

RUTINA HIDROLISADA COMO POTENCIAL MODIFICADORA DA VIA ATM EM ADENOCARCINOMA COLORRETAL

Natália Taís Klinkerfuss¹, Denise Gonçalves Priolli².

¹ Acadêmica de Biomedicina da Universidade São Francisco (USF), Bragança Paulista, SP.

² Docente da Universidade São Francisco (USF), Bragança Paulista, SP.

Autor correspondente: Natália Taís Klinkerfuss

Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa Universidade São Francisco

Avenida São Francisco de Assis, 218

Bragança Paulista, São Paulo, Brasil

CEP: 12916-900

E-mail: nat-klink@hotmail.com

RESUMO

A terapia mais utilizada para tratar o câncer colorretal é a ressecção cirúrgica associada a tratamento adjuvante com antineoplásicos os quais apresentam efeitos mutagênicos em células normais. Os flavonóides são compostos polifenólicos que possuem ampla atividade farmacológica, sendo a rutina um de seus representantes de maior acessibilidade, porém com baixa biodisponibilidade. A hidrólise enzimática da rutina, rutina hidrolisada (RH), leva ao aumento de sua biodisponibilidade e em decorrência o aumento de sua atividade antiproliferativa e antioxidante que pode estar relacionada à via de reparo de DNA. **Objetivo:** Avaliar a ação da RH sobre a expressão de proteínas associadas à via de reparo ATM. **Métodos:** Os animais foram inoculados com 4×10^6 células de adenocarcinoma de cólon humano/HT-29, processadas em cultura celular. O volume tumoral foi aferido diariamente e, após eutanásia e ressecção tumoral, as amostras foram submetidas à análise histológica (HE), imunohistoquímica, genética (PCR) e citometria de fluxo. A análise dos resultados foi realizada adotando significância de 5%. **Resultados/Discussão:** A administração profilática da RH inibiu o crescimento tumoral relacionada à ativação do checkpoint da via ATM pela diminuição da expressão da proteína c-Myc e diminuição na expressão de TP53 mutada. **Conclusão:** O flavonóide RH demonstrou potencial antitumorigênico sobre o adenocarcinoma colorretal /HT-29. Sua ação parece relacionada à parada do ciclo celular, após ativação do checkpoint S/G2 por fosforilação de ATM com conseqüente diminuição de proliferação mediada pela proteína c-Myc, ao mesmo tempo em que modula a proteína TP53, aumentando a morte tumoral por meio da apoptose.

Palavras-chave: Flavonóides, Câncer colorretal, Estresse oxidativo, Ataxia telangiectasia.

ABSTRACT

The most commonly used therapy for treating colorectal cancer is surgical resection associated with adjuvant treatment by antineoplastic agents which have mutagenic effects on normal cells. Flavonoids are polyphenolic compounds that have wide pharmacological activity, being rutin one of its representatives of greater bioavailability, but low biodisponibility. The enzymatic hydrolysis of rutin, hydrolyzed rutin (HR), leads to an increase in its biodisponibility and, as a consequence, an increase in its antiproliferative and antioxidant activity, which may be related to the DNA repair pathway. **Objective:** To evaluate the HR action on proteins expression associated with the ATM repair pathway. **Methods:** Animals were inoculated with 4×10^6 HT-29/colon adenocarcinoma human cells, growth in cell culture. Tumor volume was measured daily and, after euthanasia and tumor resection, the samples were submitted to histological analysis (HE), immunohistochemistry, genetics (PCR) and flow cytometry. An analysis of the results was carried out adopting a meaning of 5%. **Results / Discussion:** Prophylactic HR administration inhibited tumor growth related to ATM phosphorylation by decreasing c-Myc expression and decreased TP53 mutation. **Conclusion:** HR flavonoid demonstrated antitumorigenic potential on human colon adenocarcinoma / HT-29. Its application is related to a cell cycle arrest, after activation of the S/G2 checkpoint by ATM phosphorylation with consequent decrease of proliferation mediated by the c-Myc protein, while modulating the TP53 protein, increasing tumor death by apoptosis.

Keywords: Flavonoids, Colorectal cancer, Oxidative stress, Ataxia telangiectasia.

1. INTRODUÇÃO

Entre os cânceres de maior incidência, o câncer colorretal (CCR) configura-se como o segundo mais freqüente na região sudeste do Brasil, independente do sexo. Embora sua incidência varie de acordo com as regiões do mundo, tendo uma predileção por áreas de maior desenvolvimento, admite-se que o CCR é o quarto mais comum na espécie humana, em ordem de incidência: próstata, mama feminina, pulmão e CCR (INCA, 2016; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013).

