

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO  
Pós Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde

**NATALIA PERES MARTINEZ**

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DA RUTINA  
ENZIMATICAMENTE MODIFICADA NO ADENOCARCINOMA DE  
CÓLON. ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Bragança Paulista  
2016

NATALIA PERES MARTINEZ – R.A. 001201202835

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DA RUTINA  
ENZIMATICAMENTE MODIFICADA NO ADENOCARCINOMA DE  
CÓLON. ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Tese apresentada no Programa de Pós  
graduação *Stricto Sensu* em Ciências da  
Saúde da Universidade São Francisco  
como requisito parcial para obtenção do  
título de Doutor em Ciências da Saúde.

**Área de Concentração:** Biologia  
Molecular e Celular

**Orientador:** Prof. Dra. Denise  
Gonçalves Priolli

Bragança Paulista  
2016

QV 269 Martinez, Natalia Peres.

M337i            Investigação do potencial antitumoral da rutina  
enzimaticamente modificada no adenocarcinoma de cólon :  
estudos *in vitro* e *in vivo* / Natalia Peres Martinez. –  
Bragança Paulista, 2016.  
111 p.

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

Orientação de: Denise Gonçalves Priolli.

1. Rutina. 2. Xenoenxerto. 3. Citotoxinas. 4. Ensaios de

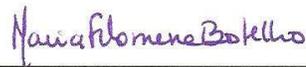
Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de

Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

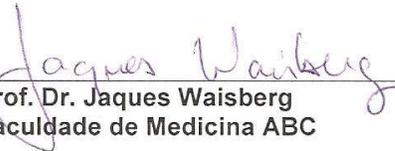
MARTINEZ, P., Natália, "Investigação do Potencial Antitumoral da Rutina Enzimaticamente Modificada no Adenocarcinoma de Cólon. Estudos In Vitro e In Vivo" Tese defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 31 de Agosto de 2016 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dra. Denise Gonçalves Priolli  
Universidade São Francisco



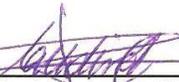
Prof. Dra. Maria Filomena Botelho  
Universidade de Coimbra



Prof. Dr. Jaques Waisberg  
Faculdade de Medicina ABC



Prof. Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero  
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Mario Angélio Claudino  
Universidade São Francisco

MARTINEZ, P., Natalia, **“Investigação do potencial antitumoral da rutina enzimaticamente modificada no adenocarcinoma de cólon/HT-29. Estudos *in vitro* e *in vivo*”** Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em XXX, pela banca examinadora constituída pelos professores:

## DEDICATÓRIA

À minha “vó Liza” que sempre foi minha inspiração para a vida.

À Professora Denise Gonçalves Priolli que sempre foi minha inspiração nas Artes Médicas e na Ciência.

## AGRADECIMENTOS

À Professora Denise Gonçalves Priolli por ser orientadora no sentido amplo da palavra, por acreditar que eu era capaz.

A meu pai Antonio, minha mãe Marilise, minha irmã Bruna que tantas vezes me apoiaram.

Ao Rodrigo que me deu força e a tranquilidade necessária para continuar.

Ao amigo Daniel de Castilho.

Aos alunos Guilherme Orfalli, Carolina Duarte, Julio Valdivia e Renato Colenci.

À Universidade São Francisco que foi parte integral da minha formação.

À CAPES pela bolsa de estudos.

## RESUMO

Devido às propriedades antitumorais dos flavonóides, *in vitro*, em modelos animais e em ensaios clínicos; tendo em vista o papel promissor da terapia antineovascular no tratamento do câncer, assim como dos flavonoides na indução da apoptose tumoral; reconhecendo que os efeitos biológicos dependem da estrutura química dos flavonoides e que as reações de biotransformações enzimáticas têm apresentado vantagens sobre os processos que envolvem reações químicas, como disponibilidade comercial das enzimas, versatilidade catalítica e especificidade pelos substratos; o desenvolvimento e aperfeiçoamento de novas moléculas eficazes para aplicação na terapêutica do câncer, utilizando como protótipo os flavonóides encontrados na natureza, pode representar uma nova perspectiva terapêutica antitumoral. **Objetivo:** Determinar se a rutina hidrolisada, obtida por hidrólise enzimática, apresenta ação antitumoral na profilaxia e terapêutica de carcinoma de colon, prospectando seu possível mecanismo de ação. **Material e Métodos.** A rutina hidrolisada (RH) foi obtida à partir da desglicolização. As reações de biotransformação foram monitoradas por espectrometria de massa (ESI-MS). A ação terapêutica foi avaliada por testes de citotoxicidade e citometria de fluxo *in vitro*. A atividade antiproliferativa utilizou ensaio da sulforrodamina B (SBR). Apoptose e ciclo celular foram analisados por citometria de fluxo em 6, 12, 24 e 48 horas. Foi utilizado xenoenxerto heterotópico de adenocarcinoma de cólon em camundongos atímicos. Os animais foram gavados por sete dias consecutivos com o biocomposto. Nos grupos tratamento o início da gavagem ocorreu após o tumor atingir 1cm<sup>3</sup>. O grupo profilaxia foi tratado até o dia que precedeu o implante tumoral. A avaliação da expressão de ING2, Vash (inibina) e TP53 foi realizada por imunohistoquímica quantificando a resposta de proliferação celular (ING2), de antiangiogênese (Vash) e da apoptose (TP53) por processamento de imagem assistido por computador. Realizou-se também quantificação microvascular dos tumores. Determinação de malonaldeído (MDA) avaliou a peroxidação lipídica nos tumores tratados em comparação ao controle. **Resultados *in vitro*:** Houve inibição do crescimento tumoral de células HT-29/adenocarcinoma de cólon com a utilização da rutina hidrolisada ( $p < 0,05$ ). RH em concentrações de 75 e 100 ug/ml, às 48 horas, demonstrou ação pró-proliferativa, enquanto em concentração de 250 ug/ml demonstrou efeito anti-proliferativo ( $p < 0,05$ ). Não houve ação da rutina hidrolisada sobre a apoptose na linhagem tumoral HT-29. **Resultados *in vivo*:** A administração da RH profilática, determinou redução do crescimento tumoral quando comparada ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). A RH profilática teve importante diminuição na velocidade de crescimento do tumor ( $p < 0,05$ ). RH em ambas as administrações, terapêutica ou profilática, levou a perda significativa de peso. Não foi observada alteração na quantidade do MDA nos grupos estudados portanto, não houve ação da RH na peroxidação lipídica tumoral. A RH profilática ou terapêutica, não mostrou alteração na expressão de ING2. O grupo RH demonstrou menor imunexpressão da VASH em comparação ao controle ( $p < 0,05$ ). Quanto à análise da quantificação microvascular, não houve diferença entre animais que receberam rutina hidrolisada de forma profilática comparativamente ao grupo controle. Houve diminuição da imunexpressão de TP53 em todos os tumores quando comparados ao controle ( $p < 0,05$ ). **Conclusões:** A RH obtida por hidrólise enzimática apresenta ação antitumoral na profilaxia do adenocarcinoma de cólon. Os possíveis mecanismos de ação da Rutina hidrolisada estão relacionados à diminuição da imunexpressão de TP53 mutada e da inibina, inibindo o crescimento do tumor por limitação à neovascularização, assim como a indução da apoptose por diminuição da expressão de TP53 mutada.

---

**Palavras Chave:** Rutina, citotoxicidade, neoplasia colorretal, xenoenxerto, Testes de Drogas Anticâncer.

## ABSTRACT

Due to flavonoids antitumor activity, considering the importance of antineovascular activity in cancer treatment as well as flavonoids capacity to induce cancer cells apoptosis. Understanding that biologic effects depends on chemical structure and that enzymatic biotransformation reactions do have advantages over chemical processes. The development of new molecules to act in cancer therapeutic portfolio, using nature found flavonoids as bases, could represent a new perspective to cancer therapy. **Material and Methods:** The hidroyzed rutin (HR) was obtained from deglycosylation. Biotransformation reaction was monitored by mass espectofotometry (ESI-MS) The therapeutic effect was evaluated by *in vitro* cytotoxicity assays and flow cytometry. The antiproliferative activity was tested by sulforhodamine B assay. (SBR). Apoptosis and cell cycle were analyzed by flow cytometry of HR for 6, 12, 24 and 48 hours. Heterotopic xenografts of colon carcinoma was performed in athymic mice. The animals received gavage for seven consecutive days with the biocompound. For the treatment group the gavage started right after the tumor reaches 1cm<sup>3</sup>. Prophylaxis group received gavage until the day the tumor implantation was proceeded. ING2, VASH and TP53 expression was evaluated by immunohistochemistry and quantified by means of cell proliferation response (ING2) and anti-angiogenesis (Vash) and apoptosis (TP53) by computer-assisted image processing. Determination of malondialdeyde (MDA) was assessed by lipid peroxidation in the treated tumors and compared to control. **Results: *In vitro*:** HR at concentrations of 75 and 100 mg/ml at 48 hours, showed proliferative action, while at a concentration of 250 mg/ml showed anti-proliferative effect ( $p < 0,05$ ). ***In vivo*:** The administration of prophylactic HR determined reduction of tumor growth when compared to the control group ( $p < 0,05$ ). Prophylactic HR had significant decrease effect in tumor growth rate ( $p < 0,05$ ). HR administered as therapeutic or prophylactic form led to significant weight loss ( $p < 0,05$ ). There was no change in MDA in all groups so, there was no action of HR in tumor lipid peroxidation. Prophylactic or therapeutic HR showed no change in ING2 expression. The HR group showed greater VASH Immunoexpression than the control group ( $p < 0,05$ ). The microvascular quantification showed no difference between animals receiving HR prophylactically compared to the control group. There was a decrease in immunoexpression of TP53 mutated in all tumors when compared to the control group ( $p < 0,05$ ). **Conclusion:** HR, obtained by enzymatic hydrolysis, has antitumor activity in the prophylaxis of colon adenocarcinoma. Possible mechanisms are related to reducing mutated TP53 and increasing inhibin, inhibiting tumor growth reducing angiogenesis as well as decreasing TP53 expression and apoptosis induction.

---

**Palavras Chave:** rutin, cytotoxicity, colonic neoplasm, Xenograft Model Antitumor Assays antitumor Drugs Screening Assays

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIACÕES E SIGLAS

8-OHdG – 8-Hidroxi-guanina

ABC – complexo estreptavina-biotina-peroxidase

Anti-p53 - Anti-human p53 protein (proteína p53 anti-humano)

APC - Adenomatous polyposis coli

ATCC - American Type Culture Collection

CCR – Câncer Colorretal

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CH3 - Metil

CIN – do Inglês Chromosomal Instability, Instabilidade Cromossômica

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CONCEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Ética

CONEP – Conselho Nacional de Ética em Pesquisa

DAB – solução de diaminobenzidina

DII – Doença Inflamatória Intestinal

DMSO – do Inglês Dimethyl Sulfoxide, Sulfóxido de Dimetilo

DNA – Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribobucleico)

EDTA – do Inglês Ethylenediaminetetraacetic acid, ácido etilendiaminotetraacético

ELN – Espécies Livres de Nitrogênio

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FGF-2 fibroblast growth factor 2 (fator de crescimento fibroblástico 2)

G – Gauge

GH – Hormônio do Crescimento

GRAS – *do inglês Generally Regarded as Safe*, Considerado geralmente seguro

G>T - Guanina-timina

G1 – Interfase do ciclo celular

G-C - Guanina-citosina

HBSS – do Inglês Hanks' Balanced Salt Solution, Solução salina equilibrada de Hank

HE - Hematoxilina-Eosina

hLP – Hormônio lactogênico

INCA – Instituto Nacional do Câncer

ING2 - Inhibitor of growth protein 2 (Proteína inibidora de crescimento 2)

L- maior diâmetro aferido no tumor

MAPK – proteína quinase mitogênica ativada

MDA – do Inglês, Malondialdehyde, Malondialdeído

MDR – Multidrug resistance (resistência a multi drogas)

MSI – do Inglês Microsatellite Instability, Instabilidade de Microsatélites

ON – Óxido Nítrico

p – P-value, nível de significância

Poly. – Polinômio

NCI – do inglês National Cancer Institute, Instituto Nacional do Cancer)

NF- $\kappa$  $\beta$  – Fator nuclear kapa beta

PBS – do Inglês Phosphate-buffered Saline, Solução Tampão Fosfato-salino

PCR – do Inglês Polymerase Chain Reaction, Reação em Cadeia da Polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

PMSF – do Inglês Phenylmethylsulfonyl Fluoride, Fenilmethylsulfonida fluoreto

pRb – proteína do retinoblastoma

PRL - Prolactina

p21 – proteína reguladora da transição da fase G1 para S no ciclo celular

p53 – proteína supressora que células normais expressam para controle do ciclo celular

Q3G - Isoquercitina

r – Coeficiente da Correlação Parcial

RCUI – Reto Colite Ulcerativa Inespecífica

RGB – do Inglês Red Green Blue, Vermelho Verde Azul

RH – Rutina Hidrolizada

RIPA – do Inglês Modified radioimmunoprecipitation buffer, Tampão radioimunoprecipitação modificado

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

rs – Coeficiente da Correlação de Spearman

S- menor diâmetro aferido no tumor

SDS - do Inglês Sodium Dodecyl Sulfate, Dodecil sulfato de sódio

SGLT1 transportador ativo de glicose sódio-dependente 1

SRB - ensaio de sulforrodamina B

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TGF-  $\beta$  - transforming growth factor beta (fator transformador do crescimento beta)

TGI - Concentração efetiva da inibição de crescimento celular

TM – do Inglês Tail Moment, Momento de Cauda

*TP53* – gene que codifica a proteína p53, localizado no cromossomo 17

TP53 – Proteína p53

TRIS - N-tris[hidroximetil]aminoetano

UNIFAG – Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia

USA – do inglês Unites States of America, Estados Unidos da América

USF – Universidade São Francisco

U/pixel – Unidades por pixel

VASH – Vasoinhibin (Vasoinibina)

VGF Vascular endotelial growth fator (fator de crescimento endotelial vascular)

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

X – vezes

## LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

- FIGURA 1.** Representação esquemática do modelo de progressão tumoral do câncer de cólon com representação da atuação de genes específicos Gene TP53 possuía atuação em fases tardias da progressão tumoral 26
- FIGURA 2.** Processo de tumorigênese, adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011 27
- FIGURA 3.** Estrutura básica de um flavonoide: núcleo flavilium, composto por três anéis fenólicos. O benzeno do primeiro anel (A) é condensado com o sexto carbono do terceiro anel (C), que na posição 2 carrega um grupo fenila como substituinte... 33
- FIGURA 4.** Estrutura dos principais flavonoides da família da quercitina 34
- FIGURA 5.** Organograma do método experimental. Grupos Controle, Terapia e Profilaxia subdivididos de acordo com o composto recebido 48
- FIGURA 6.** FIGURA 6. Relação temporal entre os grupo Controle, que não recebeu os biocompostos e, Grupos Terapia ou Profilaxia que receberam Rutina, Q3G ou Rutina hidrolisada 49
- FIGURA 7.** Foto da inoculação subcutânea de células tumorais para a criação do modelo de adenocarcinoma de cólon humano heterotópico em animal atímico..... 50
- FIGURA 8.** Técnica de gavagem. Observa-se animal sendo gavado por cânula ponta-bola em câmara de fluxo laminar com imobilização completa da porção cranial (cabeça e pescoço) 51
- FIGURA 9.** Fotografia do método de determinação do volume tumoral por meio de paquímetro de metal, pela medida do maior e do menor diâmetro tumoral em camundongo nude com massa tumoral em região da coxa esquerda 52
- FIGURA 10.** Atividade antiproliferativa (TGI) da rutina hidrolisada em células tumorais avaliadas pelo ensaio da sulforrodamina B (SBR) 59
- FIGURA 11.** Avaliação do ciclo celular das células HT29 em 48h de estímulo com a Rutina hidrolisada nas concentrações 25, 50, 100 e 250 ug/mL. Notar o efeito pró-proliferativo em concentrações 75, 100 e efeito antiproliferativo em 250 ug/ml em relação ao controle 60
- FIGURA 12.** Avaliação da indução de apoptose das células HT29 em 48h de estímulo com a rutina hidrolisada nas concentrações 25, 50, 100 ug/mL. Notar ausência de efeito sobre a apoptose em todas as concentrações testadas..... 61
- FIGURA 13.** Fotografia de camundongo atímico exibindo massa fixa no local de enxerto sugestiva de lesão neoplásica (A), com aumento da vascularização (B) de fácil visibilização 62
- FIGURA 14.** Adenocarcinoma pouco diferenciado. A- Notar traves de fibrose separando as células tumorais de padrão desmoplásico em “ninhos” [H&E, 100X].

<b>B-</b> Observar os 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]	62
<b>FIGURA 15.</b> Crescimento tumoral avaliado por curvas de regressão sigmoidal ao longo do tempo dos animais com adenocarcinoma humano dos grupos profilaxia e controle	63
<b>FIGURA 16.</b> Crescimento tumoral avaliado por curvas de regressão sigmoidal ao longo do tempo dos animais com adenocarcinoma humano dos grupos terapia e controle	64
<b>FIGURA 17.</b> Velocidade de crescimento tumoral relativa ao controle dos grupos tratados com Rutina hidrolisada, Rutina, Q3G administradas de forma profilática ou terapêutica	65
<b>FIGURA 18.</b> Evolução do peso avaliado ao longo do tempo, 7 dias antes do implante, no dia do implante e, 7 dias após o implante do adenocarcinoma de cólon humano em animais submetidos a profilaxia ou tratamento com Rutina, Rutina hidrolisada e Q3G	66
<b>FIGURA 19.</b> Peroxidação lipídica no adenocarcinoma de colon dos animais sem tratamento, tratados com Q3G, rutina ou rutina hidrolisada profilática e terapêutica	67
<b>FIGURA 20.</b> Expressão de ING2 no adenocarcinoma de colon dos animais sem tratamento, tratados com Q3G, rutina ou rutina hidrolisada profilática e terapêutica	67
<b>FIGURA 21.</b> Expressão de VASH (vasoinibina) no adenocarcinoma de cólon não tratado (controle) e tratado com rutina, rutina hidrolisada, Q3G de forma profilática	68
<b>Figura 22.</b> Expressão de VASH (vasoinibina) no adenocarcinoma de cólon não tratado (controle) e tratado com rutina, rutina hidrolisada, Q3G de forma terapêutica	68
<b>FIGURA 23.</b> Microfotografias de adenocarcinoma de cólon demonstrando células pleomórficas com citoplasma acidófilo, dando ênfase às estruturas vasculares presentes no tecido conjuntivo de permeio (setas). [H&E, A:100X; B;400X]	69
<b>FIGURA 24.</b> Número de vasos nos grupos que receberam rutina, rutina hidrolisada e Q3G de forma profilática em relação ao grupo não tratado (controle)	69
<b>FIGURA 25.</b> Número de vasos nos animais que receberam rutina, rutina hidrolisada ou Q3G de forma terapêutica comparados ao que não recebeu tratamento (controle)	70
<b>FIGURA 26.</b> Microfotografia de adenocarcinoma de cólon HT-29. Expressão de TP53 mutada. Notar em: A (Controle) grande expressão de TP53, em B (Rutina hidrolisada terapia) TP53 em média expressão e, em C (Q3G profilaxia) TP53 em	

menor expressão. Imunohistoquímica realizada com anti-corpo monoclonal anti-TP53. A,B: IHx p53 [100X]; C: IHx Tp53 [400X] 70

**FIGURA 27.** Imunoexpressão de p53 tumores de animais que receberam ou não tratamento com rutina, rutina hidrolisada e Q3G 71

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Concentração efetiva da inibição de crescimento celular (TGI) (ug/mL) para linhagens tumorais humanas com utilização de doxorubicina, rutina, quercetina e rutina hidrolisada pelo ensaio de sulforrodamina B (SRB).	58
---	----

## SUMÁRIO

1. Introdução	23
2. Objetivo	40
3. Materiais e Métodos	41
3.1 Fase 1 - Obtenção da rotina hidrolisada	41
3.2. Fase 2 - Estudo <i>in vitro</i> de células tumorais humanas de adenocarcinoma de cólon (HT-29) para verificação da atividade antitumoral...	41
3.2.1. Descongelamento das células	41
3.2.2 Cultura de células	42
3.2.3 Ensaio da Sulforrodamina B (SBR)	43
3.2.4 Citometria de Fluxo	45
3.2.4.1 Avaliação do ciclo celular	45
3.2.4.2 Avaliação dos estágios da apoptose	46
3.3 Fase 3 - Estudo da resposta terapêutica da rotina hidrolisada <i>in vivo</i>	47
3.3.1 Utilização de modelos animais	47
3.3.2 Grupos experimentais	47
3.3.3 Modelo experimental	49
3.3.3.1 Criação do Modelo experimental de adenocarcinoma de cólon humano em camundongos atímicos	49
3.3.3.2 Cuidados no período pós operatório	50
3.3.3.3 Técnica de gavagem	50
3.3.4 Monitoramento do peso do animal	51
3.3.5 Avaliação do crescimento tumoral	51
3.3.6 Velocidade relativa de crescimento tumoral	52
3.3.7 Obtenção das amostras	53
3.3.8 Estudo histopatológico	53

3.4 Fase 4 - Investigação preliminar sobre o mecanismo de ação da rutina hidrolisada sobre a peroxidação lipídica, proliferação celular mediada pela ING2, inibição da neoangiogênese (VASH) e apoptose mediada por TP53	53
3.4.1 Determinação da peroxidação lipídica pelo método do TBARS	53
3.4.2 Análise imunohistoquímica	54
3.4.2.1 Imunocoloração	54
3.4.2.2 Quantificação da imunoe expressão por análise de imagem assistida por computador	55
3.4.2.3 Quantificação Microvascular	56
3.5 Análise Estatística	56
4. Resultados	58
4.1 Fase 1 - Obtenção da Rutina hidrolisada	58
4.2 Fase 2 - Estudo in vitro em painel de cultura de células tumorais humanas para verificação da atividade antitumoral	58
4.2.1 Quanto à concentração efetiva da inibição de crescimento celular em adenocarcinoma de cólon/HT29	58
4.2.2 Quanto à ação da rutina hidrolisada sobre a inibição do ciclo celular	59
4.2.3 Quanto à ação da rutina hidrolisada sobre a apoptose celular	60
4.3 Fase 3 Estudo da resposta terapêutica dos flavonoides <i>in vivo</i>	61
4.3.1 Confirmação da presença do adenocarcinoma de cólon em modelo animal	61
4.3.1.1 Avaliação macroscópica	61
4.3.1.2 Avaliação microscópica	62
4.3.2 Crescimento tumoral nos animais que receberam ou não os flavonoides Q3G, Rutina e Rutina hidrolisada	63
4.3.2.1 Grupo profilaxia	63
4.3.2.2 Grupo Terapia	64
4.3.3 Velocidade relativa de crescimento tumoral	64

4.3.4 Variação de peso do animal com adenocarcinoma de cólon com ou sem tratamento com os flavonoides Rutina, Q3G e Rutina Hidrolisada 7 dias antes, no dia e no 7º dia após o xenoenxerto	65
4.4 Fase 4 - Investigação preliminar sobre o mecanismo de ação da rutina hidrolisada sobre a peroxidação lipídica, proliferação celular mediada pela ING2, inibição da neoangiogênese (VASH) e apoptose mediada por TP53	66
4.4.1 Indução da peroxidação lipídica	66
4.4.2 Expressão de ING2	67
4.4.3 Potencial antiangiogênico da rutina hidrolisada	68
4.4.3.1 Expressão da VASH (inibina)	68
4.4.3.2 Quantificação Microvascular	69
4.4.4 Expressão de TP53 nos espécimes tumorais	70
5. Discussão	72
5.1 Quanto ao Material e Métodos	72
5.1.1 Fase 1 – Quanto a Obtenção da rutina hidrolisada	72
5.1.2. Fase 2 Fase 2 – Quanto aos métodos de estudo de atividade antiproliferativa	72
5.1.2.1. Citometria de Fluxo	72
5.1.2.2. Ensaio da SRB	74
5.1.2.3. Método de TBARS	74
5.1.2.4. Análises Himunohistoquímicas	75
5.1.3 Fase 3 - Estudo da resposta terapêutica da rutina hidrolisada <i>in vivo</i>	76
5.2 Quanto aos Resultados	77
5.2.1 Fase 1- Utilização da Rutina Hidrolisada, vantagens e justificativa	77
5.2.2 Fase 2- Ação da rutina hidrolisada <i>in vitro</i>	78
5.2.3 Fase 3- Resposta terapêutica da rutina hidrolisada <i>in vivo</i>	81
5.2.4 Fase 4- - Investigação preliminar sobre o mecanismo de ação da rutina hidrolisada sobre a peroxidação lipídica, proliferação celular mediada pela	

ING2, inibição da neoangiogênese (VASH) e apoptose mediada por TP53	85
5.2.4.1 Atividade anti/pró-oxidante da rutina hidrolisada	85
5.2.4.2 Ação da Rutina hidrolisada sobre a modificação de proteínas	87
5.2.4.2.1 ING2	87
5.2.4.2.2 Vasoinibina (VASH) e quantificação vascular	88
5.2.4.2.3 TP53	91
6. Conclusão	93
7. Referências	94

## 1. INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm como característica comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se, pelo processo de metástase, para outras regiões do corpo (INCA, 2015). Devido à rápida divisão celular, essas células apresentam caráter altamente agressivo e incontrolável, o que leva a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias.

Nos Estados Unidos, o câncer colorretal é a terceira causa mais comum de morte, excluindo-se o câncer de pele, tanto em homens como em mulheres e é a segunda causa de morte relacionada a câncer. De forma geral, nota-se uma queda da incidência e mortalidade na última década neste país, provavelmente relacionada a melhora nos testes de detecção da doença. Homens e mulheres tem incidência semelhante da doença até os 39 anos de idade, mas a partir dos 40 anos, a incidência é maior em homens (NCI, 2016).

A Sociedade Americana de Câncer prospecta que 95.270 novos casos de câncer de cólon serão diagnosticados nos EUA em 2016. Serão neste ano, 47.710 homens e 47.560 mulheres. Estimativas de mortalidade por câncer de reto e de cólon estão contabilizadas conjuntamente, devido à dificuldades classificatórias, e serão de 49.190 mortes em 2016 (SIEGEL et. al., 2014).

Para 2016 no Brasil, estima-se 16.660 casos novos de câncer de cólon e reto em homens e de 17.620 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 16,84 casos novos a cada 100 mil homens e 17,10 para cada 100 mil mulheres (INCA 2015).

Ainda sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de cólon e reto em homens é o segundo mais frequente na Região Sudeste do Brasil (24,27/100 mil) e o terceiro nas Regiões Sul (22,35/100 mil) e Centro-Oeste (14,16/100 mil). Nas Regiões Nordeste (7,05/100 mil) e Norte (5,34/100 mil) ele ocupa a quarta posição. Para as mulheres, é o segundo mais frequente nas Regiões Sudeste (22,66/100 mil) e Sul (23,27/100 mil). Nas Regiões Centro-Oeste (16,93/ 100 mil), Nordeste (8,77/100 mil) e Norte (5,89/100 mil), é o terceiro mais frequente (INCA, 2015).

O aumento da incidência do câncer no Brasil provoca, a cada ano, uma elevação dos gastos públicos, tanto com o tratamento quanto com o combate a esta doença.

Os fatores de risco incluem idade, presença de pólipos colorretais, história familiar de câncer colorretal, algumas mutações genéticas, consumo excessivo de álcool, obesidade, inatividade física, tabagismo e história de doença inflamatória intestinal (NCI, 2016).

A idade é um conhecido fator de risco, assim como para muitos outros tumores sólidos. O tempo estimado para progressão desde lesões pré-malignas até o tumor maligno propriamente dito varia de 10 a 20 anos. A idade média de diagnóstico é de 68 anos (NCI, 2016).

A carcinogênese no cólon é complexa e resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais (HAMILTON e AALTONEN, 2000; LI e LAI, 2009). Fortes evidências sugerem que o evento inicial de agressão ao tecido cólico normal seja provocado por agentes genotóxicos existentes localmente, como é o caso dos agentes intraluminais no câncer colorretal. Os fenômenos iniciais que levam o tecido normal a se transformar progressivamente em áreas de displasia focal e evoluírem para a neoplasia parecem relacionados a fenômenos oxidantes (RIBEIRO, et al., 2008; SCALISE et al., 2016), o que atribui aos flavonoides importante interesse. A exposição contínua das células do epitélio a diferentes agentes carcinogênicos representa a principal causa de dano ao DNA nuclear (POOL-ZOBEL e LEUCHT, 1997). Dentre os agentes genotóxicos, as espécies reativas de oxigênio (EROs), formadas durante o metabolismo aeróbico das células ou oriundas da dieta, apresentam papel importante no desenvolvimento desse estresse oxidativo (GEDIK et al., 2002). É sabido que o dano ao DNA celular ocasionado pelas EROs e por outros radicais tais como as espécies livres de nitrogênio (ELN) e metil (CH<sub>3</sub>), encontram-se relacionados ao processo de inflamação e conseqüentemente, ao surgimento e desenvolvimento do câncer do aparelho digestório (AMES et al., 1993). A gênese tumoral inclui como principal fator a disfunção apoptótica (BRIGHT-THOMAS e HARGEST, 2003; PRIOLLI et al., 2016).

Quando ocorre a perda do equilíbrio entre produção e eliminação de EROs, o que é chamado de estresse oxidativo, podem ocorrer danos ao DNA, RNA, lipídios e proteínas. Além de fragmentação do DNA, as EROs podem causar o mal funcionamento do sistema de reparo do DNA, contribuindo para o desenvolvimento de doenças como o câncer (SOSA et al., 2013).

Dentre os agentes genotóxicos, as espécies reativas de oxigênio (EROs) formadas durante o metabolismo aeróbico das células da mucosa intestinal ou oriundas da dieta

apresentam papel importante no desenvolvimento do estresse oxidativo (GEDIK et al., 2002). É sabido que o dano oxidativo ao DNA celular, ocasionado pelas EROs e por outros radicais, tais como as espécies livres de nitrogênio (ELN) e grupo metil (CH<sub>3</sub>), encontram-se relacionados ao processo de inflamação da mucosa cólica e, possivelmente, ao surgimento e desenvolvimento do câncer do aparelho digestório (AMES et al., 1993).

