e raspadores de células foram obtidos da Nunc (Roskilde, Dinamarca).

Também foram adquiridos da Sigma-Aldrich® os seguintes reagentes: brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio(MTT), dimetilsulfóxido (DMSO), radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), metanol, 2,2'-azinobis (2-amidinopropano) dihidrocloro (AAPH), Fluoresceína sódica, Trolox, 2,3,5-cloro trifeniltetrazolium (TPTZ), fosfato de sódio monobásico monohidratado, acetato de sódio anidro, cloreto de ferro e sulfato de ferro.

Todos os reagentes e compostos utilizados tinham grau de pureza analítica.

4.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A determinação da atividade antioxidante foi avaliada através de quatro métodos distintos: método DPPH, método ABTS, capacidade ferri-redutora (FRAP) e a capacidade de absorção de radical de oxigênio (ORAC).

4.2.1. Avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams & Berset (1995). O DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) é um radical livre estável que aceita um elétron ou um radical de hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável e desta forma, é reduzido na presença de um antioxidante. Para avaliação da atividade antioxidante, os padrões comerciais dos ácidos foram adicionados para reação com o radical estável DPPH em uma solução de metanol. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 515 nm, a qual desaparece após a redução pelo

hidrogênio arrancado de um composto antioxidante. A redução do radical do DPPH foi medida através da leitura da absorbância a 515 nm em 30 min de reação. A atividade antioxidante foi expressa de acordo com a Equação de Mensor e colaboradores (2001), descrita abaixo:

$$\%AA = 100 - \left\{ \frac{(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times 100}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right\}$$

4.2.2. Análise determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do Ferro (FRAP)

A atividade antioxidante pelo método de FRAP foi determinada de acordo com Rufino *et al.* (2006). Este método baseia-se na quantificação da capacidade de redução do complexo Fe (III)-TPTZ (cor azul clara) para o complexo Fe(II)-TPTZ (cor azul escura) em meio ácido, reação esta que é desencadeada pelo antioxidante presente na amostra. O método consiste em adicionar a 100 µL da amostra que foram previamente diluídas, a fim de se obter as concentrações desejadas para as análises: 2,5; 5,0 e 10 µM e quantificar, em 2,7 mL de reagente FRAP somado a 270 µL de água destilada. Após 30 minutos em banho maria foi efetuada a leitura de absorbância a 595 nm. Os resultados foram expressos em µM de sulfato ferroso por grama de amostra. A curva padrão foi produzida com uma solução de sulfato ferroso com quatro diluições diferentes (500; 1000; 1500 e 2000 µM).

4.2.3. Análise de atividade antioxidante total pela captura do radical abts•+

O método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico) foi utilizado como descrito por Rufino *et al.* (2007), O radical ABTS•+ é formado por uma reação química com persulfato de potássio em uma relação estequiométrica de 1:0,5. Uma vez formado, o radical ABTS•+ é diluído em etanol até obter uma medida de absorbância de 0,70 (± 0,02) a um comprimento de onda de 734 nm. Alíquotas com três diferentes volumes das amostras de ácidos foram utilizadas de modo a restar um volume final de 3ml em cada leitura. As leituras foram realizadas em triplicata. Uma curva padrão com soluções de Trolox e outra curva com ácido ascórbico foram produzidas.

Os resultados foram expressos em TEAC, atividade antioxidante equivalente ao Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) em μmol de trolox e μmol de ácido ascórbico por grama de amostra.

4.2.4. Ensaio ORAC

A capacidade de absorção de radical de oxigênio (ORAC) foi determinada pelo método adaptado de Prior *et al.* (2003), utilizando-se fluoresceína como molécula fluorescente em fluorímetro de microplaca.

Para as análises, 100 μL de fluoresceína (7,8 μM) e 150 μL do tampão fosfato foram adicionados a microplaca e a leitura foi realizada durante 15 minutos a 37 °C.

Após, 100 μL do composto (3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA), em diferentes concentrações, 100 μL dos padrões (concentrações de 10; 20; 40; 60; 80 e 100 μM) e 100 μL do tampão fosfato foram adicionados a microplaca, todos em triplicata. Em todos os poços, foi adicionado, em seguida, 100 μL da solução de fluoresceína. A microplaca contendo a amostra, os padrões e tampão foram incubados por 15 minutos a 37 °C, antes da injeção automática do AAPH (2,2'-azinobis (2-amidinopropano) dihidroclorato).

Foi realizada leitura em espectrofotômetro, com leitor de microplaca, mediante injeção automática do sistema de 50 μL da solução de AAPH. A leitura da fluoresceína foi realizada sob excitação a 485 nm e emissão a 535 nm, com um espaço de 30s entre uma leitura e outra. Antes e após cada injeção, foi realizada a limpeza da bomba de injeção com a solução de AAPH.

A partir dos dados de absorbância em relação aos tempos obtidos, foi calculada a área abaixo da curva (AUC). A atividade antioxidante do composto foi determinada através da diferença entre a área da amostra subtraída pela área do branco, medida pelo decaimento da fluorescência com a adição da substância antioxidante no decorrer do tempo.

Usando-se Trolox de concentrações conhecidas, uma curva padrão foi gerada e a atividade antioxidante do composto foi calculada. Todas as análises foram feitas em triplicata e os valores foram expressos em μmoles equivalentes de Trolox/g.

4.3. CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Brasil). A cultura de células HT-29 foi realizada em frascos próprios para cultura, em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2g/L tampão HEPES, pH 7,4, sob atmosfera com 5% de CO₂ a 37°C. As células quando em confluência de 70-80%, sofriam processo de tripsinização, cerca de duas vezes por semana. Para cada experimento, as células foram semeadas em concentrações que variavam de $2,0 \times 10^5$ a $4,0 \times 10^4$ células/cm² em placas de 06,24 e 96 poços, durante as análises de ciclo celular, apoptose, captação celular e viabilidade celular, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4. INCUBAÇÃO DOS COMPOSTOS EM LINHAGEM DE CÉLULA HT-29

Para preparo das soluções, os compostos 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA foram pesados e diluídos, separadamente, em meio de cultura estéril, a fim de se obter soluções com concentrações de 3,0 mM.

As células HT-29 com 10 dias de confluência foram incubadas separadamente com os compostos, em diferentes concentrações (0,1 µM a 100µM), dependendo do experimento a ser realizado. Para análises de viabilidade celular as células HT-29 foram incubadas com os compostos nas concentrações de 0,1 µM a 100 µM. Para as análises de ciclo celular e apoptose, as células foram incubadas com 10µM e 100 µM de 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA. Já, para as análises de captação celular foi utilizada a concentração de 10 µM, por ser esta uma concentração fisiológica dos compostos. Grupos controle (sem incubação com os compostos) foram incluídos em cada placa para todos os experimentos. O tempo de incubação estudado para todos os experimentos foi de 24 h.

4.5. DOSAGEM DO 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA E METABÓLITOS EM CULTURA DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON (HT-29)

4.5.1. Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

No tempo previamente determinado (24 h), os meios de cultura (sobrenadante) das placas controle e das contendo as culturas de células incubadas com 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA, na concentração de 10 μ M, foram recolhidos, armazenados em tubos tipo eppendorf estéreis e armazenados a -80 °C até o momento das análises. As células, por sua vez, foram descoladas da placa de cultura por ação de *cells scrapers* (pequenos rodos), mediante a adição de 500 μ L de BSS-CMF. O precipitado celular das células controle e tratadas também foram recolhidos e armazenados a -80 °C até o momento das análises.

Após descongelamento, 400 μ L do precipitado celular foi adicionado a um tubo tipo eppendorf e 600 μ L de solução aquosa de Metanol (60:40, v.v) foi adicionado. Posteriormente, a mistura foi agitada em vórtex durante 1 minuto e centrifugada a 13000 *rpm* por 5 minutos. 1000 μ L do sobrenadante foi analisado por CLAE (Murad *et al.*,2015).

As análises cromatográficas foram realizadas de acordo com adaptações do método descrito por Murad *et al.*(2015). O sistema de cromatografia líquida (Shimadzu, Japão) incluiu uma bomba quaternária LC-20AT, injetor automático SIL-20A_{HT}, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A, sistema CBM-20A como controlador e degaseificador DGU-20A₅. A separação cromatográfica dos analitos foi obtida utilizando-se uma coluna de CLAE de fase reversa C18 (5 μ m, 250 mm \times 4,6 mm, Kromasil[®]), acoplada a uma pré-coluna C-18 (5 μ m, 10mm \times 3 mm, Kromasil[®]). A fase móvel utilizada foi uma mistura binária de ácido fórmico aquoso 0,3% (eluente A) e metanol (eluente B). O eluente foi monitorado a 325 nm e 280 nm e o gradiente de concentração da fase móvel foi programado utilizando-se fluxo de 1,0 mL/min, da maneira apresentada na Tabela 6, a seguir:

Tabela 6. Programação do gradiente de concentração da fase móvel utilizada na análise dos meios de culturas de células e dos precipitados celulares de linhagem celular de adenocarcinoma de cólon incubadas com ácidos 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA.

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0,01	78	22
9,0	78	22
14,0	68	32
25,0	65	35
35,0	55	45
40,0	55	45
45,0	78	22

Os padrões externos de 3,4-DHPAA, FA, *p*-CoA, VA, *m*-CoA, ácido gálico, salicílico, 3,4-dihidroxibenzóico, *p*-hidroxibenzóico, benzoico, cafeico, 2,4-dihidroxibenzóico, 3-(4-hidroxi)-fenilpropiónico e 4-hidroxifenilacético, na concentração individual de 10 µg/ml, foram injetados na forma de *pool* no início e no final de cada dia de trabalho.

A identificação e a quantificação do 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA foi obtida por comparação dos tempos de retenção (Tr) e da área dos picos dos componentes nas amostras com o Tr e a área do pico referente aos padrões externos.

4.6. ENSAIO DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

4.6.1. Quantificação celular: câmara de Neubauer

As quantificações das células tratadas e não tratadas (24 horas) foram feitas através de contagem direta ao microscópio, com auxílio da câmara de Neubauer (MORAES & ALVÊS, 1986). Foram plaqueadas $4,0 \times 10^4$ células/poço em placas de 24 poços que 24 horas depois, foram incubadas com diferentes concentrações (1 μM e 10 μM) de 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA. Após 24 h de incubação, o número de células da linhagem de células humanas de adenocarcinoma de cólon (HT-29) foram postas na lamínula, onde foram quantificadas utilizando um hemocitômetro de Neubauer sob exclusão de azul de tripano e levada ao microscópio para avaliação do número de células encontradas.

4.6.2. Ensaio de MTT

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio), conforme descrito por Mosmann (1983). Foram plaqueadas $2,0 \times 10^4$ células/poço em placas de 96 poços que, 24 horas depois, foram incubadas com diferentes concentrações de 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA., que variavam de 0,1 μM a 100 μM . Após 24 h de incubação, foram adicionados 10 μL de MTT (5g/L) em cada poço. O meio foi, então, recolhido depois de 4 h de incubação e 100 μL /poço de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados, a fim de dissolver o produto gerado. Por fim, a placa foi lida em leitor de microplacas (Bio-Rad 2550, USA) a 570nm. A taxa de inibição da proliferação celular (CPIR) foi calculada com base na fórmula: $\text{CPIR} = (1 - \text{valor médio do grupo experimental} / \text{valor médio do grupo controle}) \times 100\%$.

4.7. Ensaio de ciclo celular

A análise de ciclo celular foi realizada utilizando ensaio com iodeto de propídio. As células foram ressuspensas em 500 µL de solução fria de Vindelov (Vindelov, 1977), contendo 0,1% de Triton X-100, 0,1% de RNase e 50 µg/mL iodeto de propídio (Sigma). Após incubação por 15 minutos, a suspensão celular foi analisada para conteúdo de DNA em citômetro de fluxo (FACScalibur BD Biosciences), após a aquisição de 20000 eventos.

As proporções relativas de células com conteúdo de DNA indicativo de apoptose (<2n), fase G0-G1 (2n), fase S (fase > 2n mas <4n), e fase G2/M (4n) foram adquiridos e analisados utilizando CellQuest. A percentagem de população de células em uma fase específica foi estimada com EXPO32 software de análise versão 1.2.

4.8. Ensaio de apoptose

Para avaliação de apoptose, as células em estudo foram submetidas à marcação com anexina V conjugada à FITC (BD Pharmigen, San Diego, EUA). As células foram ressuspensas em 400 µL de solução tampão do kit II de detecção de apoptose (BD Pharmigen), 5 µL de anexina V FITC e 5 µL de iodeto de propídio por 15 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACScalibur BD Biosciences), após a aquisição de 20000 eventos e, os dados analisados em software Cell Quest.

4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram apresentados como médias \pm desvio padrão de dois experimentos independentes feitos em triplicata (n=6). Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0 .

5. RESULTADOS

5.1. Atividade antioxidante do 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA

A atividade antioxidante do 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA foi avaliada por quatro diferentes métodos (DPPH, ORAC, FRAP e ABTS). Os resultados dos ensaios de FRAP e ABTS estão apresentados nas tabelas 7 e 8 e os resultados dos ensaios de DPPH e ORAC nas figuras 7 e 8.

Para os quatro métodos em estudo, os compostos foram analisados em concentrações que variaram de 2,5 μ M a 25 μ M. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata até o término da reação.

Para avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH, os compostos foram analisados em concentrações inferiores a 25 μ M, onde observou-se que não houve uma redução significativa do radical DPPH (resultados não mostrados). Após 30 minutos de ensaio, o percentual de redução do DPPH e conseqüentemente a atividade antioxidante dos compostos tenderam a estabilização na concentração de 25 μ M.

