

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

DANIEL DE CASTILHO DA SILVA

**ATIVIDADE ANTITUMORAL PROFILÁTICA E TERAPÊUTICA
DA RUTINA E DA ISOQUERCITINA SOBRE O
ADENOCARCINOMA COLORRETAL. ESTUDO
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS ATÍMICOS**

Bragança Paulista
2016

DANIEL DE CASTILHO DA SILVA – RA 001201402018

**ATIVIDADE ANTITUMORAL PROFILÁTICA E TERAPÊUTICA
DA RUTINA E DA ISOQUERCITINA SOBRE O
ADENOCARCINOMA COLORRETAL. ESTUDO
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS ATÍMICOS**

Defesa de Mestrado apresentada no Curso de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Dra. Denise Gonçalves Priolli

Bragança Paulista
2016

QV 269 Silva, Daniel de Castilho da.
S579a Atividade antitumoral profilática e terapêutica da rutina e da isoquercitina sobre o adenocarcinoma colorretal: estudo experimental em camundongos atímicos / Daniel de Castilho da Silva. – Bragança Paulista, 2016.
69 p.

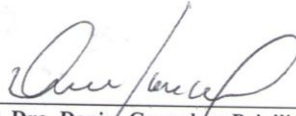
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Denise Gonçalves Priolli.

1. Flavonoides. 2. Ensaios Antitumorais Modelo de Xenoenxerto. 3. Citotoxinas. 4. Transplante Heterólogo. 5. Neoplasias. 6. Rutina. I. Priolli, Denise Gonçalves. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

SILVA, C., Daniel, “Atividade Antitumoral Profilática e Terapêutica da Rutina e da Isoquercitina sobre o Adenocarcinoma Colorretal. Estudo Experimental em Camundongos Atímicos”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 26 de Agosto de 2016 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dra. Denise Gonçalves Priolli
Universidade São Francisco



Prof. Dra. Juliana Carvalho Santos
UNICAMP



Prof. Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero
Universidade São Francisco

DEDICATÓRIA

Às professoras Denise Gonçalves Priolli e Natália Peres Martinez,
pelo incentivo nesta fase acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Denise Gonçalves Priolli, pela inspiração e dedicação.

Aos meus pais, José Maria Correia da Silva e Denise de Castilho da Silva, pelo apoio incondicional.

Aos meus alunos, pela motivação.

RESUMO

Introdução: Nos últimos anos têm-se intensificado as pesquisas de novos compostos que possam atuar no tratamento de diversos tipos de câncer. Entre os possíveis agentes com atividade antitumoral estão alguns flavonoides, compostos fenólicos amplamente distribuídos na natureza e presentes na maioria dos alimentos da dieta humana. Estudos epidemiológicos e ensaios clínicos em humanos indicam que os flavonoides têm efeitos importantes na quimioprevenção do câncer e quimioterapia como terapêutica anticâncer em potencial. Alguns mecanismos têm sido apontados, incluindo inativação da carcinogênese, atividade antiproliferativa, parada do ciclo celular, indução de apoptose e diferenciação, inibição da angiogênese, antioxidação e reversão da resistência a múltiplas drogas ou uma combinação desses mecanismos. **Objetivos:** Avaliar em modelo animal de adecarcinoma de cólon humano se os flavonóis Rutina e Isoquercitina administrados de forma profilática e terapêutica apresentam-se como agentes antitumorais, influenciam no peso corporal, agem sobre a peroxidação lipídica no tumor, possuem potencial para modificar a expressão da TP53 mutada. **Método:** Os compostos foram utilizados de forma terapêutica e profilática. O grupo controle não recebeu tratamento. A atividade antitumoral foi verificada pela curva de crescimento tumoral; o peso foi aferido diariamente. Peroxidação lipídica foi avaliada pelo método do TBARS. Diagnóstico anatomopatológico foi realizado por histopatologia convencional (HE) e estudo imunohistoquímico para determinação da expressão da TP53. **Resultados:** Observou-se inibição de crescimento tumoral no grupos: profilaxia com Isoquercitina ($p=0.04$), terapia com Isoquercitina ($p=0.03$) e terapia com Rutina ($p=0.00$). Não houve diferença na peroxidação lipídica entre os grupos teste e controle. Houve perda de peso significativa nos grupos Rutina e Isoquercitina profilaxia em relação ao Controle ($p=0.00$), assim como ganho de peso no grupo Isoquercitina terapia ($p=0.00$). Houve diferença na expressão da TP53 mutada em relação ao controle nas diferentes formas de administração ($p<0.05$). **Conclusão:** Rutina e Isoquercitina são biocompostos de ação antitumoral; a variação do peso dos animais parece mais relacionada a ação antitumoral e diminuição do volume do tumor do que a ação dos biocompostos testados; não houve ação antioxidante ou pró-oxidante no adenocarcinoma de cólon sob ação da Rutina e Isoquercitina administradas de forma terapêutica ou profilática quando avaliada pelo método do TBARS; Rutina e da Isoquercitina terapêuticas e profiláticas são capazes de promoverem a diminuição da imunoexpressão da TP53 mutada.

Palavras Chave: Flavonoides, Atividade citotóxica, Neoplasias, Xenotransplante, Ensaios Antitumorais Modelo de Xenoenxerto

ABSTRACT

Introduction: In the last years have intensified the search for new compounds that can be effective in treating various types of cancer. Possible agents with antitumor activity are some flavonoids, phenolic compounds widely distributed in nature and present in most human food diet. Epidemiological studies and clinical trials in humans indicate that flavonoids have important effects on cancer chemoprevention and chemotherapy as a potential anticancer therapy. Some mechanisms have been identified, including inactivation of carcinogenesis, antiproliferative activity, cell cycle arrest, apoptosis induction and differentiation, inhibition of angiogenesis, anti-oxidation and reversal of multidrug resistance, or a combination of these mechanisms.

Objective: Evaluate in an animal model of human colon adenocarcinoma if Rutin and Isoquercetin flavonoids in prophylactic and therapeutic administration present themselves as anti-tumor agents, influence on body weight, tumor lipid peroxidation and the potential to modify TP53 mutation expression. **Method:** The compounds were used as therapy or prophylaxis. The control group didn't receive treatment. The antitumor activity was verified by the tumor growth curve. Lipid peroxidation was evaluated by the TBARS method. Histopathological diagnosis was performed by conventional histopathology (HE), and immunohistochemical study was performed to determination of TP53 expression. **Results:** We observed inhibition of tumor growth in the groups: Isoquercetin prophylaxis ($p = 0.04$), Isoquercetin therapy ($p = 0.03$) and therapy with Rutin ($p = 0.00$). There was a significant weight loss in rutin and isoquercetin prophylaxis groups compared to the control group ($p = 0.00$), as well as a significant weight gain in therapy Isoquercetin group ($p = 0.00$). There was no difference in lipid peroxidation between groups test and control. There were changes in TP53 expression in all groups compared to the control group ($p < 0.05$). **Conclusion:** Rutin and Isoquercetin are antitumor biocompounds; the animal weight variation seems more related to the antitumoral activity and tumor volume decrease instead of being related to the tested biocompounds; Rutin and the Isoquercetin administered in therapy or prophylaxis forms did not have antioxidant or pro-oxidant action in the colon adenocarcinoma; Rutin and Isoquercetin in therapeutic and prophylactic administration are able to promote modification in TP53 mutation.

Keywords: Flavonoids, Cytotoxic Activity, Cancer, Xenotransplantation, Xenograft Model Antitumor Assays

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-OHdG - 8-Hidroxi-guanina

ABC - Complexo estreptavina-biotina-peroxidase

Anti-TP53 - do Inglês, Anti-human TP53 protein, proteína TP53 anti-humano

CCR - Câncer colorretal

CONCEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Ética

CONEP - Conselho Nacional de Ética em Pesquisa

DAB - Solução de diaminobenzidina

EDTA - do Inglês, Ethylenediaminetetraacetic acid, ácido etilenodiaminotetraacético

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

G - Gauge

G>T - Guanina-timina

G1 – Interfase do ciclo celular

HE - Hematoxilina-Eosina

INCA – Instituto Nacional do Câncer

MDA – do Inglês, Malondialdehyde, Malondialdeído

TP53 - proteína p53

PBS - do Inglês, Phosphate-buffered Saline, Solução tampão fosfato-salino

PMSF - do Inglês, Phenylmethylsulfonyl Fluoride, Fenilmethilsulfonida fluoreto

RGB - do Inglês, Red Green Blue, Vermelho Verde Azul

RIPA - do Inglês, Modified radioimmunoprecipitation buffer, Tampão radioimmunoprecipitação modificado

rs - Coeficiente da correlação de Spearman

SFB – Soro bovino fetal

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TM – do Inglês, Tail Moment, Momento de cauda

TP53 – gene p53

TRIS - N-tris[hidroximetil]aminoetano

U/pixel – Unidades por pixel

WNT – Via de sinalização canônica, do inglês “Canonical Wingless-type MMTV pathway”

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Representação esquemática do modelo de progressão tumoral do câncer de cólon com atuação de genes específicos. Gene *TP53* possui atuação em fases tardias da progressão tumoral..... 19
- FIGURA 2.** Estrutura química da Rutina, da Quercetina-3-glicosídeo e da Quercetina (retirado de Wang et al., 2011).....21
- FIGURA 3.** Organograma do método experimental. Grupos Controle, Profilaxia e Terapia subdivididos de acordo com o composto recebido, Rutina ou Isoquercitina, Grupo Controle onde o tumor cresceu espontaneamente, sem intervenção.....28
- FIGURA 4.** Foto da inoculação subcutânea de células tumorais para a criação do modelo de adenocarcinoma de cólon humano heterotópico em animal atímico.30
- FIGURA 5.** Técnica de gavagem. Nota-se animal sendo gavado por agulha ponta-bola em câmara de fluxo laminar com imobilização completa da porção cranial.....31
- FIGURA 6.** Fotografia do método de determinação do volume tumoral por meio da aferição com paquímetro de metal, do maior e do menor diâmetro tumoral.32
- FIGURA 7.** Fotografia de camundongo atímico exibindo tumor no local de implante que se apresenta como (A) lesão tumoral sólida no subcutâneo da coxa esquerda facilmente visível, (B) com vascularização abundante (setas).37
- FIGURA 8.** Fotomicrografia de corte histológico de espécime tumoral. A análise histopatológica dos espécimes extirpados demonstrou adenocarcinoma de cólon pouco diferenciado. Podem ser observados agrupamentos de células tumorais de médio a grande tamanho, citoplasma acidófilo e amplo, núcleo de cromatina delicada e nucléolo evidente. Há frequentes figuras de mitose, incluindo formas atípicas (setas) e células em anel de sinete (cabeças de setas) [H&E, 400X].38
- FIGURA 9.** Evolução do peso avaliado ao longo de uma semana dos animais com adenocarcinoma de cólon submetidos à profilaxia e terapia com Isoquercitina ou Rutina. Notar perda de peso significativa nos grupos Rutina e Isoquercitina profilaxia em relação ao Controle, assim como ganho de peso significativo no grupo Isoquercitina terapia. ...39
- FIGURA 10.** Crescimento tumoral avaliado por curvas de regressão, ao longo de uma semana, dos animais com adenocarcinoma de cólon submetidos à gavagem com Isoquercitina ou Rutina administradas de forma profilática em relação ao grupo Controle. Notar a inibição do crescimento tumoral com a administração da Isoquercitina profilática, com inibição do crescimento tumoral desde a data do implante tumoral, que se mantém ao longo do tempo.40

| | |
|--|----|
| FIGURA 11. Crescimento tumoral ao final da primeira semana em animais com adenocarcinoma de cólon submetidos à gavagem com Isoquercitina ou Rutina Profilática em relação ao grupo Controle. Notar a redução expressiva do volume tumoral com a utilização da Isoquercitina administrada de forma profilática..... | 41 |
| FIGURA 12. Crescimento tumoral avaliado por curvas de regressão ao longo de uma semana de animais com adenocarcinoma de cólon submetidos à gavagem com Isoquercitina ou Rutina em esquema terapêutico em relação ao grupo Controle. Notar a inibição do crescimento tumoral com a administração da Isoquercitina e Rutina, com inibição do crescimento tumoral após o implante ter atingido volume maior ou igual a 100mm ³ , ou seja, após o início do tratamento. | 42 |
| FIGURA 13. Crescimento tumoral, ao final da primeira semana, em animais com adenocarcinoma de cólon submetidos à tratamento com Isoquercitina ou Rutina comparado ao grupo Controle. Notar a redução expressiva do volume tumoral com a utilização dos biocompostos administrados de forma terapêutica..... | 43 |
| FIGURA 14. Crescimento tumoral ao final da primeira semana em animais com adenocarcinoma de cólon submetidos à gavagem com Isoquercitina ou Rutina administrados de forma terapêutica ou profilática. Notar a melhor ação antitumoral na terapia do que na profilaxia com Rutina, sem diferença para a Isoquercitina. | 44 |
| FIGURA 15. Peroxidação lipídica nos espécimes tumorais dos grupos Controle, Isoquercitina e Rutina aferida pela expressão do malondealdeído (MDA). Nota-se que não há diferença entre os grupos tratados quando comparados ao grupo Controle. Barra representa o IC95%..... | 45 |
| FIGURA 16. Microfotografia de adenocarcinoma de cólon. Expressão de TP53 mutada. Notar em: A (grupo Controle) grande expressão de TP53, em B (grupo Rutina terapia), TP53 em média expressão e, em C (grupo Isoquercitina terapia), TP53 em menor expressão. Imunohistoquímica realizada para TP53. A, B: [IHx TP53, 100X]; C: [IHx TP53, 400X]. | 46 |
| FIGURA 17. Imunoexpressão de TP53 mutada nos diferentes tratamentos do adenocarcinoma de cólon com Isoquercitina e Rutina administradas na forma profilática ou terapêutica. Notar diferença entre os grupos quando comparados ao Controle. | 46 |
| FIGURA 18. Vantagens e desvantagens de modelos animais de tumores (retirado de REIS, 2009)..... | 50 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1. Epidemiologia do Câncer Colorretal..... | 14 |
| 1.2. Carcinogênese colorretal e o papel dos oxidantes..... | 15 |
| 1.3. A proteína TP53 e o câncer colorretal..... | 17 |
| 1.4. Avaliação da proteína TP53 por análise assistida por computador..... | 19 |
| 1.5. Modelo animal de adenocarcinoma humano..... | 20 |
| 1.6. Flavonoides Isoquercitina e Rutina como fármacos antitumorais | 21 |
| 1.7. Câncer e Flavonoides | 23 |
| 1.8. Justificativa..... | 25 |
| 2. OBJETIVOS | 26 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 27 |
| 3.1. Animais de Experimentação e Grupos de Estudo..... | 27 |
| 3.2. Cultura de células | 28 |
| 3.3. Criação do modelo de adenocarcinoma em camundongos atímicos | 29 |
| 3.4. Cuidado pós-operatório e manejo terapêutico dos animais | 30 |
| 3.4.1. Técnica de gavagem..... | 31 |
| 3.5. Crescimento tumoral | 31 |
| 3.6. Monitorização do peso do animal..... | 32 |
| 3.7. Preparação dos espécimes..... | 32 |
| 3.7.1. Estudo histopatológico | 33 |
| 3.7.2. Imunoexpressão de TP53 | 33 |
| 3.7.3. Determinação da peroxidação lipídica | 35 |

| | |
|--|-----------|
| 3.8. Análise estatística | 36 |
| 4. RESULTADOS | 37 |
| 4.1. Quanto à obtenção do modelo de xenoinxerto de adenocarcinoma de cólon humano/HT29..... | 37 |
| 4.2. Quanto à variação de peso do animal..... | 38 |
| Comparação entre peso do grupo Controle com os grupos Isoquercitina e Rutina | 38 |
| 4.3. Quanto ao crescimento tumoral | 39 |
| 4.3.1. Comparação entre o grupo Controle e grupos Isoquercitina profilaxia e Rutina profilaxia | 39 |
| 4.3.2. Comparação entre os grupos Controle e Isoquercitina terapia e Controle e Rutina terapia | 41 |
| 4.3.3. Comparação dos grupos Rutina profilaxia e terapia e dos Grupos Isoquercitina profilaxia e terapia | 43 |
| 4.4. Quanto à peroxidação lipídica nos espécimes tumorais | 44 |
| 4.5. Quanto à expressão de TP53 nos espécimes tumorais | 45 |
| 5. DISCUSSÃO | 47 |
| 6. CONCLUSÕES | 56 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 57 |
| ANEXO I | 69 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia do Câncer Colorretal

O câncer é a segunda causa de morte no mundo, sendo somente menos frequente que as doenças cardiovasculares. Estima-se que em 2016 cerca de 1.685.210 norte-americanos serão diagnosticados com câncer, excluindo o câncer de pele do tipo não melanoma. Destes, em torno de 595.690 morrerão da doença, sendo quase 1.632 indivíduos por dia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). No Brasil, as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o ano de 2016, apontam a ocorrência de aproximadamente 420 mil casos novos de câncer, sem os casos de pele não melanoma. Incluindo este último, as estimativas apontam para um total de 596 mil novos casos (INCA, 2016).

Entre os cânceres de maior incidência, o câncer colorretal (CCR) é o quarto mais comum na espécie humana, em ordem: câncer de pele do tipo não melanoma, próstata, mama e CCR (INCA, 2016; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). Embora sua incidência varie de acordo com as regiões do mundo, há uma predileção por áreas de maior desenvolvimento, configurando-se como o segundo mais frequente na região sudeste do Brasil, independente do sexo (INCA, 2016).