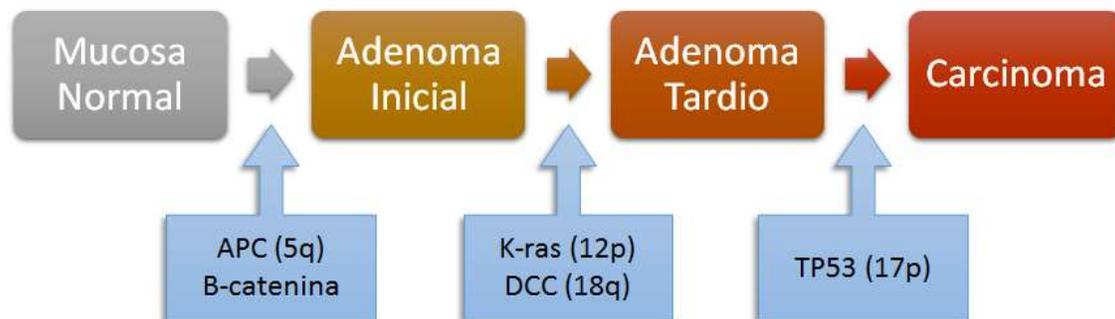
A mucosa de todo o trato digestório é continuamente exposta e particularmente vulnerável a radicais livres que determinam dano oxidativo ao DNA celular. Várias doenças que cursam com inflamação crônica da mucosa do trato digestório já foram associadas ao estresse oxidativo (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1990; 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 (DII), como um fator predisponente ao CCR. Em doentes com retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI), 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). O mecanismo pelo qual o estresse oxidativo promove a agressão ao DNA das células da mucosa cólica ainda não é totalmente conhecido. O radical hidroxila (OH<sup>•</sup>) 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 encontra-se a hidroxilação da base nitrogenada guanina. Nesta reação existe a incorporação de OH<sup>•</sup> 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 pareia-se 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, com isso é gerada 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, formando um clone de células mutantes com características semelhantes. Este desequilíbrio do ciclo celular, com favorecimento da

proliferação em detrimento a apoptose, poderia 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).

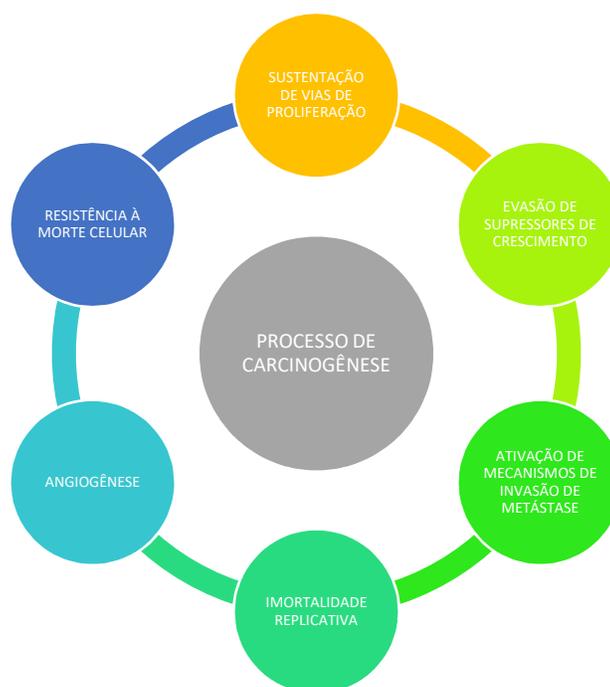
EROs têm sido implicadas como fatores patogênicos em uma variedade de doenças e no desenvolvimento do CCR. EROs podem atacar proteínas, lipídeos, açúcares e DNA (AMES *et al.*, 1993). A estreita relação que existe entre as doenças crônicas inflamatórias intestinais e câncer colorretal (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1990; SERIL *et al.*, 2003; KAWANISHI *et al.*, 2006) e a relação entre o EROs e 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; MARTINEZ *et al.*, 2010). 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) Leung e colaboradores ainda 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).

O modelo clássico de carcinogênese proposto em 1990 por Fearon e Vogelstein baseia-se na sequência adenoma-carcinoma que envolve mutações em oncogenes, K-ras e Beta-catenina, e na inativação de genes supressores de tumores, como APC e *TP53* (Figura 1) (FRATTINI *et al.*, 2004; MARTINEZ *et al.*, 2008; MARTINEZ *et al.*, 2010; RÚA E PEÑA, 2012; SCALISE *et al.*, 2016).



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

Hanahan, Weinberg e Francisco (2000) propuseram que o processo de carcinogênese apresenta seis mecanismos biológicos essenciais para a sustentação e progressão de qualquer tumor (*Figura 2*). Dentro das capacidades biológicas expostas, 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 envolvendo os efeitos de flavonoides (SHAW et al., 1992; YOSHINIZU et al., 2004; PIERRINI et al., 2008; YANG e LIU, 2009; CHEN et al., 2010; XAVIER, 2010; KIM et al., 2010; SANTOS et al., 2011;HAO e CHO, 2014).



**FIGURA 2.** Processo de tumorigênese, adaptado de Hanahan e Weinberg, 2000

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

A via de instabilidade cromossômica (CIN) é a via mais comum na patogênese do CCR esporádico, originando 70 a 85% dos tumores. A CIN propõe que alterações estruturais cromossômicas geram mutações em genes reguladores da progressão tumoral (PINHO et. al.,1999). Neste cenário, a mutação da proteína TP53 foi identificada em fases

tardias da progressão tumoral, sendo fator determinante na progressão do adenoma tardio para o carcinoma.

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). O *TP53* é um gene supressor de tumor responsável pela transcrição de uma fosfoproteína nuclear. É capaz de se unir ao DNA celular e induzir a transcrição de múltiplos genes envolvidos no controle do ciclo celular e apoptose. Mutações deste gene são extremamente comuns e ocorrem em mais de 50% dos cânceres humanos. No CCR, representam 60 a 80% das mutações, ocorrendo predominantemente em tumores do cólon distal (MARTINEZ *et al.*, 2008) e, em grande parte, simultaneamente à mutação do gene APC. A literatura sugere que a mutação do gene *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).

A proteína TP53 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 à 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 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), além de influenciar diretamente as funções da ING2 (KUMAMOTO *et al.*, 2009).

A alteração da proteína TP53 pôde ser determinada em tecido normal adjacente ao tumor e no adenoma (KAKLAMANIS *et al.*, 1993; BRAND *et al.*, 2013; SCALISE *et al.*, 2016). Dessa forma, parece existir relação direta entre a mutação da proteína e a formação do adenocarcinoma colorretal (FEARON e VOGELSTEIN, 1990; RIBEIRO e SAFATLE-RIBEIRO, 2006; MARTINEZ *et al.*, 2008; PRIOLLI *et al.*, 2013, SCALISE, 2016). 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).

Uma explicação plausível para a conhecida correlação entre a tumorigênese e o processo de envelhecimento foi dada por Feng e colaboradores, em 2007, quando sugeriram que o declínio na função da *TP53* poderia, em associação ao acúmulo de mutações ao longo da vida explicar por que idosos têm maior frequência de tumores (FENG et al., 2007).

Os avanços na terapia dirigida têm buscado o tratamento do câncer de forma sistêmica, além de contornar três clássicos problemas associados à quimioterapia convencional: resistência a múltiplas drogas (MDR), toxicidade aos tecidos normais e acesso limitado dos quimioterápicos às células-alvo (HLATKY et al., 2002). Atualmente estudos têm apontado que alterações na proteína TP53 estão associadas à maior agressividade de tumores, assim como maior resistência a multidroga, conseqüentemente, a taxa de sobrevivência de pacientes portadores desta mutação em tratamento quimioterápico é menor, mas há muita controvérsia sobre a sua utilização na clínica, já que muitos relatos da literatura permanecem contraditórios. Possivelmente a falta de homogeneidade deva-se às diversas técnicas de determinação desta proteína. Neste sentido, a determinação do conteúdo da TP53 pela avaliação da imunopressão de por análise assistida por computador apresenta vantagem, pelo fato da TP53 mutada se apresentar estável no tecido cólico tumoral, de forma distinta ao que ocorre com a forma selvagem, tornando fácil e precisa sua quantificação (VOJTĚŠEK et al., 1992; PINHO, 2000; PRIOLLI et al., 2016).

As proteínas da família ING também podem ser mensuradas pela sua imunopressão e parecem regular a transcrição mediada por cromatina, desempenhando papel na sua remodelação (AASLAND et al., 1995). Diferentes linhagens de câncer de cólon demonstraram aumento da expressão de ING2 e elevação dos níveis de NF- $\kappa$ B, o qual apresenta função antiapoptótica, favorecendo processos de invasão tumoral e metástases (KUMAMOTO et al., 2009). Entretanto, a função da ING no processo de carcinogênese permanece pouco conhecida (LARRIEU et al., 2009).

Sabe-se por exemplo, que o aumento na expressão de ING2 leva à interrupção de crescimento na fase G1 do ciclo celular e a apoptose induzida em vários tipos de células, (NAGASHIMA et al., 2001; OKANO et al., 2006) que dependem em grande medida da ativação de TP53 (NAGASHIMA et al., 2001), mas, do melhor do conhecimento atual, a relação entre os flavonoides e a ING2 ainda não foi estudada.

Outro processo de extrema importância no desenvolvimento tumoral é a angiogênese. Em 1787, John Hunter usou pela primeira vez o termo angiogênese para descrever o aspecto da intensa vascularização presente em tecidos cicatriciais de feridas operatórias. Porém, somente 148 anos depois a angiogênese foi descrita cientificamente através de estudos em placentas de macacas (HERTIG, 1935).

Em 1971, Folkman, médico pesquisador considerado o “pai da angiogênese”, postulou que todos os tipos de tumores dependem de processo neovascular para suprir as demandas metabólicas de suas células em expansão, caracterizando o crescimento tumoral como uma variável “angiogênese-dependente”. Finalmente, em 1989, foram descritos os primeiros resultados positivos do tratamento oncológico baseado na inibição do crescimento vascular, a antineoangiogênese (VAN EPPS, 2005; STEPHENSON et al., 2013).

As vasoinibinas (VASH) são uma família de peptídeos derivados da prolactina (PRL), hormônio do crescimento (GH) e hormônio lactogênico placentário (hLP) que atuam nas células endoteliais suprimindo a vasodilatação depende de óxido nítrico (ON) e a angiogênese, além de promoverem regressão vascular mediada por apoptose (CLAPP et al., 2006; GONZÁLEZ et al., 2007; ARNOLD et al., 2010). Estas substâncias apresentam ação locorregional, uma vez que são liberadas especificamente pelas células do endotélio vascular ativado, regulando a proliferação vascular por meio de *feedback* negativo (MIYAZAKI et al., 2012; KOSAKA et al., 2013). A catepsina D é a principal endoprotease responsável pela geração de vasoinibinas adenohipofisárias, atuando predominantemente no interior de grânulos secretores dos lactotrofos após ativação em pH ácido (CRUZ-SOTO et al., 2009).

A angiogênese tumoral, ponto de interesse nas terapias dirigidas, se caracteriza pela formação de neovasos a partir do estímulo à proliferação endotelial de vasos sanguíneos pré-existentes. Trata-se de processo complexo e dependente de múltiplas variáveis, incluindo fatores pró-angiogênicos (VEGF, bFGF, TGF- $\beta$ ), antiangiogênicos (angiostatina, endostatina, vasoinibinas) e não angiogênicos (taxa de consumo de O<sub>2</sub> e nutrientes, limiar de privação para início da necrose) (TARTA et al., 2000; HLATKY et al., 2002; MIHALACHE E ROGOVEANU, 2014; MOUSA et al., 2015).

A regulação da angiogênese em tecidos saudáveis ocorre devido à influência de inibidores naturais que previnem o crescimento excessivo de novos vasos (CLAPP et al,

2006). A desregulação de tal controle contribui para o desenvolvimento de uma variedade de doenças, incluindo artrite reumatoide, retinopatia diabética e câncer.

As células endoteliais apresentam receptores com sítios de ligação muito sensíveis à VASH, mas que não realizam a ligação com a prolactina (PRL). A VASH atua de diferentes maneiras, nas células endoteliais, visando ao bloqueio de mecanismos estimuladores da função angiogênica; na proliferação, migração e manutenção da vida de células endoteliais, além da permeabilidade vascular (CLAPP et al., 2008).

A proliferação endotelial é inibida devido ao bloqueio da cascata da proteína quinase mitogênica ativada (MAPK), pois os fatores de crescimento fibroblástico (FGF) e de crescimento do endotélio (VEGF), os quais fazem a ativação desta cascata, são bloqueados pela VASH. Também a migração celular é bloqueada pela atuação da VASH, devido à inibição do ativador do plasminogênio tipo uroquinase (uPA) por aumento da expressão do inibidor do ativador de plasminogênio tipo-1 (PAI-1) (CLAPP et al, 2006; CLAPP et al., 2008).

A VASH causa ainda a inibição da óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), pois interfere na mobilização de  $Ca^{+2}$  intracelular, pelo bloqueio da ação da acetilcolina e bradicinina nos receptores do  $Ca^{+2}$ . Como o eNOS é dependente do complexo  $Ca^{+2}$ -calmodulina, as suas ações vasodilatadora e de aumento de permeabilidade vascular e de proliferação endotelial são inibidas. A VASH também inibe a eNOS por meio da desfosforilação dessa enzima, via proteína fosfatase 2<sup>a</sup> (PP2A) (GARCIA et al., 2008). Além disto, estimula a apoptose celular pela ativação do fator nuclear  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ), pela degradação do inibidor I $\kappa B$ -a e pela indução das vias apoptóticas extrínsecas e intrínsecas, via caspases 3, 8 e 9 (CLAPP et al., 2006).

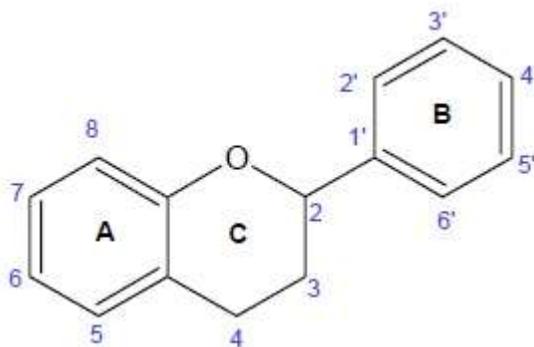
Nos últimos anos têm-se intensificado as pesquisas de novos compostos que possam atuar no tratamento de diversos tipos de neoplasias. Entre os possíveis agentes com atividade antitumoral estão alguns flavonoides (HEIM et al., 2002). Estes compostos polifenólicos possuem diversas atividades biológicas já documentadas em estudos *in vitro*, em modelos animais e em ensaios clínicos, sendo sua propriedade antioxidante a mais 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 (MICJELS et al., 2005; WANG et al., 2005).

Os flavonoides estão amplamente distribuídos em frutas, hortaliças, legumes, grãos, cereais e leguminosas. Trata-se, portanto, de composto fenólico importante para a alimentação humana. A luz estimula a biossíntese destes compostos que se acumulam nos tecidos aéreos (ARCHIVIO et al., 2007).

Um dos mais importantes mecanismos de ação dos flavonoides se deve às suas propriedades antioxidantes. O termo antioxidante é aplicado a substâncias capazes de retardar, prevenir ou remover o dano oxidativo a uma molécula-alvo (HALLIWELL & GUTTERIDGE (1998). O papel fisiológico desses compostos, como a definição sugere, é prevenir danos a componentes celulares que surgem como consequência de reações químicas envolvendo radicais livres.

Os flavonoides podem prevenir danos causados por radicais livres através dos seguintes mecanismos: neutralização direta de espécies reativas de oxigênio; ativação de enzimas antioxidantes; quelação de metais; redução de radicais  $\alpha$ -tocoferil; inibição de oxidases; mitigação do estresse oxidativo causado pelo óxido nítrico; aumento nos níveis de ácido úrico e aumento da atividade de antioxidantes de baixo peso molecular. A capacidade antioxidante de alguns flavonoides, como a epigalocatequina galato, é muitas vezes superior à das vitaminas C e E, e comparável à do  $\alpha$ -tocoferol (PROCHÁZKOVÁ et al., 2011).

A estrutura dos flavonoides (*Figura 3*), baseia-se em seu núcleo flavilium, composto por três anéis fenólicos. O benzeno do primeiro anel (A) é condensado com o sexto carbono do terceiro anel (C), que na posição 2 carrega um grupo fenila como substituinte. O anel C pode ser um pirano heterocíclico, gerando as estruturas básicas das leucoantocianinas (ou pró-antocianinas ou catequinas) e antocianidinas, e é denominado de núcleo flavana (AHERNE e O'BRIEN, 2002).



**FIGURA 3.** Estrutura básica de um flavonoide: núcleo flavilium, composto por três anéis fenólicos. O benzeno do primeiro anel (A) é condensado com o sexto carbono do terceiro anel (C), que na posição 2 carrega um grupo fenila como substituinte.

Variações no anel heterocíclico C originam as diversas classes de flavonoides, como flavonóis, flavonas, catequinas, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides. A estrutura básica dos flavonoides origina vários padrões de substituição nos anéis A e B dentro das classes dos flavonoides: grupamentos hidroxila (OH), fenólicos, açúcares, grupos metóxi, sulfatos e glucoronídeos (HOLLMAN & KATAN, 1999). A interconversão entre eles pode ser explicada pela existência pelos padrões de substituições na estrutura química dos flavonoides, incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações podem modificar suas atividades bioquímicas e de seus metabólitos.

A estrutura química dos flavonoides apresenta três requisitos possivelmente responsáveis pela atividade de neutralização de radicais exercida por esta classe de compostos: (1) presença do grupo orto-dihidroxi ou grupo catecol no anel B, o que confere uma maior estabilidade à forma radicalar, pois contribui para a deslocalização dos elétrons. Este grupo constitui o principal fator que controla a eficiência dos flavonoides como quelantes de oxigênio singlete (TOURNAIRE et al., 1993); (2) ligação dupla conjugada com a função 4-oxo, que aumenta deslocalização eletrônica a partir do anel B; (3) grupos OH nas posições 3' e 5' com função oxo, que promovem a deslocalização eletrônica do grupo 4-oxo para estes dois substituintes (SILVA et al., 2002). OH na posição 3' é um dos fatores responsáveis pela reatividade do flavonoide com oxigênio singlete (TOURNAIRE et al., 1993).

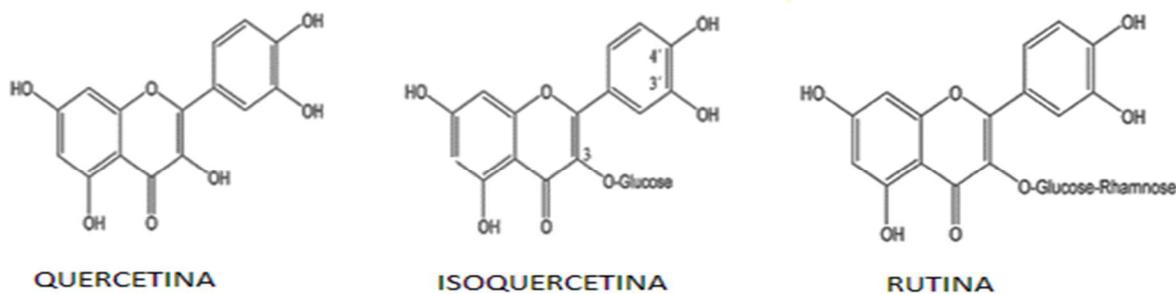
A atividade antioxidante de um flavonoide é determinada principalmente pelo anel B, enquanto a restante estrutura base tem apenas uma pequena influência. Isto se verifica devido a maior capacidade eletrodoadora deste anel, havendo maior influência da restante estrutura base com o decréscimo de atividade antioxidante do anel B. O arranjo espacial

dos substituintes presentes na molécula contribui de forma significativa para a atividade antioxidante destes compostos (HEIM et al., 2002).

O comportamento antioxidante de alguns flavonoides, relaciona-se com sua estrutura. Flavonas, isoflavonas e flavanonas mostraram atividade antioxidante contra radicais  $O_2^-$  e  $OH^-$ , porém tiveram atividade pró-oxidante na presença de íons  $Cu_2^+$ . Flavonoides contendo múltiplas substituições OH mostraram atividades antirradicais peroxila várias vezes maiores do que o Trolox®, um análogo do  $\alpha$ -tocoferol. A simples substituição OH na posição 5'' não promoveu atividade antioxidante, ao passo que a substituição di-OH nas posições 3'' e 4'' se mostrou particularmente importante para a capacidade de absorção de radicais  $O_2^-$  do flavonoide (CAO et al., 1997).

Dentre os flavonoides, na classe dos flavonóis, de grande interesse devido às suas propriedades antitumorais, é a família da quercetina, composto por quercitina, seu principal representante, rutina, mircetina e kaempherol.

A quercetina é uma aglicona, encontrada em vegetais principalmente na forma esterificada a diferentes açúcares (*Figura 4*). Dentre estes compostos esterificados, os de maior interesse são a isoquercetina (Q3G) e a rutina, a qual possui um dissacarídeo (rutinose = ramnose + glicose) como substituinte na hidroxila da posição 3 do anel C (pirano) (KIM et al., 2011).



**FIGURA 4.** Estrutura dos principais flavonoides da família da quercetina

A quercetina é encontrada em altas concentrações na cebola (284-486 mg/ kg), couve (100 mg/kg), vagem (32-45 mg/ kg), brócolis (30 mg/ kg), repolho (14 mg/ kg) e tomate (8mg/ kg). Entre as frutas, grandes concentrações de quercetina são encontradas na maçã (21-72 mg/ kg). No vinho tinto, o teor de quercetina varia entre 4-16 ml/L. O chá

preto é a bebida que apresenta maior concentração de quercetina, em torno de 10-25 mg/L (HERTOG et al., 1993).

A rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo) é um glicosídeo conjugado, formado pela forma aglicona, a quercetina (3,5,7,3-4'-pentahidroxi-flavona) ligada, na posição C2 do anel C, a uma molécula dissacarídica, a rutinose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>), que é composta por uma molécula de ramnose e uma de glicose (WILLIAMSON et al., 1996).

A rutina e seus derivados representam cerca de 95% do total de flavonoides ingeridos, estando presentes em altas concentrações na cebola, na maçã, no brócolis, no vinho, no chá (HERTOG et al., 1993), nos frutos de fava d'anta (*Dimorphandra sp.*) (planta do cerrado brasileiro) (CHAVES & USBERTI, 2003), em cascas de frutas cítricas (laranja, toranja, limão, lima) (BILBAO et al., 2007) e em outras frutas, como o mirtilo (KAHKÖNEN et al., 2001).

Estudos relatam que a rutina possui várias propriedades farmacológicas, tais como: atividade antioxidante (BOYLE et al., 2000) com alto potencial de neutralização de radicais OH<sup>-</sup> e O<sub>2</sub><sup>-</sup> (BOMBARDELLI & MORAZZONI, 1993; OMAH & MAZZA, 1996; METODIEWA et al., 1997) e inibição da peroxidação lipídica (NEGRÉ-SALVAYRE et al., 1991), além das atividades citoprotetora (POTAPOVICH & KISTYUK, 2003), vasoprotetora (IHME et al., 1996; LINDAHL & TAGESSON, 1997; TANG et al., 2011), antiproliferativa (SANTOS et al., 2011, KUNTZ et al., 1999), antitrombótica (SHEU et al., 2004) e cardioprotetora (ZIAEE et al., 2009).

A rutina é capaz de diminuir a permeabilidade capilar, exercendo efeito vasoconstritor sobre os vasos sanguíneos periféricos e inibindo o conteúdo de fator de ativação plaquetária (PAF) (IZZO et al., 1994). Tem sido relatado que a rutina previne ulcerações na mucosa gástrica em diversos modelos animais (PÉREZ-GUERRERO et al., 1994; LA CASA et al., 2000).

Os flavonoides em sua forma aglicona são facilmente absorvidos pelo intestino delgado; entretanto, a maioria desses compostos está presente em alimentos na forma de 3-O-glicosídeos e polímeros (HEIM, 2002). Até recentemente, aceitava-se que flavonoides glicosídicos permaneciam íntegros até alcançarem o cólon, onde ocorre a remoção do açúcar, catalisada por enzimas da microflora intestinal (glicosidases). No entanto, estudos de intervenção indicaram que o sítio primário de absorção de alguns flavonoides glicosídicos é o intestino delgado (HOLLMAN & KATAN, 1997; GRAEFE et al., 2001; ORFALLI et al., 2016). Já os flavonoides ramnosídicos necessitam ser hidrolisados pelas

ramnosidases da microflora colônica (HOLLMAN et al., 1999). 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. Em ratos e humanos, por exemplo, a absorção da rutina é mais lenta e de forma menos eficiente se comparada à quercetina-4-Oglicosídeo (derivado da quercetina formado pela glicosilação da forma aglicona na posição C-4) e à quercetina aglicona (HOLLMAN et al., 1999; MORAND et al., 2000; ERLUND et al., 2002; ARTS et al., 2004), sendo a biodisponibilidade da rutina em torno de 15 a 20% da quercetina-4-Oglicosídeo (HOLLMAN & KATAN, 1997).

A quercetina glicosilada é mais rapidamente absorvida no intestino delgado (CORNARD et al., 1999; CHANG et al., 2005; WACH et al., 2007), independentemente da posição da glicose. A quercetina-3-glicosídeo (Q3G) apresenta alta biodisponibilidade, sendo a meia vida plasmática da Q3G de  $18,5 \pm 0,8$  horas e a da -4'-glicosídeo de  $17,7 \pm 0,9$  horas. Seus picos de concentração plasmática são de  $5,0 \pm 1,0$   $\mu\text{mol/L}$  para a Q3G e  $4,5 \pm 0,7$   $\mu\text{mol/L}$  para a -4'-glicosídeo, ocorrendo  $37,0 \pm 12,0$  min após a ingestão da primeira e  $27,0 \pm 5,0$  min após a ingestão da segunda. O pico da concentração plasmática da rutina, por sua vez, ocorre apenas  $7,0 \pm 2,9$  horas após sua ingestão.

Estudo *ex vivo*, com soluções de flavonoides, incluindo a quercetina reafirmam que a conjugação de uma glicose a um composto fenólico resulta em absorção ativa a partir do lado da mucosa até o lado da serosa pelo sistema de transporte de glicose (MIZUMA et al., 1992; WOLFFRAM et al., 2002; ORFALLI et al., 2016).

Em comparação com a rutina e a quercetina, a Q3G administrada via oral é melhor absorvida. Estudos relatam que a biodisponibilidade da quercetina administrada em cápsulas é inferior a 1% em humanos (ARTS et al., 2004; ERLUND 2004; SALIM et al., 2004; FERNANDEZ et al., 2005; MOTOYAMA et al., 2009). Já foi demonstrado que a biodisponibilidade da Q3G é 1,5 vez superior à da quercetina em cães (REINBOTH et al., 2010) e também em ratos (MORAND et al., 2000). Evidências experimentais sugerem que a Q3G pode ser transportada pelo SGLT1 e subsequentemente desglicosilada no interior do enterócito pela  $\beta$ -glicosidase citosólica (WALGREN et al., 2000; ARTS et al., 2002). A quercetina, por sua vez, não é transportada pelo SGLT1 ou pelo transportador de glicose 2 (GLUT2) (KWON et al., 2007).

Outro caminho de absorção de polifenóis foi sugerido, envolvendo uma 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  $\beta$ -glicosidase citosólica hidrolisará a molécula, formando os flavonoides na forma livre, que posteriormente serão conjugados e entrarão na corrente sanguínea (NÉMETH et al., 2003; ORFALLI et al., 2016).

A Q3G apresenta algumas atividades biológicas importantes, como antioxidante, anti-inflamatória, atividade de proteção contra a aterosclerose e estabilização plaquetária (WANG et al., 2011; ORFALLI et al., 2016). Apesar das similaridades estruturais, existem algumas diferenças notáveis entre a Q3G, a quercetina, e a rutina quanto às suas propriedades físicas, químicas e biológicas (SEYOUM et al., 2006). A quercetina é geralmente acumulada em plantas sob a forma glicosilada, como glicosídeos, rutinosídeos e xilosídeos (MAULUDIN et al., 2009). Essas formas glicosiladas da quercetina mostram maior solubilidade em água quando comparadas à quercetina aglicona, devido à hidrofiliabilidade dos resíduos glicosídicos que contêm OH (AHERNE & O'BRIEN, 2002). A Q3G é composta pela quercetina ligada a uma molécula de glicose. Embora os três compostos exibam atividades biológicas em comum, incluindo os efeitos antiproliferativos em diversas linhagens tumorais (ERLUND, 2004; FERNANDEZ et al., 2005; SEYOUM et al., 2006; WACH et al., 2007; SILVA et al., 2009; MOTOYAMA et al., 2009), alguns estudos farmacológicos têm demonstrado que certas atividades biológicas da Q3G, como alelopática, antioxidante, anti-inflamatória, proteção contra a aterosclerose e estabilização plaquetária são superiores às da rutina (SALIM et al., 2004; FERNANDEZ et al., 2005; MOTOYAMA et al., 2009).

A Q3G é um produto natural de distribuição escassa, presente em poucas fontes vegetais e em baixa concentração, em média, 0,01%, o que torna os processos de extração biológicos pouco eficazes (WANG et al., 2011). Por outro lado, a rutina é amplamente distribuída e abundante entre diversos vegetais folhosos e frutas cítricas encontrados no mundo inteiro, como por exemplo, no trigo-sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) (KREFT et al., 1999), na uncária (*Uncaria elliptica*), nas folhas e pecíolos das espécies do gênero *Rheum* (SOPONAR et al., 2010) e no fruto da árvore brasileira fava-d'anta (*Dimorphandra mollis*).

A fava-d'anta é uma espécie arbórea nativa do Brasil pertencente à família Caesalpinaceae, encontrada em regiões de cerrado nos estados do Pará, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e na caatinga nordestina, que

contém cerca de 8g de rutina para cada 100g de pericarpo (CHAVES & USBERTI, 2003).

A literatura demonstra a ação antitumoral da Q3G, entretanto a escassez de fontes naturais e sua baixa concentração em alimentos fazem com que os processos para isolamento desse composto, a partir de matrizes naturais, apresentem pouca eficácia. Em contraste, a ampla distribuição e a abundância da rutina entre espécies vegetais do mundo inteiro fazem deste flavonoide uma matéria-prima adequada para a obtenção de Q3G, através da hidrólise de seu resíduo ramnosídico (TAKAHAMA et al., 2009; DE ARAÚJO et al., 2013).