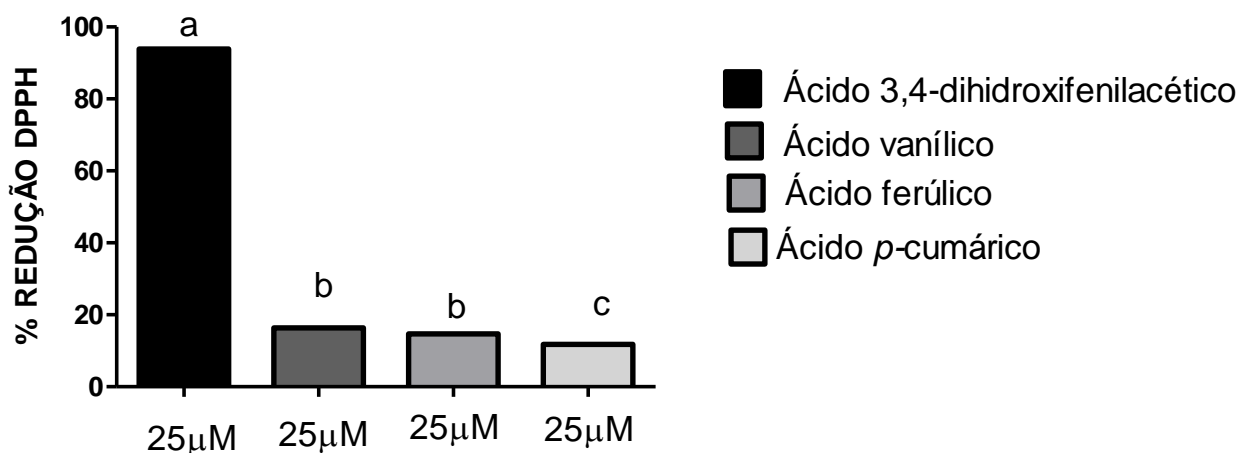


Figura 7. Percentual de redução do radical DPPH pelo 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos. Os dados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (^ap <0,05; ^bp <0,01; ^cp <0,001).

Observou-se pelo método DPPH, que o 3,4-DHPAA apresentou o maior percentual de redução do radical, seguido do VA, FA e *p*-CoA, onde apresentaram diferença significativa entre si. Esta diferença, contudo, não foi observada no FA.

Ao analisar a atividade antioxidante dos compostos pelo método de ORAC (Figura 8), observou-se que, tanto o *p*-CoA quanto o 3,4-DHPAA apresentaram um aumento significativo da atividade antioxidante, seguido do VA e FA. Pelo método FRAP, o 3,4-DHPAA e VA demonstraram ter uma atividade antioxidante superior a do FA e *p*-CoA corroborando com os resultados observados no ensaio de DPPH. Todos os compostos demonstraram também ser significativamente diferente em todas as concentrações estudadas ($p \leq 0,05$).

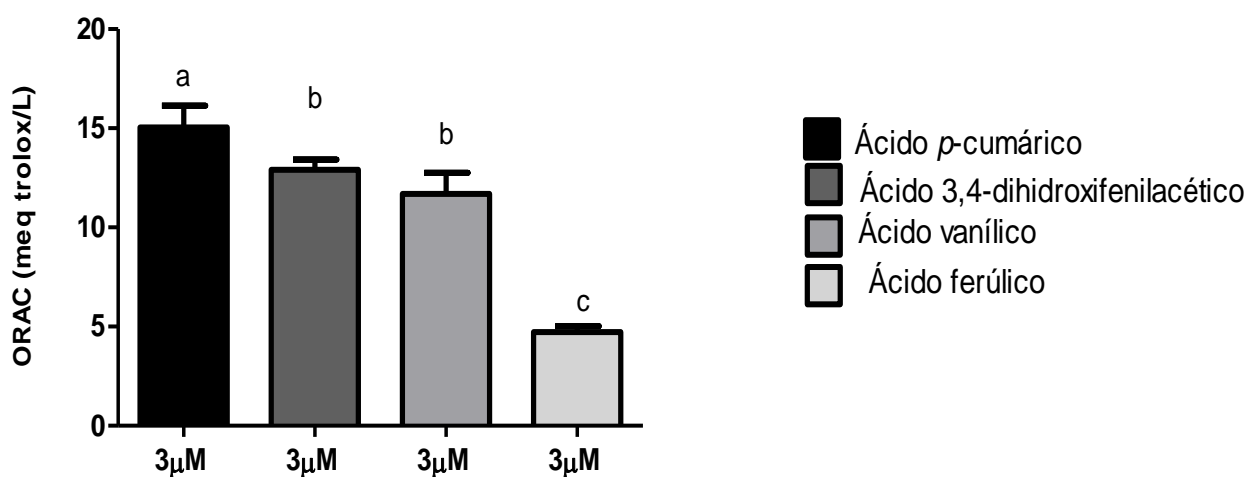


Figura 8. Atividade antioxidante, avaliada pelo método ORAC, do 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA. As análises foram realizadas em triplicata. Resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Os dados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$).

Tabela 7. Atividade Antioxidante de ácidos fenólicos pelo ensaio FRAP expresso (μMol Sulfato Ferroso / μMol).

Padrões de Ácido Fenólico	2,5 μM	5,0 μM	10,0 μM
Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	533,12 \pm 25,52 ^a	970,62 \pm 22,67 ^a	1852,50 \pm 41,12 ^a
Ácido vanílico	83,33 \pm 7,34 ^c	240,56 \pm 67,56 ^c	568,06 \pm 32,66 ^c
Ácido ferúlico	9,17 \pm 21,17 ^d	141,39 \pm 7,16 ^d	376,94 \pm 12,08 ^d
Ácido <i>p</i>-cumárico	1,94 \pm 1,66 ^b	33,06 \pm 5,00 ^b	126,94 \pm 4,29 ^b

* Letras diferentes na mesma coluna, se diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

No ensaio de ABTS (Tabela 8), o ácido 3,4-DHPAA apresentou a maior atividade antioxidante tanto nos resultados expressos em μM Trolox/ μMol e μMol Ácido ascórbico / μMol , assim como no ensaio de DPPH e FRAP. Em oposto aos demais ensaios, o ácido que apresentou a segunda maior atividade antioxidante foi o FA seguido do *p*-CoA e VA. Todos apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$).

Tabela 8. Atividade antioxidante de ácidos fenólicos pelo ensaio ABTS expresso em μM Trolox/ μMol e μMol Ácido ascórbico / μMol .

ABTS	Compostos	2,5 μM	5,0 μM	10,0 μM
(μMol Ácido ascórbico /μMol)	3,4-DHPAA	2241,75 \pm 57,78 ^a	2999,25 \pm 86,05 ^a	3671,75 \pm 75,09 ^a
	FA	1901,75 \pm 90,40 ^d	2341,75 \pm 37,50 ^d	2803,00 \pm 124,50 ^d
	<i>p</i> -CoA	1750,50 \pm 122,56 ^b	1834,25 \pm 189,70 ^b	2121,75 \pm 122,50 ^b
	VA	1218,00 \pm 65,89 ^c	1330,50 \pm 75,93 ^c	1676,75 \pm 62,76 ^c
ABTS (μMol Trolox/μMol)	3,4-DHPAA	2287,25 \pm 75,09 ^a	3044,75 \pm 86,05 ^a	3717,25 \pm 57,78 ^a
	FA	1947,25 \pm 90,00 ^d	2387,25 \pm 37,50 ^d	2848,50 \pm 124,50 ^d
	<i>p</i> -CoA	1796,00 \pm 78,52 ^b	1879,75 \pm 189,79 ^b	2167,25 \pm 122,56 ^b
	VA	1263,50 \pm 65,89 ^c	1376,00 \pm 75,93 ^c	1722,25 \pm 62,76 ^c

* Letras diferentes na mesma coluna, se diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

5.2. Cinética de captação do 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA pelas células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29)

As células HT-29 foram incubadas com 10 μM de 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA, isoladamente durante 1 h; 2 h; 4 h e 6 h para o estudo da cinética de captação destes compostos. Foram incluídos grupos controle em todos os tempos, sendo os mesmos tratados somente com meio próprio (isento do composto).

Não foi observada a presença de compostos fenólicos nas células e meio de cultura tratados com 3,4-DHPAA e nos grupos controles (dados não mostrados).

5.2.1. Incubação com *p*-CoA

O *p*-CoA foi identificado e quantificado na célula e no meio de cultura após a incubação com 10 μM de *p*-CoA. Um aumento na captação celular de *p*-CoA foi observado 6 h após a incubação, com captação máxima (0,80 $\mu\text{mol/L}$) (Figura 9). Nesse mesmo tempo, foi identificado no meio de cultura (Figura 10) um aumento significativo do conteúdo de *p*-CoA no meio de cultura após 6 h de incubação, com captação máxima (33,7 $\mu\text{mol/L}$).

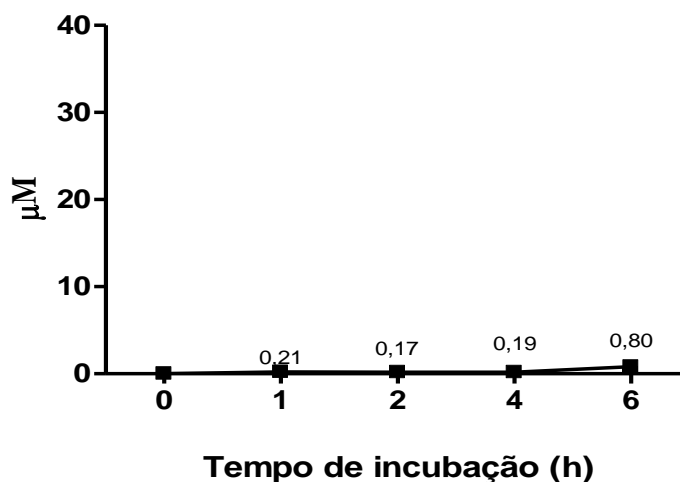


Figura 9. Concentração ($\mu\text{mol/L}$) de *p*-CoA no conteúdo intracelular de células HT-29 após a incubação com 10 μM de *p*-CoA (1 h a 6 h). Os resultados são expressos como média \pm desvio-padrão de três experimentos.

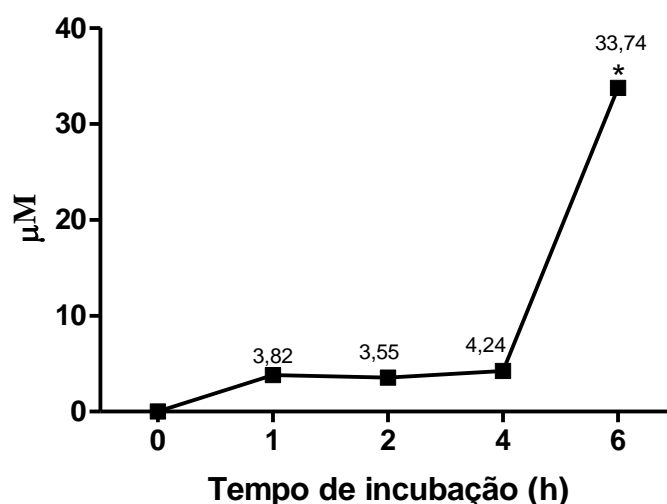


Figura 10. Concentração ($\mu\text{mol/L}$) de *p*-CoA no meio de cultura de células HT-29 após a incubação com $10 \mu\text{M}$ de *p*-CoA (1 h a 6 h). Os resultados são expressos como média \pm desvio-padrão de três experimentos. (*) indica diferença estatística (One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

5.2.2. Incubação com VA

O VA foi identificado e quantificado na célula e no meio de cultura após a incubação com $10 \mu\text{M}$ de VA. Um aumento na captação celular de VA foi observado 1 h após a incubação, com captação máxima ($5,7 \mu\text{mol/L}$) no conteúdo intracelular. Porém após 1h, a captação tendeu a uma estabilização (Figura 11).

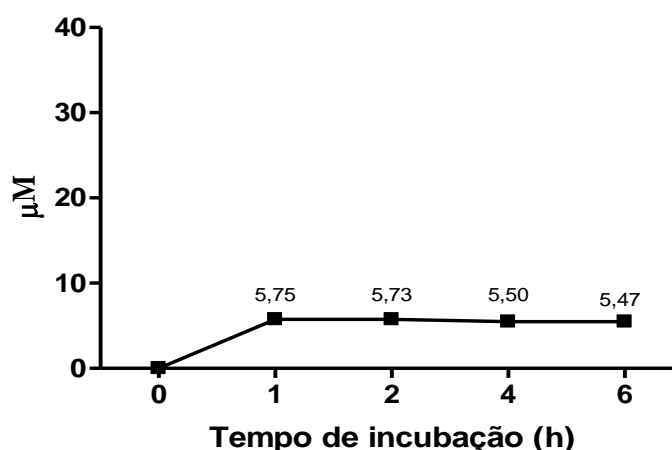


Figura 11. Concentração ($\mu\text{mol/L}$) de VA no conteúdo intracelular de células HT-29 após a incubação com $10 \mu\text{M}$ de VA (1 h a 6 h). Os resultados são expressos como média \pm desvio-padrão de três experimentos.

O mesmo perfil foi identificado no meio de cultura após a incubação com 10 μM de VA. Um aumento na captação celular de VA foi observado 1 h após a incubação, com captação máxima (9,5 $\mu\text{mol/L}$). Porém após 1h, a captação tendeu a uma estabilização (Figura 12).

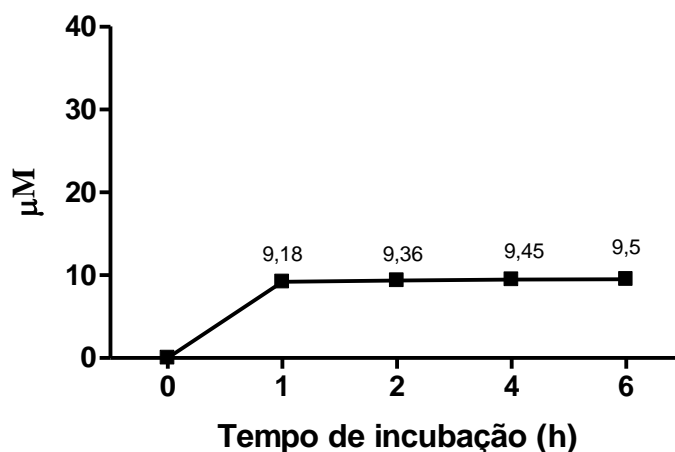


Figura 12. Concentração ($\mu\text{mol/L}$) de VA no meio de cultura de células HT-29 após a incubação com 10 μM de VA (1 h a 6 h). Os resultados são expressos como média \pm desvio-padrão de três experimentos.