Apesar da possibilidade de desenvolvimento relacionado à genética familiar, cerca de 75% dos casos de CCR ocorre de forma esporádica, surgindo de mutações somáticas e evolução do clone celular tumoral (INCA, 2016). Estudos epidemiológicos indicam que, de forma similar a outros cânceres, a etiologia do adenocarcinoma de intestino grosso está associada a fatores genéticos e ambientais, sendo um dos mais notáveis, a dieta. Entre outros, a carne vermelha, carnes processadas, bebidas alcoólicas, tabagismo e índice de gordura corporal e abdominal merecem destaque. Por outro lado, os fatores protetores mais importantes são a atividade física e o consumo de alimentos que contêm fibra dietética, ou seja, aqueles de origem vegetal, tais como: frutas, hortaliças (legumes e verduras) e cereais integrais (MADEIRA et al., 2009; INCA, 2016). Outros fatores de risco são a história familiar de CCR, a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino e a idade, esta última diretamente relacionada à mortalidade (INCA, 2016).

1.2. Carcinogênese colorretal e o papel dos oxidantes

Desde 1990 encontra-se bem estabelecido que o surgimento do CCR, a partir da mucosa cólica normal e sua evolução para pólipos, é mediado por uma sequência de mutações em genes controladores da proliferação, diferenciação, adesão e apoptose celulares (FEARON e VOGELSTEIN, 1990). A importância dos pólipos adenomatosos está, portanto, em sua correlação direta com o CCR (GOLD e FREEDMAN, 1965; FEARON e VOGELSTEIN, 1990; KIN et al., 1994; POOL-ZOBEL e LEUCHT, 1997; GEDIK et al., 2002). Desta forma, tanto a remoção dos adenomas quanto o diagnóstico precoce por colonoscopia podem reduzir a mortalidade do CCR.

Avanços na compreensão da biologia molecular dos tumores vêm demonstrando que o CCR se desenvolve a partir de duas vias principais de carcinogênese. Estas duas vias são conhecidas como instabilidade cromossômica e instabilidade de microsátélites e respondem por 85% e 15%, respectivamente, dos casos de câncer colorretal esporádico (KIN et al., 1994; POOL-ZOBEL e LEUCHT, 1997).

Não obstante a presença destas duas vias distintas de carcinogênese do CCR esporádico, seu desenvolvimento surge a partir de mucosa cólica normal. A grande dúvida concentra-se nos fenômenos iniciais que levam a mucosa normal a se transformar progressivamente em pólipos adenomatosos ou em áreas de displasia focal. Existem fortes evidências sugerindo que o evento inicial de agressão ao colonócito normal seja provocado por agentes genotóxicos existentes na luz intestinal (PINHO e ROSSI, 1999; RIBEIRO et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008; PRIOLLI et al., 2013, SCALISE et al., 2016).

Os agentes genotóxicos são caracterizados por possuírem atividade biológica primária, própria ou de metabólitos, capazes de alterar informações codificadas no DNA. A genotoxicidade ocorre quando a exposição do agente tóxico leva à alteração da estrutura ou do conteúdo de cromossomos (clastogenicidade) ou da sequência de pares de bases do DNA (mutagenicidade) (MCGREGOR, 2000). A exposição contínua das células do epitélio cólico a diferentes agentes carcinogênicos representa a principal causa de dano ao DNA (PINHO e ROSSI, 1999; RIBEIRO et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008; PRIOLLI et al., 2013, SCALISE et al., 2016).

Dentre os agentes genotóxicos, as espécies reativas de oxigênio (EROs) formadas durante o metabolismo aeróbico das células da mucosa intestinal ou oriundas da dieta causam o estresse oxidativo (GEDIK et al., 2002). É sabido que o dano oxidativo ao DNA, ocasionado pelas EROs e por outros radicais, tais como as espécies reativas de nitrogênio e grupos metilas (CH₃), estão relacionados ao processo de inflamação da mucosa cólica e, possivelmente, ao surgimento e desenvolvimento do câncer do aparelho digestório (AMES et al., 1993; SCALISE et al., 2016). A mucosa de todo o trato digestório é continuamente exposta e vulnerável a radicais livres que determinam dano oxidativo ao DNA.

Várias doenças que cursam com inflamação crônica da mucosa do trato digestório já foram associadas ao estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990; AMES et al., 1993; SERIL et al., 2003; KAWANISHI et al., 2006; RIBEIRO et al., 2007; LADEIRA et al., 2008). Evidências relacionam a agressão crônica ao epitélio cólico por EROs, a exemplo do que ocorre em portadores de doença inflamatória intestinal, como fator predisponente ao CCR. Em doentes com retocolite ulcerativa inespecífica, o risco de desenvolvimento de câncer aumenta significativamente com o tempo de duração da agressão inflamatória, estimando-se em 0,5% a 1% ao ano (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990; SERIL et al., 2003; KAWANISHI et al., 2006; RIBEIRO et al., 2007).

EROs podem atacar proteínas, lipídeos, açúcares e DNA (AMES et al., 1993). A estreita relação que existe entre as EROs, gastrite e câncer gástrico (LADEIRA et al., 2004) reforçam a hipótese de que o processo inflamatório crônico possa ser o evento inicial de carcinogênese (ITZKOWITZ e YIO, 2004; GOODMAN et al., 2008; LEUNG et al., 2008; SCALISE et al., 2016).

Autores mostraram associação inversa entre balanço oxidativo, que caracteriza exposições pró-oxidantes e antioxidantes, e adenoma colorretal (GOODMAN et al., 2008; PRIOLLI et al., 2013; SCALISE et al., 2016). Leung et al. demonstraram que o estresse oxidativo aumenta durante a progressão do CCR ressecável para metástase hepática e não ressecável, como observado por esgotamento de vitaminas antioxidantes e aumento da peroxidação lipídica (LEUNG et al., 2008), enquanto Scalise demonstrou que o dano oxidativo aumenta na evolução da carcinogênese, na sequencia de tecido normal, pólipos e adenocarcinoma colorretal (SCALISE et al., 2016).

O mecanismo pelo qual o estresse oxidativo promove a agressão ao DNA das células da mucosa cólica ainda não é totalmente conhecido. O radical OH representa o agente oxidante mais comumente implicado no fenômeno de oxidação de bases do DNA celular. As EROs são eletrofílicas, com atividade altamente reativa, atacando substâncias com alta densidade de elétrons, tais como as bases nitrogenadas que formam os ácidos nucleicos que compõe a molécula de DNA (BATTACHARYA e BARTON, 2001).

Dentre os mecanismos mais bem estudados de dano oxidativo ao DNA se encontra a hidroxilação da base nitrogenada guanina. Nesta reação existe a incorporação de um radical OH[•] no carbono 8 da molécula da guanina, formando a 8-hidroxi-guanina (8-OHdG) (KASAI e NISHIMURA, 1983). Durante o processo normal de duplicação do DNA, a guanina se pareia com a citosina (G-C). Contudo, durante o processo de duplicação do DNA, caso ocorra a formação da 8-OHdG, a guanina hidroxilada pareia-se, de forma errônea, com a molécula de adenina, ou seja, ocorre uma mutação do tipo transversão (G>T). Na eventualidade de não haver correção, por meio das proteínas de reparo do DNA, no local onde ocorreu a inserção da 8-OHdG, poderá haver formação de proteína defeituosa. Caso esta proteína mutada se encontre relacionada aos mecanismos de controle do ciclo celular, a célula poderá ganhar autonomia proliferativa e perda de controle da morte programada, formando clone de células mutantes com características semelhantes. Este desequilíbrio do ciclo celular, com favorecimento da proliferação em detrimento à apoptose, poderá se constituir na explicação molecular para o início de formação dos pólipos (TOYOKUNI et al., 1995). Assim podem surgir clones de células com acentuada capacidade de divisão celular e diferentes graus de diferenciação, determinando a formação de displasia tecidual de graus progressivos e o surgimento do câncer (KASAI e NISHIMURA, 1983).

1.3. A proteína TP53 e o câncer colorretal

O estudo das bases moleculares e genéticas envolvidas no processo de carcinogênese encontra-se em expansão. Dentre todos os genes reconhecidamente envolvidos neste processo, destaca-se o *TP53* situado no cromossomo 17 em 17p13.1 (YAMAGUCHI et al., 1997). Este gene codifica a proteína supressora de tumor TP53, assim denominada devido ao seu peso molecular de 53kDa (PINHO, 2000; MARTINEZ et al., 2008). Esta proteína é

responsável por verificar a ocorrência de mutações no genoma, impedindo que a célula mutada entre em processo de mitose e complete a divisão celular a partir de duas possíveis vias: correção da mutação por ativação de proteínas de reparo (p21 e PRb) ou indução da apoptose (LIMA et al., 2006). Assim, ficou conhecida como “guardiã do genoma” e exerce papel chave na inibição do desenvolvimento de tumores, preservando a integridade do genoma em cada célula (PINHO, 2000). A ação da TP53 resulta em parada do ciclo celular em G1, antes que ocorra a duplicação do DNA, permitindo que aconteça o reparo do DNA. Em caso de ausência de possibilidade de reparação do dano, a célula é induzida à apoptose. Quando o gene *TP53* sofre mutações, a célula com mutações poderá iniciar um clone maligno (RIBEIRO e SAFATLE-RIBEIRO, 2006).

A alteração da proteína TP53 pôde ser determinada em tecido normal adjacente ao tumoral e no adenoma (KAKLAMANIS et al., 1993; BRAND et al., 2013; SCALISE et al., 2016) e pode ser considerada como a alteração decisiva no processo de malignização, sendo encontrada em 60 a 80% dos casos de CCR (FELIN et al., 2008; MARTINEZ et al., 2008). Dessa forma, parece existir relação direta entre a mutação do gene e a formação do adenocarcinoma colorretal (FEARON e VOGELSTEIN, 1990; RIBEIRO e SAFATLE-RIBEIRO, 2006; SCALISE et al., 2016) (figura 1). Além disto, a proteína é detectada em 30% dos adenomas e em 40% a 60% dos adenomas com displasia de alto grau (KIN et al., 1994; ITZKOWITZ e YIO, 2004). A alteração na TP53 acarreta em menor resposta ao tratamento adjuvante e menor sobrevida em 5 anos (ELSALEH et al., 2001; PETERSEN et al., 2001; RUSSO et al., 2005; AHMED et al., 2008), portanto apresenta importante valor no prognóstico dos doentes. A literatura sugere que a mutação do *TP53*, que resulta da substituição de prolina por arginina no códon 72 desse gene, aumenta o risco de transformação maligna do adenoma para o adenocarcinoma (LIMA et al., 2006). Recentemente Scalise e colaboradores (2016) sugeriram a utilização da TP53 no tecido normal adjacente ao tumor como marcador de margem cirúrgica livre de tumor, parâmetro importante para diminuição de índices de recidiva local do adenocarcinoma de cólon (SCALISE et al., 2016).

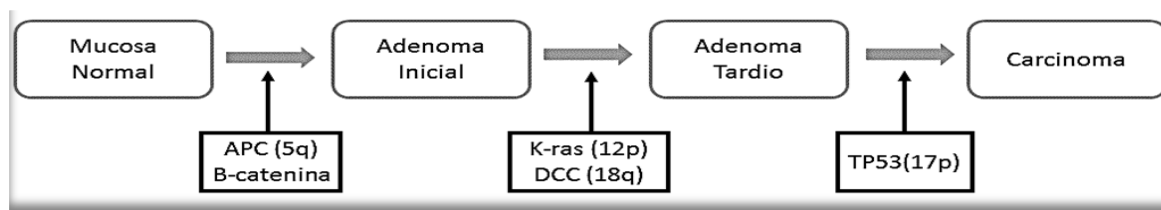


FIGURA 1. Representação esquemática do modelo de progressão tumoral do câncer de cólon com atuação de genes específicos. Gene *TP53* possui atuação em fases tardias da progressão tumoral.

1.4. Avaliação da proteína TP53 por análise assistida por computador

Em 1992 foi apresentado método computadorizado que permite a avaliação quantitativa de estruturas microscópicas (NOVELLI, 1992). Autores se beneficiaram, como era o objetivo inicial do idealizador do método, quanto à pesquisa mais rápida e objetiva (MATOS et al., 1993; NOVELLI et al., 1997; IMLAY et al., 1998; PRIOLLI, 1999; MARTINEZ et al., 2002; PRIOLLI et al., 2003; STHEPHANI et al., 2004; ROSSINGOL et al., 2004; PRIOLLI et al., 2007; SOUZA et al., 2008; MARTINEZ et al., 2008; PRIOLLI et al., 2010; PRIOLLI et al., 2013; SCALISE et al., 2016).

Pela análise de imagem assistida por computador foram estudados a cicatrização das anastomoses intestinais (NOVELLI et al., 1997; PRIOLLI, 1999; PRIOLLI et al., 2003; STHEPHANI et al., 2004), a superfície isquêmica de mucosa gástrica em cães submetidos à vagotomia (MARTINEZ et al., 2002), a utilização de anel biofragmentável em comparação à sutura manual em anastomose colo-cólica (MATOS et al., 1993), expressão de proteínas teciduais (PRIOLLI et al., 2010; MARTINEZ et al., 2011; PRIOLLI et al., 2013; SCALISE et al., 2016) entre outras pesquisas (IMLAY et al., 1998; ROSSINGOL et al., 2004; SOUZA et al., 2008; MARTINEZ et al., 2009; MARTINEZ et al., 2011).

A análise de imagem assistida por computador permite quantificar de forma objetiva a expressão tecidual de diversas proteínas e, desta forma, apresenta importância no diagnóstico e terapêutica de doentes com câncer, especialmente se estes marcadores puderem ser detectados em sua forma pré-maligna e com a maior sensibilidade possível. Programas de

análise computadorizada foram desenvolvidos por empresas especializadas e atualmente estão disponíveis comercialmente, tal como o utilizado nesse estudo* e permitem quantificar a TP53. Vantagem na utilização da imunohistoquímica assistida por computador para determinar o conteúdo da TP53 é o fato da proteína mutada, de forma distinta ao que ocorre com a forma selvagem, apresentar-se estável no tecido cólico tumoral, tornando fácil e precisa sua imunoquantificação (VOJTĚŠEK et al., 1992; PINHO, 2000; SCALISE et al., 2016).

1.5. Modelo animal de adenocarcinoma humano

Os modelos animais são necessários não só para busca de mecanismos de patogênese, mas também para os ensaios pré-clínicos de novas drogas anticâncer. A introdução do camundongo atímico no início dos anos 60 foi seguida por grandes possibilidades em pesquisa com modelos de tumor implantável. Desde 1968 camundongos atímicos são usados como uma importante ferramenta biomédica (PANTELOURIS, 1968; RYGAARD e POLVSEN, 1969).

Atualmente, o animal mais utilizado para o tipo de estudo dos adenocarcinomas humanos é o roedor atímico. Sua preferência ocorre pelas suas características, como permitir rápido crescimento tumoral, fácil manuseio e a habilidade de aceitar as células de tumores humanos (xenoenxerto). Como estes animais são imunocomprometidos, aceitam enxertos alogênicos ou xenogênicos, incluindo os tumores malignos humanos. O transplante de tumores malignos em camundongos foi amplamente utilizado em muitos tipos de pesquisa em câncer, porque o animal pode manter as características histológicas originais do tumor, tais como cariótipo, expressão de oncogenes, estrutura molecular e evolução clonal (THYGESSEN et al., 1990; PRIOLLI et al., 2014).

O modelo de inoculação subcutânea pode ser facilmente criado e é conveniente para a observação do tumor (RYGAARD e POLVSEN, 1969; PRIOLLI et al., 2014). Tumores implantados no subcutâneo produzem massas sólidas que são visíveis, capazes de serem medidas externamente e proporcionam fácil acesso à biópsia. A área tumoral tem, geralmente, vascularização abundante e a drenagem linfática pode ser facilmente estabelecida, além disso,

* NIS Elements® for Windows

a mobilidade da pele permite a grande expansão do tumor. O modelo de neoplasia humana tem alta taxa de sucesso de inoculação e fornece informação sobre a resposta do tumor a drogas (CÉSPEDES et al., 2007; PRIOLLI et al., 2014).

A terapia individualizada é fortemente dependente da interpretação científica dos parâmetros clínicos relevantes. Assim, modelo de doença em animal que se assemelha ao comportamento em humanos é necessário para que se possa validar os resultados de terapias antineoplásicas.

1.6. Flavonoides Isoquercitina e Rutina como fármacos antitumorais

Nos últimos anos têm-se intensificado as pesquisas de novos compostos que possam atuar no tratamento de diversos tipos de câncer. Entre os possíveis agentes com atividade antitumoral estão alguns flavonoides, compostos fenólicos amplamente distribuídos na natureza e presentes na maioria dos alimentos da dieta humana (HEIM et al., 2002).

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural, amplamente distribuídos no reino vegetal. As modificações no anel central dessas substâncias levam à diferenciação em subclasses (Flavonas, Flavonóis, Flavanonas, Flavanóis, Antocianidinas e Isoflavonas).

Dentre estes compostos, os de maior interesse são a Isoquercitina (quercetina-3-O-glicosídeo, Q3G), Quercitina (quercetina-3-O-L-ramnosídeo) e Rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo) (figura 2), os quais possuem um dissacarídeo (rutinose = ramnose + glicose) como substituinte na hidroxila da posição 3 do anel C (pirano) (KIM et al., 2011).