Existem evidências de que os flavonoides agliconas exibem maior atividade antioxidante se comparados às formas glicosiladas, visto que esta atividade depende de um OH livre na posição 3 do anel C da molécula. Este OH livre não está presente nas formas glicosiladas, outro motivo que justifica a utilização da RH no presente estudo. A RH, formada por flavonoides, como Q3G, Q4G, quercitina e rutina, conta com cerca de 70% de Q3G em sua composição (DE ARAÚJO et al., 2013). A conversão da rutina em outros flavonoides onde o principal componente é a Q3G, é, portanto, uma estratégia importante para aumentar a sua biodisponibilidade, mantendo suas ações biológicas, em especial a antineoplásica, como o proposto no presente estudo e, possivelmente com baixa toxicidade para as células normais.

Recentemente a RH demonstrou ação antitumoral em painel de células de tumores humanos (DE ARAUJO et al., 2013) trazendo ainda mais interesse neste recém modificado biocomposto.

A hidrólise enzimática apresenta vantagens sobre os métodos químicos, em especial quanto às condições de reação, mais brandas, e quanto à especificidade da reação. Somente duas preparações enzimáticas de  $\alpha$ -L-ramnosidases estão disponíveis comercialmente, a hesperidinase e a naringinase, ambas produzidas por fungos e possuindo atividade tanto de  $\alpha$ -L-ramnosidase quanto de  $\beta$ -D-glicosidase (YADAV et al., 2010). A hesperidinase pode ser empregada na síntese de Q3G a partir da rutina; entretanto, neste processo a atividade de  $\beta$ -D-glicosidase do complexo enzimático é indesejada, uma vez que a molécula de glicose deverá permanecer esterificada à aglicona. Para eliminar a necessidade de purificação da fração de  $\alpha$ -L-ramnosidase e reduzir o custo do método, uma das alternativas é recorrer à inativação da fração  $\beta$ -Dglicosidase da hesperidinase por meio de tratamento térmico seletivo, mantendo ao mesmo tempo a atividade de  $\alpha$ -L-ramnosidase (VILA-REAL et al., 2011; DE ARAUJO et al., 2013).

Desta forma, tendo os flavonoides atividade antitumoral demonstrada *in vitro*, em modelos animais e em ensaios clínicos com papel promissor devido às suas propriedades funcionais, como a inibição da carcinogênese, a atividade antiproliferativa, parada do ciclo celular, inibição da angiogênese, reversão da resistência a múltiplas drogas, indução de diferenciação, regulação de apoptose ou a combinação desses mecanismos; associado ao fato das reações de modificação enzimática dos flavonoides, de uma forma geral, apresentarem vantagens sobre os processos que envolvem reações químicas e; considerando que a hidrólise enzimática da rutina demonstrou ação antitumoral *in vitro* em painel de células tumorais humanas; a utilização da rutina hidrolisada (RH) pode representar nova perspectiva na terapêutica antitumoral, sendo interessante estudar seus efeitos profilático e terapêutico e contribuir para o melhor entendimento do seu mecanismo de ação no carcinoma de cólon.

## **Objetivo**

Determinar se a rutina hidrolisada, obtida por hidrólise enzimática, apresenta ação antitumoral na profilaxia e terapêutica de carcinoma de colon e prospectar seu possível mecanismo de ação.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### FASES DO ESTUDO

O projeto de pesquisa proposto está dividido em fases:

1. Obtenção da Rutina hidrolisada;
2. Estudo *in vitro* de células tumorais humanas de adenocarcinoma de cólon (HT-29) para verificação da atividade antitumoral da Rutina hidrolisada;
3. Estudo da resposta terapêutica da Rutina hidrolisada *in vivo*;
4. Investigação preliminar sobre o mecanismo de ação da Rutina hidrolisada sobre a peroxidação lipídica, proliferação celular mediada pela ING2, inibição da neoangiogênese (VASH) e apoptose mediada por TP53.

#### 3.1. Fase 1 - Obtenção da Rutina hidrolisada

A obtenção da RH corresponde ao descrito na literatura (DE ARAÚJO et al., 2013), resumidamente, como se segue:

A atividade da  $\alpha$ -L-rhamnosidase pela hesperidinase (Sigma-Aldrich®) foi avaliada utilizando-se 0.20 mM de p-nitrofenil  $\alpha$ -L-rhamnopiranosideina 20 mM, tampão citrato a pH 4.0 em 20 mM de tampão citrato a pH 4.0. Solução de Hesperidinase (Sigma-Aldrich®) (20 mg L<sup>-1</sup> em 0.05 M de tampão acetato a pH 4.0) foi aquecida a 70°C por 30 min para inativar a glucosidase. A mistura reativa contendo 100  $\mu$ L de preparado enzimático (50 mg L<sup>-1</sup>) e 4 mL de uma solução de rutina a 1% m/v (previamente dissolvida em 1 mL de metanol) foi misturada e incubada por 4 horas em *shaker* a (130 rpm) a 40°C. A reação foi interrompida por fervura (100°C) por 30 min, a amostra foi subsequentemente armazenada a -80°C, sendo utilizada de forma oportuna.

#### 3.2 Fase 2 - Estudo *in vitro* de células tumorais humanas de adenocarcinoma de cólon (HT-29) para verificação da atividade antitumoral da Rutina hidrolisada

##### 3.2.1 Descongelamento das células

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 congelamento, o volume foi completado para 10 mL com meio de cultura RPMI-1640

contendo 5% SFB. 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 HT-29 foi descongelada e propagada em garrafas T75 a 37°C, em câmara umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> (HeraCELL 150) usando o Modified Dulbecco Eagle Medium (DMEM - Sigma D-5648), suplementado com 100 mM piruvato de sódio (Gibco - 11- 360), 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco 2010-09) 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 três 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.

### **3.2.2 Cultura de células**

Foi empregada linhagem de células tumorais humanas HT-29, obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC), caracterizadas por possuir microvilos, microfilamentos, mitocôndrias vacuolizadas e densas, alta expressão de receptores de uroquinase e antígenos p53, mutações pró-tumorais no gene APC (adenomatous polyposis coli) e COX-2 (HIS, BACK e ELING, 2000). As células utilizadas foram submetidas a menos do que 22 passagens.

A linhagem de células foi descongelada e propagada em frascos de 25 cm<sup>2</sup> (T25) em cultura a 37°C, em câmara umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> (HeraCELL 150) usando o Modified Dulbecco Eagle Medium (DMEM - Sigma D-5648), suplementado com 100 mM piruvato de sódio (Gibco -11- 360), 10% de soro fetal bovino (SFB- Gibco 2010-09) e 1% de antibióticos (100 U/ml de penicilina e 10 mg/ml de estreptomicina, Gibco 15140-122), em acordo com as instruções da ATCC.

Para todos os estudos, as células foram submetidas ao uso de solução de tripsina-EDTA a 0.25% (Gibco) a 37°C por três minutos para permitir a desagregação celular. A ação da tripsina foi bloqueada com RPMI + SFB a 5% e uma alíquota de suspensão foi transferida para os frascos de 75 cm<sup>2</sup> (T75), completando o volume para 10 mL e a suspensão celular que originou a nova garrafa foi completada com 5ml. O meio de cultura

foi trocado, no máximo, a cada 24 horas ou sempre que necessário.

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

### **3.2.3 Ensaio da sulforrodamina B (SBR)**

As células foram mantidas no laboratório de cultura de células em frascos de 25 cm<sup>3</sup> (Nunc), com 5mL de meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

Foram inoculados 100µL/compartimento, em placa de 96 compartimentos (Nunc®), da suspensão celular com densidade de inoculação de 5x10<sup>4</sup> céls/mL, em meio RPMI/5% SFB acrescido de 1% de penicilina/streptomicina (LGC Biotecnologia). Após 24h de incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, foram adicionados 100µL/compartimento da amostra a ser testada em quatro concentrações distintas.

Para preparação das amostras, uma alíquota de 10mg foi dissolvida em 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO Synth®). Em seguida, 50µL dessa solução-mãe foram dispersos em 950µL de meio RPMI/5% SFB, para preparação da solução de trabalho, que foi diluída sucessivamente, em meio de cultura, para a preparação das concentrações finais de 0.25, 2.5, 25 e 250 µg/mL. A concentração final de DMSO não interfere no crescimento celular (SACOMAN et. al., 2008).

Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico Doxorubicina (Cloridrato de doxorubicina® - Europharma) nas concentrações 0.025, 0.25, 2.5 e 25 µg/mL.

Uma placa controle denominada T0 foi fixada no momento da adição das amostras, conforme descrição abaixo, a fim de determinar qual a quantidade de células no início do experimento.

Ao final de 48 horas de incubação, as células foram fixadas com 50µL/compartimento de TCA (ácido tricloroacético Sigma®) a 50% e incubadas por 1 hora a 4°C. A seguir, a placa foi lavada quatro vezes consecutivas com água destilada para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Depois de secas completamente à temperatura ambiente, as células fixadas foram coradas com 50µL/compartimento de SRB 0,4% (p/v) dissolvida em ácido acético 1%; e mantidas por 20 min. à temperatura ambiente. A seguir foi lavada quatro vezes com ácido acético 1% e

secas à temperatura ambiente. Finalmente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (Sigma®) 10mM e pH 10,5. A SRB é um corante proteico que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Portanto, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade antiproliferativa da amostra em teste (RUBISTEIN et. al., 1990; MONKS et. al., 1991).

### **Análise dos resultados do SBR**

As análises do SBR foram baseadas na metodologia de triagem *in vitro* para drogas anticâncer desenvolvidas pelo NCI (MONKS et al., 1991; SHOEMAKER, 2006).

As absorvâncias foram calculadas descontando o valor de seus respectivos brancos e, através das fórmulas a seguir pode ser determinado a porcentagem de crescimento de cada linhagem tumoral em função da concentração da amostra testada.

A leitura espectrofotométrica da absorvância foi realizada em 540nm em leitor de microplacas. Com os valores médios de absorvância para cada concentração de amostra, a porcentagem de crescimento (%C) foi calculada segundo as seguintes fórmulas:

Se  $T > T1$  → estímulo de crescimento celular

Se  $T1 > T \geq T0$  → atividade citostática:  $\%C = 100 \times [(T-T0)/(T1-T0)]$

Se  $T < T0$  → atividade citocida:  $\%C = 100 \times [(T-T0)/T0]$ , onde:

T = média da absorvância da célula tratada – absorvância amostra sem célula

T1 = absorvância do branco de células

T0 = absorvância do controle de células na placa T0

Sendo T0 a média da absorvância da célula tratada, T1 o controle de célula e T0 o controle das células no dia da adição das amostras, obteve-se então a porcentagem de crescimento. Foram gerados gráficos de porcentagem de crescimento em função da concentração da amostra testada, para cada uma das linhagens testadas. A concentração efetiva denominada TGI (do inglês *total growth inhibition*, concentração necessária para que ocorra 0% de crescimento celular) e o GI50 (50% growth inhibition): concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular (utilizado para amostras citostáticas).

Esses parâmetros são utilizados para comparar a potência das amostras e evidenciar a seletividade das mesmas e foram calculados por regressão não linear, tipo sigmoidal, utilizando-se software Origin, versão 8.0.

### **3.2.4 Citometria de fluxo**

As análises do ciclo celular e apoptose foram realizadas utilizando-se citômetro de Fluxo (Guava EasyCyte Millipore®). Foram realizados estímulos com RH nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 250 ug/mL em tempo de de 6, 12, 24 e 48 horas, mantendo um grupo controle em meio de cultura. Como controle adicional a doxorrubicina foi utilizada.

#### **3.2.4.1 Avaliação do ciclo celular**

A avaliação pelo iodeto de propídio, intercalante de DNA, permite determinar a percentagem de células em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>/M com base no conteúdo de DNA e na geração de fluorencências diferentes.

As amostras foram plaqueadas em placas de 96 compartimentos na concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL. As células foram sincronizadas em G<sub>0</sub> através da incubação por 24 horas em meio de cultura sem soro fetal bovino. As células foram incubadas com RH nas diferentes concentrações. Passado o tempo de estímulo, as células foram centrifugadas a 300g durante 5 minutos. O sobrenadante de cada poço foi aspirado, seguindo-se a lavagem com 50 uL de PBS. Para fixação, foram adicionados 200 uL de etanol a 70% a 4°C nos compartimentos, agitando em baixa velocidade. A placa permaneceu refrigerada durante 12 horas antes da coloração. Passado o período de fixação, a placa foi centrifugada a 450g durante 5 minutos à temperatura ambiente, sendo adicionados 200 uL de PBS a cada poço, homogeneizando as células, com posterior centrifugação (300g/5min). O sobrenadante foi removido com cuidado. Garantida a lavagem adequada para remoção do etanol, seguiu-se com adição de 200 uL de reagente Cell Cycle Guava® para cada poço. A placa foi incubada à temperatura ambiente durante 30 minutos, sendo então submetida à leitura. Amostra de controle negativo de células em fase de crescimento log e não tratadas foi preparada.

A excitação foi realizada por um laser de argônio de operação a 488 nm e a detecção de fluorescência foi realizada a 650-670 nm (PI). A análise dos resultados foi feita por meio do software Guava Nexin (10000 eventos) que forneceu a porcentagem de células

marcadas. As células que não tinham sido expostas ao kit de ciclo celular foram utilizadas para determinar a autofluorescência sob estas mesmas condições.

A análise da quantidade celular presente em cada quadrante permitiu a confecção dos gráficos, onde o quadrante inferior esquerdo considerado duplo negativo, Anexina V-PE(-)/7AAD(-), representa as células viáveis; o quadrante inferior direito: Anexina V-PE(+)/7AAD(-), representa as células em apoptose em estágio inicial, com exposição de fosfatidilserina; o quadrante superior direito: duplo positivo, representa as células em apoptose em estágio tardio, células sem integridade de membrana com exposição de fosfatidilserina e; quadrante superior esquerdo: AnexinaV-PE(-)/7AAD(+), os debris.

### **3.2.4.2 Avaliação dos estágios da apoptose**

Para este experimento foi utilizado o kit Guava® Nexin Reagent (Merck/Millipore 4500-0450), que contém anexina V-PE e 7AAD.

A medida de apoptose foi feita por meio do ensaio de marcação com anexina, o qual se baseia na translocação da fosfatidilserina para a superfície externa da membrana celular, fenômeno associado ao início da apoptose.

As células HT-29/adenocarcinoma de cólon humano foram plaqueadas em 96 compartimentos a uma densidade de  $2 \times 10^5$  células/mL por às 6, 12, 24 e 48 horas, com RH nas diferentes concentrações e tempos já descritos.

As células foram incubadas. Como controle negativo foram utilizadas apenas células e meio de cultura RPMI contendo 0.25% de DMSO, diluente dos compostos. Passado o tempo de estímulo, as células foram centrifugadas a 300g durante 5 minutos. O sobrenadante de cada poço foi aspirado, seguindo-se a lavagem com 50 uL de PBS. Esse conteúdo de PBS foi transferido para uma placa de 96 compartimentos para leitura em citômetro GUAVA®. Após adição de tripsina/EDTA 0,25% por 5 minutos, foram adicionados 50uL de soro fetal bovino. Seguiu-se a homogeneização para desprender todas as células do fundo do poço. Após o desprendimento, foram adicionados 50µL de PBS retirados da primeira lavagem, para cada poço. Prosseguiu-se com centrifugação a 300g durante 5 minutos. Após, o sobrenadante dos poços foi aspirado com cuidado, sendo adicionados 100ul de meio sem soro a cada poço e, posteriormente, adicionou-se 100µl do Reagente Guava Nexin®, mantendo as amostras durante 20 minutos à temperatura ambiente no escuro, prosseguindo-se a leitura das amostras.

### **3.3 Fase 3 - Estudo da resposta terapêutica da Rutina hidrolisada *in vivo***

Objetiva avaliar a atividade antiproliferativa da RH em modelo animal de adenocarcinoma de cólon humano/HT-29.

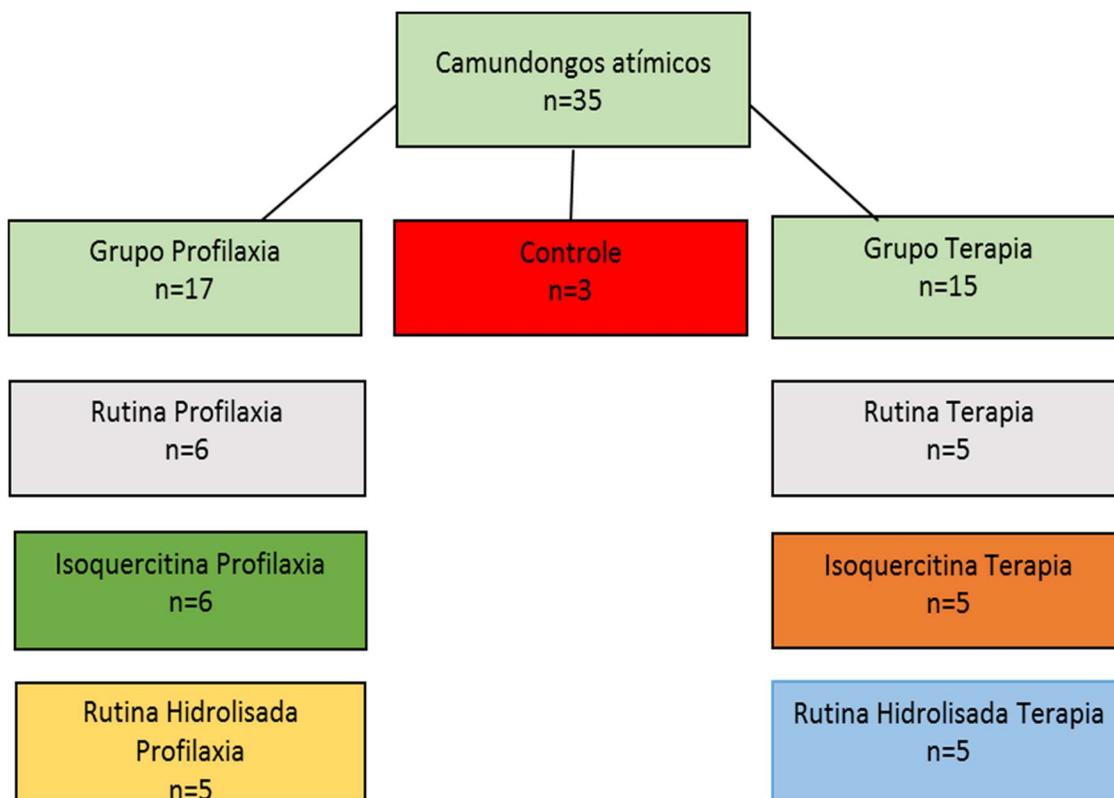
#### **3.3.1 Utilização de modelos animais**

A realização deste estudo obedeceu à Lei Federal 6.638 e e às orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade São Francisco (protocolo 001.05.12.).

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.

#### **3.3.2 Grupos experimentais**

Foram utilizados 35 camundongos Balb/c nu-nu, machos, com seis a oito semanas de idade, provenientes do laboratório Charles River (Charles River Laboratories International, Inc., Wilmington, USA). Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em 3 grupos e 3 conforme organograma a seguir (*Figura 5*):



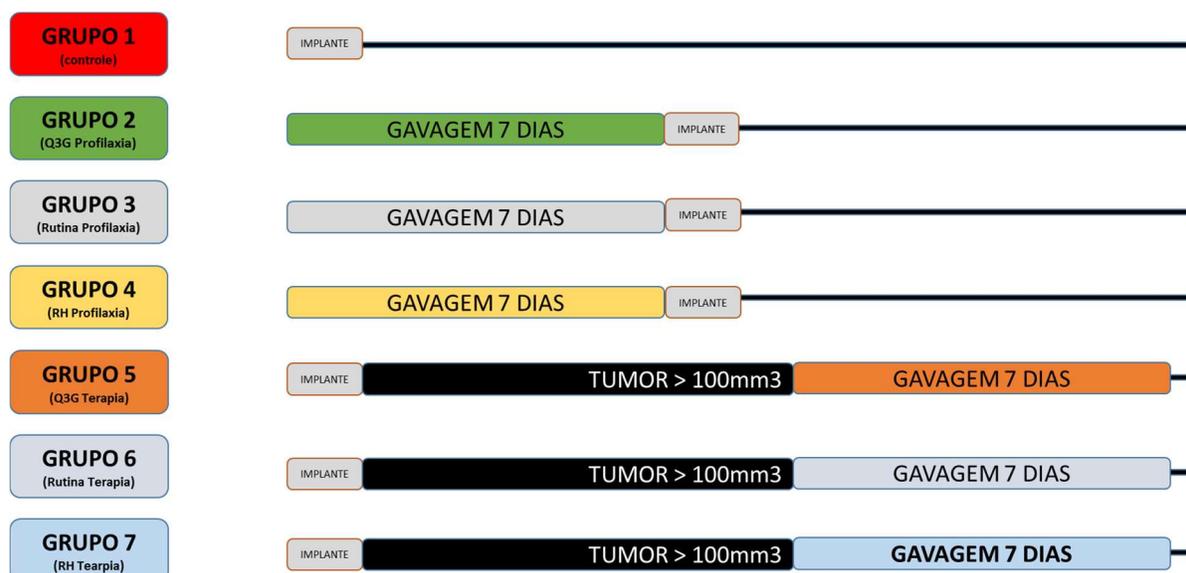
**FIGURA 5.** Organograma do método experimental. Grupos Controle, Terapia e Profilaxia subdivididos de acordo com o composto recebido

Os compostos foram administrados lentamente nas doses de 30 mg/Kg e 17 mg/Kg e 78 mg/Kg de peso do animal, respectivamente para rutina e isoquercitina e RH. 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; KŘÍŽKOVÁ et al., 2009; AZUMA et al., 2010) e foram testadas em acordo a OECD 425 (oecd.org/ehs/test/testlist.htm), para toxicidade aguda oral de substâncias.

O volume máximo administrado foi de 0,5 mL.

- Grupo Controle: Animais não submetidos a tratamento antes ou após o xenotransplante;
- Grupo Q3G pré-tumor: Grupo no qual foi administrado 0,017 mg/g de Q3G por gavagem durante 7 dias de forma profilática, ou seja, antes da realização do xenoenxerto;
- Grupo Rutina pré-tumor. Grupo no qual foi administrado 0,03 mg/g de rutina por gavagem durante 7 dias de forma profilática, ou seja, antes da realização do xenoenxerto;

- Grupo RH pré-tumor: Grupo no qual foi administrado 0,078 mg/g de RH por gavagem durante 7 dias de forma profilática ou seja, antes da realização do xenoenxerto;
- Grupo Q3G pós-tumor. Grupo no qual foi realizado primeiramente o xenoenxerto e, após a massa tumoral atingir volume  $\geq 100 \text{ mm}^3$ , administrado, de forma terapêutica, 0,017 mg/g de Q3G por gavagem durante 7 dias;
- Grupo Rutina pós-tumor. Grupo no qual foi realizado primeiramente o xenoenxerto e, após a massa tumoral atingir volume  $\geq 100 \text{ mm}^3$ , administrado, de forma terapêutica, 0,03 mg/g Rutina padrão por gavagem durante 7 dias;
- Grupo RH pós-tumor. Grupo no qual foi realizado primeiramente o xenoenxerto e, após a massa tumoral atingir volume  $\geq 100 \text{ mm}^3$ , administrado, de forma terapêutica, 0,078 mg/g de RH por gavagem durante 7 dias.



**FIGURA 6.** Relação temporal entre os grupo Controle, que não recebeu os biocompostos e, Grupos Terapia ou Profilaxia que receberam Rutina, Q3G ou Rutina hidrolisada

### 3.3.3 Modelo Experimental

#### 3.3.3.1 Criação do modelo de adenocarcinoma de cólon humano em camundongos atímicos

A linhagem celular HT-29/adenocarcinoma de cólon humano foi utilizada para o xenoenxerto heterotópico em camundongos atímicos. As células foram propagadas e separadas, conforme descrição anterior.

As células tumorais foram suspensas em 40µl de solução-meio. Foram implantadas

$4 \times 10^6$  células tumorais por injeção subcutânea no dorso do animal, utilizando-se seringa de 1ml, com agulha hipodérmica de calibre 36G (*Figura 7*). Todos os procedimentos com os animais foram executados em fluxo laminar, devido à ausência de resposta imune completa dos animais, com rigorosa técnica de assepsia e antissepsia com iodopovidona.



**FIGURA 7.** Foto da inoculação subcutânea de células tumorais para a criação do modelo de adenocarcinoma de cólon humano heterotópico em animal atímico

### **3.3.3.2 Cuidados no período pós-operatório**

Os animais receberam os biocompostos durante sete dias consecutivos, por meio de gavagem, sempre no mesmo horário, após um período mínimo de 30 minutos de jejum prévio à gavagem, tendo sido mantido o jejum por 1 hora após o procedimento.

Antes e após o período de administração do fármaco, mantiveram a ingesta hídrica e de ração padrão *ad libitum*.

O grupo controle não sofreu intervenção terapêutica prévia ou após o xenoenxerto.

Todos os animais foram alojados em gaiolas individuais com ingesta hídrica e de ração padrão *ad libitum* e foram observados. Caso ocorressem sinais de sofrimento sugeridos pela imobilidade, ausência de ingesta, dispnéia, eriçamento de pele ou outros, o animal seria sacrificado.

### **3.3.3.3 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, sem

resistência, assegurando-se que o tubo não penetrou a traqueia (*Figura 8*). O biocomposto foi administrado lentamente nas doses acima descritas, respeitando o peso do animal, em volume máximo de 0,5 mL.



**FIGURA 8.** Técnica de gavagem. Observa-se animal sendo gavado por cânula ponta-bola em câmara de fluxo laminar com imobilização completa da porção cranial (cabeça e pescoço)

### 3.3.4 Monitoramento do peso do animal

Os animais foram diariamente submetidos à pesagem em balança semi-analítica (Marte®) em fluxo laminar, sendo os resultados anotados em prontuário eletrônico para ulterior análise.

### 3.3.5 Avaliação do Crescimento tumoral

O animal foi monitorado após a inoculação, aferindo-se o volume por meio de paquímetro de metal (*Figura 9*) e determinando-se a curva de crescimento tumoral dos grupos distintos (TOMAYKO et al., 1989), sendo:

Volume =  $S^2 \times L/2$ , onde “S” representa o menor diâmetro aferido e “L” o maior diâmetro aferido.

Os dados foram anotados diariamente em planilha eletrônica (Excell for Windows 2010).



**FIGURA 9.** Fotografia do método de determinação do volume tumoral por meio de paquímetro de metal, pela medida do maior e do menor diâmetro tumoral em camundongo *nude* com massa tumoral em região da coxa esquerda

### 3.3.6 Velocidade relativa de crescimento tumoral

Considerando que a velocidade de crescimento tumoral é determinada pelo volume alcançado pelo tumor em determinado período de tempo de replicação tumoral, para avaliar a velocidade de crescimento tumoral dos grupos tratados, em relação ao controle, foi utilizada a relação entre a média do volume final subtraído do volume inicial do controle, no tempo proposto de 7 dias de intervalo, obtendo-se a média da velocidade de crescimento dos tumores que não receberam tratamento. Da mesma forma, a velocidade, no mesmo intervalo de tempo, tempo do tratamento, de cada um dos grupos tratados foi obtida. Ao se dividir a velocidade média do grupo tratado pelo grupo controle, obteve-se a velocidade relativa de crescimento tumoral.

$$\text{Media Vol final (Grupo TTO)} - \text{Media Vol inicial (Grupo TTO)}$$

---

$$\text{Media vol final (Grupo CTL)} - \text{Media vol inicial (Grupo CTL)}$$

Sendo, final: o último dia de tratamento; inicial: o primeiro dia de tratamento; vol: volume; CTL: controle; TTO: tratamento.

Desta forma, pode-se utilizar o controle como valor comparativo de comportamento de velocidade de crescimento em relação aos grupos tratados.

### **3.3.7 Obtenção das amostras**

Depois de anestesiados os animais foram submetidos à eutanásia após a ressecção tumoral. O espécime extirpado foi dividido em três amostras diferentes para proceder às análises necessárias.

### **3.3.8 Estudo histopatológico**

O estudo histopatológico foi realizado por patologista experiente no diagnóstico de CCR, que não teve acesso aos demais aspectos do estudo.

Para a realização do estudo histopatológico um dos fragmentos proveniente do espécime cirúrgico, previamente fixado em solução de formalina a 10 por cento, foi incluído em bloco de parafina.

Três cortes de 4µ foram obtidos de cada bloco, para análise de áreas com e sem tumor, sendo corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) para diagnóstico anatomopatológico.

Presença e grau de diferenciação do tumor foram determinados.

## **3.4 Fase 4 - Investigação preliminar sobre o mecanismo de ação da Rutina hidrolisada sobre a peroxidação lipídica, proliferação celular mediada pela ING2, inibição da neoangiogênese (VASH) e apoptose mediada por TP53**

### **3.4.1 Determinação da peroxidação lipídica pelo método do TBARS**

Para medida do dano oxidativo, foi utilizado o doseamento de malondialdeído (MDA) (MARTINS et al., 2009).

As amostras foram congeladas a -80°C até o momento do uso.

Foi separada amostra com 30 mg de tecido tumoral e armazenado em *eppendorf* em soluções-tampão (RIPA, PMSF e EDTA), mantidas imersas em banho de gelo. As soluções tampão impedem que o tecido sofra mais oxidação durante a trituração e homogeneização no Ultra turrax (IKA EW-04737-21) feita por 15". Posteriormente, as amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 3000rpm por 10' a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio com solução SDS (sódio dodecil sulfato,

Cayman Kit N-10009055), em triplicata, e agitadas por 30''. 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' para parada da reação. O conteúdo obtido foi então centrifugado em *eppendorfs* a 3000rpm por 10'. O sobrenadante foi transferido para placa de 96 compartimentos e a leitura foi realizada em espectofotômetro automático com absorbância de 532nm.

### **3.4.2 Análises imunohistoquímicas**

Foram realizadas por meio de cortes adicionais no bloco de parafina e foram submetidas à técnica Biotina-Avidina-Peroxidase (MARTINEZ et al., 2010; PRIOLLI et al., 2016) com antígenos específicos anti-TP53 (Monoclonal Mouse anti-human TP53 protein. Clone DO-7. Dako Cytomation®, Copenhagen), anti-ING2 (Policlonal Rabbit anti-human ING2. Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis®), anti-VASH (Monoclonal Rabbit anti Human anti-Vasohibin-1. Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis®), como se segue:

#### **3.4.2.1 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 5 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 *PBS* por cinco minutos.

Os anticorpos anti-TP53, anti-VASH e anti-ING2 foram utilizado, em concentrações de 1:50; 1:110 e 1:250, respectivamente, por marcar especificamente a proteína TP53

mutada, a quantidade de vasoinibina e de ING2 no tecido cólico neoplásico (VOJTĚŠEK et al., 1992).