5.2.3. Incubação com FA

Não foram identificados compostos fenólicos nas amostras de células após incubação com 10 μM de FA. Já no meio de cultura, uma diminuição do conteúdo de FA no meio de cultura foi observada 2 h, 4 h e 6 h após a incubação (Figura 13), indicando que o FA foi captado pelas células intestinais.

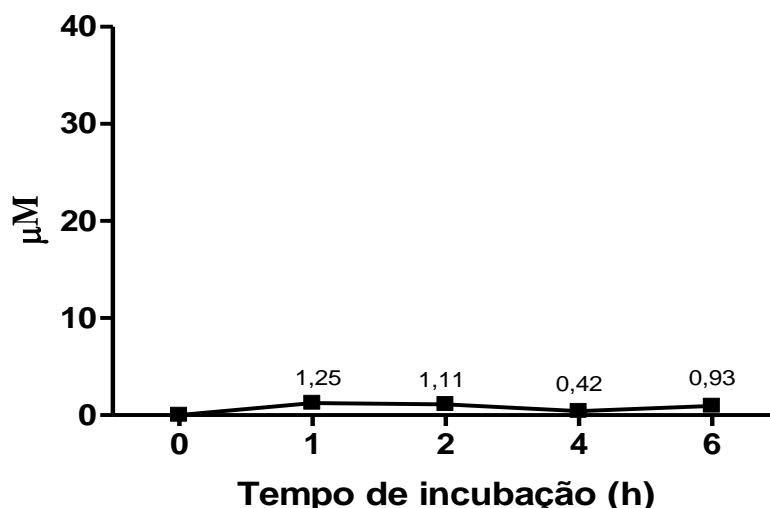


Figura 13. Concentração ($\mu\text{mol/L}$) do FA no meio de cultura de células HT-29 após a incubação com $10 \mu\text{M}$ de FA (1 h a 6 h). Os resultados são expressos como média \pm desvio-padrão de três experimentos.

5.3. ENSAIO DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

5.3.1. Quantificação celular: câmara de Neubauer

Para análise de quantificação celular pela câmara de Neubauer, as células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) foram incubadas com concentrações de $1 \mu\text{M}$ e $10 \mu\text{M}$ de 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA e analisados 24 h após o início da incubação. Foi incluído um grupo controle para todos os padrões de ácidos analisado, sendo os mesmos tratados somente com meio próprio (isento do composto).

A quantificação celular foi realizada em doses fisiológicas, a fim de se observar o seu efeito sobre a viabilidade celular e só depois em outro ensaio houve um aumento das concentrações até atingir doses farmacológicas.

As células tratadas com 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA apresentaram percentual de redução da viabilidade celular na concentração de $1 \mu\text{M}$ com diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparados a células controle. Na concentração de $10 \mu\text{M}$ as células tratadas com 3,4-DHPAA foi quem apresentou o maior percentual

de redução da viabilidade celular, seguido do *p*-CoA, FA e VA com diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparas ao grupo controle.

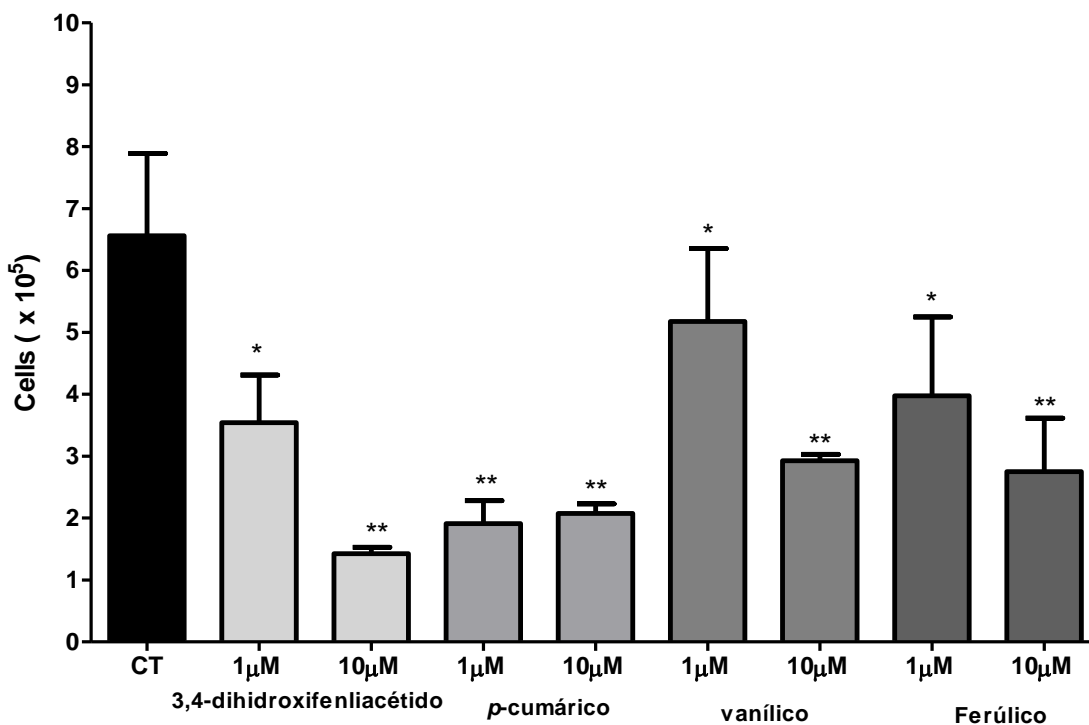


Figura 14. Efeito do 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA na quantificação de células (HT-29) 24 horas após a incubação. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as incubadas com os respectivos ácidos (1 μM e 10 μM) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

5.3.2. Ensaio de MTT

Para análise de viabilidade celular, as células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) foram incubadas com concentrações de 0,1 μM a 100 μM de 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA e analisadas 24 h após o início da incubação.

O ensaio de MTT foi utilizado para monitorar a viabilidade celular. Na linhagem celular HT-29, foi possível observar que inicialmente nas concentrações de 0,1 μM e 1,0 μM o 3,4-DHPAA não modificou o perfil de células viáveis quando

comparado ao controle, após a concentração de 2,5 μM constatou-se uma redução significativa no percentual destas células quando comparado ao grupo controle (Figura 15 A). O 3,4-DHPAA promoveu uma inibição média de 66% para este tipo celular nas concentrações iguais ou maiores que 10 μM , havendo diferença significativa entre as concentrações estudadas ($p < 0,01$).

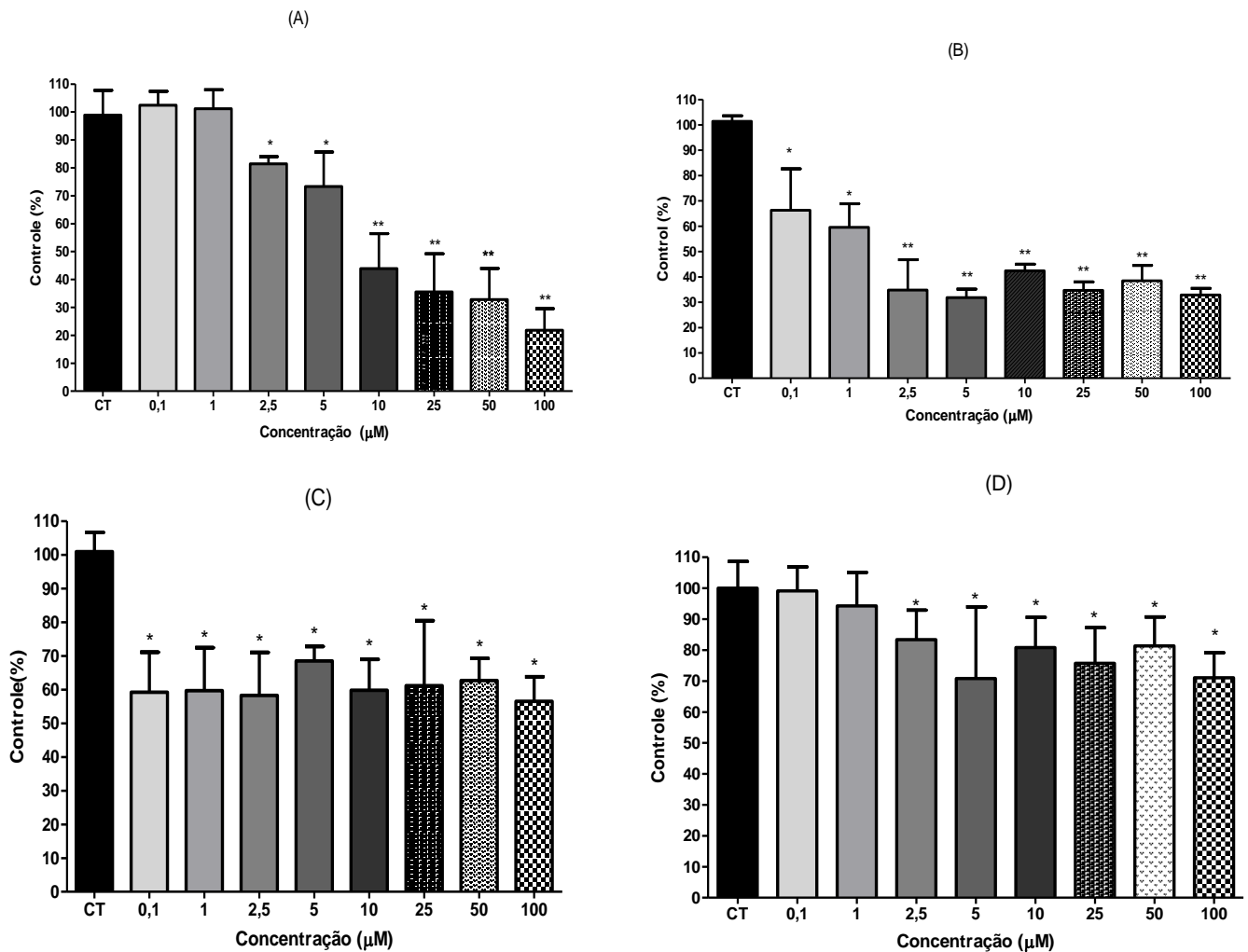


Figura 15. Efeito do 3,4-DHPAA (A), FA (B), p-CoA (C) e VA (D) sobre a viabilidade de células HT- 29 24 horas após a incubação. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as incubadas com os respectivos ácidos (0,1 μM a 100 μM) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Quando as células da linhagem HT-29 foram incubadas com o FA, observou-se que nas concentrações de 0,1 μM e 1,0 μM o composto em questão já modificou o perfil de crescimento das células viáveis quando comparado ao controle (Figura 15 B). Este efeito foi ainda mais pronunciado quando as células foram incubadas com concentrações iguais ou maiores que 2,5 μM , apresentando aproximadamente 63% de redução na viabilidade celular da linhagem HT-29, quando comparada ao controle. Além disso, foi observada diferença significativa na redução celular entre as maiores concentrações (2,5 μM e 100 μM) e as concentrações inferiores (0,1 μM e 1,0 μM).

Quando as células da linhagem HT-29 foram incubadas com o *p*-CoA foi observada uma redução significativa no número de células em todas as concentrações, uma média de 40 % quando comparado ao grupo controle, com diferença significativa entre estas concentrações $p < 0,05$ (Figura 15 C).

Para as células incubadas com o VA, observou-se que nas concentrações de 0,1 μM e 1,0 μM o composto em questão não modificou o perfil de crescimento das células viáveis quando comparado ao controle, não havendo diferença significativa entre estas concentrações utilizadas. Foi observada uma redução significativa do percentual de células viáveis, com média de 23,0% quando as células foram incubadas nas concentrações de 2,5 μM a 100 μM mostrando haver diferença significativa entre as concentrações utilizadas $p < 0,05$ (Figura 15 D).

Na Tabela 9 está demonstrada a concentração de 3,4-DHPAA e FA necessária para reduzir em 50% a viabilidade celular da linhagem HT-29 (IC_{50}).

Tabela 9. Valor do IC_{50} (μM) do 3,4-DHPAA e FA

Compostos	IC_{50} (μM)
Ácido ferúlico	1,46
Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	5,4

O FA apresentou menor valor de concentração para reduzir em 50% a viabilidade celular, cerca de duas vezes menos que o 3,4-DHPAA. Este, por apresentar menor valor de IC_{50} , pode ser considerado mais efetivo em termos de viabilidade celular através deste método.

5.4. EFEITO DO 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA SOBRE A PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR

Com a finalidade de monitorar a influência do 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA sobre o ciclo celular, as células em estudo foram incubadas com concentrações de 10 μ M e 100 μ M de cada composto, isoladamente e após 24 h quantificadas quanto ao percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular.

Foi observado que a linhagem HT-29 apresentou um aumento no percentual de células na fase G0/G1, seguido por uma diminuição no percentual de células na fase S, quando incubadas com o 3,4-DHPAA nas concentrações de 10 μ M e 100 μ M (Figura 16) mostrando haver diferença significativa entre as concentrações utilizadas ($p < 0,05$) quando comparadas ao grupo controle. Foi possível observar também uma diminuição no percentual de células presentes na fase G2/M, 24 h após a incubação com 100 μ M de 3,4-DHPAA com diferença significativa quando comparadas ao grupo controle.