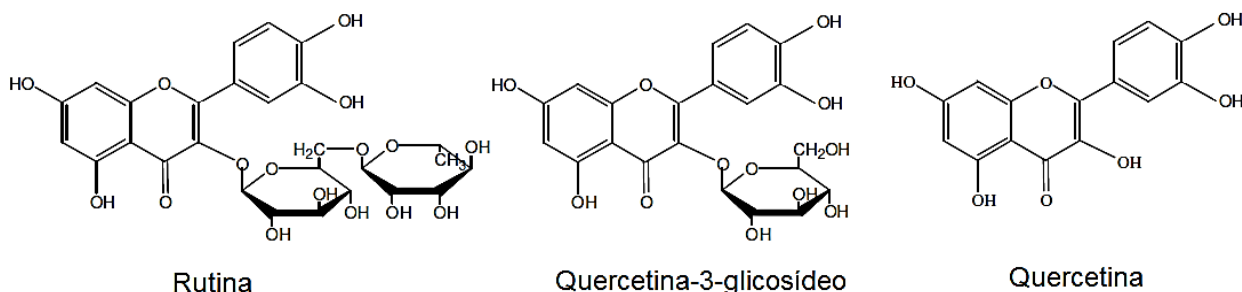


FIGURA 2. Estrutura química da Rutina, da Quercetina-3-glicosídeo e da Quercetina (retirado de Wang et al., 2011).

A absorção de flavonoides é variável, pois a diversidade estrutural destes compostos influencia em sua absorção intestinal e, conseqüentemente, em sua biodisponibilidade e propriedades biológicas (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000; DE ARAÚJO et al., 2013).

Os flavonoides em sua forma aglicona são facilmente absorvidos pelo intestino delgado e os flavonoides ramnosídicos necessitam ser hidrolisados pelas ramnosidases da microflora colônica (HOLLMAN et al., 1999; ORFALI et al., 2016).

A absorção no cólon ocorre mais lentamente e com menor intensidade se comparada ao intestino delgado, provavelmente devido a sua menor área de exposição e à baixa atividade dos transportadores de membrana. A absorção da rutina é mais lenta e menos eficiente se comparada à isoquercitina (HOLLMAN et al., 1999; MORAND et al., 2000; ERLUND et al., 2002; ARTS et al., 2004; ORFALI et al., 2016).

O mecanismo pelo qual a glicosilação facilita a absorção da quercetina parece estar relacionado com os transportadores de hexoses, especialmente o SGLT1 (transportador ativo de glicose sódio-dependente 1), que seria responsável por levar a forma glicosilada da quercetina para o interior do enterócito, no qual sofreria a ação das glicosidases citosólicas (GRAEFE et al. 2001; ORFALI et al., 2016). Segundo a conjugação de uma glicose a um composto fenólico que resulta em absorção ativa à partir do lado da mucosa até o lado da serosa, pelo sistema de transporte de glicose (ORFALI et al., 2016). Wolfram et al. (2002) conduziram um estudo *ex vivo*, utilizando jejunos e cólons proximais de ratos incubados com soluções de flavonoides que corrobora essa afirmação (MIZUMA et al., 1992).

Outro mecanismo de absorção de polifenóis foi sugerido, envolvendo enzima presente na membrana da borda em escova do intestino delgado, a lactase florizina hidrolase, uma glicosidase que catalisa a hidrólise extracelular de alguns glicosídeos. Após a hidrólise, ocorre difusão passiva da forma aglicona pela membrana da borda em escova (DAY et al., 2003), caso o flavonoide glicosilado atinja o interior do enterócito ou do hepatócito (através de transporte ativo, por receptores SGLT1), a β -glicosidase citosólica hidrolisará a molécula, formando os flavonoides na forma livre, que posteriormente serão conjugados e entrarão na corrente sanguínea (NÉMETH et al., 2003).

Os metabólitos dos flavonoides, encontrados no sangue, em órgãos alvo ou como resultado da atividade digestiva e hepática, podem ser detectados na urina e nas fezes humanas (WALLE et al., 2003). Altas taxas de excreção dos metabólitos nas fezes indicam baixa absorção dos flavonoides pelo organismo (MANACH et al., 2005). Os metabólitos glicuronizados e sulfatados são mais comuns no organismo se comparados aos metilados (KROON et al., 2004). No entanto, uma mesma molécula pode sofrer diferentes processos de metabolização (YANG et al., 2008). O tipo de metabolização depende da dose ingerida e da natureza da molécula (MANACH et al., 2004).

A Rutina e a Isoquercitina possuem diversas atividades biológicas já documentadas, sendo a propriedade antioxidante extensivamente estudada (FERRALI et al., 1997). Entretanto, estudos têm mostrado que alguns desses compostos também apresentam efeitos pró-oxidantes (LEUNG et al., 2006), inclusive com ação indutora de apoptose em diversos tipos de tumores (MICHELS et al., 2005; WANG et al., 2005). Com base nesses dados, os flavonoides podem ser promissoras moléculas usadas como protótipos para o desenvolvimento de agentes anticancerígenos.

Estudos epidemiológicos e ensaios clínicos em humanos indicam que os flavonoides têm efeitos importantes na quimioprevenção do câncer e quimioterapia como terapêutica anticâncer em potencial. Alguns mecanismos têm sido apontados, incluindo inativação da carcinogênese, atividade antiproliferativa, parada do ciclo celular, indução de apoptose e diferenciação, inibição da angiogênese, antioxidação e reversão da resistência a múltiplas drogas ou uma combinação desses mecanismos (REN et al., 2003; LI et al., 2007).

1.7. Câncer e Flavonoides

Câncer é o processo patológico e heterogêneo no qual as células sofrem alterações metabólicas e comportamentais modificando os circuitos reguladores do ciclo celular e, assim, causando a proliferação celular anormal e excessiva (AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2008). Modificar a dieta é uma estratégia alternativa para a redução do risco de câncer. Quanto aos fitoterápicos, há pouca informação disponível sobre possível efeito aditivo, sinérgico, ou interações antagônicas entre esses compostos. A citotoxicidade da Quercitina,

Isoquercitina e Q4G (quercetina 4'-O-glucósido) foram comparadas; os resultados indicaram que a Isoquercitina é uma candidata promissora para a terapia do câncer (PARK et al., 2014).

Regulação aberrante da apoptose está envolvida na patogênese de várias doenças podendo levar à proliferação celular descontrolada e tumorigênese. O câncer é um exemplo de condição patológica em que os mecanismos normais de regulação do ciclo celular são disfuncionais, quer pela proliferação excessiva de células, inibição/supressão da apoptose ou ambos. A apoptose é sugerida como mecanismo crucial para as propriedades quimioprolifáticas associada a vários fatores dietéticos, eliminando potencialmente a ação deletéria das células. Numerosos compostos fenólicos mostraram efeitos antiproliferativos e citotóxicos, com atividades pró-apoptótica em células de câncer de várias linhagens e modelos animais de tumores (FRESCO et al., 2010).

Amado et al. (2011) descreveram a ação dos flavonoides sobre a via de sinalização WNT, que desempenha papel importante no controle da diferenciação celular, proliferação e morte, bem como organogênese e homeostase em adultos (AMADO et al., 2011). Os cânceres mais comumente associados a esta via são colorretal (MARTINEZ et al., 2011), melanoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma gástrico, glioblastoma, leucemia e câncer de mama (AMADO et al., 2011, GOMES et al., 2013).

Os ensaios *in vivo* e *in vitro* em embriões de *Xenopus*, modelo funcional de estudos de sinalização WNT, foram utilizados para demonstrar o efeito inibidor da Isoquercitina sobre WNT/ β -catenina (AMADO et al., 2014). O principal componente desta via é a proteína β -catenina, que funciona principalmente induzindo a transcrição nuclear. Na ausência de WNT ligante, a β -catenina é fosforilada por vários complexos de enzimas, e é capaz de se ligar com o complexo ubiquitina-proteassoma, que a degrada. No entanto, na presença de ligante de WNT, uma cascata de reações estabiliza a β -catenina, que em seguida se transloca para o núcleo e induz a estimulação de fatores de transcrição. Numerosos estudos demonstram que o controle e ativação inadequados desta via estão relacionados a várias doenças, incluindo câncer (AMADO et al., 2014; MARTINEZ et al., 2011). A atividade antiproliferativa dos flavonoides está relacionada com a sua capacidade de modular a atividade de sinalização de WNT em diferentes níveis. Assim, cada um dos flavonoides atua em diferentes níveis da via tornando as suas ações específicas contra as linhagens tumorais (AMADO et al., 2014). O estudo com *Xenopus*,

mostrou que o flavonoide atua na translocação de β -catenina para o núcleo. Esse efeito prejudica o crescimento das células cancerígenas do cólon SW-480, DLD-1, e HCT-116 por inibir a proliferação e migração celular, sem efeito citotóxico aparente (AMADO et al., 2014). O estudo não demonstrou efeito significativo sobre as células do cólon não tumorais (IEC-18), sugerindo efeito específico sobre células tumorais *in vitro* (AMADO et al., 2014).

Outro possível mecanismo de ação antiproliferativo dos flavonoides está relacionado a sua capacidade de inibir a atividade da proteína TP53 na tradução proteica, resultando no aumento de células tumorais bloqueadas durante a mitose (AVILA et al., 1994).

Importante destacar que um dos grandes problemas dos medicamentos quimioterápicos atuais é a sua não especificidade para células tumorais, sendo também tóxicos para células normais. Problemas relacionados à ineficiência dos fármacos existentes frente a diferentes tipos de câncer, bem como o aumento do aparecimento de linhagens resistentes a estes medicamentos são também relatados (CHABNER & ROBERTS, 2005). Desta forma, a busca por novos quimioterápicos para o tratamento do câncer continua despertando grande interesse.

1.8. Justificativa

Diante dos importantes efeitos biológicos e potencial dos flavonoides como agentes antitumorais, e tendo em vista a escassez de compostos eficazes que apresentam baixa toxicidade no tratamento do CCR, este trabalho pretende, a partir de modelo de adenocarcinoma humano transplantado em camundongos atímicos, contribuir para o melhor entendimento do mecanismo de ação da Rutina e da Isoquercitina utilizadas de forma profilática e terapêutica no adenocarcinoma de cólon.

2. OBJETIVOS

Avaliar, em modelo animal de adenocarcinoma de cólon humano, se os flavonoides Rutina e Isoquercitina, administrados de forma profilática e terapêutica:

- a. Apresentam-se como agentes antitumorais;
- b. Influenciam no peso corporal dos animais;
- c. Agem sobre a peroxidação lipídica no tumor;
- d. Possuem potencial para modificar a expressão da TP53 mutada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A realização deste estudo obedece à Lei Federal 11.794/2008 e às orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e o Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA). Este trabalho só foi iniciado após aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (número 001.05.12) da Universidade São Francisco.

3.1. Animais de Experimentação e Grupos de Estudo

Foram utilizados 27 camundongos Balb/c-nu (nude), machos, com sete a oito semanas de idade, média de peso de 20 g (Charles River Laboratories International, Inc., Wilmington, USA) para o xenoenxerto de células de adenocarcinoma de cólon/HT-29.

Os animais foram mantidos em condições controladas de ciclo claro-escuro, temperatura e umidade, com recebimento de água e ração *ad libitum* em isoladores sob rack com ventilação controlada.

Os animais foram distribuídos, por sorteio, em 3 grupos e, depois, em dois subgrupos conforme uso profilático ou terapêutico das drogas-teste, a saber (figura 3):

1. Grupo Profilaxia – 12 animais. Antes do implante tumoral os animais foram submetidos a profilaxia com Isoquercitina (n=6) ou Rutina (n=6) por 7 dias;

2. Grupo Controle – 5 animais. Os animais, antes ou após implante tumoral, não foram submetidos a tratamento;

3. Grupos Terapia – 10 animais. Após implante de células tumorais e o volume do tumor ter alcançado 100mm³, os animais foram submetidos a tratamento com Isoquercitina (n=5) ou Rutina (n=5) por 7 dias.

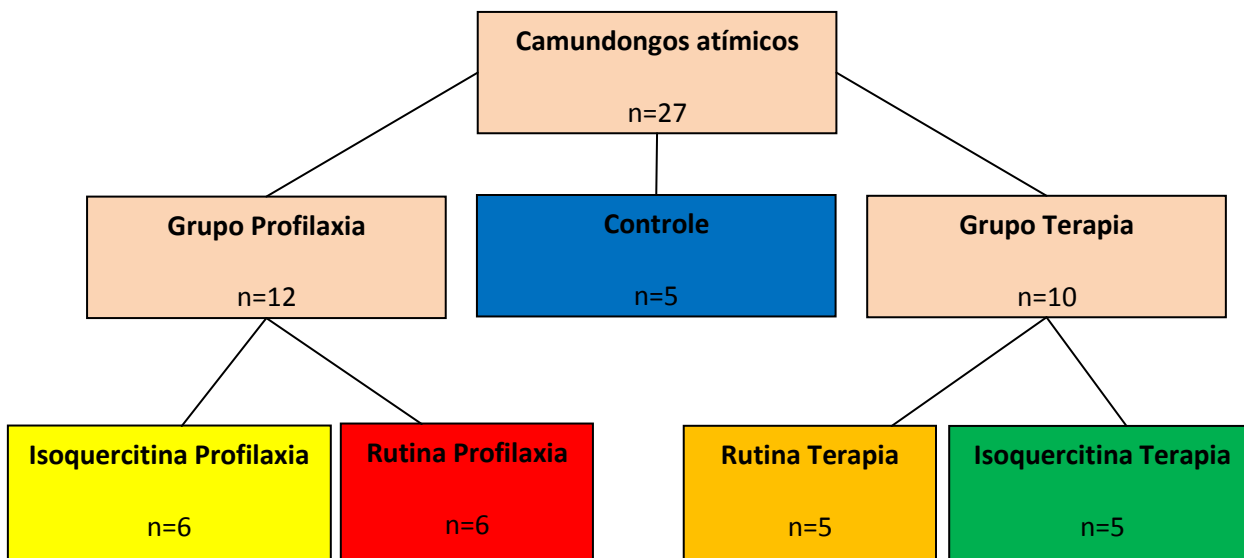


FIGURA 3. Organograma do método experimental. Grupos Controle, Profilaxia e Terapia subdivididos de acordo com o composto recebido, Rutina ou Isoquercitina, Grupo Controle onde o tumor cresceu espontaneamente, sem intervenção.

3.2. Cultura de células

A linhagem celular de tumor utilizada para o xenoenxerto foi a de adenocarcinoma de cólon humano/HT-29 (ATCC HTB-38)*. Todas as células utilizadas para o enxerto foram submetidas a menos do que 22 passagens.

O descongelamento dos criotubos foi realizado à temperatura ambiente, o conteúdo transferido para um tubo de centrifuga de 15 mL e, para lavagem do glicerol utilizado no

* *Homo sapiens*, caucasiano, 44 anos, componente secretor de IgA; antígeno carcinoembriogênico (CEA); mucina, myc +; ras +; myb +; fos +; sis +; p53 +; abl -; ros -; src -, Tipo sanguíneo A; Rh+; HLA A1, A3, B12, B17, Cw5, HT-29 células negativas para CD4, mas há expressão na superfície para galactose ceramida.

congelamento, o volume foi completado para 10 mL com meio de cultura RPMI-1640 contendo 5% de soro fetal bovino (SFB, Gibco 2010-09). O tubo foi centrifugado a 2000 rpm por 4 minutos a 4°C, o sobrenadante foi aspirado e descartado e o precipitado de células foi ressuspenso em 5 mL de meio de cultura.

A linhagem de células foi descongelada e propagada em garrafas T75 a 37°C, em câmara umidificada com 5% de CO₂ (HeraCELL 150) usando o Modified Dulbecco Eagle Medium (DMEM - Sigma D-5648), suplementado com 100 mM de piruvato de sódio (Gibco, 11-360), 10% de SFB e 1% de antibióticos (100 U/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina, Gibco 15140-122).

O meio de cultura foi trocado a cada 24 horas.

A cultura celular foi incubada com 3mL de tripsina - EDTA 0,25% (Gibco, 25 200) por 3 minutos para permitir a desagregação celular e, posteriormente, a tripsina foi inativada com SFB, presente no meio de cultura.

A viabilidade das células foi determinada em câmara de Neubauer e avaliada pelo corante Azul de Tripán.

3.3. Criação do modelo de adenocarcinoma em camundongos atímicos

As células tumorais quando em confluência superior a 80% e inferior a 95% foram suspensas em 40 µl de solução-meio. Foram implantadas 4×10^6 células tumorais por injeção subcutânea no dorso do animal, utilizando-se seringa de 1 mL, com agulha hipodérmica de calibre 30G (figura 4).

Todos os procedimentos com os animais foram executados em fluxo laminar, devido à imunodeficiência T dos camundongos, com rigorosa técnica de assepsia e antissepsia.



FIGURA 4. Foto da inoculação subcutânea de células tumorais para a criação do modelo de adenocarcinoma de cólon humano heterotópico em animal atímico.

3.4. Cuidado pós-operatório e manejo terapêutico dos animais

Os grupos Profilaxia receberam Isoquercitina e Rutina previamente à inoculação de células tumorais até as 24 horas que antecederam o xenoenxerto, enquanto os grupos Terapia iniciaram o tratamento com Isoquercitina e Rutina 24 horas após o xenoenxerto ter alcançado o volume mínimo de 100mm^3 .

Os animais receberam os compostos durante sete dias consecutivos, por meio de gavagem, sempre no mesmo horário, após um período de 30 minutos de jejum, que foi mantido por 1 hora após o procedimento. O grupo Controle não sofreu qualquer intervenção terapêutica prévia ou após o xenoenxerto. Antes e após o período de administração do composto os animais mantiveram ingesta hídrica e de ração padrão *ad libitum*.