Para o controle negativo foi utilizada a amostra sem o anticorpo primário e para o controle positivo da TP53 utilizou-se a tonsila humana, enquanto para VASH e ING2 foi utilizado adenocarcinoma de endométrio, conforme manual do fabricante\*.

Foi utilizado o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (ABC - Dako Cytomation®, Copenhagen, Dinamarca) adaptado às condições laboratoriais. As lâminas foram incubadas com o anticorpo específico diluído em albumina bovina (Sigma Chemical CO®, Saint Louis, EUA) nas concentrações descritas acima, durante 16 a 18 horas a 4°C. Em seguida, lavadas em tampão *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 tampão *PBS* com 3 trocas de 5 minutos cada; incubação com o complexo ABC diluído em tampão Tris, durante 30 minutos à temperatura ambiente; lavagem em tampão *PBS* com 3 trocas de 3 a 5 minutos cada; revelação com solução de diaminobenzidina 0,6% (DAB - Sigma Chemical CO®, Saint Louis, EUA), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,06%. As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada, contracoradas com hematoxilina de Harris por 1 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.

#### **3.4.2.2 Quantificação da imunoexpressão por análise de imagem assistida por computador**

A determinação da quantidade de imunoexpressão foi efetuada por processamento de imagem assistido por computador (PRIOLLI et al., 2010, MARTINEZ et al, 2011; PRIOLLI et al., 2016) para a TP53, ING2 e VASH.

O sistema de captação de imagem é composto por câmera Digital Color (Infinite-3C ®), acoplada a microscópio (Nikon® a-photo-2-YSC), ligado a monitor (Dell®, 17 polegadas), e ao computador (Dell-Dimension®, processador Pentium 4, dual-core, 1.8 Mb,

---

\* Disponível em [http://www.dako.com/br/ar38/p105510/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/br/ar38/p105510/prod_products.htm)

plataforma Windows XP®).

O processamento da imagem é formado por níveis de cores e tonalidades distintas, permitindo a visualização de estruturas. As imagens foram analisadas em programa específico. A mensuração foi executada com aumento de 400X em área representativa da neoplasia. A imagem gravada, observada na tela do monitor, foi captada por programa de aquisição de imagem. Ao selecionar determinada estrutura tecidual, no caso a imunocoloração, apenas ela foi observada de modo colorido. Somente a estrutura composta pelos números resultantes da combinação *RGB (Red, Green, Blue)*, que o usuário selecionou, apareceu 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 analisa a imagem permitindo ao usuário tomar conhecimento da quantidade de imunocoloração em todo o campo visibilizado. A média de três medidas da mesma lâmina em campos distintos, representativos da neoplasia foi considerada a medida final do conteúdo de imunocoloração determinada em U/pixels.

#### **3.4.2.3 Quantificação Microvascular**

A quantificação microvascular foi realizada pelo método de WEIDNER, modificado conforme Consenso Internacional de Avaliação da Angiogênese em Tumores Sólidos Humanos (WEIDNER et al., 1991; VERMEULEN et al., 1996) e adaptado para determinação em cortes histológicos corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE), tendo sido feita a contagem vascular por toda a extensão tumoral.

### **3.5 Análise estatística**

Baseada na hipótese nula: “A RH não tem ação antitumoral” e na hipótese alternativa: “A RH é agente antitumoral”, a análise dos resultados obtidos foi realizada adotando-se nível de significância menor que 5% ( $p \leq 0,05$ ) para rejeição da hipótese nula.

Os modelos para análise dos resultados, baseados nos procedimentos executados foram: cálculo amostral; estatística descritiva; medidas de tendência central; teste de normalidade; análise de variância; teste de regressão.

Para a definição do tamanho da amostra, utilizou-se modelo estatístico que, definidos os parâmetros fundamentais, informa o número representativo de animais

necessários para conseguir a confiabilidade de 95% dos resultado. Desta forma, o cálculo amostral foi realizado através de calculadora online (SANTOS, 2016) conforme a seguinte fórmula:

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot p \cdot (1 - p)}{Z^2 \cdot p \cdot (1 - p) + e^2 \cdot (N - 1)}$$

Onde n é a amostra calculada, N a população, Z a variável normal padronizada associada ao nível de confiança, p a verdadeira probabilidade do evento e e o erro amostral.

Os dados referentes a citometria de fluxo foram analisados por meio do software específico contido no citometro Guava utilizado e, o teste de atividade anti-proliferativa, por regressão não linear tipo sigmoidal pelo software Origin (versão 8.0.).

Os testes de análise de variância foram utilizados para comparação entre cada grupo tratado e o grupo controle, sempre que necessário foram aplicados os pós-testes. O teste de regressão foi utilizado para determinação do crescimento tumoral nos grupos tratados e não tratados.

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

## 4. RESULTADOS

A fim de tornar a apresentação dos resultados objetiva, os mesmos estão descritos sobre a forma de figuras e gráficos. Quando houve significância estatística ( $p < 0,05$ ) os dados foram acompanhados de identificação (\*) com o teste utilizado descrito. A discussão dos resultados será apresentada em capítulo dedicado a este fim.

### 4.1 Fase 1 - Obtenção da rutina hidrolisada

A RH utilizada seguiu os padrões de obtenção de forma idêntica ao descrito na literatura (DE ARAÚJO et al., 2013). Tomou-se o cuidado em obter volume suficiente a ser utilizado para o tratamento de todos os animais dos grupos.

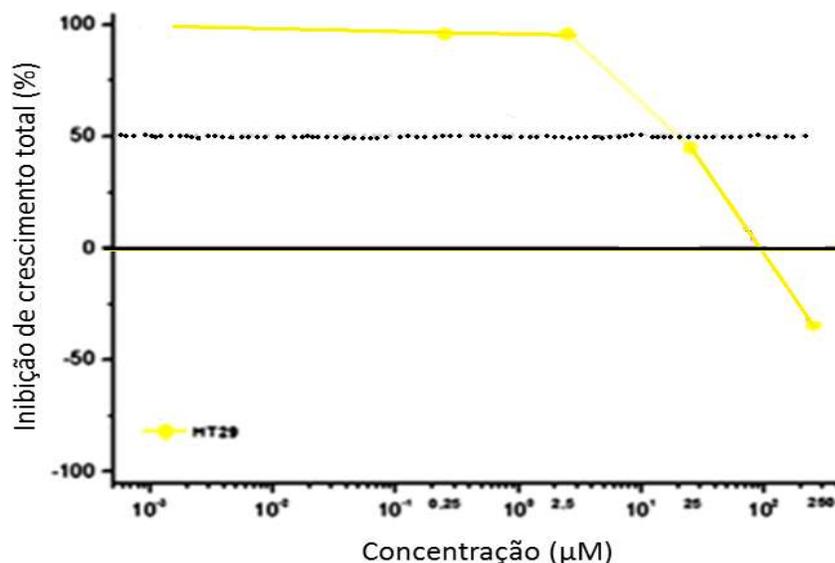
### 4.2 Fase 2 - Estudo *in vitro* de células tumorais humanas de adenocarcinoma de cólon (HT-29) para verificação da atividade antitumoral da Rutina hidrolisada

#### 4.2.1 Quanto à concentração efetiva da inibição de crescimento celular em adenocarcinoma de cólon/HT29

Foi testada célula de linhagem de tumor humano, HT-29/ adenocarcinoma de cólon, quanto ao TGI, após ser submetida a incubação com os flavonoides e doxorubicina, esta última utilizada como padrão de controle (Tabela 1, Figura 10).

**TABELA 1.** Concentração efetiva da inibição de crescimento celular (IC50%) (ug/mL) para linhagem de adenocarcinoma de cólon/HT-29 com utilização de doxorubicina, rutina, isoquercetina e rutina hidrolisada pelo ensaio de sulforrodamina B (SRB)

Agente	IC50% (ug/MI)
Doxorrubicina	0.09
Rutina	>250
Quercitina	>250
Rutina hidrolisada	24.4

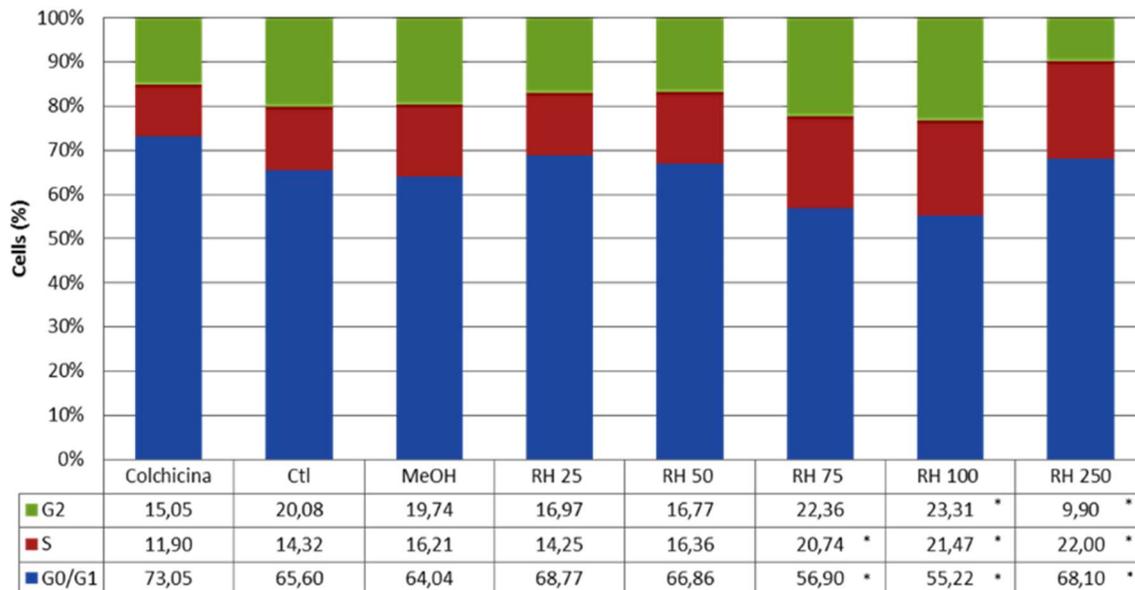


**FIGURA 10.** Atividade antiproliferativa (TGI) da rutina hidrolisada em células tumorais avaliadas pelo ensaio da sulforrodamina B (SBR)

#### 4.2.2 Quanto à ação da Rutina hidrolisada sobre a inibição do ciclo celular

O ciclo celular da linhagem de adenocarcinoma de cólon humano/HT-29 foi avaliado por citometria de fluxo às 6, 12, 24 e 48 horas com estímulo de RH em concentrações de 25, 50, 75, 100, 250 μM, demonstrando significância apenas para o tempo de 48 horas (Figura 11). Notar o efeito pró-proliferativo em concentrações 75, 100 e efeito antiproliferativo em 250 ug/ml em relação ao controle.

### Colon adenocarcinoma/HT29

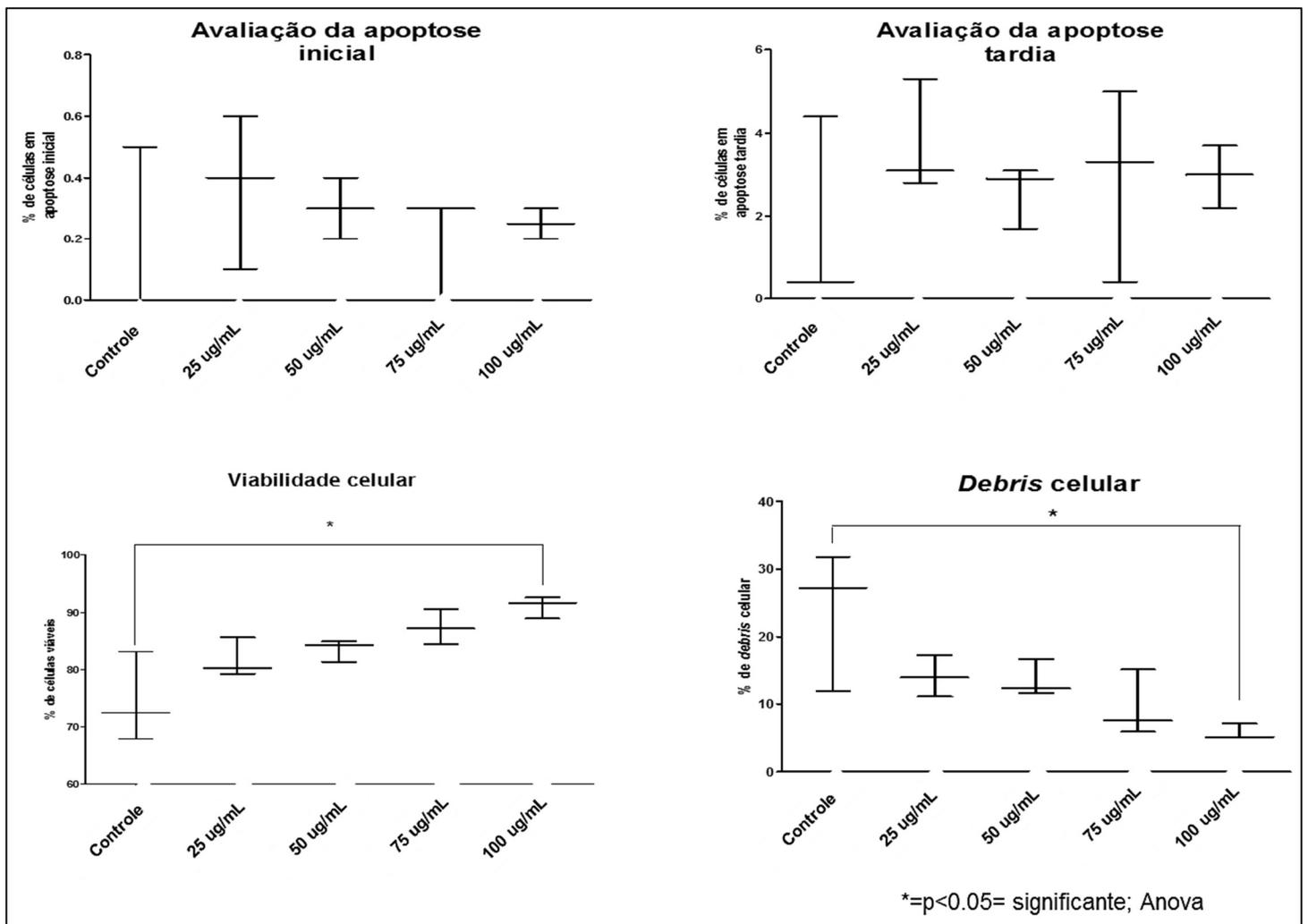


\*=p<0.05= significante; Anova

**FIGURA 11.** Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo das células HT-29/adenocarcinoma de cólon em 48h de estímulo com a Rutina hidrolisada nas concentrações 25, 50, 100 e 250 ug/mL

#### 4.2.3 Quanto a ação da Rutina hidrolisada sobre a apoptose celular

A morte celular induzida por apoptose da linhagem de adenocarcinoma de cólon humano/HT-29 foi avaliado por citometria de fluxo às 6, 12, 24 e 48 horas de estímulo com RH em concentrações de 25, 50, 75, 100  $\mu$ M (*Figura 12*). Notar ausência de efeito sobre a apoptose em todas as concentrações testadas.



**FIGURA 12.** Avaliação da indução de apoptose das células HT29 em 48h de estímulo com a rutina hidrolisada nas concentrações 25, 50, 100 µg/mL.

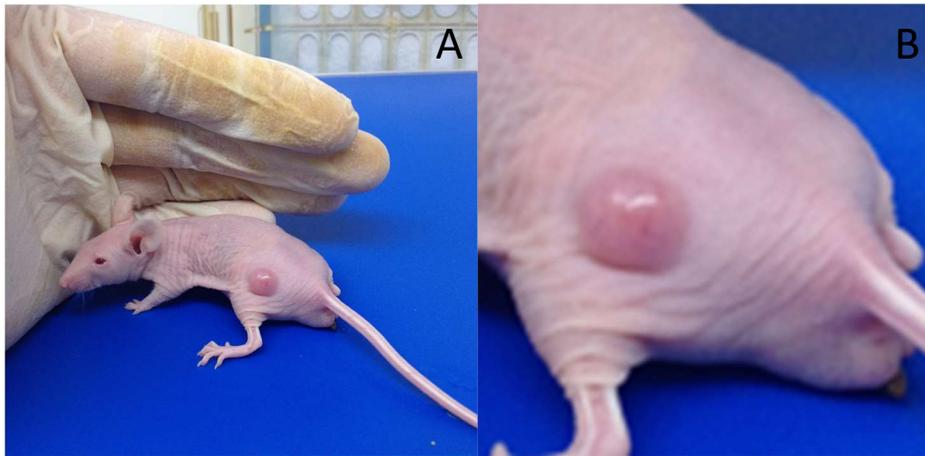
### 4.3 Fase 3 - Estudo da resposta terapêutica dos flavonóides *in vivo*

Para avaliar a resposta da RH *in vivo* foi necessário a criação do modelo animal de adenocarcinoma de cólon que foi desenvolvido de forma idêntica a literatura (PRIOLLI et al., 2012).

#### 4.3.1 Confirmação da presença do adenocarcinoma de cólon em modelo animal

##### 4.3.1.1 Avaliação macroscópica

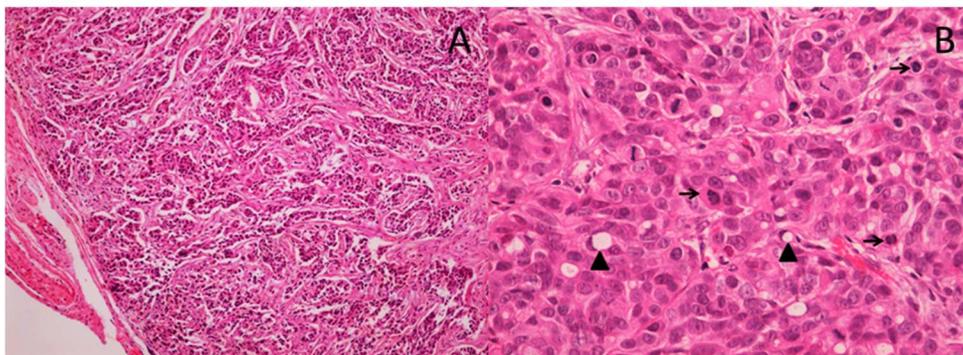
O desenvolvimento de massa endurecida e fixa com aumento da vascularização e de fácil visibilização no local de enxerto é sugestivo de lesão neoplásica.



**FIGURA 13.** Fotografia de camundongo atímico exibindo massa fixa no local de enxerto sugestiva de lesão neoplásica **(A)**, com aumento da vascularização **(B)** de fácil visibilização

#### 4.3.1.2 Avaliação microscópica

À microscopia todos os tumores foram classificados como pouco diferenciado com agrupamentos de células tumorais de médio a grande tamanho, citoplasma acidófilo e amplo, núcleo de cromatina delicada e nucléolo evidente. Há presença de traves de fibrose separando as células tumorais que apresentam-se em padrão desmoplásico em “ninhos”. Há frequentes figuras de mitose, incluindo formas atípicas e células em anel de sinete (*Figura 14*).

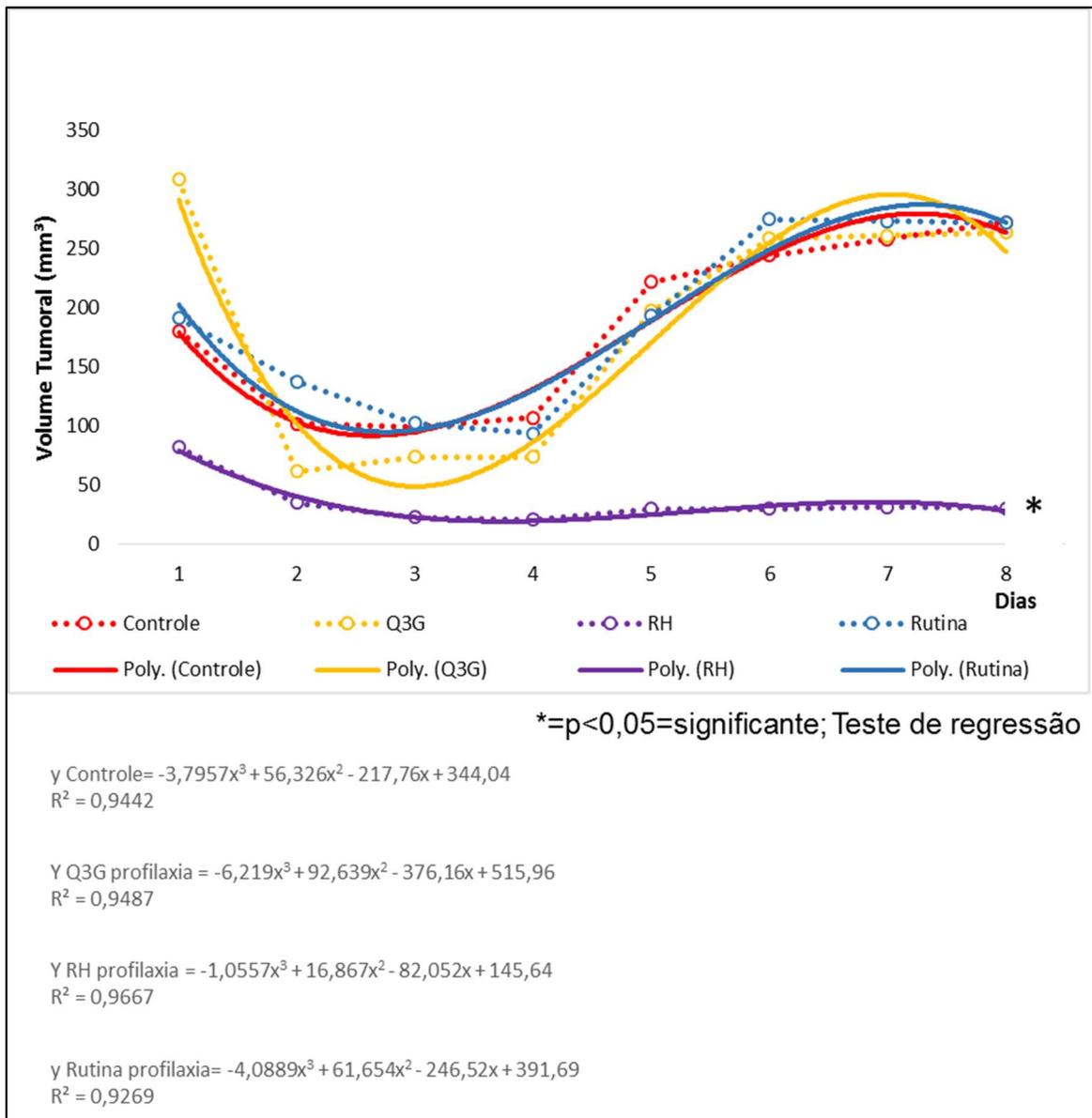


**FIGURA 14.** Adenocarcinoma pouco diferenciado. **A-** Notar traves de fibrose separando as células tumorais de padrão desmoplásico em “ninhos” [H&E, 100X]. **B-** Observar os agrupamentos de células tumorais de médio a grande tamanho, citoplasma acidófilo e amplo, núcleo de cromatina delicada e nucléolo evidente. Há frequentes figuras de mitose, incluindo formas atípicas (setas) e células em anel de sinete (cabeças de setas) [H&E, 400X]

### 4.3.2 Crescimento tumoral nos animais que receberam ou não os flavonoides Q3G, Rutina e Rutina hidrolisada

#### 4.3.2.1 Grupo profilaxia

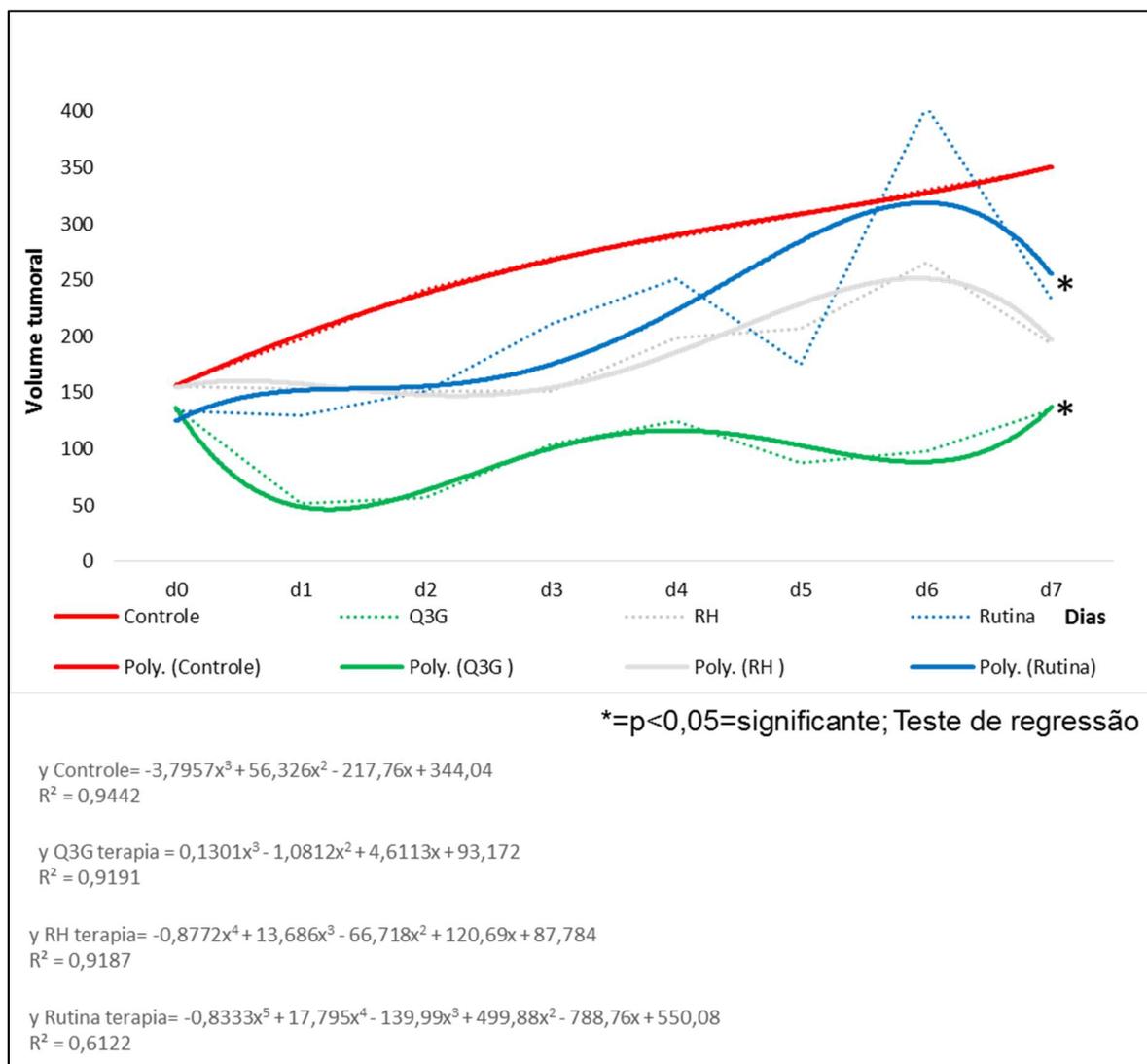
Quando administrado de forma profilática a RH foi a único capaz de inibir o crescimento tumoral de forma significativa ( $p=0.04$ ), comparativamente ao controle (*Figura 15*).



**FIGURA 15.** Crescimento tumoral avaliado por curvas de regressão sigmoide ao longo do tempo dos animais com adenocarcinoma humano dos grupos profilaxia e controle

### 4.3.2.2 Grupo Terapia

Ao serem administrados de forma terapêutica, tanto a Q3G ( $p=0,00$ ) quanto a Rutina ( $p=0,00$ ) inibiram o crescimento tumoral comparativamente ao controle (*Figura 16*).

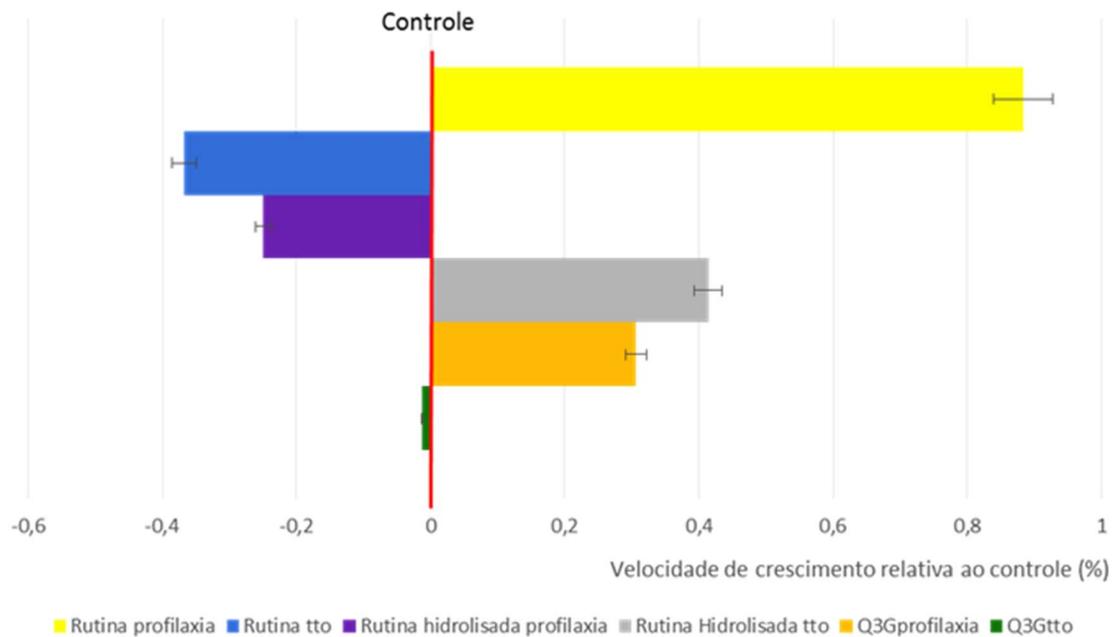


**FIGURA 16.** Crescimento tumoral avaliado por curvas de regressão sigmoideal ao longo do tempo dos animais com adenocarcinoma humano dos grupos terapia e controle

### 4.3.3 Velocidade relativa de crescimento tumoral

Para avaliar a velocidade de crescimento tumoral, pode-se utilizar o controle (linha 0) como valor de comportamento de velocidade de crescimento tumoral de animais que não receberam qualquer tratamento. Pode-se desta forma, comparar, em termos percentuais, a

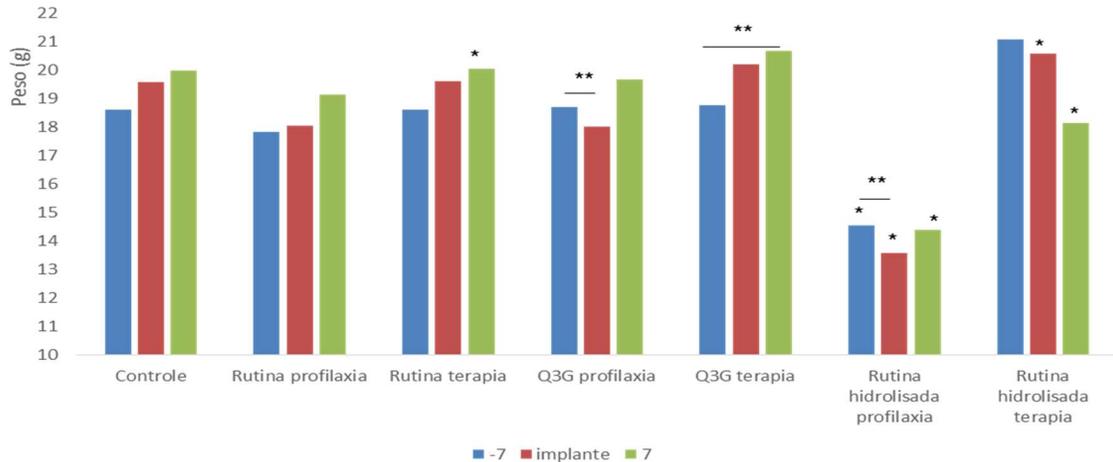
desaceleração ou aceleração do crescimento tumoral dos animais tratados em relação ao controle (*Figura 17*). Notar a diminuição da velocidade do crescimento tumoral com a administração terapêutica de rutina e Q3G e de RH administrada de forma profilática.