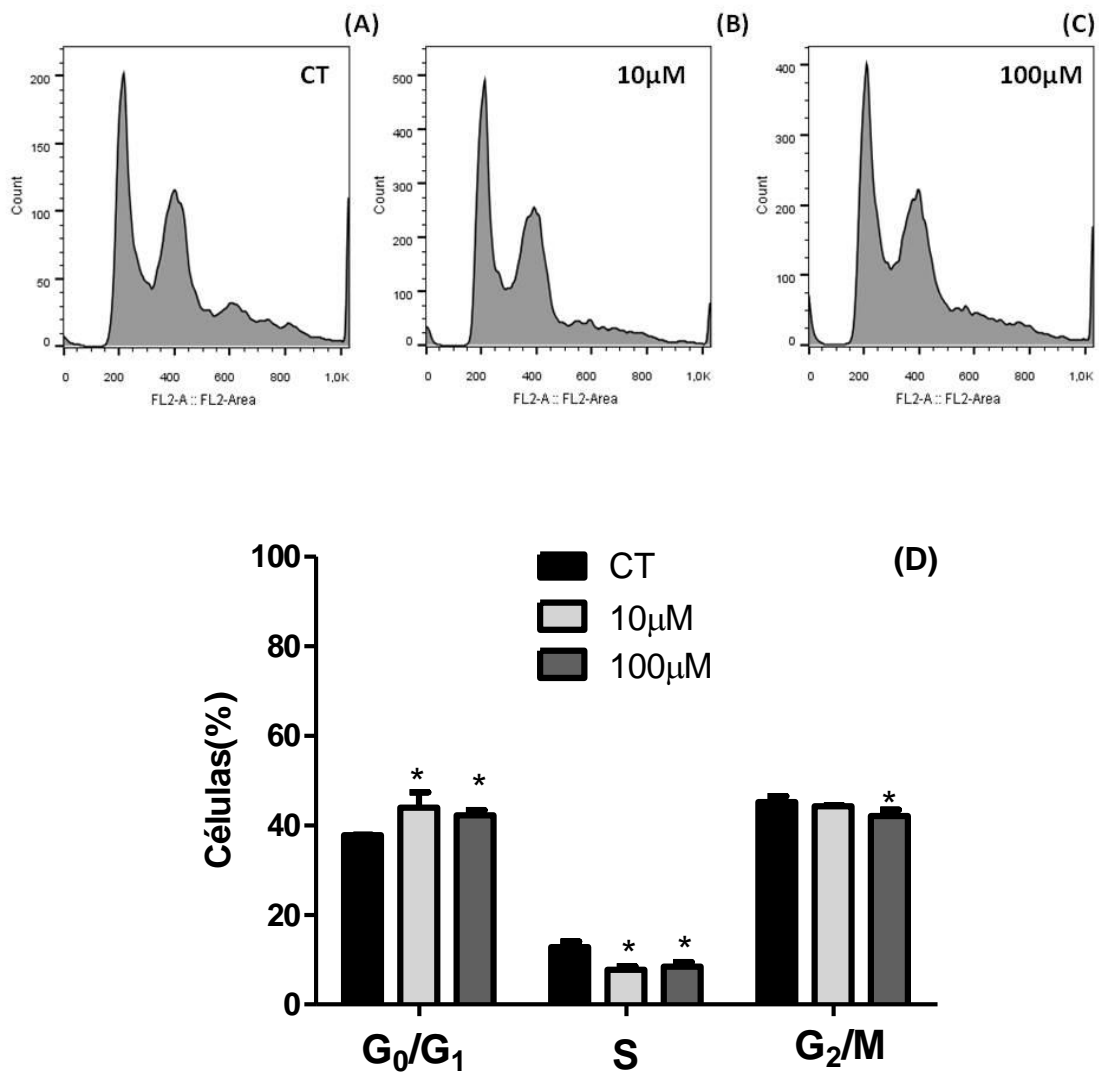


Figura 16. Efeito do 3,4-DHPAA sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 24 horas após a incubação. As fases do ciclo celular estão ilustradas em A (CT), B (10 μM) e C (100 μM). Os resultados quantitativos do efeito do composto sobre esta linhagem celular estão ilustrados no gráfico (D). Os resultados são expressos com média ± desvio padrão de três experimentos. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas (10 μM e 100 μM) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (*p < 0,05).

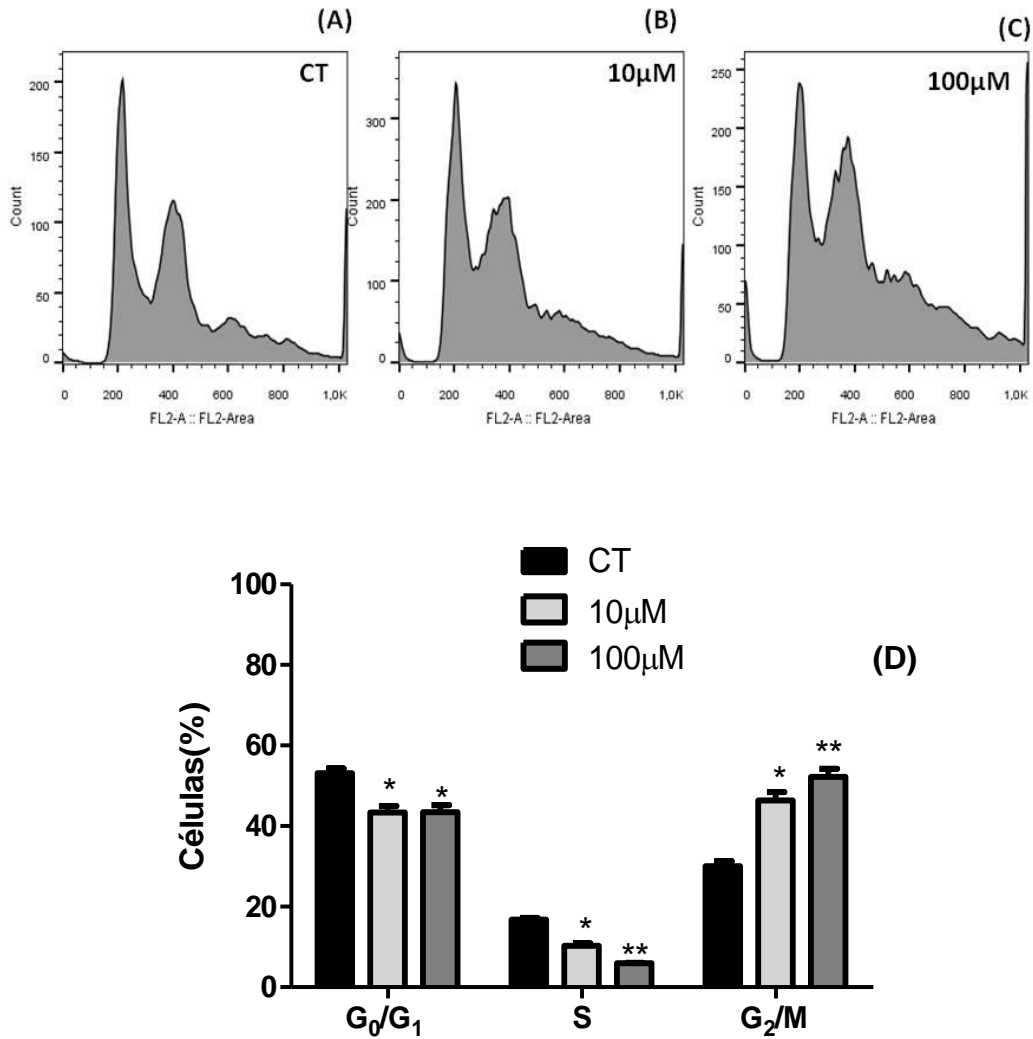


Figura 17. Efeito do *p*-CoA sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 24 horas após a incubação. As fases do ciclo celular estão ilustradas em A (CT), B (10 μM) e C (100 μM). Os resultados quantitativos do efeito do composto sobre esta linhagem celular estão ilustrados no gráfico (D). Os resultados são expressos com média ± desvio padrão de três experimentos. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas (10 μM e 100 μM) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Quando as células HT-29 foram incubadas com *p*-CoA, observou-se uma redução significativa no percentual de células na fase G₀/G₁ em todas as concentrações estudadas. Uma redução significativa no percentual de células nas fases S também foi observada, com destaque para a concentração de 100μM. Já na fase G₂/M, o comportamento do composto foi o oposto das demais fases, houve um aumento significativo tanto na concentração de 10μM e 100μM quando comparadas ao grupamento controle (Figura 17).

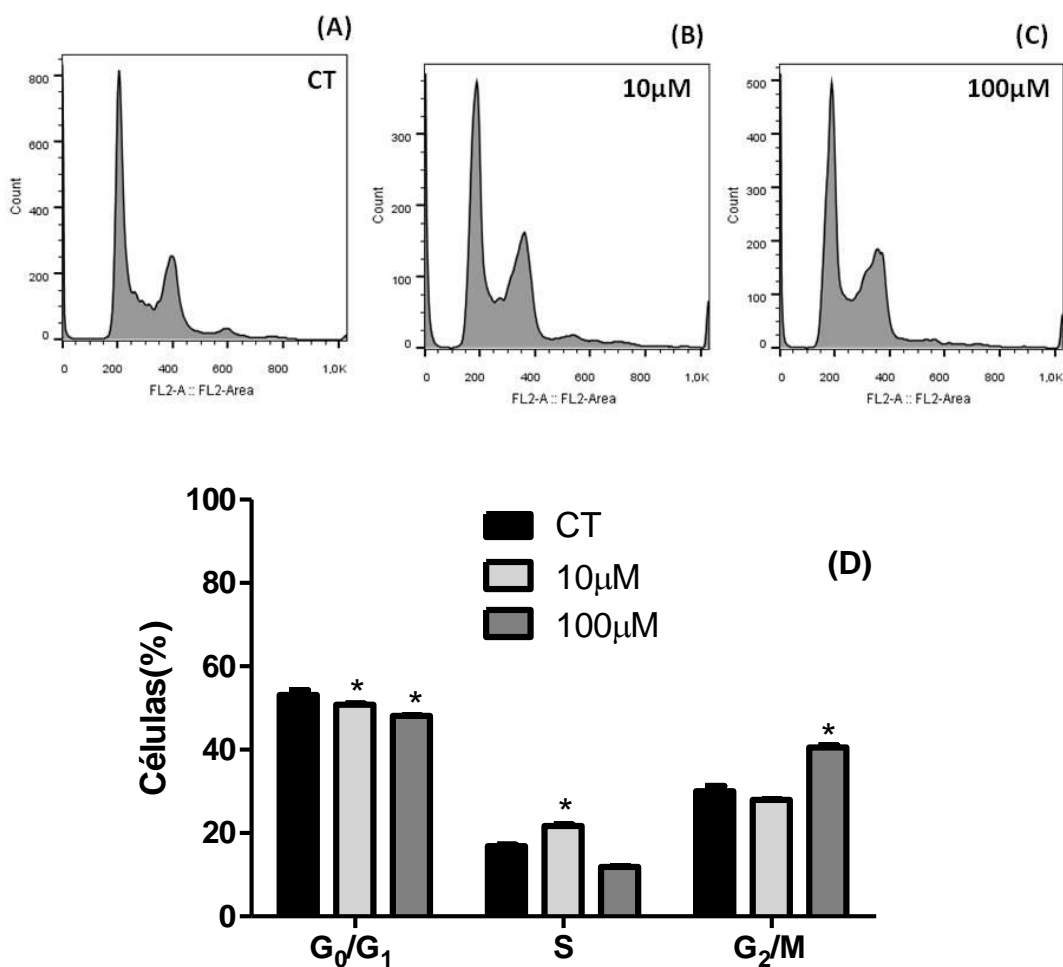


Figura 18. Efeito do FA sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 24 horas após a incubação. As fases do ciclo celular estão ilustradas em A (CT), B (10 μM) e C (100 μM). Os resultados quantitativos do efeito do composto sobre esta linhagem celular estão ilustrados no gráfico (D). Os resultados são expressos com média ± desvio padrão de três experimentos. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas (10 μM e 100 μM) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (**p* < 0,05).

Quando as células HT-29 foram incubadas com 10 μM e 100 μM de FA também foi observada uma redução no percentual de células na fase G₀/G₁. O percentual de células na fase S sofreu alteração significativa somente na incubação com 10 μM de FA, também foi observado um aumento significativo na fase G₂/M na concentração de 100 μM (Figura 18).