Os animais foram alojados em gaiolas individuais com padrão idêntico de recebimento de ingesta hídrica e de ração padrão durante todo o período de acompanhamento. Caso ocorressem sinais de sofrimento sugeridos pela imobilidade, ausência de ingesta, dispnéia, eriçamento da pele ou outros, o animal seria eutanasiado (*end-point*), garantindo o padrão de boa conduta e ética no manejo dos animais.

3.4.1. Técnica de gavagem

Após jejum de 30 minutos os animais foram submetidos à gavagem realizada com auxílio da cânula ponta-bola, para evitar danos ao esôfago. O animal foi manualmente contido, sendo a imobilização da cabeça essencial nesse procedimento. A cânula foi introduzida lentamente na cavidade oral, através da boca e da faringe para o esôfago (figura 5).

Os compostos foram administrados lentamente nas doses de 30 mg/Kg e 17 mg/Kg respectivamente para Rutina e Isoquercitina. Estas doses foram obtidas da literatura como sendo as possíveis doses máximas tóxicas de cada um dos compostos que não levassem ao êxito letal (TAMANO et al., 2001; OLTHOF et al., 2003; KRŤŽKOVÁ et al., 2009; AZUMA et al., 2010). O volume máximo administrado foi de 0,5 mL.



FIGURA 5. Técnica de gavagem. Nota-se animal sendo gavado por agulha ponta-bola em câmara de fluxo laminar com imobilização completa da porção cranial.

3.5. Crescimento tumoral

O animal foi monitorado diariamente após o xenoenxerto, sendo aferido o volume tumoral com paquímetro de metal e determinada a curva de crescimento tumoral dos grupos distintos. A determinação do volume em mm^3 obedeceu à fórmula: “Volume= $S^2 \times L/2$ ” (TOMAYKO et al.,

1989), em que o “S” representa o menor diâmetro aferido e “L” o maior diâmetro aferido (figura 6).



FIGURA 6. Fotografia do método de determinação do volume tumoral por meio da aferição com paquímetro de metal, do maior e do menor diâmetro tumoral.

3.6. Monitorização do peso do animal

Os animais foram diariamente submetidos à pesagem em balança semianalítica (Marte®), assim como a avaliação clínica composta por eriçamento de pele, ausência de ingesta alimentar, imobilidade e prurido auricular, dispneia, relacionado a dor e desconforto nestes animais. O procedimento foi realizado em fluxo laminar, com técnica aséptica rigorosa, sendo os resultados anotados em prontuário eletrônico individual para ulterior análise.

3.7. Preparação dos espécimes

Após anestesiados com cloridrato de xilasina a 2% e cloridrato de quetamina (50mg/mL) (1:2) intramuscular 0,3 mL da solução/20 g, os animais foram submetidos à ressecção do tumor. A seguir foi feita a eutanásia por deslocamento cervical em acordo com a determinação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade São Francisco e às regras Federais, para roedores com peso inferior a 120 g.

Os espécimes tumorais excisados foram divididos em duas partes para a execução das

técnicas:

- Estudo histopatológico convencional por coloração com Hematoxilina Eosina (HE), para determinação da presença do tumor e grau histológico e, imunohistoquímica, para expressão e quantificação de proteína TP53;
- Método do TBARS, para avaliação da peroxidação lipídica.

3.7.1. Estudo histopatológico

Para a realização do estudo histopatológico todos os espécimes cirúrgicos, previamente fixados em solução de formalina a 10%, foram incluídos em blocos de parafina e submetidos a cortes longitudinais.

Três cortes de 4 µm foram obtidos de cada bloco na periferia do tumor, para obtenção de áreas com e sem tumor, sendo corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE).

As análises microscópicas foram feitas em microscopia ótica comum. Presença e grau de diferenciação do tumor foram determinados.

3.7.2. Imunoexpressão de TP53

a. Imunocoloração

Para a realização do estudo imunohistoquímico todos os espécimes previamente fixados em formalina e incluídos em blocos de parafina foram submetidos a dois cortes adicionais de 4 µm e depositados em lâminas previamente silanizadas.

Os cortes foram desparafinados por três banhos sucessivos de cinco minutos em xilol e três banhos em etanol absoluto. A seguir, as lâminas foram acondicionadas em recipiente próprio e submersas em solução tampão fosfato de sódio (*PBS*) 0,05 M e pH 7,2 por 10 minutos. Foi realizado bloqueio das peroxidases endógenas pelo gotejamento de peróxido de hidrogênio 30 volumes a 3% em câmara úmida à temperatura ambiente durante 10 minutos, seguido de mais uma lavagem com *PBS* por 10 minutos. Terminada esta etapa, realizou-se recuperação antigênica. As lâminas foram acondicionadas em cuba com solução de citrato 10 mM em pH 6,0, submetidas ao calor em banho-maria à temperatura de 35°C por período de 40

minutos e, ao final deste processo, deixadas esfriar por 20 minutos em temperatura ambiente, sendo realizada lavagem com solução tampão fosfato salino (PBS) por cinco minutos.

Foi utilizado o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (ABC- Dako Cytomation[®], Copenhagen, Dinamarca) adaptado às condições laboratoriais. As lâminas foram incubadas com anticorpo primário monoclonal anti-TP53 (Monoclonal Mouse Anti-human TP53 protein. Clone DO-7. Dako Cytomation[®] Copenhagen) que marca especificamente a TP53 mutada no tecido cólico neoplásico (VOJTĚŠEK et al., 1992), diluído em albumina bovina (Sigma Chemical CO[®], Saint Louis, EUA) na proporção de 1:500 durante 16 horas a 4°C. Em seguida, lavadas em PBS, com três trocas de três a cinco minutos e incubadas com anticorpo secundário biotilado (anti-IG - Dako Cytomation[®], Copenhagen, Dinamarca) diluído em albumina bovina durante 30 minutos à temperatura ambiente. Seguiram-se as etapas: lavagem em PBS com três trocas de cinco minutos cada; incubação com o complexo ABC diluído em tampão Tris, durante 30 minutos à temperatura ambiente; lavagem em PBS com três trocas de três a cinco minutos cada; revelação com solução de diaminobenzidina (DAB - Sigma Chemical CO[®], Saint Louis, EUA) 0,6% e peróxido de hidrogênio 0,06%. As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada, contracoradas com hematoxilina de Harris por um minuto, e novamente lavadas em água corrente e água destilada. O processo final de desidratação das lâminas obedeceu a passagens com etanol em concentrações crescentes (80%, 90%, etanol absoluto) e xilol 1, xilol 2, xilol 3. Após o processo de imunocoloração as lâminas foram montadas com lamínula e resina.

Para o controle negativo foi utilizada a amostra sem o anticorpo primário e para o controle positivo utilizou-se a tonsila humana, conforme indicação do manual do fabricante.

b. Análise de imagem assistida por computador

A avaliação do conteúdo de imunexpressão da TP53 tecidual foi executada por processamento de imagem auxiliado por computador.

O sistema de captação de imagem é composto por câmera Digital Color[†] acoplada a

[†] Lumenera Infinity[®]

microscópio[‡], ligado a monitor[§], e ao computador^{**}. As imagens foram analisadas em programa específico, NIS-Elements for Windows^{††}.

O processamento da imagem é executado por níveis de cores e tonalidades distintas, permitindo a visibilização de estruturas. Somente a estrutura composta pelos números resultantes da combinação *RGB* (*Red, Green, Blue*), que o usuário seleciona, aparece colorida na tela do monitor, deixando escuro todo o restante da tela. O programa associa tabela de cores aos valores numéricos dos pontos que compõem a imagem e a analisa, permitindo ao usuário tomar conhecimento da quantidade de imunocoloração em todo o campo visibilizado.

A mensuração foi executada com aumento de 400X em área representativa da neoplasia. A imagem gravada, observada na tela do monitor, foi captada pelo programa de aquisição de imagem. Ao selecionar a imunopressão da TP53, apenas ela foi observada de modo colorido. A média de três medidas da mesma lâmina em campos distintos representativos do adenocarcinoma de cólon foi considerada a medida final do conteúdo de imunocoloração, determinada em U/pixels.

3.7.3. Determinação da peroxidação lipídica

O MDA é um aldeído reativo com baixa estabilidade e amplamente utilizado como biomarcador na avaliação do estresse oxidativo (PILZ et al., 2000). Quando o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico, forma uma solução de cor avermelhada, que em acordo com os conceitos de bioquímica experimental de Cisternas (CISTERNAS et al., 1999), tem sua absorbância ideal a 535 nm na leitura com espectrofotômetro. Alguns fatores podem alterar a absorbância da cor da amostra, como por exemplo, as hemoproteínas e metais de transição que, quando associados a membranas celulares, podem melhorar a formação da cor avermelhada no ensaio do TBARS pela formação de oxirradicais e peróxidos, provenientes do aquecimento da

[‡] Nikon® a-photo-2-YSC

[§] Dell®, 17 polegadas

^{**} Dell-Dimension®, processador Pentium 4, dual-core, 1.8 Mb, plataforma Windows XP®

^{††} Nikon Instruments Inc®

membrana com o reagente padrão TCA-TBA (tricloroacético e ácido tiobarbitúrico). Para a avaliação da peroxidação lipídica foi utilizado o doseamento de MDA (MARTINS et al., 2009). As amostras ficaram congeladas a -80°C até o momento do uso.

Para o experimento, 30 mg de tecido tumoral foram obtidas da amostra e armazenadas junto com as soluções-tampão (RIPA, PMSF e EDTA), imersos em banho de gelo até o final. As soluções tampão impedem que o tecido sofra oxidação durante a trituração e homogeneização no Ultra turrax (IKA EW-04737-21) por 15 segundos. Posteriormente, as amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C . Em seguida, o sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio com solução de sódio dodecil sulfato (Cayman Kit N-10009055) em triplicata, e agitado por 30 segundos. As amostras foram então misturadas a reagente de coloração e colocadas em banho-Maria a 100°C por 1 hora. Imediatamente após o banho foram imersas em gelo por 10 minutos para parada da reação. O conteúdo obtido foi então centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para placa de 96 compartimentos e a leitura foi realizada em leitor automático com absorvância à 532 nm.

3.8. Análise estatística

A análise dos resultados obtidos foi realizada adotando-se nível de significância menor que 5% ($p \leq 0,05$) para rejeição da hipótese de nulidade (Rutina e Isoquercitina não são agentes antitumorais) e aceitação da hipótese alternativa (Rutina e Isoquercitina são agentes antitumorais) mediante os seguintes modelos: estatística descritiva; medidas de tendência central; teste de normalidade; análise de variância, modelo de regressão polinomial.

Para análise dos resultados foi utilizado o programa de análise estatística SPSS for Windows, versão 20.0..

4. RESULTADOS

Os resultados estão descritos sobre a forma de figuras e gráficos. Cada cor apresentada tem relação a um grupo específico para facilitar a associação dos resultados com seu grupo.

Os resultados estatísticos significantes estão acompanhados de identificação (*), com o p descrito no texto; os testes utilizados estão, sempre que necessário, identificados.

A discussão dos resultados está apresentada em capítulo dedicado a este fim.

4.1. Quanto à obtenção do modelo de xenoinxerto de adenocarcinoma de cólon humano/HT29

Em todos os casos implantados ocorreu sucesso do xenoinxerto observado macroscopicamente (figura 7) e confirmado pelo HE.

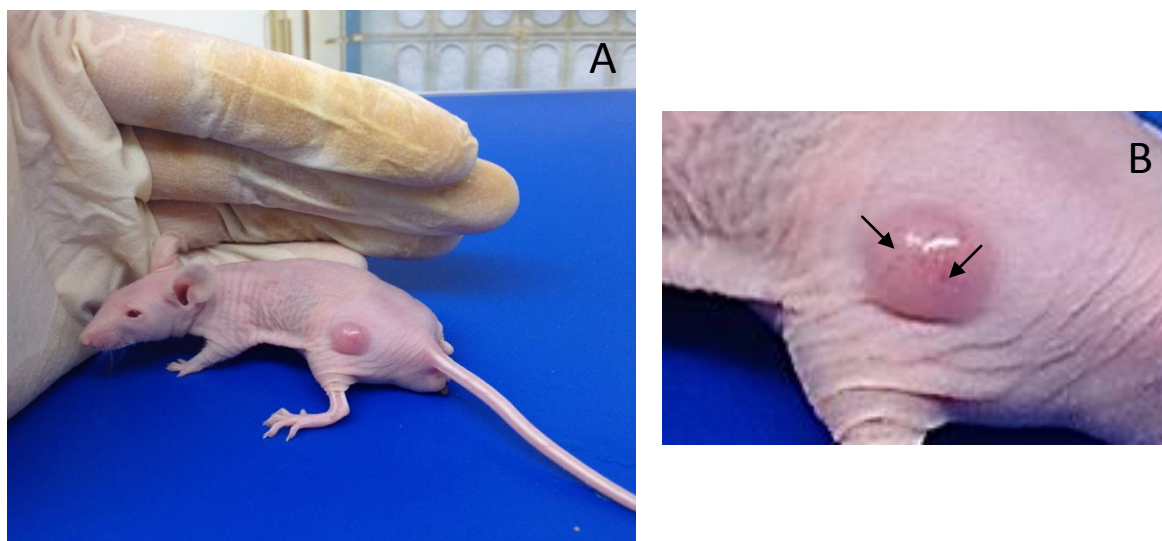


FIGURA 7. Fotografia de camundongo atímico exibindo tumor no local de implante que se apresenta como (A) lesão tumoral sólida no subcutâneo da coxa esquerda facilmente visível, (B) com vascularização abundante (setas).

Todos os tumores foram classificados como pouco diferenciado (figura 8).

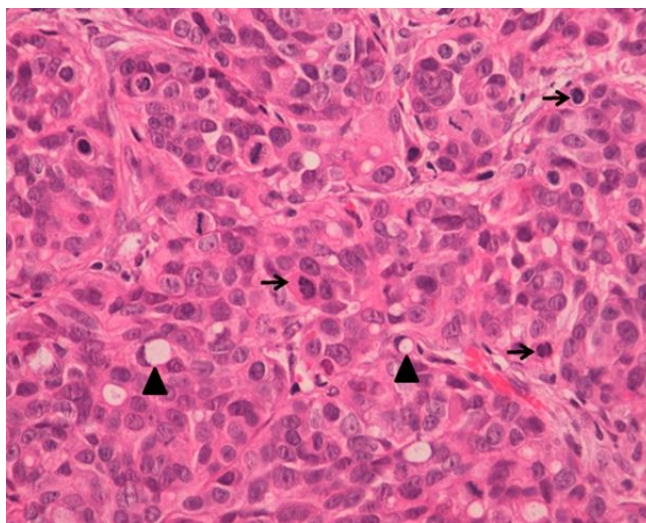


FIGURA 8. Fotomicrografia de corte histológico de espécime tumoral. A análise histopatológica dos espécimes extirpados demonstrou adenocarcinoma de cólon pouco diferenciado. Podem ser observados agrupamentos de células tumorais de médio a grande tamanho, citoplasma acidófilo e amplo, núcleo de cromatina delicada e nucléolo evidente. Há frequentes figuras de mitose, incluindo formas atípicas (setas) e células em anel de sinete (cabeças de setas) [H&E, 400X].

4.2. Quanto à variação de peso do animal

Comparação entre peso do grupo Controle com os grupos Isoquercitina e Rutina

Houve perda significativa de peso, avaliado em uma semana, no grupo tratado com Rutina na administração profilática em relação ao Controle ($p=0.00$), assim como entre o grupo Isoquercitina profilaxia e Controle ($p=0.00$).

Para os grupos terapia, houve ganho de peso do grupo Isoquercitina ($p=0.00$), sem diferença ($p=0,46$) para Rutina em relação ao grupo Controle (figura 9).

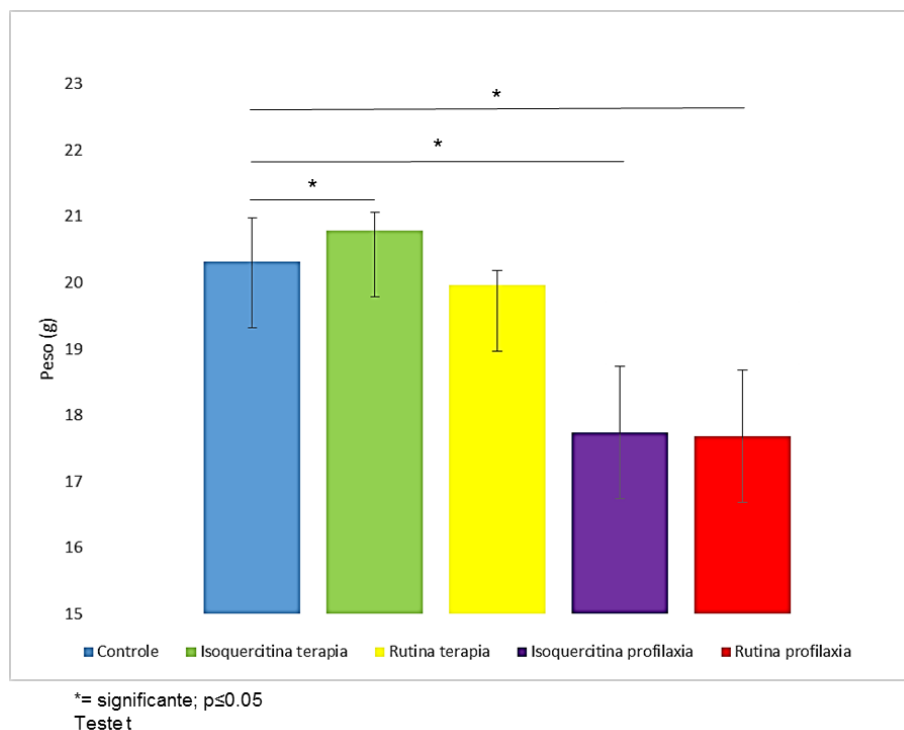


FIGURA 9. Evolução do peso avaliado ao longo de uma semana dos animais com adenocarcinoma de cólon submetidos à profilaxia e terapia com Isoquercitina ou Rutina. Notar perda de peso significativa nos grupos Rutina e Isoquercitina profilaxia em relação ao Controle, assim como ganho de peso significativo no grupo Isoquercitina terapia.