**FIGURA 17.** Velocidade de crescimento tumoral relativa ao controle dos grupos tratados com Rutina hidrolisada, Rutina, Q3G administradas de forma profilática ou terapêutica

#### 4.3.4 Variação de peso do animal com adenocarcinoma de cólon com ou sem tratamento com os flavonoides Rutina, Q3G e Rutina hidrolisada 7 dias antes, no dia e no 7º dia após o xenoinxerto

Observa-se diferença ao longo do tempo na profilaxia com RH e Q3G, entre o 7º dia anterior ao implante tumoral comparado ao dia do implante tumoral ( $p=0.00$ ) e para o tratamento com Q3G no grupo terapia entre o dia do implante e no 7º dia de tratamento ( $p=0.00$ ) (*Figura 18*).



Intergrupos (Test t):

\*Controle X Rutina terapêutica d7 (p=0.00)

\*Controle X Rutina hidrolisada profilaxia d-7, d0 e d7 (p=0.00)

\*Controle X Rutina hidrolisada terapia d0 e d7 (p=0.00)

Intragrupos (ANOVA):

\*\*Q3G profilaxia d-7 X d0 (p=0.00)

\*\*Q3G terapia entre d-7 X d7 (0,00)

\*\*Rutina hidrolisada profilaxia entre d-7X d0 (0,00)

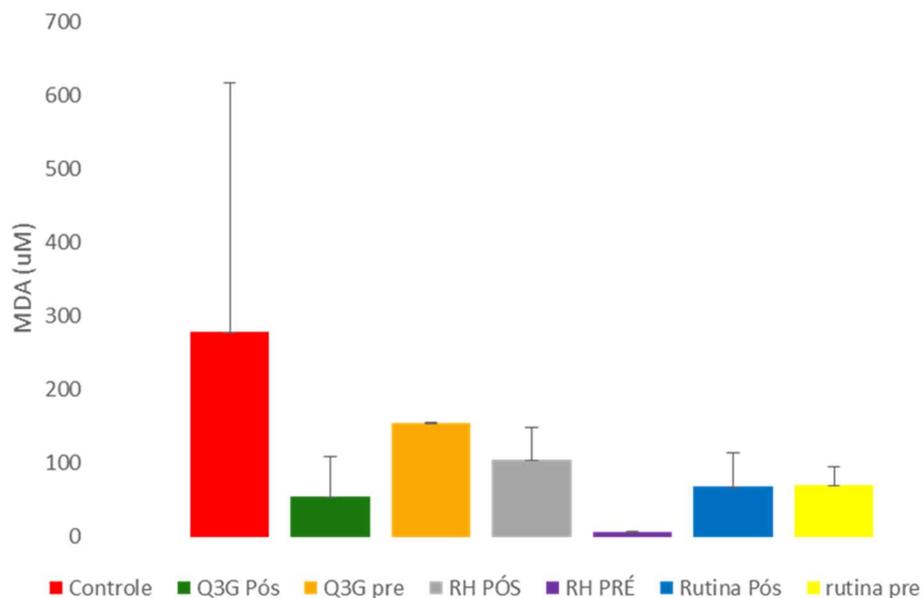
\*,\*\* = significante

**FIGURA 18.** Evolução do peso avaliado ao longo do tempo, 7 dias antes do implante, no dia do implante e, 7 dias após o implante do adenocarcinoma de cólon humano em animais submetidos a profilaxia ou tratamento com Rutina, Rutina hidrolisada e Q3G

#### 4.4 Fase 4 - Investigação preliminar sobre o mecanismo de ação da Rutina hidrolisada sobre a peroxidação lipídica, proliferação celular mediada pela ING2, inibição da neoangiogênese (VASH) e apoptose mediada por TP53

##### 4.4.1 Indução de Peroxidação lipídica

Não houve diminuição significativa da expressão de MDA nos diferentes grupos em relação ao controle (*Figura 19*).

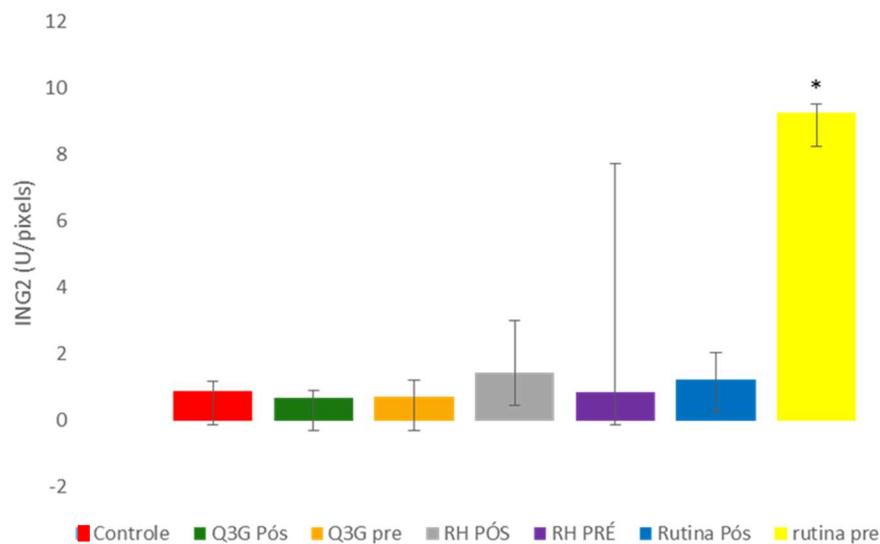


ANOVA; Teste de Dunnett

**FIGURA 19.** Peroxidação lipídica no adenocarcinoma de colon dos animais sem tratamento, tratados com Q3G, rutina ou rutina hidrolisada profilática e terapêutica

#### 4.4.2 Expressão de ING2

Notar diferença ( $p=0.01$ ) entre os animais tratados com rutina na forma profilática quando comparada ao controle (*Figura 20*).



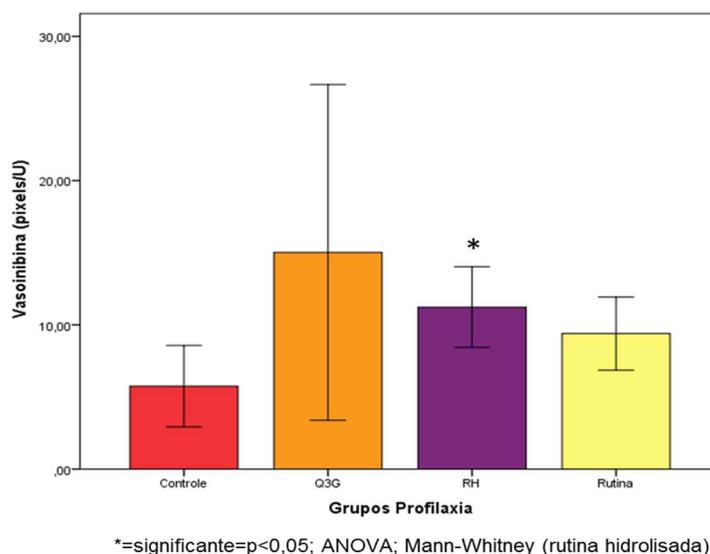
ANOVA; Teste de Dunnett

**FIGURA 20.** Expressão de ING2 no adenocarcinoma de colon dos animais sem tratamento, tratados com Q3G, rutina ou rutina hidrolisada profilática e terapêutica

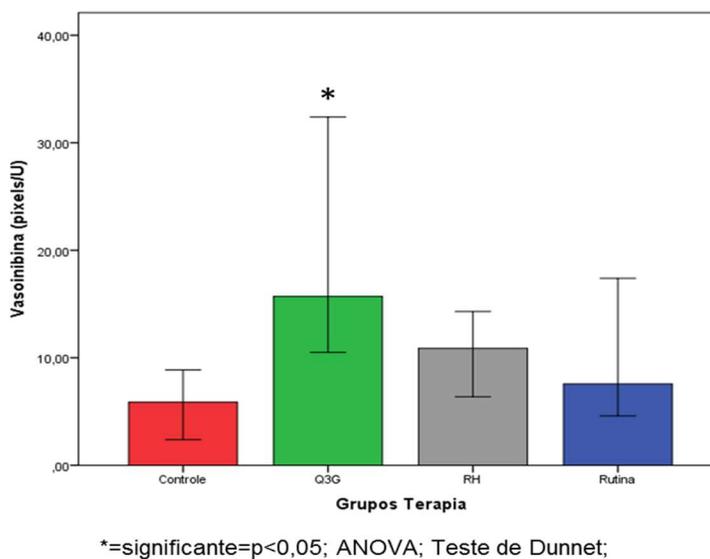
#### 4.4.3 Potencial antiangiogênico da Rutina hidrolisada

##### 4.4.3.1 Expressão de VASH (Inibina)

Observa-se aumento da expressão da VASH no grupo tratado com RH administrada de forma profilática comparativamente ao controle ( $p= 0,03$ ) (Figure 21), assim como na administração terapêutica de Q3G administrada de forma terapêutica c ( $p=0,03$ ) (Figure 22).



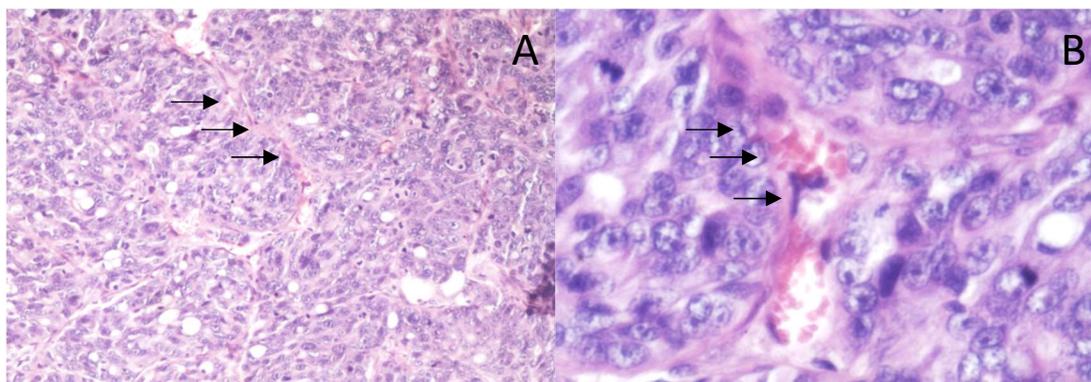
**FIGURA 21.** Expressão de VASH (vasoinibina) no adenocarcinoma de cólon não tratado (controle) e tratado com rutina, rutina hidrolisada, Q3G de forma profilática



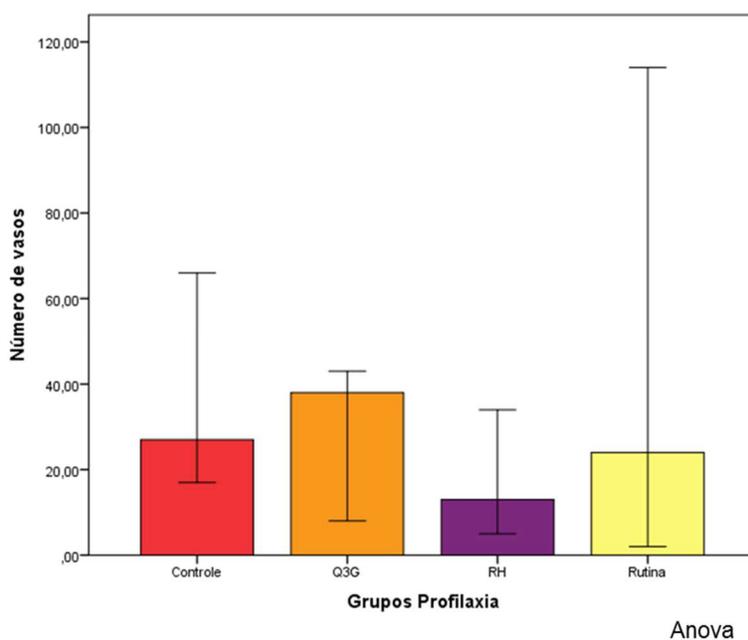
**Figura 22.** Expressão de VASH (vasoinibina) no adenocarcinoma de cólon não tratado (controle) e tratado com rutina, rutina hidrolisada, Q3G de forma terapêutica

#### 4.4.3.2 Quantificação microvascular

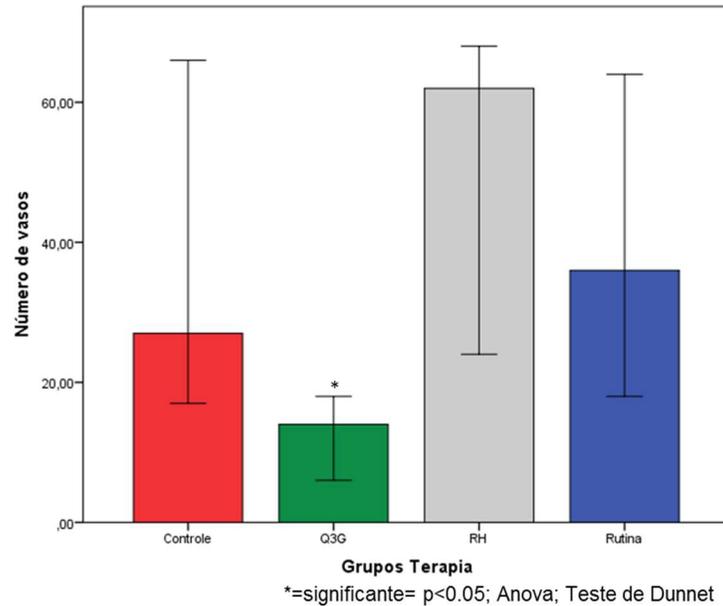
A quantificação vascular foi feita pela contagem dos vasos em todo o campo tumoral à microscopia convencional (*Figura 23*). Notar a ausência de diferença nos animais que receberam profilaxia com Q3G, Rutina e RH quando comparado ao controle (*Figura 24*), enquanto houve diminuição ( $p=0,04$ ) no número de vasos nos tumores de animais que receberam Q3G de forma terapêutica (*Figura 25*).



**FIGURA 23.** Microfotografias de adenocarcinoma de cólon demonstrando células pleomórficas com citoplasma acidófilo, dando ênfase às estruturas vasculares presentes no tecido conjuntivo de permeio (setas). [H&E, A:100X; B:400X]



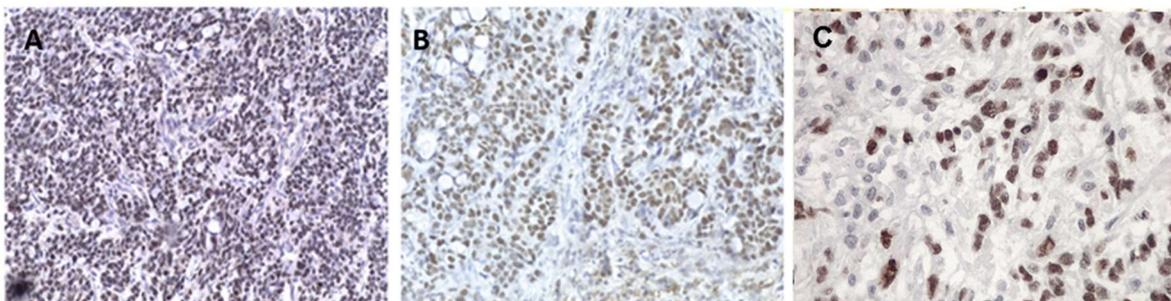
**FIGURA 24.** Número de vasos nos grupos que receberam rutina, rutina hidrolisada e Q3G de forma profilática em relação ao grupo não tratado (controle)



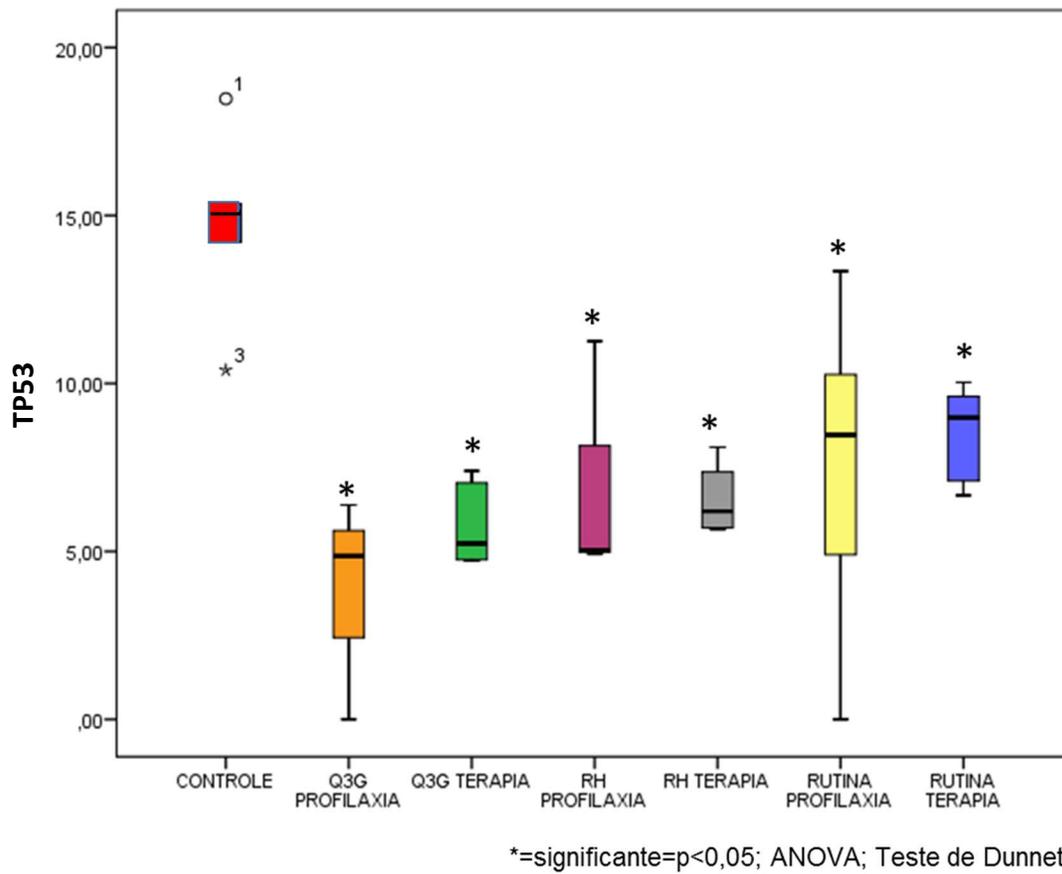
**FIGURA 25.** Número de vasos nos animais que receberam rutina, rutina hidrolisada ou Q3G de forma terapêutica comparados ao que não recebeu tratamento (controle)

#### 4.4.4 Expressão de TP53 nos espécimes tumorais

Há grande expressão de TP53 no grupo Controle, p53 em média expressão no tratamento com RH e pequena expressão no grupo Q3G profilaxia (*Figura 26*). Em todos os tratamentos propostos, quando comparado ao grupo não tratado (controle) há menor expressão de TP53 (*Figura 27*).



**FIGURA 26:** Microfotografia de adenocarcinoma de cólon HT-29. Expressão de TP53 mutada. Notar em: A (Controle) grande expressão de TP53, em B (Rutina hidrolisada terapia) TP53 em média expressão e, em C (Q3G profilaxia) TP53 em menor expressão. Imunohistoquímica realizada com anti-corpo monoclonal anti-TP53. A,B: IHx p53 [100X]; C: IHx Tp53 [400X]



**FIGURA 27.** Imunoexpressão de TP53 mutada em tumores de animais que receberam ou não tratamento com rotina, RH e Q3G

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Quanto ao Material e Método

#### 5.1.1 Fase 1 – Quanto à obtenção da Rutina Hidrolisada

Conforme descrita por de Araújo e colaboradores, a rutina hidrolisada caracteriza-se como sendo formada por 69,5% de Q3G, 23% de Rutina e 7.5% de Quercitina.

#### 5.1.2 Fase 2 – Quanto aos métodos de estudo de atividade antiproliferativa

##### 5.1.2.1. Citometria de Fluxo

A vida celular é ritmada pelo seu ciclo, onde cada célula de um organismo sofre modificações cíclicas que a conduzem à divisão celular e à formação de duas células-filhas. O ciclo celular está dividido em 4 fases: a fase G1 (G para *gap*, da tradução livre, intervalo) durante a qual a célula cresce devido às sínteses protéicas, a fase S (S para síntese) durante a qual a célula duplica seu DNA, a fase G2 que é uma outra fase de crescimento e a fase M (M para mitose) que representa a divisão celular propriamente dita (BRUCE et al. 2007). Atualmente, distinguem-se dois períodos no curso da fase G1. O primeiro período é caracterizado pela sensibilidade da célula ao meio ambiente. Nesse momento a célula sofre a ação de substâncias que favorecem a mitose (fatores mitogênicos) e de moléculas inibidoras. Nesta fase as células estão sujeitas a influências externas sobre o ciclo celular, principalmente durante a transição G1/S. Sinais que estimulam a diferenciação fazem com que o ciclo celular seja bloqueado e a célula entre em G0. Este bloqueio ocorre por volta da metade de G1 que, nos mamíferos é conhecido como Ponto de Restrição. Essa fase G1 precoce termina então no ponto de restrição e é seguida pela fase G1 tardia, durante a qual a célula se torna insensível ao seu meio e progride no ciclo, mesmo na ausência do mitogênio (BRUCE et al. 2007).

Dentro das capacidades biológicas dos tumores, a resistência à morte celular e a sustentação de vias sinalizadoras de proliferação celular são dois dos principais alvos de terapias antitumorais abordando os efeitos de flavonoides (SHAW et al., 1992; YOSHIMIZU et al., 2004; PIERINI et al., 2008; YANG e LIU, 2009; CHEN et al., 2010; KIM et al., 2010; XAVIER, 2010; SANTOS et al., 2011; HAO e CHO, 2014). Compostos fenólicos mostram efeitos antiproliferativos e citotóxicos, e atividade mais especificamente pró-apoptótica em

células de câncer de várias linhagens e modelos animais de tumores (FRESCO et al., 2010).

### **Avaliação do Ciclo Celular**

Esse ensaio baseia-se na diferenciação de células nos diversos estágios do ciclo celular pela marcação do DNA com iodeto de propídio (PI), um intercalante de DNA. Essa análise só é permitida após a permeabilização da membrana com o etanol 70% à 4°C.

As células na fase G0/G1 contêm duas cópias dos cromossomos, ou seja, apresentam ploidia típica ( $2n=2c$ ) de células que ainda não entraram em mitose. Já as células que entraram em processo de divisão celular e iniciaram a síntese de material genético na fase S, apresentam uma maior quantidade de DNA ( $>2c$ ) e, conseqüentemente, uma maior intensidade de marcação. As células que já tiveram seu material genético duplicado ( $4c$ ) e estão prestes a sofrer citocinese (fase G2/M), apresentam o dobro de fluorescência comparado à população G0/G1. Quando há fragmentação de DNA, característico de processos apoptóticos, há a presença da fase sub-G1 (KAJSTURA et al., 2007).

### **Avaliação da Apoptose**

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada para detectar a quantidade total de células em apoptose, conforme descrito por Van Oostveldt (1999).

A anexina V possui alta afinidade por fosfatidilserina, fosfolipídio translocado para a superfície externa da membrana celular nas fases iniciais de apoptose, permitindo, então, a ligação com a anexina V.

Durante o processo de apoptose, as células modificam a estrutura de suas membranas plasmáticas, o que sinaliza o início do processo de morte. A exposição da fosfatidilserina (PS) na superfície celular é uma das mudanças estruturais que ocorre, sendo reconhecida pelos fagócitos, que captam este sinal e fagocitam a célula. Anexina V é uma proteína de ligação para fosfolípidos e, na presença de íons de cálcio, ela exibe alta afinidade para ligação seletiva a PS. O fluorocromo utilizado está acoplado à anexina V, portanto evidencia as células que tem a PS exposta. O 7-AAD é composto químico fluorescente que tem alta afinidade pelo DNA, se intercalando nas regiões ricas em G-C. É impermeável quando a membrana plasmática está íntegra, ou seja, sua marcação evidencia o comprometimento da estrutura celular, fato que está associado com o estágio tardio de apoptose ou necrose (TELFORD et al., 2011).

### 5.1.2.2. Ensaio da SRB

Objetivou avaliar a atividade antiproliferativa da RH em modelo *in vitro* de cultura de células tumorais humanas, utilizando-se o ensaio da sulforrodamina B (SRB Sigma®) para avaliação do crescimento celular (SKEHAN et al., 1990).

Neste modelo, uma das formas de se inferir a porcentagem de crescimento celular é através da leitura espectrofotométrica da absorbância de proteínas celulares coradas com Sulforrodamina B (SRB), corante aniônico de coloração rosa brilhante. Esse corante é capaz de ligar-se às terminações básicas de aminoácidos proteicos de células vivas fixadas com ácido tricloroacético (TCA), sendo assim um ensaio independente do metabolismo celular e permitindo uma quantificação sensível de proteínas de modo linear com o número de células da cultura.

O ensaio de SRB é consideravelmente rápido, simples e apresenta sensibilidade comparável àquelas das metodologias fluorescentes e, superior aos ensaios que utilizam corantes visíveis, mesmo em baixas concentrações celulares (1000 a 2500 células por compartimento) (SKEHAN et al, 1990).

O objetivo principal do uso do controle com doxorrubicina, *in vitro*, é verificar se a linhagem empregada mantém o perfil de resposta ao quimioterápico. A doxorrubicina, mais do que um quimioterápico, em estudos como o SBR, verifica a capacidade de inibição de crescimento celular. É capaz de diminuir ou suspender o crescimento da célula tumoral, bloqueando a enzima isomerase 2, necessária para a divisão e crescimento celular ([www.cancerresearchuk.org](http://www.cancerresearchuk.org)). Entretanto, mais do que um padrão de comparação, o objetivo principal do uso desse controle, *in vitro*, é verificar se a linhagem empregada mantém o perfil de resposta ao quimioterápico, se houve desenvolvimento de quimioresistência, o que denotaria mutação da linhagem tumoral escolhida. Isto porque com as sucessivas passagens, no presente estudo foram utilizadas até no máximo 22, necessárias para a manutenção em cultura das células, existe a possibilidade de mutação da linhagem em cultivo, e essa mutação poderia ser detectada pela mudança de resposta frente à doxorrubicina.

### 5.1.2.3. Método de TBARS

Foi utilizado para a determinação da peroxidação lipídica nos tumores. 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 absorvância ideal a 535 nm na leitura com espectrofotômetro.

Alguns fatores podem alterar a absorvância 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 membrana com o reagente padrão TCA-TBA (tricloroacético e ácido tiobarbitúrico).

#### **5.1.2.4. Análises Himunohistoquímicas**

Em 1992 foi apresentado método computadorizado que permite a avaliação quantitativa de estruturas microscópicas (NOVELLI, 1992). Com este método, 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; MARTIEZ et al., 2002; PRIOLLI et al., 2003; STEPHANI et al., 2004; ROSSINGOL et al., 2004; PRIOLLI et al., 2007; SOUZA et al., 2008; MARTINEZ et al., 2008; PRIOLLI et al., 2010; MARTINEZ et al., 2010; PRIOLLI et al., 2013; PRIOLLI et al., 2016). Baseada na análise de imagem assistida por computador foram estudados a cicatrização das anastomoses intestinais (NOVELLI et al., 1997; PRIOLLI, 1999; PRIOLLI et al., 2003; STEPHANI 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 a sutura manual em anastomose colócica (MATOS et al., 1993), expressão de proteínas teciduais (PRIOLLI et al., 2010; MARTINEZ et al., 2010; PRIOLLI et al., 2013, MARTINEZ et al., 2012; PRIOLLI et al., 2016), entre outras pesquisas (IMLAY et al., 1998; ROSSINGOL et al., 2004; SOUZA et al., 2008; MARTINEZ et al., 2009; DE CAMPOS PESETO et al., 2016).

A análise de imagem assistida por computador permite quantificar de forma objetiva a expressão tecidual de diversas proteínas coradas por técnica de imunohistoquímica e desta forma, apresenta importância no diagnóstico, terapêutica e prognóstico 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\*, permitindo quantificar proteínas expressas nos tecidos, como a TP53, VASH, e ING2.

### **5.1.3 Fase 3 - Estudo da resposta terapêutica antitumoral da rutina hidrolisada *in vivo***

Utilização do modelo de adenocarcinoma de cólon em animal atímico

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 terapia individualizada é fortemente dependente da interpretação científica dos parâmetros clínicos relevantes. Assim, modelo animal que se assemelha ao comportamento tumoral em humanos é necessário para que possamos validar os resultados de terapias antineoplásicas, tal como o utilizado no presente estudo.