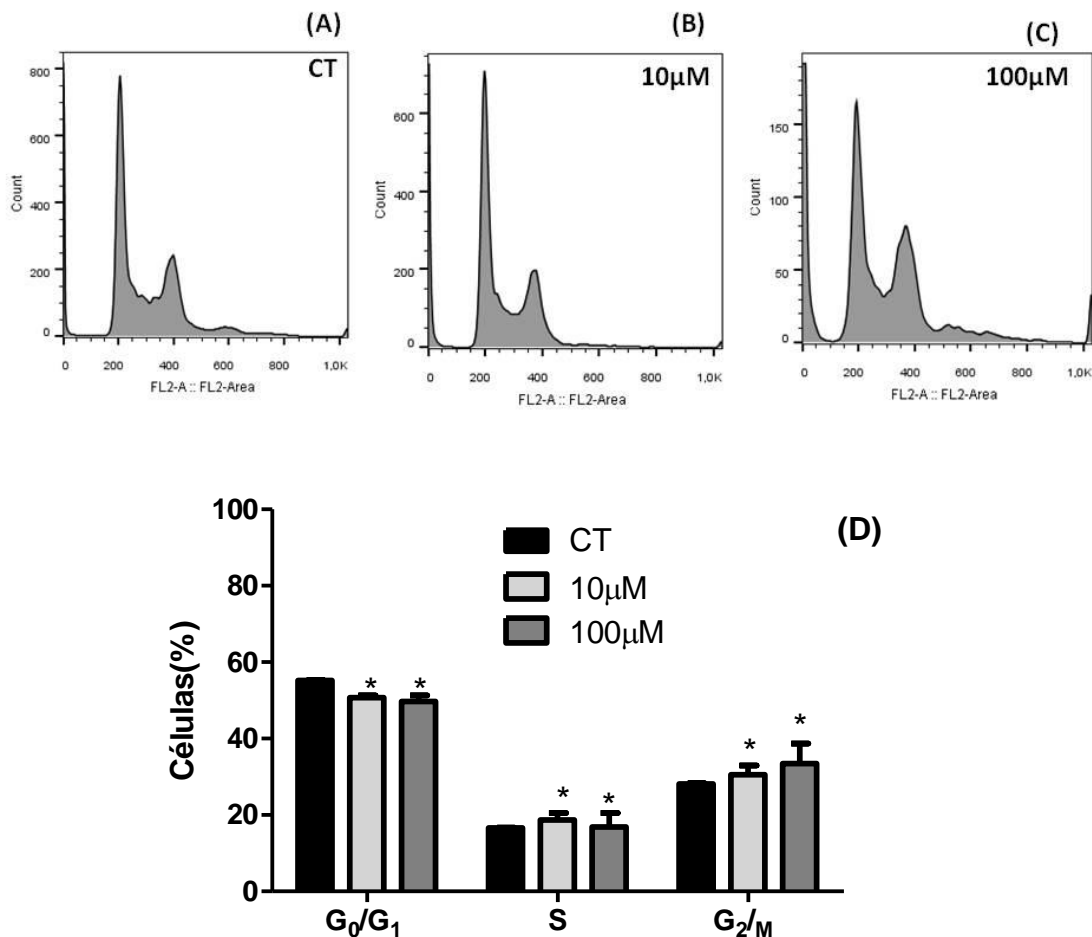


Figura 19. Efeito do VA sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 24 horas após a incubação. As fases do ciclo celular estão ilustradas em A (CT), B (10 μM) e C (100 μM). Os resultados quantitativos do efeito do composto sobre esta linhagem celular estão ilustrados no gráfico (D). Os resultados são expressos com média \pm desvio padrão de três experimentos. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas (10 μM e 100 μM) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$).

Foi observado que a linhagem HT-29 apresentou uma diminuição no percentual de células na fase G0/G1, seguido por um aumento no percentual de células na fase S, quando incubadas com o VA nas concentrações de 10 μ M e 100 μ M (Figura 19) mostrando haver diferença significativa nas concentrações utilizadas ($p < 0,05$) quando comparadas ao grupo controle. Foi possível observar também, um aumento no percentual de células presentes na fase G2/M, após a incubação com VA em ambas as concentrações com diferença significativa quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$).

5.5. EFEITO DO 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA SOBRE A TAXA DE APOPTOSE EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO (HT-29)

A apoptose é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células defeituosas. Esse fenômeno biológico, além de desempenhar um papel importante no controle de diversos processos vitais, está associado a inúmeras doenças, como o câncer. A compreensão dos mecanismos apoptóticos permite o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento do câncer.

Neste ensaio, as células em estudo foram incubadas com 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA (10 μ M e 100 μ M) durante 24h.

Após a incubação com 3,4-DHPAA, nas concentrações de 10 μ M e 100 μ M, foi observado uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no percentual de células viáveis e um aumento significativo ($p < 0,05$) do percentual de células em apoptose inicial quando comparadas ao grupo controle na concentração de 100 μ M. O percentual de células não-apotóticas sofreu um aumento significativo após incubação com 3,4-DHPAA em ambas as concentrações ($p < 0,05$) (Tabela 10).

Ao ser incubada com 10 μ M de *p*-CoA, a linhagem celular HT-29 apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no percentual de células viáveis e um aumento no percentual de células em apoptose (apoptose inicial e tardia), quando comparadas as células não tratadas (controle) e conseqüentemente uma diminuição de células não apoptóticas. Contudo, ao serem incubadas com 100 μ M de *p*-CoA, as células não apresentaram uma diminuição significativa ($p > 0,05$) no percentual de células viáveis e apresentaram uma diminuição no percentual de células em

apoptose (apoptose inicial e tardia), quando comparadas as células controle e um aumento de células não apoptóticas (Tabela 10).

Após a incubação com 10 μM e 100 μM de VA não foi observado alteração no percentual de células viáveis ($p > 0,05$) quando comparadas as células não tratadas (controle). Porém, foi observada uma diferença significativa no percentual de células em apoptose (apoptose inicial e tardia) quando comparadas as células controle (Tabela 10).

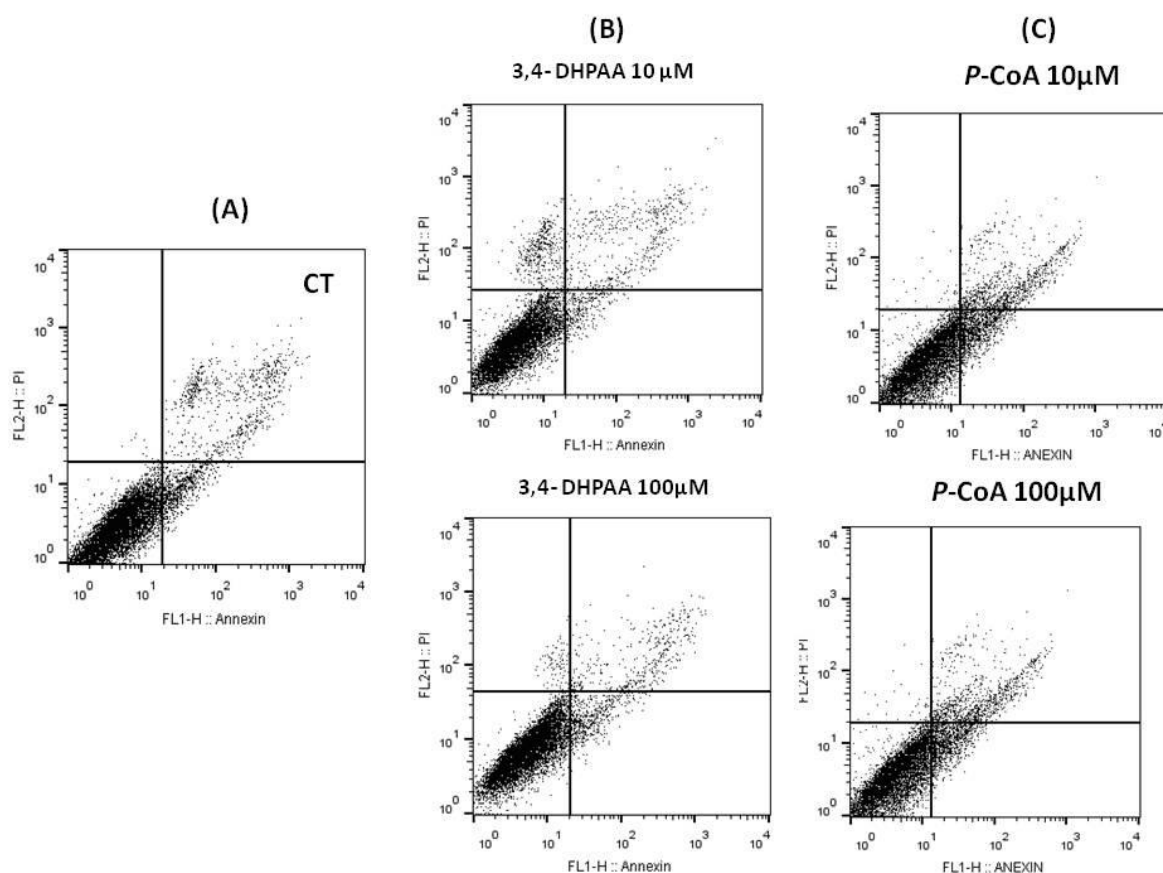


Figura 20. Efeito do 3,4-DHPAA e *p*-CoA sobre o processo de morte programada em células HT-29 24 h após a incubação. As análises por citometria de fluxo do grupo controle estão ilustrada em A e as do 3,4-DHPAA e *p*-CoA estão ilustradas em B e C, de acordo a concentração dos compostos.

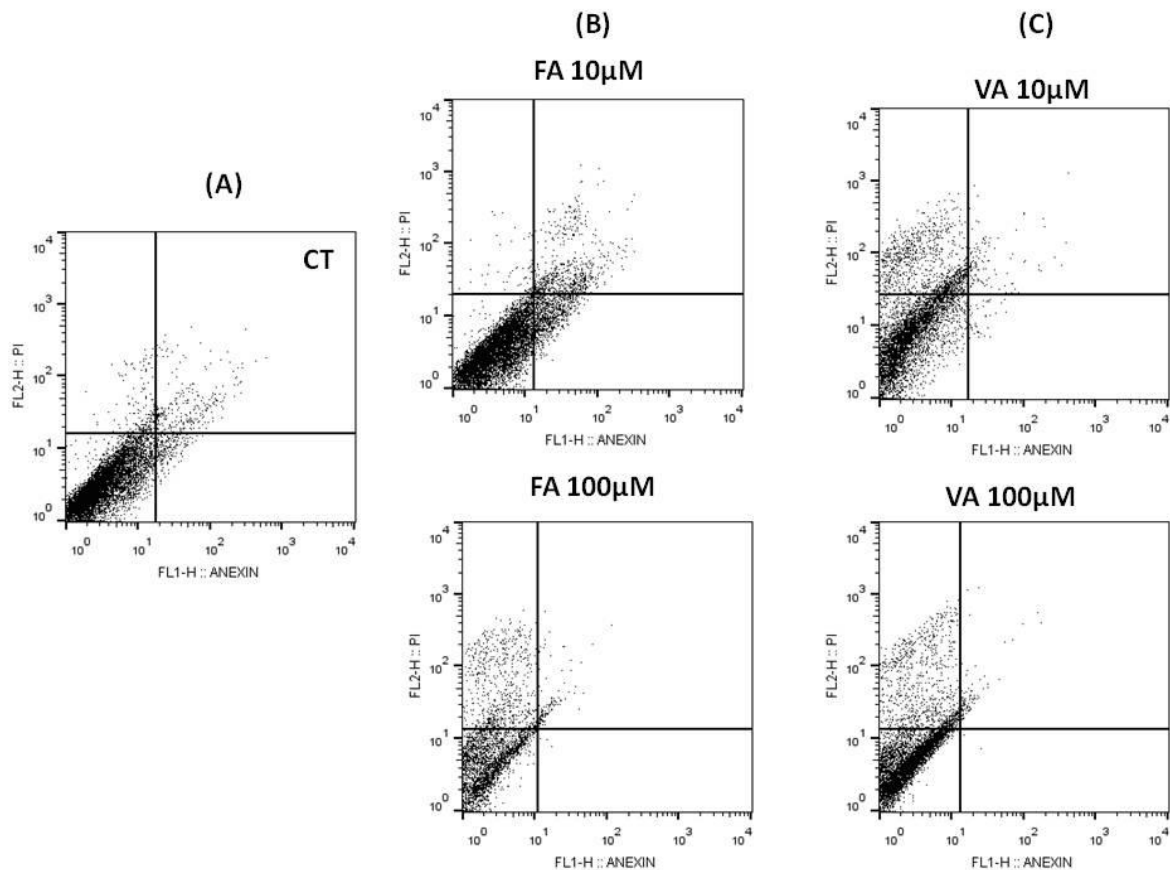


Figura 21. Efeito do FA e VA sobre o processo de morte programada em células HT-29 24 h após a incubação. As análises por citometria de fluxo do grupo controle estão ilustrada em A e as do FA e VA estão ilustradas em B e C, de acordo a concentração dos compostos.

Ao ser incubada com 10 μM e 100 μM de FA, a linhagem celular HT-29 apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no percentual de células viáveis, quando comparadas as células do grupo controle. Contudo, somente na concentração de 10 μM houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no percentual de células em apoptose (apoptose inicial e tardia), quando comparadas as células não tratadas (controle) e uma diminuição de células não apoptóticas. Quando incubadas com 100 μM de FA, as células apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) no percentual de células não apoptóticas (Figura 21 B).

Tabela 10. Efeito do 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA (10 µM e 100 µM) sobre o processo de morte celular por apoptose nas células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) 24 h após a incubação.

		Células Viáveis (Anexina V- PI-)	Apoptose inicial (Anexina V+ PI-)	Apoptose tardia (Anexina V+ PI+)	Células não-apoptóticas (Anexina V- PI+)
3,4-DHPAA	CT	85,20±0,57 ^a	6,93±0,21 ^a	7,69±0,80 ^a	0,17±0,02 ^a
	10 µM	87,90±1,04 ^b	3,87±1,33 ^a	5,84±1,48 ^a	2,41±2,06 ^b
	100 µM	89,75±0,13 ^b	5,49±0,28 ^b	3,97±0,26 ^b	0,78±0,35 ^c
<i>p</i>-CoA	CT	92,50±0,28 ^a	2,08±0,23 ^a	2,98±0,04 ^a	2,45±0,47 ^a
	10 µM	76,95±0,64 ^b	12,75±0,49 ^b	9,83±0,16 ^b	0,48±0,06 ^b
	100 µM	93,40±1,48 ^a	0,17±0,10 ^c	1,38±0,24 ^c	4,01±1,11 ^c
VA	CT	92,50±0,28 ^a	2,08±0,23 ^a	2,98±0,04 ^a	2,45±0,47 ^a
	10 µM	90,00±4,10 ^a	0,34±0,14 ^b	0,93±0,62 ^b	8,74±3,34 ^b
	100 µM	91,10±2,83 ^a	0,09±0,11 ^b	1,00±0,03 ^b	7,84±2,88 ^b
FA	CT	92,50±0,28 ^a	2,08±0,23 ^a	2,98±0,04 ^a	2,45±0,47 ^a
	10 µM	82,70±1,27 ^b	8,28±1,53 ^b	7,52±1,68 ^b	1,51±1,10 ^b
	100 µM	89,90±1,84 ^c	0,48±0,07 ^a	1,70±0,18 ^a	8,20±2,28 ^c

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão de três experimentos e representam o percentual do total de células. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas com 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA nas concentrações de 10 µM e 100 µM, foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey. Letras diferentes na mesma coluna se diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Alguns ácidos fenólicos são conhecidos naturalmente por exibir uma variedade de funções biológicas, além da sua atividade antioxidante, que está relacionada principalmente à modulação da carcinogênese. Na verdade, muitos ácidos fenólicos são investigados quanto ao seu potencial quimiopreventivo do câncer (Fiuza *et al.*, 2004). Os resultados do presente trabalho fornecem subsídios que corroboram com os dados descritos na literatura e apontam o papel do 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA na prevenção e tratamento do câncer de cólon.