4.3. Quanto ao crescimento tumoral

4.3.1. Comparação entre o grupo Controle e grupos Isoquercitina profilaxia e Rutina profilaxia

Quanto ao crescimento tumoral houve inibição significativa com o uso da Isoquercitina profilática quando avaliado na primeira semana após tratamento em relação ao grupo Controle ($p=0.04$), não existindo diferença entre a utilização da Rutina profilática e o grupo Controle ($p=0.29$) (figura 10).

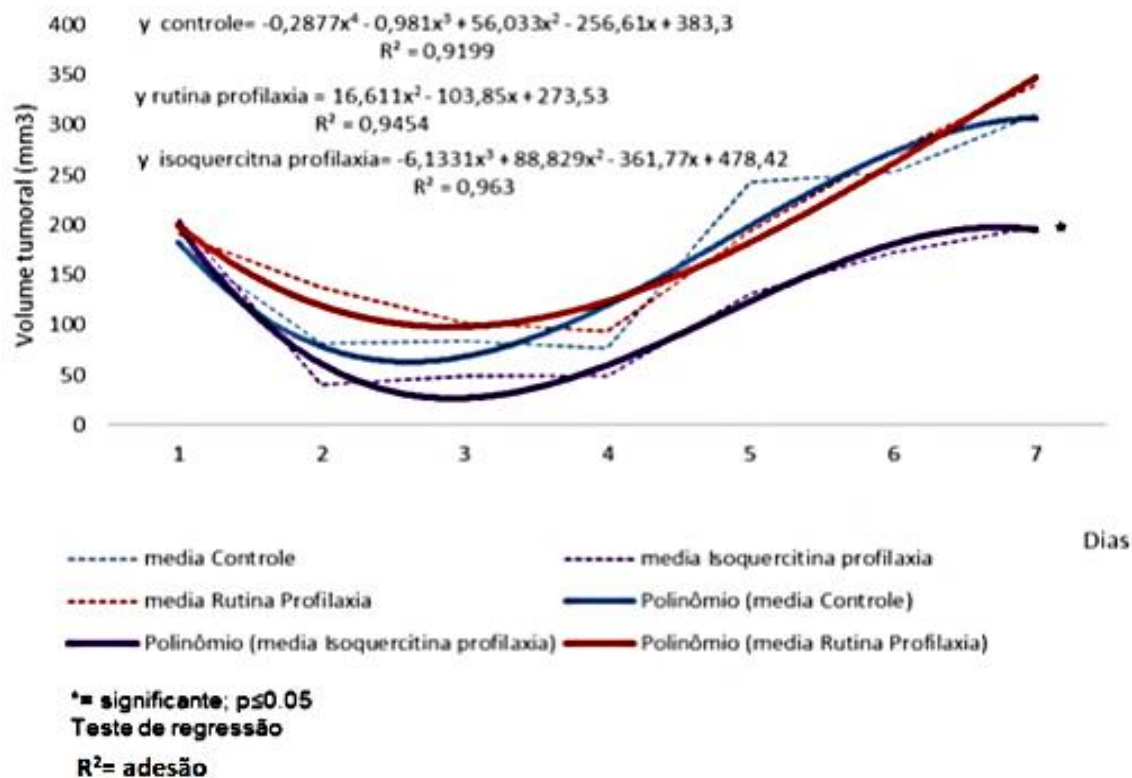


FIGURA 10. Crescimento tumoral avaliado por curvas de regressão, ao longo de uma semana, dos animais com adenocarcinoma de cólon submetidos à gavagem com Isoquercitina ou Rutina administradas de forma profilática em relação ao grupo Controle. Notar a inibição do crescimento tumoral com a administração da Isoquercitina profilática, com inibição do crescimento tumoral desde a data do implante tumoral, que se mantém ao longo do tempo.

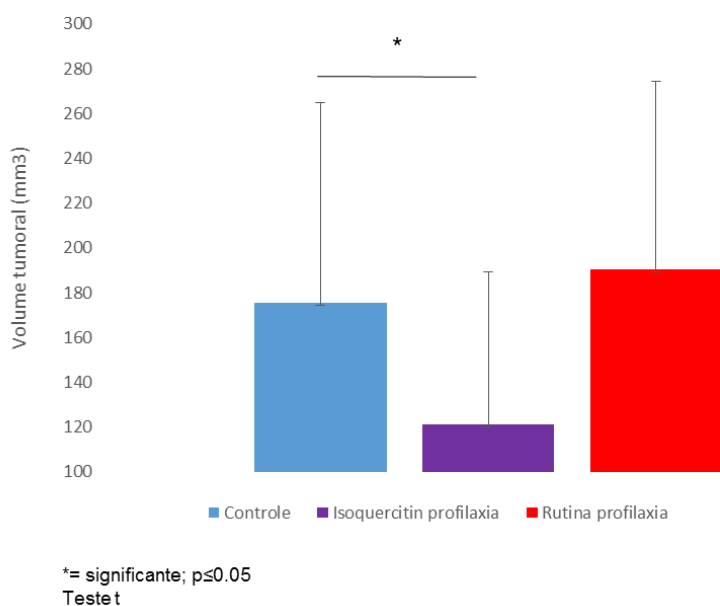


FIGURA 11. Crescimento tumoral ao final da primeira semana em animais com adenocarcinoma de cólon submetidos à gavagem com Isoquercitina ou Rutina Profilática em relação ao grupo Controle. Notar a redução expressiva do volume tumoral com a utilização da Isoquercitina administrada de forma profilática.

4.3.2. Comparação entre os grupos Controle e Isoquercitina terapia e Controle e Rutina terapia

Houve diferença significativa durante o tratamento com Isoquercitina no grupo terapia comparado ao grupo Controle ($p=0.00$), assim como quando comparados o grupo Rutina terapia e Controle ($p=0.00$) quanto ao padrão de crescimento tumoral (figuras 12 e 13).

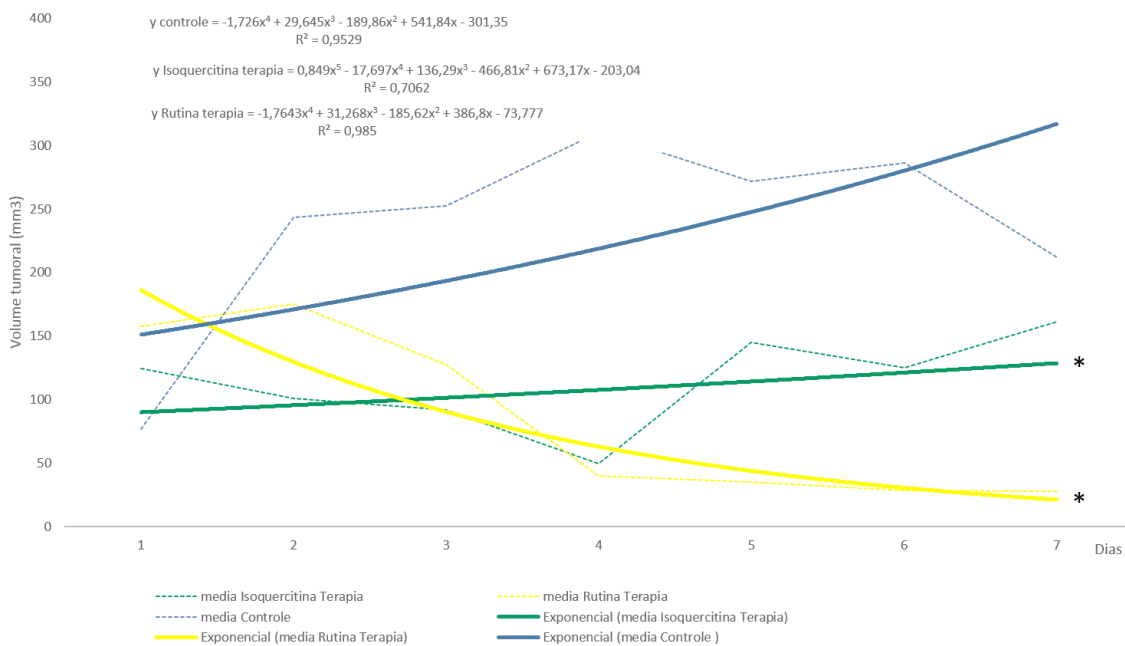
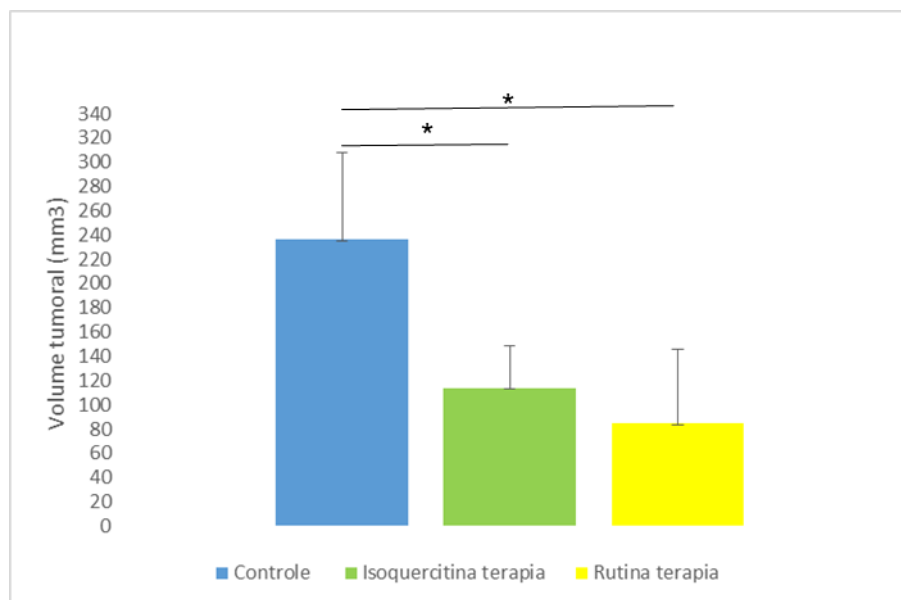


FIGURA 12. Crescimento tumoral avaliado por curvas de regressão ao longo de uma semana de animais com adenocarcinoma de cólon submetidos à gavagem com Isoquercitina ou Rutina em esquema terapêutico em relação ao grupo Controle. Notar a inibição do crescimento tumoral com a administração da Isoquercitina e Rutina, com inibição do crescimento tumoral após o implante ter atingido volume maior ou igual a 100mm³, ou seja, após o início do tratamento.



*= significante; $p \leq 0.05$
Teste t

FIGURA 13. Crescimento tumoral, ao final da primeira semana, em animais com adenocarcinoma de cólon submetidos à tratamento com Isoquercitina ou Rutina comparado ao grupo Controle. Notar a redução expressiva do volume tumoral com a utilização dos biocompostos administrados de forma terapêutica.

4.3.3. Comparação dos grupos Rutina profilaxia e terapia e dos Grupos Isoquercitina profilaxia e terapia

Não há diferença para o uso da Isoquercitina quanto à forma de administração, enquanto a Rutina se mostra mais eficaz ($p=0.02$) para a inibição do crescimento tumoral quando administrada na forma de tratamento (figura 14).

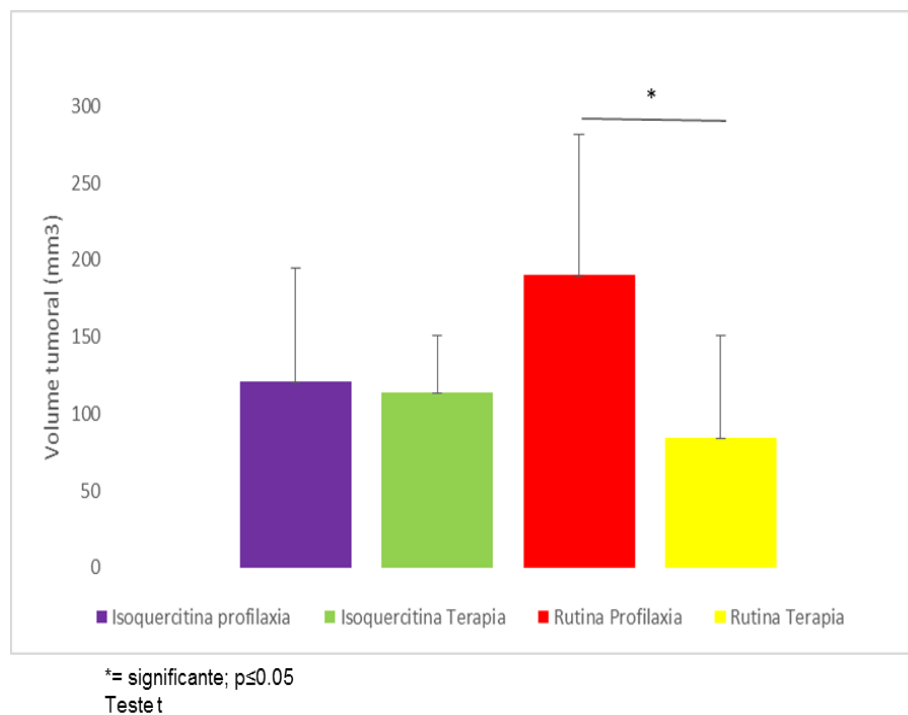


FIGURA 14. Crescimento tumoral ao final da primeira semana em animais com adenocarcinoma de cólon submetidos à gavagem com Isoquercitina ou Rutina administrados de forma terapêutica ou profilática. Notar a melhor ação antitumoral na terapia do que na profilaxia com Rutina, sem diferença para a Isoquercitina.

4.4. Quanto à peroxidação lipídica nos espécimes tumorais

Não houve maior quantidade de peroxidação lipídica, aferida pela quantidade de malondealdeído, nos tumores tratados ou não tratados quando comparados ao controle (Figura 15).

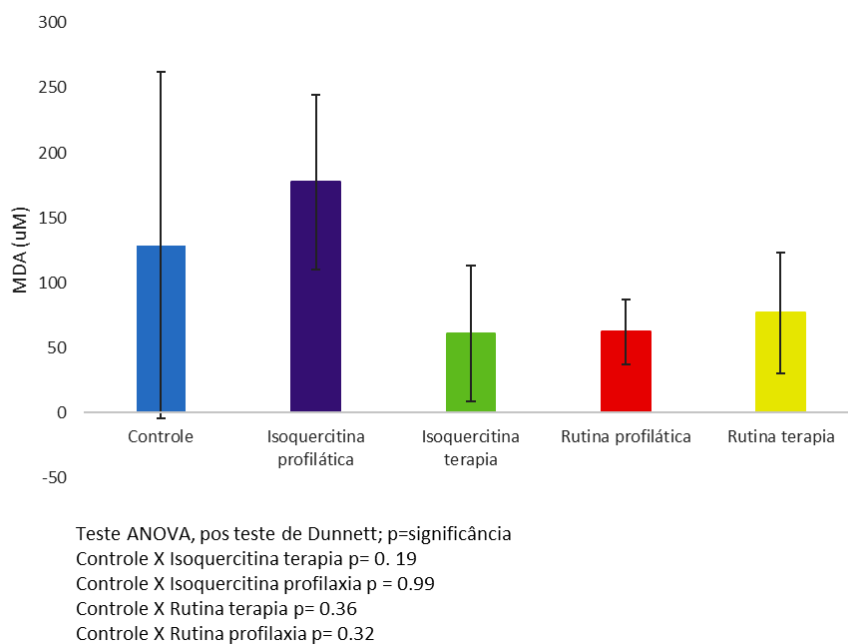


FIGURA 15. Peroxidação lipídica nos espécimes tumorais dos grupos Controle, Isoquercitina e Rutina aferida pela expressão do malondealdeído (MDA). Nota-se que não há diferença entre os grupos tratados quando comparados ao grupo Controle. Barra representa o IC95%.

4.5. Quanto à expressão de TP53 nos espécimes tumorais

Houve diferença ($p=0.00$) na expressão de TP53 entre os grupos (figura 15). Tanto a Isoquercitina quanto a Rutina modificam a expressão de TP53 mutada, nas diferentes formas de administração, quando comparados ao Controle (figura 16 e 17).