A introdução do camundongo atímico no início dos anos 60 (PANTELOURIS, 1968; RYGAARD & POLVSEN, 1969) foi seguida por grandes possibilidades em pesquisa com modelos de tumor implantável, sendo importante ferramenta biomédica.

Atualmente o camundongo atímico é o animal mais utilizado para o estudo dos adenocarcinomas humanos. Sua preferência ocorre pelas suas características quase ideais, como permitir rápido crescimento tumoral, fácil manuseio e a habilidade dos animais em aceitarem as células de tumores humanos, de forma ortotópica ou heterotópica, conforme proposto nesta pesquisa.

Como desvantagem ao modelo atímico está a ausência de resposta imune completa do animal, que fica limitado ao sistema B e, portanto, gera limitação ao desenvolvimento da terapia imune, nova e interessante modalidade de tratamento antitumoral, assim como de tumores que apresentem resposta imune B mediada.

Uma questão importante quanto à escolha de camundongos é, para além da utilização de pequenas quantidades do composto teste, a presença da vesícula biliar.

---

\* NIS-Elements® for Windows

Os ratos, embora mais frequentemente utilizados em pesquisas com flavonoides, não têm este órgão, fundamental na passagem de compostos pela circulação enterohepática, e importante para a ativação de pró-drogas.

Os flavonoides podem ser metabolizados a pequenos compostos fenólicos, sendo estas reações metabólicas muitas vezes dependentes da presença da vesícula biliar e do ciclo enterohepático. Após a absorção, os flavonoides sofrem reações metabólicas de fase I e II. As enzimas da família do citocromo P450 são as mais importantes da fase I. Na fase I das reações metabólicas, um grupo funcional, por exemplo OH, é acrescentado à molécula ou o grupo funcional da molécula é exposto através de reações de biotransformação (YAN & CALDWELL, 2001). Já nas reações da fase II ocorrem reações de conjugação, no intestino e no fígado, entre elas a glicuronização, a sulfatação e a metilação, as quais originam os principais metabólitos encontrados no sangue, após administração oral dos flavonoides. Nessas reações, um produto endógeno, como ácido glicurônico, sulfato ou glutathione, é transferido ao grupo funcional formado na fase I do metabolismo. Em alguns casos, a conjugação ocorre diretamente no substrato não modificado.

Mais estudos seriam necessários para que se soubesse efetivamente o grau de influência destes fatores na metabolização dos flavonoides.

## **5.2**

### **Quanto aos Resultados**

#### **5.2.1 Fase 1- Utilização da Rutina hidrolisada, vantagens e justificativa**

A quimioterapia é um dos métodos mais empregados para o tratamento do câncer, consistindo na utilização de compostos químicos, denominados quimioterápicos. Quando aplicada ao câncer, a quimioterapia é chamada de quimioterapia antineoplásica ou quimioterapia antitumoral.

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 compostos nutrifarmacêuticos, tal como a RH, com potencial ação antitumoral, ação sobre a reversão de resistência aos quimioterápicos e baixa toxicidade

em células normais continua despertando grande interesse.

A natureza da glicosilação do flavonoide influencia tanto sua ação biológica quanto sua absorção pelo organismo. As formas agliconas dos flavonoides podem ser absorvidas diretamente a partir do intestino delgado (HEIM et al., 2002), enquanto as formas glicosídicas requerem hidrólise preliminar por enzimas intestinais ou pela microflora do cólon (SCALBERT & WILLIAMNSON, 2000). Embora o metabolismo intestinal propicie a retirada das frações glicosídicas dos derivados da quercetina (ORFALLI et al., 2016), relatos bibliográficos mostram que a Q3G utilizada por via oral é melhor absorvida em relação à rutina e à quercetina, sendo por isso um composto de interesse para aplicação medicinal e alimentícia (REINBOTH et al. 2010; WANG et al., 2011; ORFALLI et al., 2016). Desta forma, a conversão da rutina em Q3G é uma estratégia importante para aumentar a sua biodisponibilidade (OLTHOF et al., 2000), o que também justifica o estudo.

Outra potencial vantagem da utilização da RH é o fato do pico de concentração plasmática da Q3G ocorrer  $37 \pm 12$  minutos após sua ingestão, com meia-vida plasmática de  $18,5 \pm 0,8$  h (OLTHOF et al., 2000). O pico da RH longo é bastante interessante do ponto de vista de sua utilização na prática clínica, já que traz o conforto desejado à via de administração oral, em dose única diária, tal como proposto no presente estudo, onde a gavagem foi executada a cada 24 horas. Estudos de biodisponibilidade e biodistribuição estão sendo executados pelo grupo, no sentido de estabelecer se este intervalo, para a RH, é distinto ou semelhante ao da Q3G pura, próximo às 24 horas, o que seria ideal.

### **5.2.2 Fase 2- Ação da rutina hidrolisada *in vitro***

A atividade antiproliferativa da RH em células tumorais foi avaliada pelo ensaio da sulforrodamina B. Os resultados do ensaio demonstraram inibição da proliferação de células tumorais de adenocarcinoma de cólon em concentrações de cerca de 25 ug/mL, enquanto os flavonoides isolados, rutina e quercetina, não apresentaram efeito antiproliferativo, caracterizado pela concentração necessária maior que 250 ug/mL. Estes resultados corroboram os encontrados por YANG & LIU (2009) que estudaram os efeitos antiproliferativos do extrato de maçã e da Q3G em culturas de células de câncer de mama/MCF-7. A combinação do extrato de maçã com a Q3G reduziu os valores da concentração efetiva máxima em 2 e 4 vezes, respectivamente, quando comparados aos valores para o extrato de maçã e a Q3G utilizados de maneira isolada. Estes resultados sugerem possível efeito sinérgico entre os flavonoides mais efetivo que sua atividade

isolada.

A partir dos resultados encontrados no ensaio SBR, por meio da avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo, notou-se efeito bifásico, caracterizado por respostas distintas na proliferação celular em concentrações diferentes da RH. Em baixas concentrações houve aumento da proliferação tumoral, enquanto em concentrações mais altas houve inibição da proliferação tumoral. A RH em concentrações abaixo de 100 µg/mL leva a proliferação do adenocarcinoma de cólon/HT-29, enquanto em concentração de 250 µg/mL apresenta efeito antiproliferativo. Em acordo a estes resultados, no adenocarcinoma coloretal/Caco-2 foi demonstrado que concentração de 1 µmol/L de quercetina levou a diminuição de quebras no DNA, porém na concentração de 100 µmol/L houve aumento de dano oxidativo ao DNA. Os autores observaram que a quercetina em ambas as concentrações induziu a expressão da 8-oxiguanina DNA glicosilase (hOGG1), enzima envolvida no reparo do DNA (MIN, 2009). Estes resultados sugerem que a quercetina em células Caco-2, utilizada em baixas concentrações previne o dano e aumentam o reparo do DNA, enquanto em doses altas tem efeito pró-oxidante e citotóxico (THANGASAMY et al., 2007; THANGASAMY et al., 2008). O efeito bifásico já foi descrito para outros flavonoides na literatura (VAN DER WOUDE et al, 2003, VAN ERK et al., 2005; MIN, 2009; GONCALVES et al., 2011), mas foi aqui demonstrado pela primeira vez, para a RH, do máximo de nosso conhecimento.

Em contraste, Leung e colaboradores, relataram que a indução da apoptose de células CH-27 (carcinoma de pulmão) pela luteolina foi acompanhada pela ativação de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e a catalase, e não pela produção de espécies reativas de oxigênio ou alteração do potencial da membrana mitocondrial (LEUNG et al., 2006). Assim, os efeitos antiproliferativos da luteolina em células tumorais parecem resultar de sua atividade antioxidante, e não pró-oxidante, discordando dos resultados anteriores e, em acordo com Lambert & Elias, que relataram que a atividade pró-oxidante das catequinas é responsável pela indução da apoptose em células tumorais, e também é capaz de induzir sistemas antioxidantes endógenos em tecidos normais, oferecendo proteção contra danos carcinogênicos (LAMBERT & ELIAS, 2010).

Este fenômeno, detectável pela citometria de fluxo, não foi encontrado no presente estudo, ou seja, não houve efeito indutor de apoptose da RH sobre as células HT-29, discordando de trabalhos apresentados na literatura para outros flavonoides.

Pesquisa demonstrou o efeito antiproliferativo de diversos flavonoides, entre eles a quercetina, relacionando tais efeitos com a capacidade inibitória da ácido graxo sintetase (FAS), enzima responsável pela síntese de ácidos graxos de cadeia longa. Esta enzima se apresenta em níveis muito elevados, em relação a células normais, em diversos tumores, como próstata, mama, ovário, endométrio, cólon e pulmão. Os autores relataram que após 5 horas de exposição à quercetina em baixa concentração (6  $\mu$ M), a síntese lipídica em células de tumor de próstata/LNCaP e de tumor de mama/MDA-MB 231 foi marcadamente reduzida. Concentrações maiores causaram maiores níveis de inibição, de forma dose-dependente. Como consequência da ação da quercetina, as células tumorais apresentaram alterações na estrutura da membrana, como perda de adesão e formação de extrusões celulares, inibição da proliferação e indução da apoptose via expressão de caspases. Além disso, estudos em fibroblastos normais mostraram que a quercetina não afetou a proliferação ou a viabilidade dessas células, indicando que a ação da quercetina na inibição da FAS é seletiva para células tumorais e que a presença de dupla ligação na posição C2-C3, um grupo funcional 4-cetona e grupos OH nas posições 5, 7, 3' e 4', favorecem a inibição da lipogênese por flavonoides (BRUSSELMANS et al., 2005).

Os efeitos da quercetina nos mecanismos moleculares implicados na geração de cascatas apoptóticas em células de carcinoma cervical/HeLa também foram estudados e mostraram que a quercetina induziu a morte celular através de mecanismo dependente de receptores de estrógeno  $\alpha$ , envolvendo a ativação da caspase-3 e da quinase p38 (GALLUZZO et al., 2009). Da mesma forma, foi demonstrado efeito apoptótico da quercetina em células HT29 através da via de sinalização AMPK (KIM et al, em 2010) com elevação da atividade de caspase-3, perda de MMP e elevação na população de células apoptóticas em resposta a quercetina em células de câncer colorretal/DLD-1 em tempo e dose dependente (LINSALATA et al., 2010).

Para avaliação da atividade antiproliferativa da rutina em células B de hibridoma murino, *in vivo*, houve aumento da apoptose em até cinco vezes, ao mesmo tempo reduzindo a proliferação celular e ainda induzindo a necrose do tecido tumoral (ROSEGHINI et al., 2009).

As diferenças encontradas na literatura podem estar relacionadas a diversos fatores, entre eles, a avaliação de flavonoides distintos, já que foram avaliados na literatura, os efeitos da quercetina e rutina e não da RH ou da Q3G e, a possibilidade do efeito da RH

estar relacionado a produção de metabólitos dependentes de sua transformação *in vivo*, o que só poderá ser solucionado com os estudos de biodisponibilidade.

### **5.2.3 Fase 3- Resposta terapêutica da Rutina hidrolisada *in vivo***

O modelo de inoculação subcutânea pôde ser facilmente criado e é conveniente para a observação do tumor, em acordo a literatura (RYGAARD & POLVSEN, 1969), e revelou 100% de sucesso de desenvolvimento tumoral, reproduzindo as taxas descritas na literatura (PRIOLLI et al., 2011; PRIOLLI et al., 2014). Também forneceu as informações pretendidas sobre a resposta do tumor aos biocompostos testados. A área com a massa tumoral mostrou vascularização abundante, a mobilidade da pele permitiu grande expansão do tumor, sem incômodo local ao bem estar animal. Tumores implantados no subcutâneo produziram massas sólidas que foram facilmente visíveis, permitindo a sua fácil aferição, o que adiciona vantagem a este modelo, pois diminui o viés de apreciação do crescimento tumoral, muitas vezes limitado em modelos ortotópicos. Da mesma forma, ficou facilitada sua extirpação.

O transplante de tumores malignos em camundongos foi amplamente utilizado em muitos tipos de pesquisa em câncer, porque o animal mantém as características originais do tumor, tais como cariótipo, expressão de oncogenes, estrutura molecular, evolução clonal (RYGAARD et al., 1990). Especificamente para este estudo, o comportamento quanto às características histológicas foram mantidas, em acordo a descrição da linhagem parental de origem, que mostra histologia indiferenciada.

Os adenocarcinomas colorretais são classificados como moderadamente diferenciados em 70% dos casos, bem diferenciados em 10% e pouco diferenciados em 20% dos casos (FLEMING et al., 2012). O adenocarcinoma convencional é caracterizado por formação glandular que é a base para a gradação histológica dos tumores. Em tumores bem diferenciados, mais de 95% do tumor forma glândulas. Os tumores moderadamente diferenciados apresentam entre 50 e 90% de formação de glândulas. Os tumores pouco diferenciados são mormente sólidos com menos de 50% de formação glandular. No presente estudo, à microscopia convencional, foi observado adenocarcinoma indiferenciado, notando-se traves de fibrose separando as células tumorais de padrão desmoplásico em “ninhos”. Apesar de controverso, a gradação histológica tumoral é, de forma geral, considerada como variável estágio independente de prognóstico, e tumor de alto grau ou indiferenciado está tradicionalmente associado a pior taxa de sobrevida e

menor resposta aos tratamentos quimioterápicos convencionais (BLENKINSOPP et al., 1981; JASS et al., 1986). Desta forma, o estudo experimental em tumores com estas características têm importância crucial, tal como proposto no presente estudo, onde a descoberta de novas terapias antitumorais adjuvantes são preementes.

Já a presença de anel de sinete é rara no reto e cólon, representando menos de 1% de todos os adenocarcinomas colorretais. Os carcinomas que apresentam células em anel de sinete são definidos pela presença de mais de 50% das células tumorais com vacúolos de mucina proeminentes que empurram o núcleo para a periferia. Estas células podem apresentar crescimento infiltrativo. Por definição, trata de células pouco diferenciadas e são de pior prognósticos do que os carcinomas convencionais (KANG et al., 2005; CHEN et al., 2010; MAKINO et al., 2006). Pode ser observado, no presente estudo, agrupamentos de células tumorais de médio a grande tamanho, citoplasma acidófilo e amplo, núcleo de cromatina delicada e nucléolo evidente, com frequentes figuras de mitose, incluindo formas atípicas, além das células em anel de sinete. Desta forma, ao serem mantidas as características das células parentais do doador do carcinoma de cólon/HT-29, e utilizando-se de tipo histológico, embora menos comum na população, mais agressivo, pode-se demonstrar a eficácia do biocomposto testado, sugerindo alta toxicidade da RH às células tumorais.

Um dos critérios de toxicidade dos biocompostos avaliado no presente estudo, a pesagem diária, teve também como objetivo o acompanhamento de critérios de conforto e bem estar animal, mais ainda, objetivou avaliar a capacidade da RH em prevenir 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 da expectativa de vida dos pacientes (EKAMBARAM et al., 2008; CAMARGO et al., 2011). Pesquisas têm demonstrado que citocinas próinflamatórias 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 a melhoria na qualidade de vida e no prognóstico do paciente, aliada à sua capacidade de inibição do crescimento tumoral.

Ao longo do tempo, observou-se aumento de peso nos animais que receberam a Q3G e Rutina de forma terapêutica, denotando efeito protetor sistêmico, além do efeito antitumoral da Q3G, corroborando estudos da literatura quanto à prevenção da perda de peso em portadores de neoplasias e uso de quercetina (CAMARGO et al., 2011). Entretanto, não coincidem com os resultados encontrados para a RH, quer em sua administração terapêutica, quer na administração profilática, onde ocorreu perda significativa de peso ao longo do tempo. Estes resultados sugerem a incapacidade da RH em evitar a manutenção da produção de citocinas liberadas pelo tumor, com progressão inflamatória e consequente evolução da caquexia. Pode, de outra forma, estar evidenciando o efeito citotóxico do biocomposto, que entretanto, dentro da perspectiva de agente antitumoral, é aceitável.

O modelo animal de adenocarcinoma de cólon humano permitiu estudar a curva de crescimento tumoral, e portanto, a ação antitumoral da RH tanto em administração profilática como terapêutica. Notou-se, caracteristicamente, o crescimento sigmoidal do tumor de cólon implantado no grupo controle. O crescimento tumoral de forma geral não ocorre de maneira linear, portanto, a taxa de crescimento foi determinada, no presente estudo, por meio de curva de regressão polinomial. Esta avaliação é importante nos modelos de xenoinxerto onde a inoculação das células, em meio de cultura, levam a formação inicial de pápula local que regride com o passar do tempo, pela total absorção do meio e possível morte de parte das células tumorais, antes que o clone de células neoplásicas cresça de modo a gerar o tumor. 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. Fato 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 e consequentemente diminuição do tumor, seguida de novo crescimento, o que também pode ser outro fator contribuinte da curva em forma polinomial.

Experimentos em ratos e em culturas de células relataram o potencial da rutina e da quercetina na inibição da neoplasia colônica (DESCHENER et al, 1991; PEREIRA et al., 1996; LIPKIN, 1999; YANG et al, 2000). Em modelos experimentais de ratos com tumores de cólon induzidos por azoximetano houve redução na proliferação celular nos grupos experimentais tratados com dietas enriquecidas em 2% de quercetina ou 4% de rutina. Além disso, a rutina e a quercetina foram capazes de inibir a fase S do ciclo celular e de reduzir

significativamente as áreas focais de displasia. A incidência de tumores de cólon nos animais tratados foi reduzida em cerca de 4 vezes com o tratamento com quercetina e em 2 vezes com o tratamento com rutina (DESCHENER et al, 1991). Ambos os flavonoides foram capazes de inibir a multiplicidade dos tumores, isto é, menor número de tumores por animal surgiu nos grupos tratados.

Concordando parcialmente com os resultados da literatura, no presente estudo, quando comparado ao grupo controle houve redução do crescimento tumoral com a utilização da Q3G e da rutina administradas de modo terapêutico, em contrapartida ao uso da RH na mesma forma de administração. De modo contrário, na administração profilática, apenas a RH determinou redução tumoral. Entretanto, embora o resultado do presente estudo esteja em concordância com a literatura, a administração terapêutica da rutina, tem que ser vista com cuidado. Mesmo capaz de reduzir de forma significativa o crescimento tumoral, a resposta ao tratamento com rutina não foi homogênea, fato demonstrado pela baixa adesão à curva de crescimento tumoral, o que pode diminuir a confiabilidade do resultado. Considerando este fato, haveria então, discordância à literatura. Isto poderia ser explicado pela utilização dos testes de análise de variância, utilizados de forma mais simples e corriqueira na literatura, onde são comparados os volumes médios finais dos tumores na busca do efeito da droga, em contraste a aplicação da regressão polinomial, aqui utilizada, a qual avalia o crescimento tumoral ao longo do tempo. Este tipo de análise parece mais fidedigno considerando que não é possível saber, ao longo do tempo entre inoculação das células e “pega tumoral”, quantas células deram início ao clone gerador do tumor, sem o uso da curva de regressão e, portanto, o volume real inicial do tumor estaria sendo desconsiderado, fato produtor de possível viés de análise.

Quanto à velocidade de crescimento tumoral, considerando como referência o crescimento do tumor sem interferência de qualquer intervenção, grupo controle, verifica-se que a RH administrada de forma profilática, assim como a rutina e Q3G administradas sob a forma terapêutica foram capazes de reduzir a velocidade de crescimento tumoral. Assim se confirma que, embora a resposta da rutina não seja homogênea em termos de crescimento tumoral, ocorre diminuição na velocidade do crescimento com esta terapêutica. Interessante notar que o comportamento do biocomposto, em relação a velocidade de crescimento tumoral relativa, está condicionada a sua forma de administração. A RH administrada de forma profilática teve importante diminuição na velocidade de crescimento do tumor, enquanto que o mesmo composto quando administrado de forma terapêutica,

passou a aumentar sua velocidade de crescimento. Da mesma forma, a Q3G administrada de forma profilática mostrou aumento na velocidade de crescimento do tumor, enquanto a Q3G administrada na forma de tratamento demonstrou diminuição na velocidade de crescimento tumoral, estando demonstrada a mesma relação para a rutina. Assim, para os flavonoides estudados, composto que apresenta atividade diminuindo a velocidade de crescimento do tumor quando administrado de forma profilática, passa a aumentá-la quando administrado de forma terapêutica, denotando aqui, possíveis mecanismos distintos de ação em tempos de administração distintos.

#### **5.2.4 Fase 4- Investigação preliminar sobre o mecanismo de ação da rutina hidrolisada sobre a peroxidação lipídica, proliferação celular mediada pela ING2, inibição da neoangiogênese (VASH) e apoptose mediada por TP53**

Como dito anteriormente, os flavonoides são reconhecidos como agentes quimiopreventivos e inibidores da progressão de tumores (HSU et al., 2004; WANG et al., 2005; ORFALLI et al., 2016). Entre as várias propriedades farmacológicas estão a atividade antioxidante (BOYLE et al., 2000) com alto potencial de neutralização de radicais  $\text{OH}^\cdot$  e  $\text{O}_2^\cdot$  (BOMBARDELLI & MORAZZONI, 1993; OMAH & MAZZA, 1996; METODIEWA et al., 1997) e inibição da peroxidação lipídica (NEGRÉ-SALVAYRE et al., 1991), além das atividades citoprotetora (POTAPOVICH & KISTYUK, 2003), vasoprotetora (IHME et al., 1996; LINDAHL & TAGESSON, 1997; TANG et al., 2011), antitrombótica (SHEU et al., 2004), cardioprotetora (ZIAEE et al., 2009) e antiproliferativa (SANTOS et al., 2011, KUNTZ et al., 1999) com suspensão do ciclo celular de linhagens tumorais e/ou a indução da apoptose por meio de sua atividade pró-oxidante (ARCHIVIO et al., 2007; PIERINI et al., 2008; LOA et al., 2009).

Diante dos efeitos antitumorais encontrados para a RH, parece interessante, investigar o mecanismo farmacológico pela qual este efeito ocorreu, ainda que de forma preliminar.

##### **5.2.4.1 Atividade anti/pró-oxidante da Rutina hidrolisada**

Há muito se reconhece que as células são naturalmente sensíveis à ação de diversos fatores danosos que podem interferir no seu metabolismo (NOVIKOFF et al., 1977). As espécies reativas de oxigênio (EROs), podem, por exemplo, danificar todos os

componentes celulares e ocorrem, em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, quando o  $O_2$  sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de  $H_2O$  formando intermediários reativos, como os radicais superóxido ( $O_2^-$ ), hidroperoxila ( $HO_2$ ) e hidroxila ( $OH^\cdot$ ), e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A produção excessiva de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  pode resultar em danos aos tecidos, o que muitas vezes envolve a  $OH^\cdot$  (HALLIWELL, 1991).

A atividade de neutralização de radicais atribuída aos flavonoides é capaz de afetar várias etapas da cascata de araquidonato via ciclo-oxigenase ou lipoxigenase (ABAD et al., 1995; ROBAK & GRYGLEWSKI, 1996). Além destes efeitos importantes, os flavonoides possuem propriedades de estabilização de membranas e também afetam alguns processos do metabolismo intermediário (BOMBARDELLI & MORAZZONI, 1993).

Os flavonoides inibem enzimas responsáveis pela produção de  $O_2^-$ , tais como a xantina oxidase (XO) e a proteína quinase C (HANASAKI et al., 1994). A XO é uma enzima envolvida no metabolismo de purinas, catalisando a oxidação da hipoxantina e da xantina em ácido úrico. Durante a reoxidação da XO, o  $O_2$  molecular age como acceptor de elétrons, produzindo radicais  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  (COS et al., 1998). Os radicais  $O_2^-$  promovem danos oxidativos em tecidos e estão, desta forma, envolvidos em vários processos patológicos como inflamação, aterosclerose, envelhecimento e câncer (PARAVICIN & TOUYZ, 2008). A membrana celular é a estrutura que, se atingida por estes radicais, resulta em peroxidação lipídica, processo que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade, comprometendo todo o metabolismo celular. Quando a peroxidação lipídica ocorre, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos com formação de produtos citotóxicos, como o malonaldeído (MDA) resultando em morte celular (FERREIRA et al., 1997). O MDA é um aldeído reativo de baixa estabilidade, amplamente utilizado como biomarcador na avaliação do estresse oxidativo (PILZ et al., 2000). Em organismos vivos, os radicais livres podem danificar o DNA, afetando assim a expressão gênica e levando a regulação gênica aberrante e sinalização anormal (ARUOMA, 2003).

O presente estudo, à semelhança de outros, avaliou o dano celular produzido pelo estresse oxidativo por meio da quantificação do MDA, produzido na peroxidação lipídica, pelo método do TBARS, entretanto, em discordância à literatura, não foi observada alteração na quantidade do MDA nos grupos estudados, quer sob administração profilática, quer terapêutica. Classicamente, o flavonóide é capaz de reagir com espécies reativas de

oxigênio (EROS) diminuindo o dano oxidativo ao DNA; a menor oxidação do DNA levaria a prevenção do processo tumorigênico (MUROTA E TERAQ, 2003), entretanto, aspecto observado para alguns flavonoides é sua dúbia característica nos processos redox. A depender de sua concentração pode atuar como antioxidante e também como pró-oxidante (VAN ERK et al., 2005; GONÇALVES et al., 2011), em acordo aos resultados encontrados para a RH quanto à avaliação antiproliferativa *in vitro*.

De forma não esperada, não houve ação dos flavonoides estudados na peroxidação lipídica tumoral. Estes resultados sugerem a não relevância da ação pró-oxidante no mecanismo de ação da RH *in vivo*. Ao se avaliar o grau de peroxidação lipídica pela quantificação de MDA, poderia se esperar, por parte do biocomposto, efeito pró-oxidante determinando elevação na produção de EROS que, em consequência, levaria a lesão da membrana por peroxidação lipídica, induziria a morte celular e, em última instância, levaria à redução da massa tumoral, entretanto este resultado não foi observado. O comportamento antioxidante/pró-oxidante dos flavonoides pode ser determinado por muitos fatores, como a concentração e a natureza dos íons de metais de transição presentes, a concentração dos compostos fenólicos e o pH (SIMIC et al., 2007), o que pode ter levado aos resultados divergentes aos encontrados na literatura.

#### **5.2.4.2 Ação da Rutina hidrolisada sobre a modificação de proteínas**

O estudo das bases moleculares e genéticas envolvidas no processo de carcinogênese encontra-se em expansão.

Entre os mecanismos propostos para os efeitos antiproliferativo e antitumoral exercidos pelos flavonoides estão aqueles envolvendo a modulação da expressão de genes, a modificação de enzimas que ativam ou detoxificam carcinógenos e aqueles relacionados à alteração de vias de sinalização celular (MOON et al., 2006; MARTÍN et al., 2010; ORFALI et al, 2016).

Diversos flavonóis promovem inibição do tipo competitiva, atuando como substratos para a isoforma CYP2C9 do sistema P450 (SI et al., 2009). Alguns flavonoides são capazes de inibir enzimas relacionadas à regulação celular, como topoisomerases, quinases dependentes de ciclinas e proteína quinases (BRUSSELMANS et al., 2005).

##### **5.2.4.2.1 ING2**

A pesquisa de ING2 neste estudo foi feita no sentido de prospectar possível mecanismo de inibição tumoral pela via antiproliferativa.

Como referido anteriormente, o fator de inibição de crescimento tipo 2 (Inhibitor of Growth 2 – ING2) é um gene localizado na posição q35 cromossomo 4 que está envolvido na regulação da ciclo celular, senescência, reparo de DNA e a apoptose e é um novo candidato a gene supressor de tumor (GARKAVTSEV et al., 1996; LARRIEU et al., 2009).

As proteínas da família ING contêm uma região homóloga e têm sido implicado na regulação da transcrição mediada por cromatina, uma vez que desempenha papel na sua remodelação (AASLAND et al., 1995), regulação da expressão do gene por ligação a um resíduo de histona H3K4 metilada e recrutamento de complexos de HDAC para a região (GOZANI et al., 2003).

Sua expressão encontra-se reduzida na grande maioria dos tumores humanos (YTHIER et al., 2008; LARRIEU et al., 2009; LARRIEU et al., 2010), especialmente nos cânceres de pulmão, hepatocelular e osteossarcoma (HAN ET AL., 2014; AL ZEYADI et al., 2015). Em experimentos, o aumento na expressão de ING2 leva à interrupção de crescimento na fase G1 do ciclo celular e à apoptose em várias tipos de células (NAGASHIMA et al, 2001; OKANO et al, 2006) que dependem em grande medida da ativação de TP53 (NAGASHIMA et al, 2001).

Contrariando a literatura envolvendo esta proteína, KUMAMOTO et al. (2009) demonstrou a presença de superexpressão de ING2 em diferentes linhagens de câncer de cólon, identificando, particularmente, sua associação à elevação dos níveis de NF- $\kappa$ B, o qual apresenta função antiapoptótica, favorecendo processos de invasão tumoral e metástases.

No presente estudo não se pode corroborar nenhum dos resultados encontrados em literatura já que ao se administrar rotina de forma profilática, houve aumento da imunoexpressão da ING2 que não foi seguida de modificação do volume tumoral quando comparado ao controle. Quanto a RH, esta não alterou a expressão de ING2, mesmo diante da regressão do volume tumoral, em sua utilização profilática.

Mais estudos para a verificação do exato papel da ING2, que permanece pouco conhecido no adenocarcinoma colorretal, são desta forma, necessários.

#### **5.2.4.2.2 Vasoinibinas (VASH) e quantificação vascular**

Os avanços na terapia antiangiogênica têm buscado o tratamento do câncer de forma sistêmica, além de contornar três clássicos problemas associados à quimioterapia convencional: resistência às drogas, toxicidade aos tecidos normais e acesso limitado dos quimioterápicos às células-alvo (HLATKY et al., 2002).

Para analisar o potencial antiangiogênico dos biocompostos foi avaliada a expressão da vasoinibina e a quantificação de vascularização no tecido tumoral. A adaptação da técnica de quantificação microvascular modificada (WEIDNER et al., 1991; VERMEULEN et al., 1996) e adaptada neste estudo, teve como objetivo a aferição mais precisa da vascularização tumoral, uma vez que se avalia o corte histológico por completo. Contudo, é fato que este método adaptado requer mais tempo, atenção e experiência por parte do examinador, principalmente para diferenciar o endotélio capilar do tecido fibroso presente em alguns tumores.