Apesar destes dados, existe uma grande dificuldade de comparação entre dados experimentais referentes à avaliação da atividade antioxidante, aferida por diferentes métodos, bem como de comparar dados da literatura, haja vista que as metodologias para análise da determinação da atividade antioxidante baseiam-se em diferentes fundamentos. Soma-se a isto, ainda a complexidade das reações envolvidas na atividade antioxidante. Portanto, é recomendada a utilização de dois ou mais métodos, já que nenhum ensaio utilizado isoladamente para determinar a atividade antioxidante irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (Huang *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2003).

Neste trabalho, a atividade antioxidante do 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA foi analisada por quatro diferentes métodos (DPPH, FRAP, ORAC e ABTS). Para os quatro métodos utilizados foram observados uma elevada atividade antioxidante dos compostos. Foi possível ainda observar, em todos os métodos utilizados, um aumento na atividade antioxidante com o aumento da concentração dos compostos testados (2,5 µM a 25 µM).

Foi observado em nosso estudo, que pelo método DPPH, FRAP e ABTS o 3,4-DHPAA demonstrou possuir uma atividade antioxidante superior a dos demais ácidos.

Monagas *et al.* (2010) observou que o 3,4-DHPAA derivado do metabolismo microbiano de proantocianidinas apresenta acentuada propriedade anti-inflamatória *in vitro*, reduzindo a secreção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em células mononucleares de sangue periférico estimuladas com lipopolissacarídeo de indivíduos saudáveis. Tem sido sugerido que estes metabólitos microbianos podem estar entre a nova geração de agentes terapêuticos para a gestão de doenças imunoinflamatórias como a

aterosclerose e a redução da resposta inflamatória a antígenos bacterianos, o que pode ter implicações nas doenças crônicas auto-imunes ou inflamatórias, como doença inflamatória do intestino.

Ao ser avaliado pelo método FRAP e DPPH, o VA foi o composto que apresentou a segunda maior atividade antioxidante, com 568,06 $\mu\text{Mol Sulfato Ferroso} / \mu\text{Mol}$ e um percentual de redução de 17% do radical DDPH na maior concentração testada nos respectivos métodos. Já no ensaio de ABTS e ORAC, o VA apresentou uma menor atividade antioxidante, porém com diferença significativa quando comparado aos demais compostos.

Os resultados encontrados no nosso estudo, são similares aos demonstrados por Tai *et al.*(2012). Ao analisar a atividade antioxidante do VA pelo ensaio de DPPH, ORAC e ABTS Tai *et al.* (2012) observaram que o VA foi capaz de reprimir os três radicais. No ensaio de ORAC, o VA mostrou uma inibição parcial ao longo do tempo no perfil do decaimento da fluorescência e uma eliminação significativa do radical ABTS.

Libardi (2010), também que observou em seus estudos que o VA apresentou uma elevada reatividade frente ao radical DPPH. Kiliç & Yesiloglu (2013), ao avaliar a atividade antioxidante do *p*-CoA por diferentes metodologias analíticas, como DPPH, ABTS e FRAP, mostrou que o composto é eficiente na redução do percentual DDPH, ABTS e Fe^{3+} sugerido que o *p*-CoA pode ser utilizado na indústria alimentar e farmacológica devido a estas propriedades.

Em nossos dados, podemos observar que o *p*-CoA, apresentou elevada atividade antioxidante pelo método de ORAC e uma menor atividade pelos demais métodos, porém, todos com diferença significativa.

Ao avaliarmos o FA pelo ensaio de ABTS, podemos destacar uma elevada atividade antioxidante com média de 2803,00 $\mu\text{M Trolox} / \mu\text{Mol}$. O FA fornece hidrogênio para a neutralização dos radicais livres combatidos, o que lhe confere efeito antioxidante.

Marinova & Yanishlieva (1992) na tentativa de se elucidar as diferenças de potencial antioxidante existentes entre os ácidos fenólicos, realizou uma comparação quantitativa do comportamento cinético da inibição da oxidação de alguns ácidos benzóicos (ácidos *p*-hidroxibenzóico, VA, siríngico, e 3,4-

dihidroxibenzóico) e cinâmicos (ácidos *p*-CoA, FA, sinápico e cafeico). Concluíram que, a metoxila presente com a hidroxila no VA confere a ele uma pequena atividade antioxidante. Com referência aos ácidos cinâmicos, a presença de uma metoxila adjacente a hidroxila como ocorre no FA, aumenta o período de indução da oxidação duas vezes mais. Entretanto, o maior potencial antioxidante foi encontrado quando há duas hidroxilas nas posições 3 e 4 destes ácidos.

Devido aos diversos tipos de radicais e aos diferentes sítios de ação dos compostos, é possível concluir que dificilmente haverá um único método capaz de representar de forma segura e precisa a verdadeira atividade antioxidante de um composto, alimento ou fluido biológico.

Nossos dados confirmaram o que já é descrito na literatura em relação à elevada atividade antioxidante do 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA. Os métodos utilizados em nosso estudo para avaliar a atividade antioxidante destes compostos mostraram-se satisfatórios e adequados.

O câncer é caracterizado pela desregulação da apoptose, proliferação celular, invasão, angiogênese e metástases. É desejável que haja composto capaz de inibir a proliferação de células cancerígenas.

Em nosso trabalho, o efeito do 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA sobre a viabilidade de células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) foi investigado. A inibição da viabilidade celular por esses compostos, já foi descrita em outros estudos.

Gao *et al.* (2006), observaram que entre os principais ácidos fenólicos formados durante a fermentação bacteriana intestinal de chá verde, chá preto, frutas cítricas e flavonóides da soja, somente o ácido 3,4-DHPAA demonstrou atividade antiproliferativa em células de câncer de próstata e de cólon (HCT116). O 3,4-DHPAA inibiu significativamente ($P < 0,005$) as células cancerígenas do cólon (HCT116), quando comparadas a uma linhagem imortalizada de células normais do epitélio do intestino (IEC6) com IC_{50} 90 μ mol/L. A atividade antiproliferativa do 3,4-DHPAA pode ser devido a sua estrutura catecol.

Resultados semelhantes foi encontrado por Henning *et al.* (2013), onde observaram que a concentração plasmática de 3,4-DHPAA aumentou após a

ingestão de chá preto e quando testado *in vitro*, o 3,4-DHPAA demonstrou atividade antiproliferativa em células de câncer de cólon (HCT116).

Nossos resultados demonstraram uma redução significativa no percentual de células viáveis incubadas com 3,4-DHPAA, quando comparados ao controle, sendo, contudo, observadas diferenças estatísticas em relação às concentrações testadas.

O 3,4-DHPAA promoveu uma redução significativa no percentual de células viáveis, em torno de 66%, nas concentrações iguais ou maiores a 10 μM , 24 h após a incubação com um IC_{50} 5,4 μM .

Quando a linhagem celular foi incubada com FA, observou-se que o FA foi capaz de promover uma redução significativa (em torno de 35%) no percentual de células viáveis incubadas com as concentrações de 0,1 e 1,0 μM . Da mesma forma, foi observada uma redução significativa (média de 63,0%) no percentual de células viáveis nas concentrações iguais ou maiores que 5,0 μM .

Mori *et al.* (1999), relataram o efeito inibidor do FA no crescimento de células cancerígenas do cólon. Este efeito, foi confirmado por testes *in vivo* em ratos por Hudson *et al.* (2000).

Os potenciais benefícios do FA e de outros ácidos hidroxicinâmicos a saúde têm sido relacionados principalmente a sua atividade antioxidante. Os ácidos hidroxicinâmico podem proteger a LDL a partir de modificações oxidativas e assim reduzir a aterogênese. Eles também exibem efeitos inibitórios sobre a promoção tumoral e podem bloquear a formação de compostos mutagênicos tais como as nitrosaminas (Andreasen *et al.*, 2001).

Janicke *et al.* (2005) demonstram que o FA e *p*-CoA inibe a proliferação de células de Caco-2, ambos os compostos diminuíram o número de células de 43-75% depois 2-3 dias de tratamento. Estes resultados corroboram com os achados de Hudson *et al.* (2000), onde células SW480 (células de câncer de cólon) quando tratadas com FA tiveram redução da viabilidade celular.

Jaganathan *et al.* (2013), mostrou em seu estudo que no ensaio de MTT o *p*-CoA mostrou efeito inibitório sobre as células HCT-15 e HT-29 com um valor de IC_{50} de 1400 e 1600 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. O ensaio de formação de colônia, revelou que a inibição depende do tempo em que as células HCT-15 e HT-29 são expostas ao *p*-CoA. Estes dados corroboram com o estudo de Paudel *et al.* (2014),

no qual relataram que o *p*-CoA apresentou atividade antiproliferativa nas células HT-29.

Ferguson *et al.*(2005), também relataram que células HT-29 que receberam tratamento com *p*-CoA tiveram o crescimento celular reduzido e a eliminação de radicais livres induzida.

Podemos observar em nossos dados, que quando a linhagem celular foi incubada com *p*-CoA, já nas menores concentrações o *p*-CoA foi capaz de promover uma redução significativa no percentual de células viáveis, quando comparadas as células controle. Nas concentrações maiores, esse percentual de redução não foi alterado, as células mantiveram o mesmo percentual de redução (em torno de 40%).

Dentre os compostos por nós estudados, o VA foi o que apresentou menor percentual de redução da viabilidade das células HT-29, um percentual médio de 23%.

Ho *et al.*(2009), testaram o efeito do VA e vanilina na viabilidade celular de células de câncer de cólon. A vanilina mostrou efeito citolítico e citostáticos no modelo HT-29, enquanto que o VA não mostrou qualquer citotóxico ou citostático na concentração de até 500 µg/ml.

Há poucos dados na literatura acerca do efeito citotóxico do VA, o que nos impossibilita de realizar uma ampla discussão sobre este composto.

Os dados obtidos em nosso estudo através do ensaio de MTT corroboram com os dados obtidos através da quantificação celular pela câmara de Neubauer, onde os compostos apresentaram a seguinte ordem na redução da viabilidade celular: 3,4-DHPAA>FA> *p*-CoA>VA. Os dados existentes na literatura e os encontrados em nosso estudo sugerem que o 3,4-DHPAA, FA e *p*-CoA possam desempenhar um papel de agente inibidor da viabilidade celular e preventivo na proliferação de células de câncer de cólon humano.

A desregulação no controle do ciclo celular é um aspecto fundamental no desenvolvimento do câncer. As células normais apenas proliferam em resposta ao desenvolvimento da célula ou a sinais presentes na mitose que indicam um requisito para o crescimento do tecido, enquanto que a proliferação das células cancerosas procede essencialmente sem controle. Isto indica que as células cancerosas proliferam devido a presença de defeitos de sinalização internos e/ou externos

(Nakayama & Nakayama, 2006). Sabe-se que as células cancerosas perdem a capacidade de regular seu ciclo celular e, assim, controlar a sua taxa de proliferação. Um passo limitante no ciclo celular, que muitas vezes não é regulada no câncer, é a progressão de células na primeira fase (G1) do ciclo para a fase S (Borojevic *et al.*, 2010). Falhas no processo da regulação do ciclo celular podem levar a uma proliferação maior de células cancerosas, enquanto que esforços realizados para corrigir este problema, levam a um retardo no crescimento e indução da morte celular (Palozza *et al.*, 2009).

Estudos anteriores mostraram que células HCT-15 quando tratadas com *p*-CoA mostraram acumulação crescente de células apoptóticas na fase sub-G1 e uma diminuição da fase G0/G1 do ciclo celular. Quando observadas com fotomicrografia eletrônica de varredura, as células HCT-15 mostraram sinais de apoptose como prolongamentos (blebs) e encolhimento após exposição a *p*-CoA. Além disso, houve um aumento da produção de EROS, que quando induzida por compostos fenólicos induz a apoptose através da ativação de MAPK (Jaganathan *et al.*, 2013).

Janicke *et al.* (2010) investigaram os efeitos do FA e *p*-CoA sobre a expressão gênica em células Caco-2. As células Caco-2 foram tratadas com 150 μ M de FA ou *p*-CoA durante 24 h. Um total de 517 genes foram significativamente afetados pelo FA e 901 pelo *p*-CoA, genes estes que estão envolvidos com a progressão do ciclo celular.

Da mesma forma, Janicke *et al.* (2005), ao avaliarem também o efeito do FA e *p*-CoA sobre as fases do ciclo celular, demonstram que cada composto diminuiu a proporção de células na fase G1 e aumentou a porcentagem de células nas fases S e G2. O tratamento com 1500 μ M de FA aumentou significativamente a duração da fase S, enquanto o *p*-CoA não. Com isto, concluiu-se que FA e *p*-CoA inibem a proliferação celular pelo fato de afetar as diferentes fases do ciclo celular, o que requer novas investigações, porque esta inibição pode ser uma explicação para proteção contra o câncer.

Em nosso trabalho, a análise do ciclo celular revelou que o 3,4-DHPAA, nas concentrações de 10 μ M e 100 μ M, aumentou a proporção de células HT-29 na fase G0/G1 e, reduziu o percentual de células presente nas fases S e G2/M, 24h pós-incubação, quando comparadas ao controle.