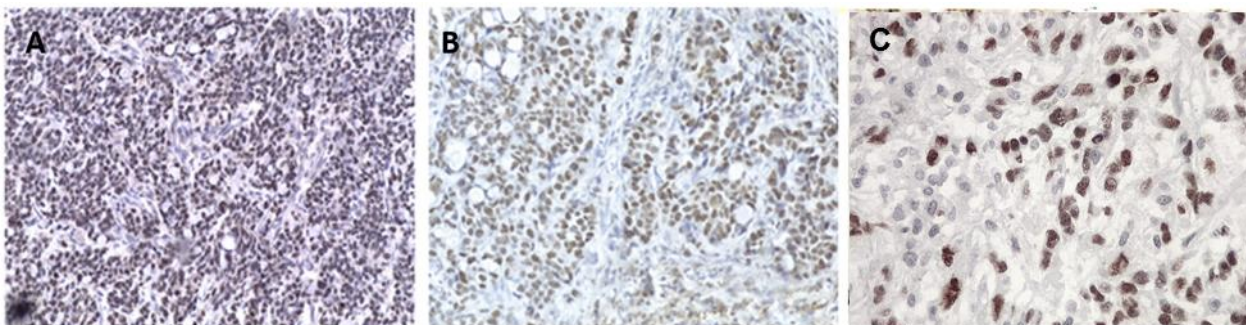
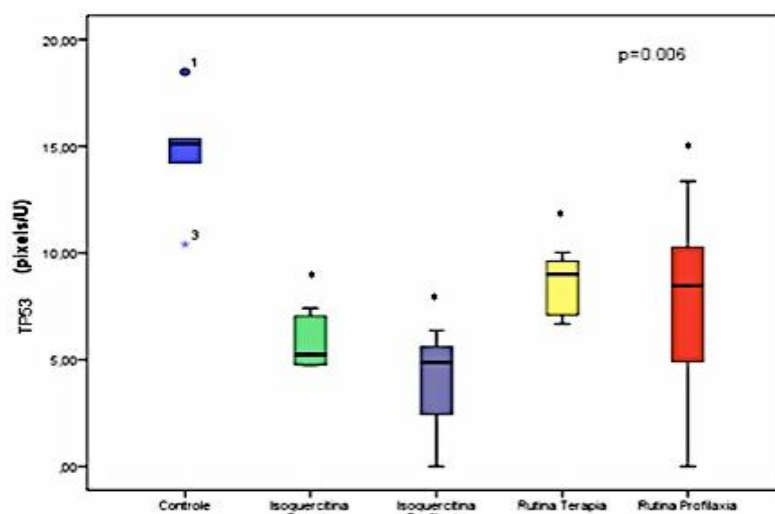


FIGURA 16. Microfotografia de adenocarcinoma de cólon. Expressão de TP53 mutada. Notar em: **A** (grupo Controle) grande expressão de TP53, em **B** (grupo Rutina terapia), TP53 em média expressão e, em **C** (grupo Isoquercitina terapia), TP53 em menor expressão. Imunohistoquímica realizada para TP53. A, B: [IHx TP53, 100X]; C: [IHx TP53, 400X].



*= significante, $p \leq 0.05$

Teste ANOVA, $p =$ significância

teste de Dunnett:

Controle X Isoquercitina Terapia $p = 0.000$

Controle X Isoquercitina Profilaxia $p = 0.003$

Controle X Rutina Terapia $p = 0.003$

Controle X Rutina Profilaxia $p = 0.02$

FIGURA 17. Imunoexpressão de TP53 mutada nos diferentes tratamentos do adenocarcinoma de cólon com Isoquercitina e Rutina administradas na forma profilática ou terapêutica. Notar diferença entre os grupos quando comparados ao Controle.

5. DISCUSSÃO

É incontestável que o câncer é um problema de saúde pública e que ações de controle e prevenção devem ser priorizadas em todas as regiões, desde as mais desenvolvidas até as mais desiguais. Nos últimos anos o câncer se tornou a segunda causa de morte no mundo, com menor frequência apenas quanto comparadas às doenças cardiovasculares (INCA, 2016; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

À partir da década de 60 os camundongos atímicos começaram a ser utilizados em ensaios pré-clínicos para estudo das neoplasias, por serem animais imunocomprometidos, aceitarem enxertos alogênicos ou xenogênicos, como o adenocarcinoma de cólon humano. (PANTELOURIS, 1968; RYGAARD e POLVSEN, 1969; THYGESEN et al. 1990; CÉSPEDES et al., 2007; PRIOLLI et al., 2014). Algumas características tornam esse modelo animal ideal, que incluem crescimento tumoral rápido, fácil manuseio, bem como a capacidade para aceitar as células humanas. No presente estudo, todos os animais tiveram sucesso do enxerto, contrastando com as taxas apresentadas na literatura para modelos de tumor de cólon que variam de 75% a 100% (CÉSPEDES et al., 2007 e PRIOLLI et al., 2014) e o crescimento tumoral foi facilmente visibilizado para acompanhamento, atendendo aos critérios de desenvolvimento de modelo ideal. Outro ponto importante do xenoenxerto é que os camundongos atímicos permitem a manutenção das características histológicas originais do tumor, tais como cariótipo, expressão de oncogenes, estrutura molecular e evolução clonal (RYGAARD et al., 1969; PRIOLLI et al., 2014), tal qual encontrado neste estudo, quando o diagnóstico anatomopatológico revelou adenocarcinoma de cólon humano pouco diferenciado, assim como no doador da linhagem tumoral, mantendo desta forma, as características da linhagem parental celular.

Atualmente, o mercado farmacológico anticâncer concentra-se na busca por novos compostos que apresentam características quimioterápicas juntamente a potenciais efeitos benéficos à saúde individual (HEIM et al., 2002). Neste cenário, flavonoides representam um dos grupos polifenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural,

apresentando uma grande variedade de efeitos orgânicos, entre eles os efeitos antiproliferativo e antitumoral (HALLIWELL et al., 2005).

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos na natureza e presentes na maioria dos alimentos da dieta humana (HEIM et al., 2002). Segundo relatos bibliográficos, a Isoquercitina é absorvida de forma eficiente pelo organismo e possui alta biodisponibilidade, sendo assim, pode-se assumir que a administração oral da Isoquercitina pode levar a efeitos potencialmente benéficos, em especial aqueles relacionados à sua atividade antioxidante e antitumoral (REN et al., 2003; LI et al., 2007). Esse composto pode atuar na prevenção e tratamento de diversas doenças, em especial o câncer, por sua capacidade de inibir danos oxidativos através do sequestro de radicais livres, e de inibir a proliferação de células de diversas linhagens tumorais (REN et al., 2003; LI et al., 2007).

A ação antitumoral dos flavonoides Isoquercitina e Rutina, tanto administrados em sua forma profilática quanto terapêutica, pôde ser observada no estudo, corroborando os dados da literatura. Segundo alguns autores, os efeitos biológicos atribuídos à Isoquercitina são superiores aos efeitos observados para a Rutina (FERNANDEZ et al., 2005), em acordo aos dados do presente estudo, que demonstrou atividade inibidora de crescimento tumoral mais evidente com o uso da Isoquercitina. Em 2002, entretanto, Salucci et al. sugeriram que a atividade antioxidante dos flavonoides não estava envolvida com a inibição do crescimento das células de adenocarcinoma de cólon. Os autores concluíram que a Isoquercitina era um promissor agente antioxidante, mas que não inibia o crescimento tumoral (SALUCCI et al., 2002), discordando dos resultados encontrados no presente estudo, e nos demais relatos da literatura, em que a Isoquercitina exerceu inibição significativa do crescimento tumoral *in vivo*.

Um fator que pode ser a causa dessa discrepância é a forma como as medidas de crescimento tumoral são avaliadas. De modo geral faz-se necessário lembrar que o crescimento tumoral não ocorre de maneira linear. A taxa de crescimento tumoral foi determinada no presente estudo por meio de curva de regressão polinomial. Esta necessidade é ainda mais premente nos modelos de xenoenxerto onde a inoculação das células se faz em meio líquido, levando a formação inicial de pápula local que irá regridir com o passar do tempo pela absorção

do meio e morte de parte das células tumorais inoculadas, antes que o clone de células que originará o tumor, cresça. Este crescimento, em ciclos, com aparecimento da pápula, seguido de seu desaparecimento e depois, de novo crescimento local, gera o aspecto típico da curva polinomial encontrada no presente estudo. Outro fator que influencia o crescimento tumoral não linear é o desenvolvimento da neoangiogênese que, em momentos de não sustentação do metabolismo tumoral, gera focos de morte tumoral e conseqüentemente, sua diminuição seguida de novo crescimento, o que também pode influenciar diretamente nos resultados que devem, desta maneira, serem analisados em sua curva polinomial de crescimento.

Resultados de estudo *in vitro* do grupo de pesquisa (não publicados) não demonstraram inibição de crescimento celular para a linhagem HT29, tanto para a Rutina quanto para a quercitina, em contraste ao demonstrado *in vivo*. Tais resultados corroboram a hipótese de que não se deve descartar produtos potencialmente antitumorais antes dos estudos *in vivo*, em especial aqueles que são pró-drogas e dependem de seus metabólitos, portanto, para gerar o potencial benefício à saúde. Em acordo com esta afirmativa, recentemente a NIH (National Institute of Health) inicia investimento em modelos animais com implante de diversas linhagens tumorais para seleção de novas drogas (LEDFOORD, 2016). Entende ser este o método potencialmente mais adequado, até o momento, para esta seleção, à despeito das normativas, cada vez mais complexas e exigentes, para liberação do uso de animais em experimentação.

Quanto à forma de administração dos biocompostos, profilática e terapêutica, tanto a Rutina quanto a Isoquercitina, apresentaram mais efetividade quando administradas após o implante tumoral, denotando maior ação antitumoral no tratamento e menor ação profilática no desenvolvimento tumoral com o uso de flavonoides, embora sua ação profilática também exista, concordando com trabalhos que propõem utilização na quimioprevenção dos tumores com flavonoides (HSU et al., 2004; WANG et al., 2005). Possivelmente, a tendência seja inferir que a ação antioxidante possa oferecer proteção contra o desenvolvimento da neoplasia, entretanto, não foi o encontrado no presente estudo. Estes resultados que inicialmente parecem conflitantes podem dever-se ao modelo de implantação de células já trazer a neoplasia como doença instalada, não podendo o biocomposto agir preventivamente aos carcinógenos iniciadores das mutações que dão origem ao tumor, no modelo adotado no presente estudo. Há diversas possibilidades quanto aos tipos de desenvolvimento de modelos de câncer (figura 18).

Entre eles, os transgênicos, desenvolvidos de forma mais contemporânea; os implantados, mais utilizados na pesquisa atual ou aqueles induzidos quimicamente, há vantagens e desvantagens que precisam ser consideradas para a extrapolação dos dados encontrados (REIS et al, 2009). Resultado diferente poderia ter sido obtido ao se empregar, por exemplo, modelo de indução de tumor de cólon e não modelo de enxerto, na testagem dos biocompostos de forma profilática, o que deverá ser feito oportunamente.

| Modelo | Vantagem | Desvantagem |
|---------------------------------|--|---|
| Induzido por carcinógeno | Carcinógenos humanos Imunocompetentes Múltiplos estágios, causas, fatores e processos Fisiopatologia similar à humana | Indução de outras comorbidades |
| Transgênico | Imunocompetente Permite identificação de genes específicos relacionados à carcinogênese | Perda da heterogenicidade tumoral |
| Tumor implantável | Tumor implantável Câncer humano idêntico Útil no estudo de mecanismos de metástases | Imunocomprometido Difícil implantação Ortotópica Invasivo desde o início |

FIGURA 18. Vantagens e desvantagens de modelos animais de tumores (retirado de REIS, 2009)

No presente estudo, a pesagem diária dos animais teve como objetivo não apenas o acompanhamento de critérios de conforto e bem estar animal como também avaliar de forma objetiva um dos critérios de toxicidade dos biocompostos mas, mais ainda, a capacidade da Isoquercitina e da Rutina em prevenirem a caquexia induzida pelo tumor. Alguns estudos recentes relatam que os flavonoides são capazes de prevenir ou reduzir a caquexia, síndrome que afeta pacientes já seriamente comprometidos pelo crescimento tumoral e responsável pela diminuição na qualidade e expectativa de vida dos pacientes (EKAMBARAM et al., 2008; CAMARGO et al., 2011, CAMARGO et al., 2012).

Pesquisas têm demonstrado que citocinas pró-inflamatórias estão diretamente implicadas na etiologia da caquexia, sugerindo que essa síndrome seja uma condição inflamatória crônica (MCCARTHY, 2003). Assim, a atividade anti-inflamatória dos flavonoides seria potencialmente capaz de atenuar e/ou suprimir essa síndrome, possivelmente contribuindo para uma melhoria na qualidade de vida e no prognóstico do paciente, aliada à sua capacidade de inibição do crescimento tumoral.

Ao longo do tempo, notou-se aumento de peso nos animais que receberam a Isoquercitina em relação aos animais não tratados, denotando efeito protetor sistêmico dos flavonoides, além do efeito antitumoral, corroborando estudos da literatura quanto à prevenção da perda de peso em portadores de neoplasias (EKAMBARAM et al., 2008; CAMARGO et al., 2011, CAMARGO et al., 2012), entretanto não coincidem com os resultados encontrados para a Rutina quando, no grupo profilaxia houve perda significativa de peso. Estes resultados podem ser explicados pela ausência de efeito antitumoral da Rutina, permitindo a manutenção da produção de citocinas liberadas pelo tumor com progressão inflamatória e consequente evolução da caquexia na presença do tumor, em acordo com a afirmativa de McCarthy (MCCARTHY, 2003). Desta forma, os resultados, que sugeriam inicialmente os flavonoides como potenciais substâncias contra a caquexia tumoral, parecem estar melhor relacionados aos efeitos dependentes da inibição do crescimento tumoral do que da ação direta do flavonoide sobre a síndrome.

Alguns efeitos dos flavonoides têm sido apontados como ação pró-oxidante e antioxidante, incluindo inibição do crescimento tumoral (REN et al., 2003; MICHELS et al., 2005; WANG et al., 2005; LI et al., 2007; AMADO et al., 2014).

As células são unidades estruturais e funcionais sensíveis à ação de diversos fatores lesivos que interferem no seu metabolismo (NOVIKOFF et al., 1977). Todas as organelas celulares podem sofrer alterações quando interagem com as espécies reativas de oxigênio (EROs), porém, na membrana celular acarretam alterações na permeabilidade, comprometendo todo o metabolismo celular (FERREIRA et al., 1997). Quando a peroxidação lipídica acontece, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos e formação de produtos citotóxicos, como o MDA, resultando na morte celular (FERREIRA et al., 1997). Em estudos que visam avaliar o dano

celular pelo estresse oxidativo por meio da quantificação do MDA, produzido na peroxidação lipídica, sob um fator oxidante específico, o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é amplamente utilizado nos dias de hoje, com segurança. O estudo pioneiro na utilização do TBARS, realizado por John A. Buege e Steven D. Aust (BUEGE et al., 1978), teve como intuito principal avaliar os produtos da peroxidação lipídica em membrana microssomal, entre eles, o MDA.

EROs são possíveis agressores das células, podendo danificar todos os componentes celulares. Considerando os estudos de Halliwell e Gutteridge (1990), as EROs são produzidas em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio. O oxigênio (O_2) sofre redução tetravalente com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2) e hidroxila (OH^-), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Oxigênio (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio ($2H_2O$) e ácido hipocloroso (HOCl) não oxidantes dos radicais também são formados nesse processo.

O estresse oxidativo é um desequilíbrio bioquímico no qual a produção de EROs excede a capacidade antioxidante natural. Este desequilíbrio pode ocorrer quando o organismo é exposto a pró-oxidantes. Os EROS fazem parte dos agentes genotóxicos, promovendo dano oxidativo ao DNA celular acarretando mutação do tipo transversão na base nitrogenada guanina. Este desequilíbrio no ciclo celular favorece a formação dos pólipos (AMES et al., 1993; GEDIK et al., 2002; SCALISE et al., 2016).

Pesquisas apontam que a Quercetina e a Silibina possuem atividade inibitória da Xantina Oxidase, resultando em declínio do dano oxidativo (SHOSKES, 1998; NIJVELD et al., 2001). Os flavonoides são reconhecidos como agentes quimiopreventivos (HSU et al., 2004), entretanto, no presente estudo, não se pôde observar ação antioxidante com a administração da Isoquercitina profilática, discordando dos achados da literatura. Possivelmente isso se deva aos flavonoides também apresentarem efeitos pró-oxidantes e desta forma, agirem como inibidores da progressão de tumores (WANG et al., 2005; LEUNG et al., 2006). Entretanto não se observou maior lesão oxidativa no grupo com administração dos biocompostos em comparação ao controle, assim, os resultados encontrados não parecem estar relacionados à inibição anti ou pró-oxidante dos biocompostos.

O adenocarcinoma é a principal forma de câncer colorretal e, apesar de ainda haver dúvida sobre os fenômenos iniciais que levam o tecido normal a se transformar progressivamente em áreas de displasia focal e evoluírem para a neoplasia, existem fortes evidências sugerindo que o evento inicial de agressão ao tecido seja provocado por agentes genotóxicos existentes localmente e que sua gênese inclui como principal fator a disfunção apoptótica (BRIGHT-THOMAS E HARGEST, 2003).

A carcinogênese é complexa e resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais (HAMILTON e AALTONEN, 2000; LI e LAI, 2009; SCALISE et al., 2016). O modelo clássico de carcinogênese proposto em 1990 por Fearon e Vogelstein é baseado na sequência adenoma-carcinoma que envolve mutações em oncogenes (*K-ras* e *beta Catenina*) e a inativação de protooncogenes envolvidos na supressão tumoral como o *TP53* e suas proteínas relacionadas (FRATTINI et al., 2004; MARTINEZ et al., 2008; RÚA e PEÑA, 2012).

Em 2011, Hanahan & Weinberg reavaliaram o processo de tumorigênese demonstrando sua complexidade e poder adaptativo, expondo novas características emergentes na carcinogênese, como instabilidade genômica, evasão à mecanismos imunes e reações inflamatórias locais, as quais contribuem ativamente ao processo de proliferação e invasão neoplásica (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

A proteína TP53 possui papel importante no campo de pesquisa em câncer (ARAKAWA, 2005) por atuar ativamente em processos de apoptose, regulação do ciclo celular e contribuir para a integridade do genoma humano (JOERGER e FERSHT, 2010). Mutações do gene *TP53* são extremamente comuns e ocorrem em mais de 50% dos cânceres humanos (ARAKAWA, 2005; BAI e ZHU, 2006; HAO e CHO, 2014; SCALISE et al., 2016). No CCR, representam de 60 a 80% das mutações (PINHO e ROSSI, 1999; MARTINEZ et al., 2008), ocorrendo predominantemente em tumores do cólon distal (FRATTINI et al., 2004; SUGAI et al., 2006; MARTINEZ et al., 2008).