A elevação da expressão da VASH pode estar relacionada a maior feedback negativo à formação de neovasos, bloqueando o crescimento tumoral. Sendo as vasoinibinas peptídeos secretados pelo próprio endotélio vascular ativado que, estimulando a regressão vascular mediada por apoptose e inibindo a vasodilatação dependente de NO, apresentam efeito local na contrarregulação da angiogênese, pode-se inferir que tumores que expressam maior quantidade de VASH demonstram retardo em seu crescimento devido à inibição do processo de neovascularização.

Para os flavonoides RH, administrado de forma profilática e, Q3G, terapêutica, houve maior expressão de VASH, associada a inibição do crescimento tumoral quando comparados ao controle. Este resultado corrobora com o estudo de NAMVAR et al (2014) que demonstra o efeito antiangiogênico de derivados flavonoides extraídos de algas marinhas castanhas.

O grupo RH profilaxia demonstrou volume tumoral final menor com expressão da VASH maior em comparação ao controle, entretanto quanto à análise da quantificação microvascular, não houve diferença entre animais que receberam as drogas de forma profilática comparativamente ao grupo controle. Com base nestes dados, pode-se inferir que a administração profilática de RH apresenta efeito antitumoral relacionado, ao menos em parte, ao aumento da imunoexpressão de vasoinibina, porém sem afetar diretamente a contagem vascular ao final do período observado.

Considerando o crescimento neoplásico como fator “angiogênese-dependente” (FOLKMAN, 1971), pode-se inferir que o início do processo de neovascularização

acompanhe a ascensão da curva de crescimento tumoral, que ocorre por volta do 3º ao 4º dia. Comparativamente, percebe-se que o grupo RH apresenta retardo de 1 a 2 dias para o início da ascensão da curva de crescimento, demonstrando o papel deste biocomposto na inibição do desenvolvimento tumoral que se relaciona, dentre outros fatores, ao aumento da expressão de VASH e, possivelmente, a inibição da proliferação neovascular em fases iniciais da carcinogênese. O fato dessa ação antiangiogênica não interferir na contagem neovascular ao final da 1ª semana, quando foi avaliado microscopicamente o tumor, provavelmente se deve à administração profilática do composto, fazendo com que este não mantenha níveis séricos adequados para sustentar sua ação inibitória sobre a proliferação neovascular ao longo de todo o período observado. Contudo, apesar deste efeito não ser sustentado, existe nítida redução do volume tumoral final do grupo RH em relação ao controle, sugerindo que a inibição da neoangiogênese em fases mais precoces tem impacto no desenvolvimento final do tumor. Para além desta hipótese entretanto, e melhor apoiada na literatura, sabe-se que as vaso-inibinas apresentam como função, antagonizar os efeitos vasodilatadores do óxido nítrico (NO) no endotélio vascular. Como demonstrado por alguns estudos, o processo de carcinogênese colorretal é dependente da liberação de fatores vasodilatadores pelos tecidos colônicos, tais como a enzima ciclo-oxigenase-2 e seus produtos, apresentando papel inclusive no desenvolvimento de metástases (FENWICK et al., 2003; RAO, 2004; WU et al., 2004; GARCÍA et al., 2008). Tais evidências permitem inferir que o uso da RH profilática levaria a restrição do aporte sanguíneo às células neoplásicas por inibição da vasodilatação. A superexpressão de VASH, resultante da administração dos biocompostos seria capaz de limitar a proliferação e o crescimento tumoral, sem apresentar, necessariamente, impacto sobre o número de vasos durante o crescimento tumoral. Estudos relacionados à produção de NO são oportunos no sentido de confirmar tal hipótese.

De outra forma, a Q3G terapêutica, levou a redução do volume tumoral em relação ao controle, associada a menor número de microvasos no tumor. Desta forma, pode-se dizer que a administração terapêutica de Q3G é capaz de inibir o crescimento tumoral e este efeito se deve, ao menos em parte, à inibição da proliferação neovascular por meio da maior expressão de fatores antiangiogênicos pelas células endoteliais adjacentes. A literatura aponta para a ação antitumoral de derivados flavonoides relacionado a seu efeito antineovascular em modelos de câncer de ovário, concordando com os resultados aqui apresentados (LUO et al., 2008).

Portanto, os derivados flavonoides RH e Q3G demonstraram potencial antiangiogênico no adenocarcinoma de cólon humano/HT-29 por meio da maior expressão de vasoinibina quando administrados de forma profilática e terapêutica, respectivamente, sendo que a administração de Q3G levou à inibição da proliferação neovascular de forma associada. Em acordo com a literatura é válido ressaltar que, além da eficácia antitumoral, a terapia antiangiogênica baseada no uso de derivados naturais apresenta como benefício adicional a menor incidência de complicações em comparação à terapia anti-VEGF convencional (WHEN et al., 2008).

#### **5.2.4.2.3 TP53**

Embora no estudo *in vitro* não se tenha observado diferença na indução da apoptose, a análise *in vivo* não foi descartada, já que a metabolização de biocompostos administrado via oral podem apresentar ações distintas às encontradas *in vitro*, relacionadas ao metabolismo, conforme descrito anteriormente.

Um dos mecanismos reguladores do crescimento e desenvolvimento tumoral é a apoptose, morte celular programada, que provoca a morte em detrimento da possibilidade da célula tornar-se alterada, o que poderia gerar o câncer (ZHOU E ELLEDGE, 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. Mas, em caso de ausência de possibilidade de reparação do dano, a célula é induzida a apoptose. Quando o gene *TP53* sofre mutações, a célula com mutação poderá iniciar um clone maligno (RIBEIRO E SAFATLE-RIBEIRO, 2006).

Autores propuseram como mecanismos a ação de quercetina o efeito pró-apoptótico direto em células tumorais, o bloqueio do crescimento do tumor através da regulação do ciclo celular pela interação com os locais de ligação do estrógeno tipo II, diminuição da resistência às drogas e indução da apoptose de células tumorais (YOSHIDA et al., 1990; XIAO et al., 1998; YANG et al., 2001).

Em modelo experimental *in vivo* foi verificado que os animais que receberam dietas suplementadas com quercetina ou rutina exibiram aumento nas taxas de apoptose em células tumorais (YANG et al., 2000), corroborando os dados do presente estudo onde todos os flavonoides testados, nos diferentes tempos de administração, demonstraram redução na expressão da TP53 mutada.

Embora a redução da imunexpressão de TP53 mutada estivesse presente em todas as formas de administração de todos os biocompostos em acordo à literatura (YOSHIDA et al., 1990; XIAO et al., 1998; YANG et al., 2000; YANG et al., 2001; BRUSSELMANS et al., 2005; GALLUZZO et al., 2009; ROSEGHINI et al., 2009; LAMBERT & ELIAS, 2010; KIM et al., 2010; LINSALATA et al., 2010), apenas se pode considerar a redução do tumor na administração de Rh profilática e de Q3G terapêutica, tendo em vista o resultado pouco homogêneo da rotina terapêutica, como já explanado anteriormente, quanto à resposta terapêutica.

Desta forma, a ação da RH não parece ocorrer exclusivamente pela ativação da via de morte celular modulada pela TP53, se assim o fosse, todos os grupos apresentariam redução do volume tumoral.

Em contrapartida em ambos os grupos, RH profilaxia e Q3G terapia, houve aumento da expressão da vasoinibina. Estes resultados sugerem que, além da modificação na expressão da TP53, a ação antiangiogênica mediada pela vasoinibina seja fundamental no mecanismo de ação antitumoral da RH.

Desta forma, pode-se concluir que a RH apresenta ação multifuncional no tratamento do adenocarcinoma de colon humano/ HT-29, tal como aumento de expressão da vasoinibina e na modulação da TP53.

## **6. CONCLUSÃO**

Em acordo ao delineamento deste estudo é possível afirmar que a Rutina hidrolisada:

- apresenta ação na profilaxia do adenocarcinoma de colon;
- tem seu mecanismo de ação antitumoral relacionado à diminuição modulação da TP53 e ao aumento da expressão da vasoinibina.

## REFERÊNCIAS

- AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **World cancer report**. Lyon, France: IARC, 2008. <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014> Acesso em 28 de maio de 2016
- AASLAND, R., GIBSON T.J., STEWART A.F. The PHD finger: implications for chromatin mediated transcriptional regulation. **Trends Biochem Sci.**, v. 20, p. 56-59, 1995
- AHERNE, A.S., O'BRIEN, N.M. Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. **Nutrition**, v.18, p. 75-81, 2002.
- 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.**, v. 10, n.4, p. 344–351, 2008.
- AL YANG K., LAMPRECHT S.A., LIU Y., SHINOZAKI H., FAN K., LEUNG D., NEWMARK H., STEELE V.E., KELLOFF G.J., LIPKIN M. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. **Carcinogenesis**, v. 21, n.9, p.1655-1660, 2000
- AMADO, N.G., FONSECA, B.F., CERQUEIRA, D.M., NETO, V.M., ABREU, J.G. Flavonoids: Potential WNT/beta-catenin signaling modulators in cancer. **life Sciences**. n. 89, p. 545–554, 2011.
- AMADO, N.G., PREDES, D., FONSECA, B.F., CERQUEIRA, D.M., REIS, A.H., DUDENHOEFFER, A.C., ABREU, J.G. Isoquercitrin suppresses colon cancer cell growth in vitro by targeting the WNT/beta-catenin signaling pathway. **J Biol Chem.**, 2014.
- AMES, B., SHIGENAGA, M., HAGEN, T. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.7915–7922, 1993.
- ARAKAWA, H. P53, Apoptosis and Axon-Guidance Molecules. **Cell Death Differ.**, v.12, n.8, p. 1057–1065.
- ARCHIVIO, M.D., FILSEI, C., BENEDETTO, R.D., GARGIULO, R., GIOVANNINI, C., MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali del Istituto Superiore di Sanità**, v.43, n.4 p. 348-361, 2007.
- ARNOLD, E., RIVERA, J. C., THEBAULT, S., MORENO-PÁRAMO, D., QUIROZ-MERCADO, H., QUINTANAR-STÉPHANO, A., BINART, N., ESCALERA, G. M. DE LA, CLAPP, C. High levels of serum prolactin protect against diabetic retinopathy by increasing ocular vasoinhibins. **Diabetes Journal**, v. 59, p. 3192-3197, 2010
- 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. **British Journal of Nutrition**, v. 91, n.6 p. 841-847, 2004
- MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali del Istituto Superiore di Sanità**. v 43, p.4348-4361, 2007
- ARUOMA, O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in food plants. **Mutat. Res.**, v 9, p. 523-524, 2003
- 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.** v48, n.4, p.1117-1122, 2010.

- BATTACHARYA, P.K., BARTON, J. K.. Influence of intervening mismatches on long range guanine oxidation in DNA duplexes. **J. Am. Chem. Soc.**, v123. p. 8649-8656, 2001.
- BILBAO, M. L. M., ANDRES-LACUEVA, C., JAUREGUI, O., LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Determination of flavonoids in a citrus fruit extract by LC-DAD and LC-MS. **Food Chem.**, v101, p. 1742-1747, 2007
- BIRT, D.F., HENDRICH, S., WANG. W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacol. Ther.**, v.90, p.157-77, 2001.
- BLENKINSOPP W.K., STEWART-BROWN S., BLESOVSKY L. Histopathology reporting in large bowel cancer. **J. Clin. Pathol**, v.34, p.509-513, 1981
- BOMAN B.M, HUANG M. Human Colon Cancer Stem Cells: A New Paradigm in Gastrointestinal Oncology. **J. Clin. Oncol**, v.26: n.28 p.228, 2008.
- BOMBARDELLI, E., MORAZZONI, P. The flavonoids: new perspectives in biological activities and therapeutics. **Chimica Oggi**, v.11, p. 25–28, 1993.
- BONNET D., DICK J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nat. Med.**, v.3 p.730-7, 1997.
- BOYLE S.P., DOBSON V.L., DUTHIE S.J., HINSELWOOD D.C., KYLE J.A., COLLINS A.R. Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant: a human supplementation study. **Eur. J. Clin. Nutr.** v.54, n.10:774-782, 2000
- BRAGANHOL, E., ZAMIN, L. L., CANEDO, A. D., HORN, F., TAMAJUSUKU, A. S., WINK, M. R., SALBEGO, C., BATTASTINI, A. M. Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. **Anticancer Drugs**, 17(6), p. 663-671, 2006
- INSTITUTO NACIONAL DE CANCER Brasil, Ministério da Saúde, Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>, consultado em 05/01/16.
- BRAND, L., MUNDING, J., POX, C. P., ZIEBARTH, W., REISER, M., HÜPPE, D., SCHMIEGEL, W., REINACHER-SCHICK, A., TANNAPFEL, A.  $\beta$ -catenin, Cox-2 and p53 immunostaining in colorectal adenomas to predict recurrence after endoscopic polypectomy. **Int. J. Colorectal Dis.**, v.28, p.1091-1098, 2013.
- BRIGHT-THOMAS, R., HARGEST, R., APC,  $\beta$ -Catenin and hTCF-4, an unholy trinity in the genesis of colorectal cancer. **Eur. J. Surg. Oncol.**, (EJSO). v.29, n.2, p.107–117, 2003
- BRUCE, A., JOHNSON A., LEWIS J. **Molecular Biology of the Cell** 5<sup>th</sup> edition, 2007
- BRUSSELMANS, K., VROLIX, R., VERHOEVEN, G., SWINNEN, J. V. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. **J. Biol. Chem.** v.280, n.7, p. 5636–5645, 2005.
- BUEGE J A. E AUST SD. Microsomal Lipid Peroxidation Methods in Enzymology. **Cancer Research UK**. v.52, p.302-310, 1978
- CAMARGO, C.A., DA SILVA, M.E., 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.**, v. 406, p. 638-42, 2011.
- CAO G., PRIOR R.L., CUTLER R.G., YU B.P. Effect of dietary restriction on serum antioxidant capacity in rats. **Arch. Gerontol. Geriatr.**, v.25, n. 3, p.245-253, 1997.
- CHAVES, M. M. F., USBERTI, R. Prediction of *Dimorphandra mollis* Benth. (—faveiroll) seed longevity. **Rev. Bras. Bot.**, v. 26, n.4, p. 557-564, 2003.

- CHANG, Q., ZUO, Z., CHOW, M. S. S., HO, W. K. K. Difference in absorption of the two structurally similar flavonoid glycosides, hyperoside and isoquercitrin in rats. **Eur J Pharm Biopharm.** v. 59, n. 3, p. 549-555, 2005.
- CHEN, T. J., JENG, J. Y., LIN, C. W., WU, C. Y., CHEN, Y. C. Quercetin inhibition of ROS et. al-dependent and independent apoptosis in rat glioma C6 cells. **Toxicology.** n. 223, p.113–126, 2006.
- CHEN, W.-S., LEE, Y.-J., YU, Y.-C., HSAIO, C.-H., YEN, J.-H., YU, S.-H., CHIU, S.-J. Enhancement of p53-mutant human colorectal cancer cells radiosensitivity by flavonoid fisetin. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** n. 77, p.5, 1527–35, 2010.
- CHEN JS, HSIEH PS, CHIANG JM, et al. Clinical outcome of signet ring cell carcinoma and mucinous adenocarcinoma of the colon. **Chang Gung Med J**,33:51-7. 14, 2010.
- CISTERNAS, J, JOSÉ RAUL, VARGA, JOSÉ, MONTE, OSMAR. **Fundamentos de Bioquímica Experimental.** Editora Atheneu, 2ª edição, p. 7-19, 1999.
- CLAPP, C. ARANDA, J., GONZÁLEZ, C., JEZIORSKI, M. C., ESCALERA, G. M. DE LA Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. **Trends Endocrinol. Metab.** p. 17, n. 8, 301-307, 2006
- CLAPP, C, THEBAULT, S, ARNOLD, E, GARCÍA, C, RIVERA, JC, DE LA ESCALERA, GM. Vasoinhibins: novel inhibitors of ocular angiogenesis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 295, n. 4, p. E772-E778, 2008
- CLEWELL, R. A, SUN, B., ADELEYE, Y., CARMICHAEL, P., EFREMENKO, A., MCMULLEN, P. D., ANDERSEN, M. E. Profiling Dose-Dependent Activation of p53-Mediated Signaling Pathways by Chemicals with Distinct Mechanisms of DNA Damage. **Toxicol. Sci.**, v.12, n1, p. 56–73, 2014
- COLLINS A.T., BERRY P.A., HYDE C. Prospective identification of prostate cancer stem cells. **Cancer. Res.**, v.65, p.10946-10951, 2005.
- COS, P., YING, L., CALOMME, M., HU, J. P., CIMANGA, K., VAN POEL, B. Structure activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p. 71-76, 1998
- CORNARD, J. P., BOUDET, A. C., MERLIN, J. C. Theoretical investigation of themolecular structure of the isoquercitrin molecule. **J. Mol. Struct.** v.508, n.1-3, p.37-49, 1999.
- CRUZ-SOTO, M. E., COSÍO, G., JEZIORSKI, M. C., VARGAS-BARROSO, V., AGUILAR, M. B., CÁRABEZ, A., BERGER, P., SAFTIG, P., THEBAULT, S., ESCALERA, G. M. DE LA, CLAPP, C. Cathepsin D is the primary protease for the generation of adenohipofyseal vasoinhibins: cleavage occurs within the prolactin secretory granules. **Endo. Soc. J.**, v. 150, n.2, 5446-5454, 2009
- DALERBA P., DYLLA S.J., PARK I.K. Phenotypic characterization of human colorrectal cancer stem cells. **Proc. Natl. Acad. USA**, v.104 p.10158-10163, 2007
- 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. **Bioch. Pharma.**, 65, p. 1199-1206, 2003
- DE ARAÚJO, M.E., MOREIRA FRANCO, Y.E., ALBERTO, T.G., SOBREIRO, M.A., CONRADO M.A., PRIOLLI DG, FRANKLAND SAWAYA AC, RUIZ AL, DE CARVALHO JE, DE OLIVEIRA CARVALHO P. Enzymatic de-glycosylation of rutin improves its antioxidant and antiproliferative activities. **Food chemistry.** v. 141, n.1. p 266-73, 2013.

DE CAMPOS PESETO D., CARMONA E.V., SILVA K.C., GUEDES F.R., HUMMEL FILHO F., MARTINEZ N.P., PEREIRA J.A., ROCHA T., PRIOLLI D.G. Effects of tretinoin on wound healing in aged skin. **Wound Repair Regen.**, v.24, n.2. p.411-417, 2016.

DESCHNER E.E., RUPERTO J., WONG G., NEWMARK H.L. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. **Carcinogenesis**.v.12, n.7. p.1193-1196, 1991

DEVITA, V. T., HELLMAN, S. AND ROSENBERG, S. A. **Cancer: Principles and Practice of Oncology**, 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore 2001

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. **Nutrition Research**, v. 24, n.10, p.851-874, 2004.

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.** v.56, n.9, p. 891-898, 2002.

FEARON, E.R., VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell.**, v. 61, n.5, p.759-67, 1990.

FENG, Z., HU, W., TERESKY, A. K., HERNANDO, E., CORDON-CARDO, C., LEVINE, A. J. DECLINING p53 function in the aging process: A possible mechanism for the increased tumor incidence in older populations. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v.104 p. 16633-16638, 2007.

FENWICK, S.W., TOOGOOD, G.J., LODGE, J.P., HULL M.A. The effect of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib on human colorectal cancer liver metastases. **Gastroenterology**. v. 125, n. 3, p.716-29, 2003

FERRALI, M., SIGNORINI, B., CACIOTTI, B., SUGHERINI, L., CICCOLI, L., GIACHETTI D, COMPORITI M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. **FEBS Letters**, v 416, p.123-129, 1997.

FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Assoc. Med. Bras.**, vol. 43, n.1, p. 61-68 1997

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. Pharm.**, v. 522, p. 108-115, 2005.

FLEMING, M., RAVULA, S., TATISHCHEV, S.F., WANG, H.L. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. **J. Gastrointest. Oncol.**,3(3):153-73, 2012

FOLKMAN, J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. **N. Engl. J. Med.**, v. 285, n. 21, p. 1182-1186, 1971

FRATTINI, M., BALESTRA, D., SUARDI, S., OGGIONNI, M., ALBERICI, P., RADICE, P., PIEROTTI, M. A. Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. **Clinical Cancer Research** : An Official Journal of the American Association for Cancer Research. v. 10 n.12, p. 4015–21, 2004

FRESCO, P., BORGES, F., MARQUES, M.P., DINIZ C. The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis. **Curr. Pharm. Des.** v16, n.1, p.114-34. 2010.

- GALLUZZO, P., MARTINI, C., BULZOMI, P., LEONE, S., BOLLI, A., PALLOTTINI, V., MARINO, M. Quercetin-induced apoptotic cascade in cancer cells: antioxidant versus estrogen receptor  $\alpha$ -dependent mechanisms. **Mol. Nutr. Food. Res.** v.53, n. 6, p. 699–708, 2009.
- GARCÍA, C., ARANDA J., ARNOLD, E. Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation **J. Clin. Invest.** v.118, n.6, p. 2291-2300, 2008
- GARKAVTSEV, I., KAZAROV, A., GUDKOV, A., & RIABOWOL, K. Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. **Nature Genetics**, v.14, n. 4, p. 415–420, 1996
- GEDIK, C.M., BOYLE, S.P., WOOD, S.G., VAUGHAN, N.J., COLLINS AR. Oxidative stress in humans: validation of biomarkers of DNA damage. **Carcinogenesis** v.23, n.9, p.1441-1446, 2002.
- GIBELLINI, L., PINTI, M., NASI, M., DE BIASI, S., ROAT, E., BERTONCELLI, L., COSSARIZZA, A. Interfering with ROS metabolism in cancer cells: the potential role of quercetin. **Cancers**, 2, p.1288-1311, 2010
- GLEI M, LATUNDE-DADA GO, KLINDER A, ET AL. Iron-overload induces oxidative DNA damage in the human colon carcinoma cell line HT29 clone 19A. **Mutat Res** v. 519, p.151-61, 2002.
- GOLD, P., FREEDMAN, S.O. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. **J. Exp. Med.** v. 122, p. 467-481, 1965.
- GONCALVES, A.P., VIDEIRA, A., MAXIMO, V., SOARES, P. Synergistic growth inhibition of cancer cells harboring the RET/PTC1 oncogene by staurosporine and rotenone involves enhanced cell death. **J. Biosci.** v. 36, n.4, p. 639-48, 2011
- GONZÁLEZ, C. PARRA, A., RAMÍREZ-PEREDO, J., GARCÍA, C., RIVERA, J. C., MACOTELA, Y., ARANDA, J., LEMINI, M., ARIAS, J., IBARGÜENGOITIA, F., ESCALERA, G. M. DE LA, CLAPP, C. Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia. **Laboratory Investigation.** v.87, p. 1009-1017, 2007
- 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.** v.19, p.1051–1064, 2008.
- GOZANI, O., KARUMAN, P., JONES, D.R., IVANOV, D., CHA, J., LUGOVSKOY, A.A., BAIRD, C.L., ZHU, H., FIE, S.J., LESSNICK, S.L., VILLASENOR, J., MEHROTRA, B. CHEN, J., RAO, V.R., BRUGGE, J.S., FERGUSON, C.G., PAYRASTRE, B., MYSZKA, DG, CANTLEY LC, WAGNER G, DIVECHA N, PRESTWICH GD, YUAN J. **Cell** The P.H.D. finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor, v. 11, n.11, p.99-111, 2003.
- 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.** v. 41, p. 492-499, 2001
- HAO, Q., CHO, W. C. Battle Against Cancer: An Everlasting Saga of p53. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, n. 12, p. 22109–22127. 2014
- HLATKY, L., HAHNFELDT, P., FOLKMAN, J. Clinical Application of Antiangiogenic Therapy: Microvessel Density, What It Does and Doesn't Tell Us. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 94, n. 12, p. 883-893, 2002

- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M.. The antioxidants of human extracellular fluids. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 280, n. 1, p.1-8, 1990
- HAMILTON, S. R., & AALTONEN, L. A. World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics. **IARC Press**, 2000
- HANAHAH, D., WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell.** v. 100, p. 57-70, 2000.
- HANASAKI, Y., OGAWA, S., FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free. Radic. Biol. Med.** v. 16, n.6, p. 845-850, 1994
- HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, A.R., BOBILYA, D.J. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J. Nutr. Biochem.** n.13, p.572-584, 2002.
- HERTIG, A.T. Angiogenesis in the Early Human Chorion and in the Primary Placenta of the Macque Monkey. **Contrib. Embryol.**, v. 25, p. 37, 1935,
- HERTOG, M.G., HOLLMAN, P.C., KATAN, M.B., KROMHOUT, D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. **Nutr. Cancer.** v. 20, n. 1, p. 21-9, 1993
- HIS, L.C., BACK, S.J., ELING, T.E. Lack of cyclooxygenase-2 activity in HT-29 human colorectal carcinoma cells. **Exp. Cell Res.**, 256(2): 563-570, 2000.
- HOLLMAN, P. C. H., KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food Chem. Toxicol.**, 37, p. 937-942, 1999.
- HOLLMAN, P.C.H., KATAN, M.B. Absorption, metabolism and health effects of dietaryflavonoids in man. **Biomed. Pharmacother.**v.51, p. 305-310, 1997.
- 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**, v. 212, p.53-60, 2004.
- IHME, N., KIESEWETTER, H., JUNG, F., HOFFMANN, K.H., BIRK A., MÜLLER, A., GRÜTZNER, K.I. LEG oedema protection from a buckwheat herb tea in patients with chronic venous insufficiency: a single-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Eur. J. Clin. Pharmacol.** v.50, n.6, p.44344-7, 1996.
- IZZO, A. A., DI CARLO, G., MASCOLO, N., CAPASSO, F., AUTORE, G. Antiulcer effectsof flavonoids: role of endogenous PAF. **Phytother Res.** v. 8, p. 179–181, 1994.
- IMLAY, J., CHIN, S. M., LINN, S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. **Science.** v. 240, p.640-2, 1998.
- SILVA, J. A. G. INCA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer**, 2015
- 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.** v. 287, p.G7-G17, 2004.
- JASS, J.R., ATKIN, W.S, CUZICK, J. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. **Histopathology.** v.10, p.437-459, 1986,
- KANG, H., O'CONNELL, J.B., MAGGARD, M.A. A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. **Dis. Colon. Rectum.** v.48, p.1161-1182, 2005

- KÄHKÖNEN, M. P., HOPIA, A. I., HEINONEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 49, n. 8, p. 4076-4082, 2001
- KAJSTURA, M., HALICKA, H.D., PRYJMA, J., DARZYNKIEWICZ, Z. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms. **Cytometry Psrt A** 71<sup>a</sup>: p. 125-131, 2007.
- 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.** v. 142, n.1, p. 87-93, 1993.
- KANG, Y.K., KO, Y., CHOI, A. Humanizing NOD/SCID/IL-2R $\gamma$ null (NSG) mice using busulfan and retro-orbital injection of umbilical cord blood-derived CD34+ cells **Blood research.** v.51, n.1, p.31-36. 2016
- KASAI, H., NISHIMURA, S.. Hydroxylation of the C-8 position of deoxyguanosine by reducing agents in the presence of oxygen. **Nucleic. Acids. Symp. Ser.** v. 12, p.165-167, 1983.
- KAWAI, S., TOMONO, Y., KATASE, E., OGAWA, K., YANO, M. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 63, n. 5, p. 896-899, 1999.
- 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. **Bio. Chem.** v. 387, n. 4, p.365-72, 2006.
- KEMPER K., GRANDELA, C., MEDEMA, J.P. Molecular identification of cancer stem cells. **Oncotarget**, v.1, n. 6, p.387-95, 2010.
- KEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BOKESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 82, n. 1, p. 1107-1118, 1990.
- KIM, G.N., KWON, Y.I., JANG, H.D. Protective mechanism of quercetin and rutin on 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride or Cu<sup>2+</sup>-induced oxidative stress in HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n.1, p. 138-144, 2011
- KIM, H.J., KIM, S.K., KIM, B. S., LEE, S.H., PARK, Y.S., PARK, B.K., JUNG, J.Y. Apoptotic effect of quercetin on HT-29 colon cancer cells via the AMPK signaling pathway. **J. Agric. Food. Chem.** v. 58, n. 15, 8643–8650, 2010
- 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.** v.145, p.148-56, 1994
- KNOWLES, L. M., ZIGROSSI, D. A., TAUBER, R. A., HIGHTOWER, C., MILNER, J. A. Flavonoids suppress androgen-independent human prostate tumor proliferation. **Nutrition and Cancer.** v. 38, n. 1, p. 116-122, 2000.
- KOSAKA, T., MIYAZAKI, Y., MIYAJIMA, A., MIKAMI, S., HAYASHI, Y., TANAKA, N., NAGATA, H., KIKUCHI, E., NAKAGAWA, K., OKADA, Y., SATO, Y., OYA, M. The prognostic significance of vasohibin-1 expression in patients with prostate cancer. **British Journal of Cancer.** v.108, p. 2123-2129, 2013
- KREFT, S., KNAPP, M., KREFT, I. Extraction of rutin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds and determination by capillary electrophoresis. **Journ. Agricult. Food Chem.** v. 47, n.11, p. 4649–52, 1999.
- 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.** v. 80, p.15-21, 2004.