Estes dados sugerem uma parada de ciclo celular na fase G0/G1, onde as células ficam impossibilitadas de chegarem à etapa de mitose e se multiplicarem. Com a parada do ciclo na fase G0/G1, pressupõe-se que um menor número de células prossiga no ciclo e alcance as fase S e G2/M, ocasionando conseqüentemente, a redução no percentual de células observado nesta fase.

A parada de ciclo celular na fase G0/G1, justifica o fato do 3,4-DHPAA não ter causado apoptose de células HT-29 em nosso estudo.

Os resultados encontrados na análise do ciclo celular do 3,4-DHPAA relacionam-se, de forma positiva aos resultados de viabilidade anteriormente descritos, assim como, aos dados da literatura científica.

Em nosso trabalho, a análise de ciclo celular dos VA e FA revelou uma diminuição da proporção de células em fase G0/G1 nas concentrações de 10 μ M e 100 μ M, em 24 horas pós-tratamento. Além disso, o VA não promoveu um aumento do percentual de células apoptóticas (inicial e tardia).

Nossos dados revelaram ainda que o FA diminuiu o percentual de células viáveis na concentração de 10 μ M, promoveu um alongamento da fase S e uma diminuição da fase G2/M do ciclo celular, com um aumento do percentual de células apoptóticas (inicial e tardia). Na concentração de 100 μ M, esse percentual de células apoptóticas foi reduzido e acrescido de um aumento de células não-apoptóticas.

Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas em: apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica e senescência. Alterações na coordenação desses tipos de morte celular estão implicadas na tumorigênese (Grivicich *et al.*,2007).

A necrose é um tipo de morte na qual as células sofrem um insulto que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e conseqüente ruptura celular. Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando dano às células vizinhas e uma reação inflamatória no local (Ziegler & Groscurth, 2004).

A apoptose é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células supérfluas ou defeituosas. Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas características desse tipo de morte celular. Tais alterações incluem a retração da célula, perda de aderência

com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos. Muitas são as moléculas envolvidas no controle das vias de ativação da apoptose, dentre estas, as proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas, além das caspases. Esse fenômeno biológico, além de desempenhar um papel importante no controle de diversos processos vitais, está associado a inúmeras doenças, como o câncer. A compreensão dos mecanismos apoptóticos permite o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento do câncer. Tais estratégias são embasadas na indução da morte nas células tumorais e em uma maior resposta aos tratamentos com radiação e agentes citotóxicos (Parolin & Reason, 2001).

Como a apoptose é o ponto final de pelo menos uma das vias de diferenciação das células epiteliais do cólon, um processo que resulta em morte celular por apoptose também deve minimizar o sinal proliferativo. De fato, em nosso modelo, o aumento da taxa de morte celular por apoptose, após 24 horas de incubação com *p*-CoA, foi acompanhado por um aumento de células na fase G2/M do ciclo celular.

Dado o exposto, os dados apresentados neste trabalho mostraram que os ácidos fenólicos podem desempenhar importante papel na redução da viabilidade celular, na modulação do ciclo celular e no controle da progressão tumoral, via indução da apoptose.

7. CONCLUSÃO

A literatura científica atual sobre os ácidos 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA ainda é escassa, mas o que se tem relatado até o momento, demonstra um importante papel destes compostos como potentes antioxidantes, podendo ser utilizados na prevenção de diversas doenças entre estas o câncer.

Este estudo confirmou a capacidade antioxidante destes compostos, bem como, demonstrou que os mesmos são capazes de promover modificações específicas no ciclo celular e aumento da taxa de apoptose de células de adenocarcinoma de cólon humano. O 3,4-DHPAA foi capaz de atuar positivamente na redução da viabilidade celular, de promover modificações específicas no ciclo celular, através da parada de ciclo celular na fase G0/G1 e diminuição na fase G2/M.

Os dados deste trabalho indicam que o efeito antiproliferativo do 3,4-DHPAA, *p*-CoA, VA e FA parecem ser influenciados pela concentração do composto, captação e metabolismo celular dos mesmos.

Neste sentido, o aprofundamento de estudos em modelos animais e novos ensaios *in vitro* sobre a possível proteção dos ácidos fenólicos no processo de tumorigênese, ajudará a entender outros mecanismos ainda não elucidados por este trabalho.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, L.T. *et al.* Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 27, 394-400(2007).

Adam, A. *et al.* The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. **The Journal of nutrition** 132, 1962–8 (2002).

Alteri, R. *et al.* Colorectal Cancer Facts & Figures 2011-2013. **American Cancer Society** (2011).

Alteri, R. *et al.* Colorectal Cancer Facts & Figures 2014-2016. **American Cancer Society** (2014).

Alberts, B. *et al.* Molecular biology of the cell. 4th ed. **Garland Science** (2002).

Andreasen, M. F. *et al.* Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. **Free Radical Biology and Medicine** 31, 304–314 (2001).

Anjo, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **J Vasc Br** 3, 145–154 (2004).

Anselmi, C. *et al.* Interaction of ferulic acid derivatives with human erythrocytes monitored by pulse field gradient NMR diffusion and NMR relaxation studies. **Chemistry and Physics of Lipids** 134, 109–117 (2005).

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Signs and Symptoms of Colon Cancer.** Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/news/signs-and-symptoms-of-colon-cancer>>. Acesso em: 30 de Junho de 2016.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Tests for colorectal cancer.** Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/detailedguide/colorectal-cancer-diagnosis>> Acesso em: 01 de julho de 2016.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Colorectal cancer stages. Disponível em : <<http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/detailedguide/colorectal-cancer-staged>>. Acesso em: 01 de Julho de 2016.

Archivio, M. D. *et al.* Polyphenols , Dietary sources and bioavailability. **Ann Ist Super Sanità** 43, 348–361 (2007).

Azuma, K. *et al.* Absorption of Chlorogenic Acid and Caffeic Acid in Rats after Oral Administration. **J. Agric. Food Chem** 48, 5496–5500 (2000).

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology** 28, 25-30(1995).

Batista, R. R. *et al.* Indicações de colonoscopia versus achado de pólipos e neoplasias colorretais. **Rev bras Coloproct** 31, 64–70 (2011).

Bivic, A., Hirna, M., Reggio, H. HT-29 cells are an in vitro model for the generation of cell polarity in epithelia during embryonic differentiation. **Cell Biology** 85, 136–140 (1988).

Borojevic, R. *et al.* Influência dos carotenóides na proliferação e ciclo celular de linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia** 43, 152-153 (2010).

Bouzaiene, N. *et al.* The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. **European Journal of Pharmacology** 766, 99–105 (2015).

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Falando Sobre Câncer e Seus Fatores de Risco. **Coordenação Nacional De Controle De Tabagismo – CONTAPP** (1996).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Falando sobre câncer do intestino. **Instituto Nacional de Câncer** (2003).

Brown, E.M. *et al.* Mechanisms Underlying the Anti-Proliferative Effects of Berry Components in Vitro Models of Colon Cancer. **Current Pharmaceutical Biotechnology** 13, 200–209 (2012).

Cabral, C. M. & Gruezo, N. D. Ingestão de Cálcio e Vitamina D e Risco de Câncer Colorretal : uma Revisão Bibliográfica. **Revista Brasileira de Cancerologia** 56, 259–266 (2010).

CANADIAN CANCER SOCIETY. **Treatments for colorectal cancer.** Disponível em :<
<http://www.cancer.ca/en/cancerinformation/cancertype/colorectal/treatment/?region=on>>. Acesso em: 6 de Julho de 2016.

Carrasco-Pozo, C., Gotteland, M., Castillo, R. L., Chen, C. 3,4-Dihydroxyphenylacetic Acid, a Microbiota-Derived Metabolite of Quercetin, Protects Against Pancreatic B-Cells Dysfunction Induced By High Cholesterol. **Experimental Cell Research** 334, 270–282 (2015).

Chan, A. T. & Giovannucci, E.L. Primary prevention of colorectal cancer. **Gastroenterology** 138, 2029–2043 (2010).

Cheyrier, V. Phenolic compounds: from plants to foods. **Phytochem Ver.** 11, 153-177(2012).

Chou, T., Ding, H., Hung, W. J., Liang, C. Antioxidative characteristics and inhibition of α -melanocyte-stimulating hormone-stimulated melanogenesis of vanillin

and vanillic acid from *Origanum vulgare*. **Experimental Dermatology** 19, 742–750 (2010).

Cohen, E., Ophir, I., Shaul, Y. B. Induced differentiation in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line. *Journal of cell science* 112, 2657–2666 (1999).

Cordeiro, F. *et al.* Diagnóstico, Estadiamento e Tratamento Cirúrgico e Multidisciplinar do Câncer Colorretal. **Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina Diagnóstico** 50, 10–12 (2001).

Cotti, G. C. castro *et al.* Genética do câncer colorretal. **Rev Med** (São Paulo) 79, 45–64 (2000).

Cremin, P., Kasim-Karakas, S., Waterhouse, A. L. LC/ES-MS detection of hydroxycinnamates in human plasma and urine. **Journal of agricultural and food chemistry** 49, 1747–50 (2001).

Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural product reports** 26, 1001–1043 (2009).

Faria, M.H.G. & Rabenhorst, S. H. B. Impacto do oncogene C-MYC no câncer. **Revista Brasileira De Cancerologia** 52, 165–171 (2006).

Farah, A. *et al.* Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. **J. Nutr.** 138, 2309-2315(2008).

Ferguson, L. R., Zhu, S., Harris, P. J. Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells. **Molecular nutrition & food research** 49, 585–93 (2005).

Fiuza, S. M. *et al.* Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties - a structure-activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** 12, 3581–3589 (2004).

Fonseca, L.M *et al.* Câncer colorretal – resultados da avaliação patológica padronizada de 521 casos operados no Hospital das Clínicas da UFMG. *Rev Bras Coloproct* 31,17–25(2011).

Forgue-Lafitte, M. E. *et al.* Proliferation of the Human Colon Carcinoma Cell Line HT29 : Autocrine Growth and Deregulated Expression of the c- myc Oncogene. **Cancer research** 49, 6566–6571 (1989).

Gao, K. *et al.* Of the Major Phenolic Acids Formed during Human Microbial Fermentation of Tea , Citrus , and Soy Flavonoid Supplements , Only 3,4-Dihydroxyphenylacetic Acid Has Antiproliferative Activity. **Journal of Nutrition** 136, 52–57 (2006).

Gingras, D. & Béliveau, R. Colorectal cancer prevention through dietary and lifestyle modifications. **Cancer Microenvironment** 4, 133–139 (2011).

Gitzinger, M. *et al.* The food additive vanillic acid controls transgene expression in mammalian cells and mice. **Nucleic Acids Research** 40, 1–15 (2012).

Goel, A., Boland, C. R., Chauhan, D. P. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by dietary curcumin in HT-29 human colon cancer cells. **Cancer Letters** 172, 111–118 (2001).

Grivicich, I., Regner, A., Rocha, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancrologia** 53, 335–343 (2007).

Gunasekaran, S. *et al.* Protective effect of p-methoxycinnamic acid, an active phenolic acid against 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis: modulating biotransforming bacterial enzymes and xenobiotic metabolizing enzymes. **Molecular and Cellular Biochemistry** 394, 187–198 (2014).

Haas, P. *et al.* Possíveis Mecanismos de Ação dos Grãos Integrais na Prevenção do Câncer Colorretal. **Estud. Biol** 28, 113–119 (2006).

Henning, S. M. *et al.* Phenolic acid concentrations in plasma and urine from men consuming green or black tea and potential chemopreventive properties for colon cancer. **Molecular Nutrition and Food Research** 57, 483–493 (2013).

Hendges, D. J. B., Stoll, R. R. & Moreschi, C. A Influência de Hábitos e Estilo de Vida no Surgimento de Neoplasias Malignas - Uma revisão de Literatura. **Revista Destaque Acadêmicos** 5, 121–130 (2013).

Ho, K., Yazan, L. S., Ismail, N., Ismail, M. Apoptosis and cell cycle arrest of human colorectal cancer cell line HT-29 induced by vanillin. **Cancer Epidemiology** 33, 155–160 (2009).

Holt, P. R. New insights into calcium, dairy and colon cancer. **World Journal of Gastroenterology** 14, 4429–4433 (2008).

Howard, R. A. *et al.* Physical activity, sedentary behavior, and the risk of colon and rectal cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. **Cancer Causes Control** 19, 939–953 (2008).

HUANG, D., OU, B., PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.

Hudson, E.A *et al.* Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention** 9, 1163–70 (2000).

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço**. Brasil. Rio de Janeiro: 3. ed. Ver (1999).

INCA- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Prevenção e Controle de Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia** 48, 317–332 (2002).

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Prevenção e controle do câncer: normas e recomendações do INCA. **Rev Bras Cancerol** 49,207(2003).

INCA - Instituto Nacional de Câncer de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016. Incidência de Câncer no Brasil. **Ministério da Saúde. Brasil**. Rio de Janeiro, 2015.

Jaganathan, S. K., Supriyanto, E., Mandal, M. Events associated with apoptotic effect of p -Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. **World J Gastroenterol** 19, 7726–7734 (2013).

Janicke, B. *et al.* The Antiproliferative Effect of Dietary Fiber Phenolic Compounds Ferulic Acid and p-Coumaric Acid on the Cell Cycle of Caco-2 Cells. **Nutrition and Cancer** 63, 611–622 (2011).

Janicke, B., Onning, G., Oredsson, S. M. Differential effects of ferulic acid and p-coumaric acid on S phase distribution and length of S phase in the human colonic cell line Caco-2. **Journal of agricultural and food chemistry** 53, 6658–65 (2005).

Jayaprakasam, B *et al.* Impact of alkyl esters of caffeic and ferulic acids on tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzyme, and lipid peroxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 54, 5375–5381 (2006).

Kawabata, K. *et al.* Modifying effects of Terminalia catappa on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. **Cancer Letters** 157, 15–21 (2000).