A TP53 pode ser ativada em resposta a diferentes estressores celulares, como dano ao DNA, e atua primariamente como fator de transcrição para a produção de diversas proteínas. Entretanto, ela pode agir especificamente em diferentes genes-alvos e no recrutamento de enzimas reparadoras de DNA (ARAKAWA, 2005; CLEWELL et al., 2014).

A linhagem tumoral de adenocarcinoma de cólon/HT-29 possui a característica intrínseca de mutação do *TP53*, garantindo o bloqueio de sua atividade. Entre os potenciais efeitos antitumorais dos flavonoides destacam-se a atividade antiproliferativa, a suspensão do ciclo celular de linhagens tumorais e/ou a indução da apoptose pela atividade pró-oxidante (ARCHIVIO et al., 2007; PIERINI et al., 2008; LOA et al., 2009). Compostos fenólicos mostram efeitos antiproliferativos, citotóxicos e atividade mais especificamente pró-apoptótica em células de câncer de várias linhagens e modelos animais de tumores entre outros (REN et al, 2003; LI et al, 2007; FRESCO et al., 2010). A resistência à morte celular e a sustentação de vias sinalizadoras de proliferação celular são dois dos principais alvos de terapias antitumorais descritos na literatura abordando os efeitos de flavonoides (YOSHIMIZU et al., 2004; PIERINI et al., 2008; YANG e LIU, 2009; KIM et al., 2011; HAO e CHO, 2014). Neste ensaio foi possível verificar a modificação da imunexpressão da TP53 pela ação dos flavonoides utilizados. Embora a literatura demonstre novas evidências onde os flavonoides podem atuar de maneira independente da via TP53 (KIM et al., 2011), a análise imunohistoquímica demonstrou redução significativa da expressão de TP53 mutada em todos os grupos testados, quando comparados ao grupo controle. Os resultados do presente estudo corroboram os dados da literatura e reafirmam a ação da Isoquercitina e da Rutina sob modulação da via apoptótica mediadas pela proteína TP53.

Estudos recentes que investigam a ação antitumoral de flavonoides demonstram o envolvimento de vias de regulação apoptótica, mediadas ou não pela via da proteína TP53 (TANIGAWA et al., 2008; KIM et al., 2011; LI e GAO, 2013). A atividade antiproliferativa dos flavonoides está relacionada com a sua capacidade de inibir a atividade da TP53 mutada na tradução proteica, resultando no aumento de células tumorais bloqueadas durante a mitose (AVILA et al., 1994), e/ou de induzir sua atividade apoptótica (MICHELS et al., 2005; WANG et al., 2005) e/ou do bloqueio do ciclo celular em diferentes estágios (LEPLEY et al., 1996; CASAGRANDE e DARBON, 2001; HADDAD et al., 2006). Tanigawa et al (2008) demonstrou que a quercetina possui ação direta dose-dependente na ativação da proteína TP53 e em genes dependentes da mesma, além de proporcionar bloqueio do ciclo celular, com aumento de células tumorais nas fases G2/M (TANIGAWA et al., 2008). Em conformidade ao estudo citado, Kim et al. (2011) e Chan et al. (2013) voltaram a demonstrar a ação antitumoral da quercetina

por atuação direta na ativação do processo apoptótico pela TP53, comprovando sua ação na regulação da proteína e, adicionalmente, demonstrando a ação do flavonoide em conjunto ao quimioterápico, aumentando sua eficácia (KIM et al., 2011; CHAN et al., 2013).

Desta forma, pode-se dizer, pelos resultados do presente estudo, que a ação antitumoral terapêutica dos flavonoides Rutina e Isoquercitina decorre, ao menos em parte, da modulação da TP53 a qual permite a indução de apoptose e diminuição do volume tumoral. Novos estudos são necessários para confirmar a ação profilática da Isoquercitina em modelo induzido de adenocarcinoma de cólon.

6. CONCLUSÕES

Segundo o delineamento do presente estudo, em modelo animal de adenocarcinoma de cólon humano, os flavonoides Rutina e Isoquercitina, administrados de forma profilática e terapêutica:

- a)** São biocompostos de ação antitumoral;
- b)** Influenciam a variação do peso dos animais, o qual parece melhor relacionado à ação antitumoral e diminuição do volume do tumor do que diretamente a atividade dos biocompostos;
- d)** Não demonstram ação antioxidante ou pró-oxidante, quando avaliada pelo método do TBARS;
- e)** São capazes de modular a imunoe expressão da TP53 mutada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agency for Research on Cancer. World cancer report. Lyon, France: IARC; 2008.

Ahmed, I.A.; Kelly, S.B.; Anderson, J.J.; Angus, B.; Challen, C.; Lunec, J. The predictive value of p53 and p33(ING1b) in patients with Dukes'C colorectal cancer. *Colorectal Dis*, 10(4):344–351, 2008.

Amado, N.G.; Fonseca, B.F.; Cerqueira, D.M.; Neto, V.M.; Abreu, J.G. Flavonoids: Potential WNT/beta-catenin signaling modulators in cancer. In *Life Sciences*, 89: 545–554, 2011.

Amado, N.G.; Predes, D.; Fonseca, B.F.; Cerqueira, D.M.; Reis, A.H.; Dudenhoefter, A.C.; Abreu, J.G. Isoquercitrin suppresses colon cancer cell growth in vitro by targeting the WNT/beta-catenin signaling pathway. *J Biol Chem*, 289(51):35456-35467, 2014.

American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2016*. Atlanta, American Cancer Society, 2016.

Ames, B.; Shigenaga, M.; Hagen, T. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:7915–7922, 1993.

Arakawa, H. p53, apoptosis and axon-guidance molecules. *Cell Death Differ*, 12(8):1057-1065, 2005.

Archivio, M.D.; Filsei, C.; Benedetto, R.D.; Gargiulo, R.; Giovannini, C.; Masella, R. Polpyhenols, dietary sources and bioavailability. *Annali del Istituto Superiore di Sanità*, 43(4):348-361, 2007.

Arts, I.C.; Sesink, A.L.; Faassen-Peters, M.; Hollman, P.C. The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides. *Br J Nutr*, 91(6):841-847, 2004.

Avila, M.A.; Velasco, J.A.; Cansado, J.; Notarlo, V. Quercetin mediates the down regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. *Cancer Res*, 54:2424-2428, 1994.

Azuma, K.; Ippoushia, K.; Teraob, J. Evaluation of tolerable levels of dietary quercetin for exerting its antioxidative effect in high cholesterol-fed rats. *Food Chem Toxicol*, 48(4):1117-1122, 2010.

Bai, L.; Zhu, W.G. p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. *J Cancer Mol*, 2(4):141-153, 2006.

Battacharya, P.K.; Barton, J.K. Influence of intervening mismatches on long range guanine oxidation in DNA duplexes. *J Am Chem Soc*, 123:8649-56, 2001.

Brand, L.; Munding, J.; Pox, C.P.; Ziebarth, W.; Reiser, M.; Hüppe, D.; Schmiegel, W.; Reinacher-Schick, A.; Tannapfel, A. β -catenin, Cox-2 and p53 immunostaining in colorectal adenomas to predict recurrence after endoscopic polypectomy. *Int J Colorectal Dis*, 28:1091-1098, 2013.

Bright-Thomas, R.M.; Hargest, R. APC, β -catenin and hTCF-4; an unholy trinity in the genesis of colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol*, 29:107–117, 2003.

Buege, J.A.; Aust, S.D. *Methods in Enzimology*, 52(C):302-310, 1978.

Chan, S.T.; Yang, N.C.; Huang, C.S.; Liao, J.W.; Yeh, S.L. Quercetin enhances the antitumor activity of trichostatin A through upregulation of p53 protein expression in vitro and in vivo. *PLoS One*, 8(1): e54255, 2013.

Camargo, C.A.; Da Silva, M E.F.; Da Silva, R.A.; Justo, G.Z.; Gomes-Marcondes, M.C.; Aoyama, H. Inhibition of tumor growth by quercetin with increase of survival and prevention of cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 406(4):638–642, 2011.

Camargo, C.A; Gomes-Marcondes, M.C.; Wutzki, N.C.; Aoyama, H. Naringin inhibits tumor growth and reduces interleukin-6 and tumor necrosis factor α levels in rats with Walker 256 carcinosarcoma. *Anticancer Res*, 32(1):129-133, 2012.

Casagrande, F.; Darbon, J.M. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK11. *Biochem Pharmacol*, 61(10):1205–1215, 2001.

Céspedes, M.V.; Espina, C.; García-Cabezas, M.A.; Trias, M.; Boluda, A.; Gómez del Pulgar, M.T.; Sancho, F.J.; Nistal, M.; Lacal, J.C.; Mangués, R. Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites. *Am J Pathol*, 170(3):1077-1085, 2007.

Chabner, B.A.; Roberts, T.G. Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*, 5(1):65-72, 2005.

Cisternas, J.R.; Varga, J.; Monte, O. *Fundamentos de Bioquímica Experimental*. Editora Atheneu, 2:7-19, 1999.

Clewell, R.A.; Sun, B.; Adeleye, Y.; Carmichael, P.; Efremenko, A.; McMullen, P.D.; Pendse, S.; Trask, O.J.; White, A.; Andersen, M.E. Profiling dose-dependent activation of p53-mediated signaling pathways by chemicals with distinct mechanisms of DNA damage. *Toxicol Sci*, 142:56-73, 2014.

Day, A.J.; Gee, J.M.; Dupont, M.S.; Johnson, I.T.; Williamson, G. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercitrin-4-glucoside in the rat small intestine: role of lactase phlorizin hydrolase and sodium-dependent glucose transporter. *Biochem Pharmacol*, 65:1199-1206, 2003.

de Araújo M.E.; Franco Y.E.M; Alberto T.G.; Sobreiro M.A.; Conrado M.A.; Priolli D.G.; Frankland A.C.S; Ruiz A.L.; de Carvalho J.E.; Carvalho P.O. Enzymatic de-glycosylation of rutin improves its antioxidant and antiproliferative activities. *Food Chem*, 141(1):266-73, 2013.

Ekambaram, G.; Rajendran, P.; Magesh, V.; Sakthisekaran, D. Naringenin reduces tumor size and weight lost in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats. *Nutr Res*, 28(2), 106-112, 2008.

Elsaleh, H.; Powell, B.; McCaul, K.; Grieu, F.; Grant, R.; Joseph, D.; Iacopetta, B. P53 alteration and microsatellite instability have predictive value for survival benefit from chemotherapy in stage III colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res*, 7:1343-1349, 2001.

Erlund, I.; Silast, M.L.; Alfthan, G.; Rantala, M.; Kesaniemi, Y.A.; Aro, A. Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and high or low in fruits and vegetables. *Eur J Clin Nutr*, 56(9):891-898, 2002.

Fearon, E.R.; Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1;61(5):759-767, 1990.

Felin, C.R.; Rocha, A.B.; Felin I.P.D.; Regner, A.; Grivicich, I. Expressão das proteínas p53 e Cox-2 em adenocarcinoma intestinal e mucosa adjacente. *Rev Bras Coloproct*, 28(1):19-25, 2008.

Fernandez, J.; Reyes, R.; Ponce, H.; Oropeza, M.; Van Calsteren, M-R; Jankowski, C.; Campos, M.G. Isoquercitrin from Argemone platyceras inhibits carbachol and leukotriene D4-induced contraction in guinea-pig airways. *Eur J Pharmacol*, 522:108-115, 2005.

Ferrali, M.; Signorini, B.; Caciotti, B.; Sugherini, L.; Ciccoli, L.; Giachetti, D.; Comporti, M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters* 416:123-129, 1997.

Ferreira, A.L.A., Matsubara, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Assoc. Med. Bras*, 43(1):61-68, 1997.

Fratini, M.; Balestra, D.; Suardi, S.; Oggionni, M.; Alberici, P.; Radice, P.; Costa, A.; Daidone, M.G.; Leo, E.; Pilotti, S. Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res*, 10(12 Pt 1):4015-4021, 2004.

Fresco, P.; Borges, F.; Marques, M.P.; Diniz, C. The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis. *Curr Pharm Des* 16(1):114-34. 2010.

- Graefe, E.U.; Wittig, J.; Mueller, S.; Riethling, A.K.; Uehlek, B.; Drewelow, B.; Pforte, H.; Jacobasch, G.; Derendorf, H.; Veit, M. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol*, 41(5):492-499, 2001.
- Gedik, C.M.; Boyle, S.P.; Wood, S.G.; Vaughan, N.J.; Collins, A.R. Oxidative stress in humans: validation of biomarkers of DNA damage. *Carcinogenesis* 23(9):1441-6, 2002.
- Gomes, M.A.; Priolli, D.G.; Tralhão, J.G.; Botelho, M.F. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, biology, diagnosis, and therapies. *Rev Assoc Med Bras*, 59(5):514-24, 2013.
- Gold, P.; Freedman, S.O. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med*, 122:467-81, 1965.
- Goodman, M.; Bostick, R.M.; Dash, C.; Terry, P.; Flanders, W.D.; Mandel, J. A summary measure of pro- and anti-oxidant exposures and risk of incident, sporadic, colorectal adenomas. *Cancer Causes Control*, 19:1051–1064, 2008.
- Haddad, A.Q.; Venkateswaran, V.; Viswanathan, L.; Teahan, S.J.; Fleshner, N.E.; Klotz, L.H. Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 9:68–76, 2006.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*, 280(1):1-8, 1990.
- Halliwell, B.; Rafter, J.; Jenner, A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr*, 81:268S–276S, 2005.
- Hamilton, S.; Aaltonen, L. WHO Classification of Tumours, Pathology & Genetics, Tumours of the Digestive System. World health Organization: Geneva; 2000.
- Hanahan, D.; Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100:57-70, 2000.
- Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 4;144(5):646-74, 2011.
- Hao, Q.; Cho, W.C. Battle Against Cancer: An Everlasting Saga of p53. *Int. J. Mol. Sci*, 15(12):22109-22127, 2014.
- Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*, 13:572-584, 2002.
- Hollman, P.C.H.; Bijman, M.N.; Van Gameren, Y.; Cnossen, E.P.; De Vries, J.H.; Katan, M.B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic Res*, 31(6):569-73., 1999.

Hsu, Y.L.; Kuo, P.L.; Liu, C.F.; Lin, C.C. Acacetin induced cell cycle arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Cancer Letters*, 212:53-60, 2004.

Imlay, J.; Chin, S. M.; Linn, S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*, 240:640-642, 1998.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, INCA, 2016.

Itzkowitz, S.H.; Yio, X. Inflammation and cancer. IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287(1):G7-G17, 2004.

Joerger, A.C.; Fersht, A.R. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(6):a000919, 2010

Kaklamanis, L.; Gatter, K.C.; Mortensen, N.; Baigrie, R.J.; Heryet, A.; Lane, D.P.; Harris, A.L. p53 expression in colorectal adenomas. *Am J Pathol*, 142(1):87-93, 1993.

Kasai, H.; Nishimura, S. Hydroxylation of the C-8 position of deoxyguanosine by reducing agents in the presence of oxygen. *Nucleic Acids Symp Ser*, 12:165-7, 1983.

Kawanishi, S.; Hiraku, Y.; Pinlaor, S.; Ma, N. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Biol Chem*, 387(4):365-72, 2006.

Kim, G.N.; Kwon, Y.I.; Jang, H.D. Protective mechanism of quercetin and rutin on 2,2'- azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride or Cu²⁺-induced oxidative stress in HepG2 cells. *Toxicology in Vitro*, 25(1)138-144, 2011.

Kin, H.; Jen, J.; Vogelstein, B.; Hamilton, S. R. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol*, 145:148-56, 1994.

Křížková, J.; Burdová, K.; Stiborová, M.; Křen, V.; & Hodek, P. The effects of selected flavonoids on cytochromes P450 in rat liver and small intestine. *Interdiscip Toxicol*, 2(3):201–204, 2009.

Kroon, P.A.; Clifford, M.N.; Crozier, A.; Day, A.J.; Donovan, J.L.; Manach, C.; Williamson, G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr.*, 80:15-21, 2004.

Ladeira, M.S.; Bueno, R.C.; Dos Santos, B.F.; Pinto, C.L.; Prado, R.P.; Silveira, M.G.; Rodrigues, M.A.; Bartchewsky, W. Jr.; Pedrazzoli, J. Jr.; Ribeiro, M.L.; Salvadori, D.M. Relationship among Oxidative DNA Damage, Gastric Mucosal Density and the Relevance of cagA, vacA and iceA Genotypes of *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci*, 53(1):248-55, 2008.

Ladeira, M.S.P.; Rodríguez, M.A.M.; Salvadori, D.M.F.; Queiroz, D.M.M.; Freire-Maia, D.V. DNA Damage in Patients Infected by *Helicobacter pylori*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13:631-7, 2004.

Ledford, H. US cancer institute to overhaul tumour cell lines. Disponível em: <<http://www.nature.com/news/us-cancer-institute-to-overhaul-tumour-cell-lines-1.19364>>. Acesso em 01 jun. 2016.

Lepley, D.M.; Li, B.; Birt, D.F.; Pelling, J.C. The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratinocytes. *Carcinogenesis*, 11:2367-75, 1996.

Leung, E.Y.; Crozier, J.E.; Talwar, D.; O'Reilly, D.S.; McKee, R.F.; Horgan, P.G.; McMillan, D.C. Vitamin antioxidants, lipid peroxidation, tumour stage, the systemic inflammatory response and survival in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer*, 123:2460–2464, 2008.