- KUMAR, R. V., CHAUHAN, S. Mulberry: life enhancer. **J. Med. Plants Res.**, 2(10), p. 271-278, 2008.
- KUMAMOTO, K., FUJITA, K., KUROTANI, R., SAITO, M., UNOKI, M., HAGIWARA, N., HARRIS, C. C. ING2 is upregulated in colon cancer and increases invasion by enhanced MMP13 expression. **Int. J. Cancer**, v. 125, n. 6, p.1306–1315, 2009
- KUNTZ, S., WENZEL, U., DANIEL, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. **Euro. J. Nut.** v.38, p. 133-142, 1999.
- KWON, O., ECK, P., CHEN, S., CORPE, C. P., LEE, J. H., KRUHLAK, M., LEVINE, M. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. **The FASEB Journal**. v.21, p. 366-377, 2007.
- LA CASA, C., VILLEGAS, I., ALARCÓN DE LA LASTRA, C., MOTILVA, V., MARTÍNCALERO, M. J. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **J. Ethnopharmacol.**, v. 71, p. 45–53, 2000.
- 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.** v. 53, n. 1, p.248-55, 2007
- LAMBERT, J.D., ELIAS, R.J. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 501, n. 1, p. 65-72, 2010
- LARRIEU, D., YTHIER, D., BINET, R., BRAMBILLA, C., BRAMBILLA, E., SENGUPTA, S., & PEDEUX, R. ING2 controls the progression of DNA replication forks to maintain genome stability. **EMBO Reports**. v.10, n. 10, p. 1168–1174, 2009
- LARRIEU, D., YTHIER, D., BRAMBILLA, C., & PEDEUX, R. ING2 controls the G1 to S-phase transition by regulating p21 expression. **Cell Cycle**. v. 9, n.19, p 3984–3990, 2010
- LEUNG HWC, KUO CL, YANG, WH, LIN CH, LEE HZ Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. **European Journal of Pharmacology** v. 534, p.12-18, 2006.
- LEUNG, E. Y., CROZIER, J. E., TALWAR, D., O'REILLY, D. S., MCKEE, R. F., HORGAN, MCMILLAN, D. C. Vitamin antioxidants, lipid peroxidation, tumour stage, the systemic inflammatory response and survival in patients with colorectal cancer. **Int. J. Cancer**, v. 123, p. 2460–2464, 2008
- LI C., HEIDT, D.G., DALERBA, P. Identification of pancreatic cancer stem cell. **Cancer Re.** v. 67, p. 1030-1037, 2007.
- LI, Y., FANG, H., XU, W. Recent advance in the research of flavonoids as anticancer agents. **Mini. Rev. Med. Chem.** v. 7, n.7 p.663-78, 2007.
- LI, F., LAI, M. Colorectal cancer, one entity or three. **J of Zhejiang Univ. Science. B**, v.10, n. 3, 219–229. 2009
- 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.**, v. 43, n. 1, p.8-13, 2006
- LINDAHL, M., TAGESSON, C. Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. **Inflammation**. v. 21, p. 347–356, 1997.

- LINSALATA M, ORLANDO A, MESSA C, REFOLO MG, RUSSO F. **Anticancer Res.** - Quercetin inhibits human DLD-1 colon cancer cell growth and polyamine biosynthesis. v. 30, n 9, p.3501, 2010.
- LIPKIN M. Update of preclinical and human studies of calcium and colon cancer prevention. **World. J. Gastroenterol.** v. 5, n. 6, p.461-464. 1999
- LOA, J., CHOW, P., ZHANG, K. Studies of structure–activity relationship on plant polyphenol-induced suppression of human liver cancer cells. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v.63 p.1007–1016, 2009
- LUO H, JIANG BH, KING SM, CHEN YC. Inhibition of cell growth and VEGF expression in ovarian cancer cells by flavonoids. **Nutr. Cancer.**v.,60, n.6, p.800-809, 2008
- MA S, CHAN KW, HU L. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. **Gastroenterology** v. 132, p.2542-56, 2007.
- MAKINO T, TSUJINAKA T, MISHIMA H, ET AL. Primary signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum: report of eight cases and review of 154 Japanese cases. **Hepatogastroenterology**,v. 53, p 845-849, 2006
- MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., RÊMÉSY, C., JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 79, n.5, p. 727-747, 2004
- 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.** v.17, n.5, p. 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.** v. 35, n. 4, p. 235–243, 2008
- 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.** v. 8, p.129-135, 2012
- MARTÍN, M., SERRANO, A.B.G., RAMOS, S., PULIDO, M.I., BRAVO, L., GOYA, L Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative estresse-induced apoptosis in HepG2 cells. **J. Nutr. Biochemis.**, v. 21, p. 196-205, 2010.
- 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.** v. 101, p. 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.
- MAULUDIN, R., MÜLLER, R. H., KECK, C. M. Development of an oral rutin nanocrystal formulation. **Int. J. of Pharmac.**, 370(1-2), p. 202-209, 2009.
- MCCARTHY, D.O., WHITNEY P., HITT, A., AL-MAJID, S. Indomethacin and ibuprofen preserve gastrocnemius muscle mass in mice bearing the colon-26 adenocarcinoma. **Res. Nurs. Health.** v.27, n.3, p.174-84 2004

- MCGREGOR, D. Carcinogenicidade and genotoxic carcinogens. In: Ballantyne, B., T. Mars & T. Syversen, eds. **Gen. Applied Toxicol.** 2nd. edition. London, Macmillan Reference. p. 1099-1117, 2000.
- METODIEWA, D., KOCHMAN, A., KAROLCZAK, S. Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N,N-diethylaminoethyl ethers of flavanoneoximes: a comparison with natural polyphenolic flavonoid (rutin) action. **Biochem. Mol. Biol. Int.** n.41, p. 1067–1075, 1997.
- 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. **Toxicol. Clare.** v.206, p.337-348, 2005.
- MIHALACHE, A., ROGOVEANU, I. Angiogenesis Factors Involved in the Pathogenesis of Colorectal Cancer. **Cur. Health Scienc. J.** v. 40, n.1, p.5-11., 2014
- MIN, K., EBELER, S.E. Quercetin inhibits hydrogen peroxide-induced DNA damage and enhances DNA repair in Caco-2 cells. **Food Chem. Toxicol.** v. 47, n.1, p.2716-22, 2009
- MIYAZAKI, Y., KOSAKA, T., MIKAMI, S., KIKUCHI, E., TANAKA, N., MAEDA, T., ISHIDA, M., MIYAJIMA, A., NAKAGAWA, K., OKADA, Y., SATO, Y., OYA, M. The Prognostic Significance of Vasohibin-1 Expression in Patients with Upper Urinary Tract Urothelial Carcinoma. **Clin. Cancer Res.** v. 18, n. 15, 4145-4153, 2012
- MIZUMA, T., OHTA, K., HAYASHI, M., AWAZU S. Comparative study of active absorption by the intestine and disposition of anomers of sugar-conjugated compounds. **Biochem. Pharmacol.** v. 6, n.45, p. 1520-1523, 1993
- MONKS, A., SCUDIERO, D., SKEHAN, P., SHOEMAKER, R., PAULL, K., VISTICA, D., HOSE C, LANGLEY J, CRONISE P, VAIGRO-WOLFF A, GRAY-GOODRICH M, CAMPBELL H, MAYO J, BOYD M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 83, p 757-766, 1991
- MONTI, D., PISVEJCOVA, A., KREN, V., LAMA, M., RIVA, S. Generation of an  $\alpha$ -L-rhamnosidase library and its application for the selective derhamnosylation of natural products. **Biotechnol. Bioengin.** v.87, n.6, p. 763–71, 2004.
- MOON, Y.J., WANG, X., MORRIS, M.E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicol. In Vitro.** v. 20, p.187-210, 2006.
- MORAND, C., MANACH, C., CRESPIY, V., REMESY, C. Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. **Free Radical Research.** v. 33, n. 5, p. 667-676, 2000. Monti et al., 2004
- MOTOYAMA, K., KOYAMA, H., MORIWAKI, M., EMURA, K., OKUYAMA, S., SATO, E., INOUE, M., SHIOI, A., NISHIZAWA, Y. Atheroprotective and plaque-stabilizing effects of enzymatically modified isoquercitrin in atherogenic apoE-deficient mice. **Nutrition.** v. 25, n.4, p. 421-427, 2009.
- MOUSA, L., SALEM, M.E., MIKHAIL, S. Biomarkers of Angiogenesis in Colorectal Cancer. **Biomark. in Cancer,** v. 7, n. 1, p. 13-19, 2015
- MUROTA, K., SHIMIZU, S., CHUJO, H., MOON, J. H., & TERAJO, J. Efficiency of absorption and metabolic conversion of quercetin and its glucosides in human intestinal cell line Caco-2. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 384, n. 2, p. 391–397, 2000
- NAGASHIMA, M., SHISEKI, M, MIURA K, HAGIWARA K, LINKE SP, PEDEUX R, WANG XW, YOKOTA J, RIABOWOL K AND HARRIS CC: DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 98: p. 9671-9676, 2001

- NAMVAR, F., BAHARARA, J., MAHDI, A. A. Antioxidant and anticancer activities of selected persian gulf algae. *Indian J. Clin. Biochem.* v.29, n. 1, p.13-20, 2014
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. 2016. Compare methodology, disponível em [http://dtp.nci.nih.gov/docs/compare/compare\\_methodology.html](http://dtp.nci.nih.gov/docs/compare/compare_methodology.html), consultado em 12/01/16.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE, SURVEILLANCE, EPIDEMIOLOGY, AND END RESULTS PROGRAM. SEER Stat Fact Sheets: Colon and Rectum Cancer. National Cancer Institute. disponível em <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>. consultado: 27 de janeiro, 2016
- NEGRÉ-SALVAYRE, A., AFFANY, A., HARITON, C. R. Additional antilipoperoxidant activities of alpha-tocopherol and ascorbic acid on membrane-like systems are potentiated by rutin. *Pharmacology.* v.42, p. 262–272, 1991.
- 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  $\beta$ -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Euro. J. Nutr.* v. 42, p. 29-42, 2003.
- NIELSEN, I.L., CHEE, W.S., POULSEN, L., OFFORD-CAVIN, E., RASMUSSEN, S.E., FREDERIKSEN H, ENSLEN M, BARRON D, HORCAJADA MN, WILLIAMSON G. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. *J. Nutr.*, v.136, n.2, p.404-408, 2006
- NIJVELDT, R.J., VAN NOOD, E., VAN HOORN, D.E., BOELEN, P.G., VAN NORREN, K., VAN LEEUWEN, P.A., Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin Nutr.* v.74, p.418-425, 2001
- 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 colólicas em cães. *Rev. Assoc. Med. Bras.* v. 43, n. 4, p.277-282, 1997
- NOVIKOFF, ALEX B., HOLTZMAN, Eric. Células e estrutura celular. **Editora Interamericana**, p. 5-15, 1977
- OKANO, T., AKIHIKO, G., YOKO, H., YUKIO, H., MICHIIYA, N., YUTAKA, K., AKINOBU, Y., MASAHIKO, S., MAKOTO, N., CURTIS, C.H., SHOJI, K. Alterations in novel candidate tumor suppressor genes, ING1 and ING2 in human lung cancer. **oncol, reports**, v. 15: p. 545-549, 2006
- OLTHOF, M.R., HOLLMAN, P.C.H., VREE, T.B., KATAN, M.B. Bioavailabilities of Quercetin-3-Glucoside and Quercetin-4'-Glucoside Do Not Differ in Humans. *J. Nutr.*, v. 2, p. 1200-1203, 2000
- 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.* v.133, n.6, p.1806-181, 2003.
- OMAH, B. D., MAZZA, G. Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. *J. Agricult. Food Chemis.* v. 44, p. 1746–1750, 1996.
- ORFALLI, G., 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 isoquercitin. *World. J. Clin. Oncol.* v. 10, n.7, p.189-99, 2016.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the Testing of Chemicals**, OECD 425. Acute Oral Toxicity-Modified Up and Down Procedure. Org anisation for Economic disponivel em [oecd.org/ehs/test/testlist.htm](http://oecd.org/ehs/test/testlist.htm) acessado em 20 julho, 2016

PANTELOURIS, E.M. Absence of thymus in a mouse mutante. **Nature** v. 217, p.370-371, 1968.

PARAVICIN, T. M., TOUYZ, R. M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care**, v. 31, p. 171-180, 2008.

PEREIRA, M.A., GRUBBS, C.J., BARNES, L.H., LI, H., OLSON, G.R., ETO, I., JULIANA, M., WHITAKER, L.M., KELLOFF, G.J., STEELE, V.E., LUBET, R.A. Effects of the phytochemicals, curcumin and quercetin, upon azoxymethane-induced colon cancer and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, **Carcinogenesis** v.7, n.6, p.1305-11996

PÉREZ-GUERRERO, C., MARTÍN, M. J., MARHUENDA, E. Prevention by rutin of gastriclesions induced by e thanol in rats: role of prostaglandins. **Gen. Pharmacol.**, v. 25, p.575–580, 1994.

PHILLIPS, D. R., GREIF, P. C., AND BOSTON, R. C. DaunomycinDNA dissociation kinetics. **Mol. Pharmacol.** v.33, n. 8, p. 225 – 230, 1988

PINHO, M. S. L., ROSSI, B. M. Conceitos atuais sobre a carcinogênese colorretal. **Ver. Bras. Coloproct.**, v. 19, n.1, p. 57-60, 1999.

PINHO, M. S. L. Proteína p53: Algum Valor clínico ou apenas pesquisa? Uma revisão da Literatura. **Rev. Bras. Coloproct.** v. 20, n. 4, p. 258-260, 2000.

PIE, P., RINI, R. N., GEE, J.M., BELSHAW, N.J., JOHNSON, I.T. Flavonoids and intestinal cancers. **Br. J. Nutr.** v. 1, p. ES53-59, 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.** v.742, p. 315–325, 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.** v. 375, p.105-116, 1997.

POTAPOVICH, A. I., KOSTYUK, V. A. Comparative Study of Antioxidant Properties And Cytoprotective Activity of Flavonoids. **Biochemistry.** v. 68, n. 5, p. 514-519, 2003.

POWELL, S.M., ZILZ, N., BEAZER-BARCLAY, A.P.C. Mutations occur early during colorectal tumorigenesis. **Nature** v. 359, p.235-237, 1992.

PRINCE, M.E., SIVANANDAN, R., KACZOROWSKI, A. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cells carcinoma. Proc. **Natl. Acad.** v.104:973-8, 2007.

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., 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**, v. 27, p. 374-383, 2007.

PRIOLLI, DG, MARTINEZ, CAR , PIOVESAN, H, CARDINALLI, IA, MARGARIDO, NF , WAISBERG, J. Morphofunctional Malignancy Grading is a Valuable Prognostic Factor

- for Colorectal Cancer. **Arq. Gastr.** n.47 p.13-20, 2010.
- PRIOLLI, D.G., ABRANTES, A.M., NEVES, S., BATISTA JN, CARDINALLI IA, BOTELHO, M.F. A novel model of distal colon cancer in athymic mice. **Acta. Cir. Bras.** v. 27, n. , p. 355-360, 2011
- PRIOLLI, D. G., CANELLOI, T. P., LOPES, C. O., VALDÍVIA, J. C., MARTINEZ, N. P., AÇARI, D. P., CARDINALLI, I. A., RIBEIRO, M. L. Oxidative DNA damage and  $\beta$ -catenin expression in colorectal cancer evolution. **Int. J. Colorectal Dis.** v. 28, n.5, p.713-722, 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  $\beta$ -catenin tumor expressions from identical monoclonal cell tumor in the orthotopic model in athymic nude rats. **Scan. J. gastr.** v. 49, n. 3, p.309-316, 2014.
- PROCHÁZKOVÁ, D., BOUSOVÁ, I., WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, p. 513-523, 2011
- RAO, C.V. Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. **Mutat. Res.** v. 555, n. 1-2, p.107-119, 2004
- REINBOTH, M., WOLFFRAM, S., ABRAHAM, G., UNGEMACH, F.R., CERMAK R. Oral bioavailability of quercetin from different quercetin glycosides in dogs. **Br. J. Nutr.** n. 104, v. 2, p.198-203, 2010
- REN, W., QIAO, Z., WANG, H., ZHU, L., ZHANG L. Flavonoids: promising anticancer agents. **Med. Res. Ver.** v.23, n.4, p. 519-534, 2003.
- 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. **Ver. Bras. Coloproct.** v. 27, n.4, p.391-402, 2007
- RIBEIRO, M.L., PRIOLLI, D.G., MIRANDA, D.D.C., ARÇARI, D.P., PEDRAZZOLI, J.R. J, MARTINEZ, C.A.R. Analysis of Oxidative DNA Damage in Patients with Colorectal Cancer. **Clin. Colorectal Cancer** v. 7, n.4, p. 267-272, 2008.
- RIBEIRO, J., SAFATLE-RIBEIRO, A.. p53 in clinical contexts: yes or not? **Arq. Gastroenterol.** v. 43 n. 1, p. 6-7, 2006
- RICCI-VITIANI, L., PAGLIUCA, A., PALIO, E., ZEUNER, A., DE MARIA R. **Colon câncer etem cells.** v. 57, n. 4, p.538-548, 2008.
- ROBAK, J., GRYGLEWSKY, R. J. Bioactivity of flavonoids. **Polish. J. Pharmacol. Pharm.**, v. 48, p. 555–564, 1996.
- RODRIGUES, A. S., PÉREZ-GREGORIO, M. R., GARCÍA-FALCÓN, M. S., SIMALGÁNDARA, J., ALMEIDA, D. P. F. Effect of meteorological conditions on antioxidante flavonoids in Portuguese cultivars of white and red onions. **Food Chemistry**, v. 124, n.1, p. 303-308, 2011.
- ROGERIO, A.P., KANASHIRO, A., FONTANARI, C., DA SILVA, E.V.G., LUCISANO-VALIM, Y.M., SOARES, E.G., FACCIOLI, L.H. Anti-inflammatory Activity of Quercetin and Isoquercetrin in Experimental Murine Allergic Asthma. **Inflam. Research.**, v. 56, n. 10, p. 402-408, 2007
- ROSEGHINI, R., FALCÃO, G. M., OLIVEIRA COSTA, J. F., CLARÊNCIO, J., NASCIMENTO, I., VELOZO, E., SCHAEER, R., VALE, V., COSTA, S. L., COSTA, M. F. D., TARDY, M., MEYER, R., MENEZES FREIRE, S. The flavonoid rutin but not the

- alkaloid arborinine induces apoptosis in a B-cell hybridoma cell line. **Planta Medica**, v. 75, n. 5, p. 488-493, 2009.
- 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 Research**, v. 64, p. 985-993, 2004
- RÚA, K. A. P., & PEÑA, C. M. M. Bases moleculares del cáncer colorrectal. **IATREIA**, v. 25, n.2, p. 137-148, 2012
- RYGAARD J, POVLSEN CO. Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.** v.77, n.4, p. 758-760, 1969.
- SALEM, J.H., HUMEAU, C., CHEVALOT, I., HARSCOAT-SCHIAVO, C. Effect of donorchain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters. **Proc. Biochemistry**, v. 45, p. 382-389, 2010.
- SALIM, E. I., KANEKO, M., WANIBUCHI, H., MORIMURA, K., FUKUSHIMA, S. LACK OF carcinogenicity of enzymatically modified isoquercitrin in F344/DuCrj rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 12, p. 1949-1969, 2004
- SANTOS, B. L., SILVA, A R., PITANGA, B. P. S., SOUSA, C. S., GRANGEIRO, M. S., FRAGOMENI, B. O.COSTA, S. L. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 404-11, 2011
- SANTOS, G E O Cálculo amostral: calculadora on-line. Disponível em: <<http://www.calculoamostral.vai.la>>. Acesso em: [02/07/2016].
- SCALBERT, A., WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J. Nutr.**, v. 130, p. 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.**, 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**, v. 24, p. 353-362, 2003.
- SEYOUM, A., ASRES, K., EL-FIKY, F.K. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 67, n. 18, p.2058-2070, 2006.
- SHAW, P., BOVEY, R., TARDY, S., SAHLI, R., SORDAT, B., & COSTA, J. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 89, n.10, p. 4495-4499, 1992
- SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BOKESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Nation. Cancer. Instit.**, v. 82, p. 1107-1118, 1990.
- SHEU, J. R., HSIAO, G., CHOU, P. H., SHEN, M. Y., CHOU, D. S. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of rutin, a glycoside of the flavonol quercetin, in human platelets. **J. Agricult. Food Chem.**, v.52, n14, p. 4414-4418, 2004.
- SHIMADA, C., KANO, K., SASAKI, Y.F., SATO, I., TSUDUA, S. Differential colon DNA damage induced by azo food additives between rats and mice. **J. Toxicol. Sci.**, v. 35, n. 4, p.547-54, 2010.
- SHOEMAKER, R.H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nat. Rev. Cancer** v.6, p. 813-823, 2006.

- SI, D., WANG, Y., ZHOU, Y.H., GUI, Y., WANG, J., ZHOU, H., LI, Z-S., FAWCETT, J. P. Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols. **Drug Metab. Dispos.** v. 37, p. 629-634, 2009.
- SIEGEL, R., MA, J., ZOU, Z., JEMAL, A. Cancer statistics. **Cancer J. Clin.**, v. 64, n.1, p. 9-29, 2014
- SILVA, M. M., SANTOS, M. R., CAROÇO, G., ROCHA, R., JUSTINO, G., MIRA, L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. **Free Radical Research**, v. 36, n.11, p. 1219-1227, 2002.
- SIMIC, A., MANOJLOVIC, D., SEGAN, D., TODOROVIC, M. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. **Molecules**, v.12, p. 2327-2340, 2007.
- SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA D., WARREN, J.T., BOKESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. National Cancer Inst.**, v.82, n.13, p. 1107-1118, 1990.
- SOPONAR, F., MOȚ, A.C., SÂRBU, C. High-performance thin-layer chromatography and three-dimensional image analysis for the determination of rutin in pharmaceutical preparations. **J. AOAC Int**, v. 93, n. 3, p. 804-10, 2010
- SOSA, V., MOLINÉ, T., SOMOZA, R., PACIUCCI, R., KONDOH, H., LLEONART, M.E. Oxidative stress and cancer: an overview. Ageing **Res. Rev.** v.12, n.1, p.376-390, 2013
- SOUNDARARAJAN, R., WISHART, A. D., RUPASINGHE, H. P.V., ARCELLANAPANLILIO, M., NELSON, C. M., MAYNE, M., ROBERTSON, G. S. Quercetin 3-glucoside protects neuroblastoma (SH-SY5Y) cells in vitro against oxidative damage by inducing sterol regulatory element-binding protein-2-mediated cholesterol biosynthesis. **J. Biolog. Chem.**, v. 283, n.4, p. 2231-2245, 2008.
- SOUZA, M. V., PRIOLLI, D. G., PORTES, A. V., CARDINALLI, 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.** v. 23, n.5, p. 417-424, 2008.
- STEPHENSON, J.A., GODDARD, J.C., AL-TAAN, O., DENNISON, A.R., MORGAN, B. Tumor Angiogenesis: A Growth Area – From John Hunter to Judah Folkman and Beyond. **J. Cancer Res.**, p. 1-6, 2013
- 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**, 2004
- TAKAHAMA, U., TANAKA, M., HIROTA, S., YAMAUCHI, R. Formation of an oxathiolone compound from rutin in acidic mixture of saliva and buckwheat dough: possibility of its occurrence in the stomach. **Food Chemistry**, v. 116, n.1, p. 214-219, 2009
- 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.**, v.8, n.3, p.161-166, 2001.
- TANG, D-Q., WEI, Y-Q., GAO, Y-Y., YIN, X-X., YANG, D-Z., MOU, J., JIANG, X-I. Protective effects of rutin on rat glomerular mesangial cells cultured in high glucose conditions. **Phytotherapy Research**, v. 25, p.1640–1647, 2011

- TARTA, C., TEIXEIRA, C.R., DA SILVA, V.D., CHIELE NETO, C., PROLLA, J.C., GUS, P. Angiogênese no Carcinoma Colorretal: Revisão e Perspectivas. **Rev. Bras. Coloproctol.**, v. 20, n. 4, p. 227-230, 2000,
- TODARO, M., PEREZ ALEA, M., DI STEFANO, A.B. Colon Cancer stem cells distate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. **Cell Stem Cell**, v. 11, n.4, p. 389-402, 2007.
- TELFORD, W.G., KOMORIYA, A., PACKARD, B.Z., BAGWELL, C.B. Multiparametric analysis of apoptosis by flow cytometry p.203 in Teresa S. Howley and Robert G. Hawley (Eds.) Flow cytometry protocols, **Meth. Molec. Biol.**, v. 699, 2011.
- TERAO, J., MUROTA, K., KAWAI Y. Conjugated quercetin glucuronides as bioactive metabolites and precursors of aglycone in vivo. **Food Funct**, v. 2, n.1, p.11-7, 2011.
- THANGASAMY, T., SITTADJODY S, LANZA-JACOBY S, WACHSBERGER PR, LIMESAND KH, BURD R. Quercetin selectively inhibits bioreduction and enhances apoptosis in melanoma cells that overexpress tyrosinase. **Nutr. Cancer**. v. 59, n.2, p.258-68, 2007
- TOURNAIRE, C., CROUX, S., MAURETTE, M.-T., BECK, I., HOCQUAUX, M., BRAUN, A.M., OLIVEROS, E. Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen ( $^1\Delta_g$ ) quenching. **J. Phot. Photob.** v 19, p. 205-215, 1993.
- TOYOKUNI, S., OKAMOTO, K., YODOI, J., HIAI, H. Persistent oxidative stress in cancer, **FEBS Lett.** v. 358, p.1-3, 1995.
- VAN ERK MJ, ROEPMAN P, VAN DER LENDE TR, STIERUM RH, AARTS JM, VAN BLADEREN PJ, VAN OMMEN B. Integrated assessment by multiple gene expression analysis of quercetin bioactivity on anticancer-related mechanisms in colon cancer cells in vitro. **Eur J Nutr.** v. 44I n.3, p.143-56.2005
- VAN EPPS, H. L. What Tumors Need: a Brief History of Angiogenesis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 7, p. 1024, 2005,
- VAN OOSTVELDT, K., DOSOGNE, H., BURVENICH, C., PAAPE, M.J., BROCHEZ, V., EECKHOUT, EVD. Flow cytometric procedure to detect apoptosis of bovine polymorphonuclear leukocytes in blood. **Veter Immunol Immunopathol.** v. 70, n. 1-2, p. 125-133, 1999.
- VAN DER WOUDE, H., GLISZCZYŃSKA-SWIGŁO, A., STRUIJS, K., SMEETS, A., ALINK GM, RIETJENS IM. Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. **Cancer Lett.** v. 200, n. 1, p. 41-47, 2003
- VENDRAMINI-COSTA, D.B., CASTRO, I.B.D., RUIZ, ALTG, MARQUISSOLO, C., PILLI, R.A., DE CARVALHO, J.E. Effect of goniothalamine on the development of Ehrlich solid tumor in mice. **Bioorganic. Medicinal. Chem.** v. 18, p. 6742-6747, 2010.
- VERMEULEN, P.B, GASPARINI, G., FOX, S.B., TOI, M., MARTIN, L., MCCULLOCH P, PEZZELLA. F., VIALE, G., WEIDNER, N., HARRIS, A.L., DIRIX, L.Y. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. **Eur. J. Cancer**, v. 32A, n.14, p.2474-84, 1996
- VILA-REAL, H., ALFAIA, A. J., BRONZE, M. R., CALADO, A. R. T., RIBEIRO, M. H. L. Enzymatic Synthesis of the Flavone Glucosides, Prunin and Isoquercetin, and the Aglycones, Naringenin and Quercetin, with Selective  $\alpha$ -L-Rhamnosidase and  $\beta$ -D-Glucosidase Activities of Naringinase. **Enzyme Research**, p. 1-11, 2011.
- 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**, v. 151, p.237-244, 1992.
- WACH, A., PYRZYNSKA, K., BIESAGA, M. Quercetin content in some food and herbalsamples. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 699-704, 2007
- 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 Health and Dis**, p. 349-362, 2003.
- WALGREN, R. A., LIN, J. T., KINNE, R. K., WALLE, T. Cellular uptake of dietary flavonoidquercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. **J. Pharmacol. Experimental. Therap**, v. 294, p. 837-843, 2000.
- WANG, J., ZHAO, L-L, SUN, G-X, LIANG, Y., WU, F-A, CHEN, Z., CUI, S. A comparisonof acidic and enzymatic hydrolysis of rutin. **African J. of Biotechnol**, v. 10, n. 8, p.1460-1466, 2011.
- WANG Y, CHAN FL, CHEN S, LEUNG LK. The plant polyphenol butein inhibits testosterone-induced proliferation in breast cancer cells expressing aromatase. **Life Sciences** v. 77, 39-45, 2005
- WEISS, R. B. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? **Seminars Oncol.** v. 19, P. 670 – 686 1992
- WEIDNER N, SEMPLE JP, WELCH WR, FOLKMAN J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, v. 324, n.1, p.1-8, 1991
- WILLIAMSON, G., PLUMB, G. W., UDA, Y., PRICE, K. R., RHODES, M. J. C. Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in Hepalcl7 cells. **Carcinogenesis**, v. 17, n.11, p. 2385-2387, 1996.
- 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. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 4, p. 630-635, 2002.
- WU AW , GU J , LI ZF , JI JF , XU GW COX-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer. **World. J. Gastroenterol.**v.10, n.16, p. 2323-2326, 2004
- XAVIER, C. P. R The anticarcinogenic potential of dietary natural compounds on colorectal carcinoma : effects on signalling pathways related to proliferation and cell death. Universidade do Minho. dsiponível em <http://hdl.handle.net/1822/12355>
- XIAO, D., ZHU, S.P., GU, Z.L. Quercetin induced apoptosis in human leukemia HL-60 cell. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 18, p. 280-283, 1998. 2010
- YADAV, P. K., YADAV, S., YADAV, K. D. S.  $\alpha$ -L-rhamnosidase: a review. **Process Biochemistry**, v. 45, n.8, p. 1226-1235, 2010
- 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.**, v. 92, p. 307-312, 1997.
- YANG, K., LAMPRECHT, S.A, LIU, Y., SHINOZAKI, H., FAN, K., LEUNG, D., NEWMARK, H., STEELE, V.E., KELLOFF, G.J, LIPKIN, M. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. **Carcinogenesis**. v. 21, n. 9, p. 1655-60, 2000

- YANG, Z., CALDWELL, G. Metabolism profiling, and cytochrome P450 inhibition & induction in drug discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 1, p. 403–425, 2001.
- 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. Agricult. Food Chem.**, v. 57, n. 18, p. 8581–8586. 2009
- YOSHIDA, M., SAKAI, T., HOSOKAWA, N., MARUI, N., MATSUMOTO, K., FUJIOKA, A., NISHINO, H., AOIKE, A. The effect of quercetin of cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. **FEBS Letters**, v. 260, p. 10-13, 1990.
- YOSHIMIZU, N., SAIKAWA, Y., KUBOTA, T., IDA, M. Y., KAWA, T. F., AI, K. K. U. M., SCIENCE, L. Anti-tumour effects of nobiletin, a citrus flavonoid, on gastric cancer include: antiproliferative effects, induction of apoptosis and cell cycle deregulation, v. 20, p. 95–101, 2004
- YTHIER, D., LARRIEU, D., BRAMBILLA, C., BRAMBILLA, E., & PEDEUX, R. The new tumor suppressor genes ING: Genomic structure and status in cancer. **Internat. J. Cancer**, 2008
- ZIAEE, A., ZAMANSOLTANI, F., NASSIRI-ASL, M., ABBASI, E. Effects of rutin on lipid profile in hypercholesterolaemic rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 104(3), p. 253-258, 2009.2008
- ZHOU BB, ELLEDGE SJ **Nature**. Nov 23,408(6811):433-9.The DNA damage response: putting checkpoints in perspective.2000