Kiliç, I. & Yesiloglu, Y. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p -coumaric acid β . **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** 115, 719–724 (2013).

Konishi, Y., Zhao, Z., Shimizu, M. Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates. **Journal of agricultural and food chemistry** 54, 7539–43 (2006).

Lafay, S. *et al.* Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. **The Journal of nutrition** 136, 1192–7 (2006).

Latifah, S. Y. *et al.* Germinated brown rice (GBR) reduces the incidence of aberrant crypt foci with the involvement of β -catenin and COX-2 in azoxymethane-induced colon cancer in rats. **Nutrition Journal** 9, 1–8 (2010).

Larrosa, M. *et al.* Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. **Mol. Nutr. Food Res** 53, 1044–1054 (2009).

LAU, P. & SUNG, J. Screening for colorectal cancer. **Chin j dig dis.** 5, 87–92(2004).

Levin, B. *et al.* Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008: A Joint Guideline From the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. **CA A Cancer Journal for Clinicians** 58, 130 – 160 (2008).

LIBARDI, S.H. Atividade antioxidante da vanilina e do ácido vanílico e o efeito da complexação por proteínas do soro do leite na desativação de radicais e ferrilmioglobina em condições simulando o trato gastrointestinal. **Dissertação Mestrado** (2010).

Liu, R. H. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. **The Journal of nutrition** 134,3479–3485 (2004).

Liu, R. H. Dietary Bioactive Compounds and Their Health Implications. **Journal of Food Science** 78, A18–A25 (2013).

Machado, V. F *et al.* A review of experimental models of colorectal carcinogenesis. **j coloproctol** 36, 53–57 (2016).

Manach, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American journal of clinical nutrition** 79, 727–747 (2004).

Manach, C. *et al.* Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans . I . Review of 97 bioavailability studies. **The American journal of clinical nutrition** 81, 230–242 (2005).

Malacrida,C.R.,Motta,S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 25, 659-664(2005).

Marinova, E.M., Yanishlieva, N.V. Inhibited oxidation of lipids II: Comparison of the antioxidative properties of some hydroxy derivatives of benzoic and cinnamic acids. **Fett-Wissenschaft Technologie** 94,428-432 (1992).

Melo, M. & Braga, R. DO Rastreio do cancro do cólon e do recto. **Rev Port Clin Gera** 19, 471–482 (2003).

Mensor, L. L. *et al.* Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research** 15, 127-130 (2001).

Miene, C., Weise, A., Gleis, M. Impact of polyphenol metabolites produced by colonicmicrobiota on expression of COX-2 and GSTT2 in human colon cells (LT97). **Nutr Cancer** 63 ,653–62(2011).

Monagas, M. *et al.* Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. **Food & function** 1, 233–253 (2010).

Monteiro, M. *et al.* Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. **J. Nutr.** 137,2196–2201(2007).

Mori, H. *et al.* Chemopreventive effects of ferulic acid on oral and rice germ on large bowel carcinogenesis. **Anticancer Res.** 19,3775–3783 (1999).

Morson, B. C., Bussey, H. J. R., Hill, M. J. Aetiology of Adenoma-Carcinoma Sequence in Large Bowel. **The Lancet** 245–247 (1976).

Moraes, S.A. & Alves, S.B. Quantificação de inoculo de patógenos de insetos. **Controle Microbiano de Insetos.** cap. 14,278- 288(1986).

Mosman, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.** 65,55-63(1983).

Murad, L. D. *et al.* Effects of Caffeic and 5-Caffeoylquinic Acids on Cell Viability and Cellular Uptake in Human Colon Adenocarcinoma Cells. **Nutrition and Cancer** 67, 532–542 (2015).

Nakayama, K. I. & Nakayama, K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. **Nature Reviews Cancer** 6, 369–381 (2006).

NCI – NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Tests to Detect Colorectal Cancer and Polyps,** 2014. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/types/colorectal/screening-fact-sheet>> Acesso em: 01 de julho de 2016.

Oliveira, D. M. & Bastos, D. H. M. B. Biodisponibilidade de Ácidos Fenólicos. **Quim nova** 34, 1051–1056 (2011).

Olthof, M. R., Hollman, P. C.,Katan, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **The Journal of nutrition** 131, 66–71 (2001).

Palozza, P. *et al.* Effect of beta-carotene-rich tomato lycopene beta-cyclase (tlcy-b) on cell growth inhibition in HT-29 colon adenocarcinoma cells. **Br. J. Nutr.** 102, 207-214 (2009).

Parolin, M. B. & Reason, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia** 38, 138–144 (2001).

Paudel, L. *et al.* NMR-Based Metabolomic Investigation of Bioactivity of Chemical Constituents in Black Raspberry (*Rubus occidentalis* L.) **Fruit Extracts. Journal of agricultural and food chemistry** 62, 1989–1998 (2014).

Pérez-Jiménez, J. *et al.* Urinary metabolites as biomarkers of polyphenol intake in humans: a systematic review. **The American journal of clinical nutrition** 92, 801–9 (2010).

Piazzon, A. *et al.* Antioxidant Activity of Phenolic Acids and Their Metabolites: Synthesis and Antioxidant Properties of the Sulfate Derivatives of Ferulic and Caffeic Acids and of the Acyl Glucuronide of Ferulic Acid. **J. Agric. Food Chem** 60, 12312–12323 (2012).

Pinho, M. S. L. A estória biomolecular do pólipo adenomatoso. **Rev bras Coloproct** 26, 197–203 (2005).

Pozo-Insfran, D. DEL., Percival, S. S., Talcott, S. T. (*Euterpe oleracea* Mart .) Polyphenolics in Their Glycoside and Aglycone Forms Induce Apoptosis of HL-60. **J.Agric.FoodChem.** 54, 1222–1229 (2006).

Prior, R.L. *et al.* Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. **J. Agric. Food Chem.** 51, 3273–3279 (2003).

Raneva, V., Shimasaki, H., Ishida, Y., Ueta, N., Niki, E. Antioxidative activity of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and caffeic acid in rat plasma. **Lipids** 36, 1111–1116 (2001).

Riihinen, K. Phenolic Compounds in Berries. **Kuopio University publications** (2005).

Robbins, S.L., Cotran, R.S., Kumar, V. Pathologic basis of disease. 6th ed. **WB Saunders Company** (1998).

Rondini, L. *et al.* Sulfated ferulic acid is the main in vivo metabolite found after short-term ingestion of free ferulic acid in rats. **Journal of agricultural and food chemistry** 50, 3037–41 (2002).

Rosa, L. S. *et al.* Anticancer Properties of Phenolic Acids in Colon Cancer – A Review. **Journal of Nutrition & Food Sciences** 06, 1–7 (2016).

RUBACK, K. **Dissertação de Mestrado**, Technische Universitat, Berlin, 1969.

Rufino, M.S.M. *et al.* Metodologia científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro FRAP. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**. Comunicado Técnico, 125 (2006).

Rufino, M.S.M. *et al.* Metodologia científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical livre ABTS. **Embrapa Agroindústria Tropical**. Comunicado Técnico, 128 (2007).

Russell, W. & Duthie, G. Influences of food constituents on gut health Plant secondary metabolites and gut health: the case for phenolic acids. **Proceedings of the Nutrition Society** 70, 389–96 (2011).

Scalbert, A., Williamson, G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. **The Journal of nutrition** 130, 2073–2085 (2000).

Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **Am. J. Clin. Nutr.** 81, 215S-217S (2005).

Segnan, N. *et al.* Randomized trial of different screening strategies for colorectal cancer: Patient response and detection rates. **Journal of the National Cancer Institute** 97, 347–357 (2005).

Senawong, T. *et al.* Phenolic acid composition and anticancer activity against human cancer cell lines of the commercially available fermentation products of *Houttuynia cordata*. **Science Asia** .40, 420-427. (2014)

Sobin, L.H., Gospodarowicz, M.K., Wittekind, Ch. TNM Classification of Malignant Tumours. **Wiley Blackwell** 1 (2010).

Spence, R. A. J., Johnston, P. G. **Oncologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan(2003) .

Subbaramaiah, K. & Dannenberg, A. J. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. **Trends Pharmacol. Sci.** 24,96–102(2003).

Tai, A., Sawano, T., Ito, H. Antioxidative Properties of Vanillic Acid Esters in Multiple Antioxidant Assays. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 76, 314–318 (2012).

Taiz, L., & Zeiger, E. Plant Physiology. **Sinauer Associates** 3, 690 (2002).

Torres Y Torres, J. L. & Rosazza, J. P. Microbial transformations of p-coumaric acid by *Bacillus megaterium* and *Curvularia lunata*. **Journal of natural products** 64, 1408–14 (2001).

Vindelov, L.L. Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei. **Virchows Arch B Cell Pathol.** 24, 227–242(1977).

Winawer, S. *et al.* Colorectal cancer screening and surveillance: Clinical guidelines and rationale - Update based on new evidence. **Gastroenterology** 124, 544–560 (2003).

Zandoná, B. *et al.* Prevalência de adenomas colorretais em pacientes com história familiar para câncer colorretal. **Rev bras Coloproct** 31, 147–154 (2011).

Ziegler, U & Groscurth, P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci** 19, 124-28 (2004).

ANEXO A - ARTIGO INTITULADO “Anticancer Properties of Phenolic Acids in Colon Cancer – A Review”, PUBLICADO NA REVISTA Nutrition & Food Sciences, EM FEVEREIRO DE 2016.



Anticancer Properties of Phenolic Acids in Colon Cancer – A Review

Rosa LS^{1*}, Silva NJA¹, Soares NCP², Monteiro MC³ and Teodoro AJ¹

¹Food and Nutrition Master Program, Nutritional Biochemistry Core, Federal University of Rio de Janeiro State, Rio de Janeiro, Brazil

²Science Food Program, Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

³Nutrition Program, Laboratory of Functional Foods, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

*Corresponding author: Rosa LS, Escola de Nutrição, Laboratório de Bioquímica Nutricional, Av. Pasteur 276, Bloco II, 2º andar, Urca, Rio de Janeiro, RJ 22290-240, Brazil. Tel: 55-21-2542-7236, 55-21-2542-7276; E-mail: lanarosa@gmail.com

Rec Date: Jan 28, 2016; Acc Date: Feb 19, 2016; Pub Date: Feb 29, 2016

Copyright: © 2016 Rosa LS, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Consumption of fruits and vegetables is associated with lower risk of several cancers, particularly colorectal cancer, which is mainly associated to their phytochemical content. A diverse range of phytochemicals, especially phenolic compounds, has been reported to possess important biological properties such as anticancer, antiviral, antioxidant and anti-inflammatory activities. Several factors contribute to the development of colorectal cancer. The scientific evidences support the genetic predisposition, diet, and lifestyle as some of the major contributing factors for colorectal cancer development. In this sense, this review aims to summarize the anticancer activities and the proposed mechanisms of action of phenolic acids with an emphasis in colon cancer through *In vitro* evidences. The evidences supports the theory of anticancer properties of phenolic acids, although the mechanisms are still not fully understood, but may include scavenging free radicals, induction of enzymes involved in the metabolism of xenobiotics, regulation of gene expression, modulation of cellular signaling pathways including those involved in DNA damage repair, cell proliferation, apoptosis and invasion.

Keywords: Cancer; Phenolic acids; Colon; Bioactive compounds; Functional food; Caffeic acid

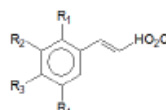
Introduction

In the last few years, some studies have reported that the diet possesses an important role in the etiology of colorectal cancer. Epidemiological evidences suggest that diets rich in fruits and vegetables, which have high contents of phytochemical compounds, may contribute to reduce the risk of certain cancers. Regarding the colon cancer, the influence of antioxidant compounds present in foods is one of the factors with extensive discussion in the literature [1].

A wide variety of bioactive compounds, especially phenolic compounds have been reported to possess important biological properties such as anticancer, antiviral, antioxidant and anti-inflammatory activities. The potential biological effects of various constituents of fruits and vegetables suggested a plausible mechanism for protective effects, such as by reducing oxidative damage of DNA or increasing the activity of enzymes able to detoxify carcinogens [2,3].

Phenolic acids are import constituents of plants found in a wide range of commonly consumed plant foods such as fruits, vegetables, cereals, legumes and beverages. The main functions of phenolic acids in plants are pigmentation, growth, reproduction and resistance to pathogens [4].

In plants, phenolic acids are derived from an ortho oxygenation and subsequent methylation substitution of cinnamic acid. These gives rise to the most common hydroxycinnamic acids, namely: p-coumaric, caffeic, ferulic and sinapic acids (Figure 1). These are often considered as intermediates of lignin biosynthesis. However, they are also the important building blocks of many other natural products and are often found as specific esters (e.g. chlorogenic acid) [5].



Radical	Hydroxycinnamic acid
R ₁ = R ₂ = R ₃ = R ₄ = H	Cinnamic acid
R ₁ = R ₂ = R ₄ = H; R ₃ = OH	p-Coumaric acid
R ₁ = R ₂ = H; R ₃ = R ₄ = OH	Caffeic acid
R ₁ = R ₂ = H; R ₃ = OH; R ₄ = OCH ₃	Ferulic acid
R ₁ = H; R ₂ = R ₄ = OCH ₃ ; R ₃ = OH	Sinapic acid

Figure 1: Chemical structure of hydroxycinnamic acid derivatives.

Hydroxybenzoic acids can be formed directly from intermediates early in the shikimate pathway. However, in plants they are more frequently formed by degradation of C₆C₃ cinnamic acid derivatives. Commonly found examples are p-hydroxybenzoic protocatechuic, vanillic and syringic acids (Figure 2). Less abundant are hydroxyphenylacetic acids (the C₆C₂ derivatives). Generally, they are observed to have the same substitution pattern as observed for the hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids, but the direct route to their biosynthesis is unclear. Phenolic acids can be found in plants not only in their free form but also conjugated (predominantly by esterification) to a variety of molecules including simple sugars, organic acids and plant polymers [5].