Leung, H.W.C.; Kuo, C.L.; Yang, W.H.; Lin, C.H.; Lee, H.Z. Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. *Eur J Pharmacol*, 534:12-18, 2006.

Li, Y.; Fang, H.; Xu, W. Recent advance in the research of flavonoids as anticancer agents. *Mini Rev Med Chem*, 7(7):663-678, 2007.

Li, F.Y.; Lai, M.D. Colorectal cancer, one entity or three. *J Zhejiang Univ Sci B*, 10(3):219-229, 2009.

Li, Z.; Gao, Q. Induction of apoptosis in HT-29 cells by quercetin through mitochondria-mediated apoptotic pathway. *Anim Cells Syst*, 17:147–153. 2013.

Lima, J.M.; Serafim, P.V.P.; Silva, I.D.C.G.; Forones, N.M. Role of the genetic polymorphism of p53 (codon 72) gene in colorectal cancer. *Arq Gastroenterol*, 43(1):8-13, 2006.

Loa, J.; Chow, P.; Zhang, K. Studies of structure–activity relationship on plant polyphenol-induced suppression of human liver cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 63(6):1007–1016, 2009.

Madeira, B.C.; Pêgas, K.L.; Zettler, C.G.; Cambuzzi, E. *Rev bras Coloproct*, 29(4):472-478, 2009.

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79(5):727-747, 2004.

Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans: review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*, 81:230-242, 2005.

Martinez, C.A.R.; Waisberg, J.; Palma, T.R.; Silva, F.Z.; Cimerman, G.; Goffi, F.S. Morphometric study of gastric mucosa in dogs submitted to proximal gastric vagotomy, splenectomy or proximal gastric vagotomy associated with splenectomy. *Acta Cir Bras*, 17(5):289-98, 2002.

Martinez, C.A.R.; Priolli, D.G.; Cardinalli, I.A.; Pereira, J.A.; Portes, A.V.; Margarido, N.F. Influência da localização do tumor na expressão tecidual da proteína p53 em doentes com câncer colorretal: estudo de 100 casos. *Rev Col Bras Cir*, 35(4):235-243, 2008.

Martinez, C.A.R.; Cordeiro, A.T.; Priolli D.G.; Miranda, D.D.C.; Bartchewsky, Júnior W.; Margarido, N.F.; Ribeiro, M.L. Avaliação da expressão tecidual do gene de reparo MLH1 e dos níveis de dano oxidativo ao DNA em doentes com câncer colorretal. *Rev Bras Coloproct*, 29(3):303-313, 2009.

Martinez, N.P.; Kanno, D.T.; Pereira, J.A.; Cardinalli, I.A.; Priolli, D.G. Beta-Catenin and E-Cadherin tissue content as a prognostic marker in left-side colorectal cancer. *Cancer Biomark*, 8:129-135, 2011.

Martins, F.; Suzan, A.J.; Arcari, D.P.; Ribeiro, M.L.; Bastos, D.H.M; Carvalho, P.O. Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. *Br J Nutr*, 101: 519-524, 2009.

Matos, D.; Saad, S.S.; Franceschi Jr, O.; Barreto, E.P.; Novelli, M.D. Estudo experimental comparativo entre anastomoses colóclicas com sutura manual e com anel biofragmentável. *Rev Assoc Med Bras*, 39(4):201-6, 1993.

McCarthy, D. O. Rethinking Nutritional Support for Persons with Cancer Cachexia. *Biol Res Nurs*, 5(1):3-17, 2003.

McGregor, D. Carcinogenicidade and genotoxic carcinogens. In: Ballantyne, B.; T. Mars & T. Syversen, eds. *General and Applied Toxicology*. 2nd. edition. London, Macmillan Reference. 1099-1117, 2000.

Michels, G.; Watjen, W.; Niering, P.; Steffan, B.; Tran, T.Q.H.; Hovolou, Y.; Kampkotter, A.; Bast, A.; Proksch, P.; Kahl, R. Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells. *Toxicology Care*, 206:337-348, 2005.

Mizuma, T.; Ohta, K.; Hayashi, M.; Awazu, S. Intestinal active absorption of sugarconjugated compounds by glucose transport system: implication of improvement of poorly absorbable drugs. *Biochem Pharmacol*, 43:2037-2039, 1992.

Morand, C.; Manach, C.; Crespy, V.; Remesy, C. Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. *Free Radic Res*, 33(5):667-676, 2000.

- Németh, K.; Plumb, G.W.; Berrin, J.G.; Juge, N.; Jacob, R.; Naim, H.Y.; Williamson, G.; Swallow, D.M.; Kroon, P.A. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr*, 42:29-42, 2003.
- Nijveldt, R.J.; van Nood, E.; van Hoorn, D.E.; Boelens, P.G.; van Norren, K.; van Leeuwen, P.A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 74(4):418-25, 2001.
- Novelli, M. D. Introdução de uma nova metodologia para análise morfométrica através do processamento de imagens por computadores, com aplicação no ensino e na pesquisa. Tese (Doutorado em Ciências da Computação) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia, São Paulo, 1992.
- Novelli, M. D.; Borra, R. C.; Matos, D. Aplicação do processamento de imagens por computador na quantificação de variáveis histopatológicas na reparação tecidual de anastomoses colócicas em cães. *Rev Assoc Med Bras*, 43(4):277-282, 1997.
- Novikoff, A.B.; Holtzman, E. Células e estrutura celular. Editora Interamericana, 2:5-15, 1977.
- Olthof, M.R.; Hollman, P.C.H.; Buijsman, M.N.C.P.; van Amelsvoort J.M.M.; Katan, M.B. Chlorogenic Acid, Quercetin-3-Rutinoside and Black Tea Phenols Are Extensively Metabolized in Humans. *J. Nutr*, 133(6):1806-181, 2003.
- Orfali, G.C.; Duarte, A.C.; Bonadio, V.; Martinez, N.P.; de Araújo, M.E.; Priviero, F.B.; Carvalho, P.O.; Priolli, D.G. Review of anticancer mechanisms of isoquercetin. *World J Clin Oncol*, 10;7(2):189-99, 2016.
- Pantelouris, E.M. Absence of thymus in a mouse mutante. *Nature*, 217:370-371, 1968.
- Park, S.H.; Kim, H.J.; Yim, S.H.; Kim, A.R.; Tyagi, N.; Shen, H.; Kim, K.K.; Shin, B.A.; Jung, D.W.; Williams, D.R. Delineation of the Role of Glycosylation in the Cytotoxic Properties of Quercetin using Novel Assays in Living Vertebrates. *J Nat Prod*, 77(11): 2389-2396, 2014.
- Petersen, S.; Thames, H.D.; Nieder, C.; Petersen, C.; Baumann, M. The results of colorectal cancer treatment by p53 status: treatment-specific overview. *Dis. Colon Rectum*, 44(3):322–333, 2001.
- Pierini, R.; Gee, J.M.; Belshaw, N.J.; Johnson, I.T. Flavonoids and intestinal cancers. *B J Nutr*, 99:ES53–ES59, 2008.
- Pilz, J.; Meineke, I.; Gleiter, C.H. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *J Chromatogr B*, 742:315–325, 2000.

Pinho, M.S.L.; Rossi, B.M. Conceitos atuais sobre a carcinogênese colorretal. *Rev Bras Coloproct*, 19(1):57-60, 1999.

Pinho, M.S.L. Proteína p53: Algum Valor clínico ou apenas pesquisa? Uma revisão da Literatura. *Rev Bras Coloproct*, 20(4):258-60, 2000.

Pool-Zobel, B.; Leucht, U. Induction of DNA damage in human colon cells derived from biopsies by suggested risk factors of colon cancer. *Mutat Res*, 375:105-16, 1997.

Priolli, D.G. Cicatrização da anastomose cólica. Avaliação através da associação de métodos convencionais com análise de imagem auxiliada por computador. Estudo experimental em ratos. Tese (Mestrado em Gastroenterologia Cirúrgica) – Hospital Servidor Público Estadual “Francisco Morato Oliveira”, São Paulo, 1999.

Priolli, D.G.; Margarido, N.F.; Martinez, C.A.R.; Rotta, C.M.; Stephani, S.M. Edema quantification by computerized morphometry as an evaluation parameter for the resistance of colon anastomoses. *Acta Cir Bras*, 18:398-406, 2003.

Priolli, D.G.; Cardinalli, I.A.; Piovesan, H.; Margarido, N.F.; Martinez, C.A.R. Proposta para Estadiamento do Câncer Colorretal Baseada em Critérios Morfofuncionais. Correlação com Níveis Séricos do Antígeno Carcinoembrionário. *Rev Bras Coloproct*, 27:374-383, 2007.

Priolli, D.G.; Martinez, C.A.R.; Piovesan, H.; Cardinalli, I.A.; Margarido, N.F.; Waisberg, J.: Morphofunctional Malignancy Grading is a Valuable Prognostic Factor for Colorectal Cancer. *Arq Gastroenterol*, 47:13-20, 2010.

Priolli, D.G.; Canello, T.P.; Lopes, C.O.; Valdívia, J.C.; Martinez, N.P.; Açari, D.P.; Cardinalli, I.A.; Ribeiro, M.L. Oxidative DNA damage and β -catenin expression in colorectal cancer evolution. *Int J Colorectal Dis*, 28(5):713-22, 2013.

Priolli, D.G.; Abrantes, A.M.; Neves, S.; Gonçalves, A.C.; Lopes, C.O.; Martinez, N.P. Microenvironment influence on human colon adenocarcinoma phenotypes and matrix metalloproteinase-2, p53 and β -catenin tumor expressions from identical monoclonal cell tumor in the orthotopic model in athymic nude rats. *Scand J Gastroenterol*, 49(3):309-316, 2014.

Reis, L.O.; Pereira, T.C.; Favaro, W.J.; Cagnon, V.H., Lopes-Cendes, I.; Ferreira, U. Experimental animal model and RNA interference: a promising association for bladder cancer research. *World J Urol*, 27(3):353-61, 2009.

Ren, W.; Qiao, Z.; Wang, H.; Zhu, L.; Zhang, L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev*, 23(4):519-34, 2003.

Ribeiro, Jr. U.; Safatle-Ribeiro, A.V. p53 in clinical contexts: yes or not? *Arq Gastroenterol*, 43(1):6-7, 2006.

- Ribeiro, M.L.; Priolli, D.G.; Miranda, D.D.C.; Arçari, D.P.; Pedrazzoli, Jr. J.; Martinez, C.A.R. Analysis of Oxidative DNA Damage in Patients with Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 7(4):267-272, 2008.
- Ribeiro, M.L.; Priolli, D.G.; Miranda, D.D.C.; Paiva, D.A.; Pedrazzoli, Júnior. J.; Martinez, C.A.R. Avaliação do Dano Oxidativo ao DNA de Células Normais e Neoplásicas da Mucosa Cólica de Doentes com Câncer Colorretal. *Rev Bras Coloproct*, 27(4):391-402, 2007.
- Rossingol, R.; Gilkerson, R.; Aggeler, R.; Yamagata, K.; Remington, S. J.; Capaldi, R. A. Energy substrate mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res*, 64:985-993, 2004.
- Russo, A.; Bazan, V.; Iacopetta, B. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol*, 23(30):7518–7528, 2005.
- Rygaard, J.; Povlsen, C.O. Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 77(4):758-60, 1969.
- Salucci, M.; Stivala, L.A.; Maiani, G.; Bugianesi, R.; Vannini, V. Os flavonoides e seu efeito sobre o ciclo celular de células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco2). *Br J Cancer*, 86(10):1645-1651, 2002.
- Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*, 130:2073S-2085S, 2000.
- Scalise J.R.; Poças R.C.; Caneloi T.P.; Lopes C.O.; Kanno D.T.; Marques M.G.; Valdivia J.C.; Maximo F.R.; Pereira J.A.; Ribeiro M.L.; Priolli D.G. DNA Damage Is a Potential Marker for TP53 Mutation in Colorectal Carcinogenesis. *J Gastrointest Cancer*, 47:1- 8, 2016.
- Seril, D.N.; Liao, J.; Yang, G.Y.; Yang, C.S. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animals models. *Carcinogenesis*, 24:353-62, 2003.
- Shoskes, D.A. Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemicrenal injury: A new class of renoprotective agents. *Transplantation*, 66(2):147-162, 1998.
- Souza, M.V.; Priolli, D.G.; Portes, A.V.; Cardinali, I.A.; Pereira, J.A.; Martinez, C.A.R. Evaluation by computerized morphometry of histopathological alterations of the colon wall in segments with and without intestinal transit in rats. *Acta Cir Bras*, 23(5):417-424, 2008.
- Sthephani, S.M.; Novelli, M.D., Leite, M.S.B.; Bromberg, S.H.; Andretto, R.; Pinto Jr., P.E.; Zanotto, A.; Farhoud, S.; Priolli, D.G. Processamento de imagens auxiliado pelo computador na avaliação da cicatrização da anastomose do colo esquerdo obstruído em ratos. *Estudos Vida e Saúde*, 31:1181-96, 2004.

Sugai, T.; Habano, W.; Jiao Y.F.; Tsukahara, M.; Takeda, Y.; Otsuka, K.; Nakamura, S. Analysis of Molecular Alterations in Left- and Right-Sided Colorectal Carcinomas Reveals Distinct Pathways of Carcinogenesis. *J Mol Diagn*, 8(2):193-201, 2006.

Tamano, S.; Hatahara, Y.; Sano, M.; Hagiwara, A.; Nakamura, M.; Washino, T.; Imaida, K. 13-Week oral toxicity and 4-week recovery study of enzymatically modified isoquercitrin in F344/DuCrj rats. *J. Food Chem*, 8(3):161-166, 2001.

Tanigawa, S.; Fujii, M.; Hou, D.X. Stabilization of p53 is involved in quercetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 72(3):797-780, 2008.

Thygesen, P.; Hougen, H.P.; Christensen, H.B.; Rygaard, J.; Svendsen, O.; Juul, P. Identification of the mononuclear cell infiltrate in the superior cervical ganglion of athymic nude and euthymic rats after guanethidine-induced sympathectomy. *Int J Immunopharmacol*, 12(3):327-330, 1990.

Tomayko, M.M.; Reynolds, C.P. Determination of subcutaneoustumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemoter Pharmacol*, 24(3):148-154, 1989.

Toyokuni, S.; Okamoto, K.; Yodoi, J.; Hiai, H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett*, 358:1-3, 1995.

Vojtěšek, B.; Bártek, J.; Midgley, C.A.; Lane, D.P. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53: New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Methods*, 151:237-44, 1992.

Walle, T.; Walgren, R.A.; Walle, U.K.; Galijatovic, A.; Vaidyanathan, J.B. Understanding the bioavailability of flavonoids through studies in Caco-2 cells. In: RICEEVANS, C.; PACKER, L., editors. *Flavonoids in Health and Disease*. New York: Marcel Dekker, p. 349-362, 2003.

Wang, Y.; Chan, F.L.; Chen, S.; Leung, L.K.: The plant polyphenol butein inhibits testosterone-induced proliferation in breast cancer cells expressing aromatase. *Life Sciences* 77:39-51, 2005.

Wang, J.; Zhao, L-L; Sun, G-X; Liang, Y.; Wu, F-A; Chen, Z.; Cui, S. Acomparison of acidic and enzymatic hydrolysis of rutin. *African Journal of Biotechnology*, 10(8):1460-1466, 2011.

Wolffram, S.; Blöck, M.; Ader, P. Quercetin-3-Glucoside Is Transported by the Glucose Carrier SGLT1 across the Brush Border Membrane of Rat Small Intestine. *J Nutr*, 132(4):630-635, 2002.

Yamaguchi, K.; Sugano, K.; Fukayama, N.; Nakashima, Y.; Saotome, K.; Yokoyama, T.; Yokota, T.; Ohkura, H.. Polymerase chain reaction-based approaches for detection of allelic loss in the p53 tumor suppressor gene in colon neoplasms. *Am J Gastroenterol*, 92:307-312, 1997.

Yang, C.S.; Sang, S.; Lambert, J.D.; Lee, M.J. Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. *Mol Nutr Food Res*, 52:139-151, 2008.

Yang, J.; Liu, R.H.; Synergistic effect of apple extracts and quercetin 3-beta-d-glucoside combination on antiproliferative activity in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *J Agric Food Chem*, 57:8581-8586, 2009.

Yoshimizu, N.; Otani, Y.; Saikawa, Y.; Kubota, T.; Yoshida, M.; Furukawa, T.; Kumai, K.; Kameyama, K.; Fujii, M.; Yano, M.; Sato, T.; Ito, A.; Kitajima, M. Anti-tumour effects of nobiletin, a citrus flavonoid, on gastric cancer include: antiproliferative effects, induction of apoptosis and cell cycle deregulation. *Aliment Pharmacol Ther*, 20:95-101, 2004.

ANEXO I**Comitê de Ética em Pesquisa – CEP**

Bragança Paulista, 30 de Maio de 2012.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**Projeto de Pesquisa:** INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO/APOPTÓTICO DE NOVOS DERIVADOS DE FLAVONÓIDES: ESTUDOS IN VITRO E IN VIVO.**ÁREA DE CONHECIMENTO:** Saúde e Biológicas**Autor(es):** Profa. Dra. Denise Gonçalves Priolli; Profa.Dra. Patricia de Oliveira Carvalho**Instituição:** UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO**Protocolo:** 001.05.12

Prezado(a)(s) Pesquisador(a)(s),

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou em reunião ordinária dia **30/05/2012** a **pendência** do projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: APROVADO
Carlos Augusto Real MartinezCoordenador do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa
Universidade São Francisco