A seqüência adenoma-carcinoma causa inúmeras mutações em genes que transformam um epitélio normal de cólon em um adenoma, sendo essa uma lesão pré-carcinoma (LESLIE, 2002) e esse estresse gera uma mutação específica em TP53 que vai determinar a transformação desse adenoma para um adenocarcinoma (COTTI et al., 2000). O estresse oxidativo parece estar diretamente relacionado a este acúmulo de mutações e ao CCR (SCALISE et al., 2016; PRIOLLI et al., 2013; RIBEIRO et al., 2008).

O entendimento dos mecanismos relacionados com o ciclo celular é muito importante para que se possa compreender a etiologia do câncer. O ciclo celular, o qual é conhecido como a alternância de mitose e intérfase, deve ocorrer de maneira muito precisa para que a duplicação celular ocorra da maneira correta, sem erros. Este controle permite que as células parem o ciclo celular e tenham tempo de reparar os danos antes de completar o ciclo (ALBERTS, 2011), onde a TP53 tem grande importância, quando não mutada, ficando conhecida como a “guardiã do genoma”, pois impede que as mutações sejam transmitidas para as células-filhas.

Células eucarióticas estão sob ataque contínuo de agentes oxidantes externos, bem como dos subprodutos do metabolismo normal como as EROs. Seja qual for à origem, o dano genético ameaça a sobrevivência da célula, leva à falência de órgãos, imunodeficiência, entre outras patologias, ao câncer.

Para assegurar que as células passem cópias exatas dos seus genomas para a próxima geração existem pontos de vigilância, denominados pontos de verificação (*checkpoints*) do ciclo celular. A função global destes *checkpoints* é detectar o dano ao DNA e reorganizar a progressão do ciclo celular, reparando o DNA. Normalmente, a ativação retarda ou adianta as fases do ciclo celular, permitindo assim que os mecanismos de reparação sejam adequados para corrigir lesões genéticas, antes que estas mutações sejam passadas para as células-filhas. Em determinados tipos de células, as proteínas de ligação dos *checkpoints* levam a quebras no DNA e a morte celular por apoptose através da indução de TP53.

ATM é uma das vias quinases centrais envolvidas na resposta celular das quebras do DNA que podem surgir, por exemplo, intrinsicamente, através das paradas de replicação ou, extrinsecamente, através de exposição à radiação ionizante, elementos químicos, drogas, etc (VAN GENT et al., 2001). Uma proposta de tratamento, visando inibição do crescimento tumoral, é a ativação da via de TP53 através da ativação da via ATM.

Embora o tratamento principal do CCR seja a ressecção cirúrgica, na maioria das vezes, será necessário o tratamento com antineoplásicos, os quais apresentam grande potencial inflamatório e de indução de efeitos mutagênicos em células normais. Assim torna-se necessário a descoberta de agentes antitumorais com menor toxicidade e menos efeitos colaterais aos pacientes.

Dentre os compostos naturais, os flavonóis, além de sua atividade antitumoral apresentam poucos efeitos genotóxicos às células sadias (UTESCH et al., 2008). Experimentos em ratos e em culturas de células relataram o potencial da rutina e da quercitina na inibição da neoplasia do cólon (PEREIRA, 1996; LIPKIN, 1999; DESCHNER, 1991; YANG, 2000, DE ARAUJO, 2013). Em modelos animais induzidos (azoximetano), obtiveram diminuição da proliferação celular tumoral, tanto a rutina quanto a quercitina que mostraram redução significativa pela inibição da fase S e assim como de áreas de displasia,

além de reduzir o número de tumores desenvolvidos (DESCHNER, 1991; YANG, 2000).

Há ampla distribuição e abundância de rutina entre as espécies vegetais do mundo inteiro, o que faz deste flavonóide matéria prima adequada para a obtenção de Q3G por meio da hidrólise de seu ramnosídico. A rutina (quercitina -3-O-rutinosídeo) é um glicosídeo conjugado, pertencente à classe dos flavonóis, é formada pela quercitina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi-flavona) ligada na posição C2 do anel C a uma molécula dissacarídica, a rutinose (C₁₂ H₂₂O₁₀) que é composta de uma molécula de ramnose e uma de glicose (WILLIAMSON, 1996). A Q3G é composta pela quercitina ligada a uma molécula de glicose, existindo similaridade estrutural entre quercitina, Q3G e rutina. Os três compostos exibem atividades biológicas comuns, incluindo efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antiproliferativos (SEYOUM, 2006; MOTOYAMA, 2009; SILVA, 2006). As reações enzimáticas têm vantagens em relação aos métodos químicos, principalmente no que diz respeito à seletividade e as condições de reação, além de modificação na biodisponibilidade, menor custo e, eficiência na geração de menos subprodutos, assim a hidrólise enzimática se torna alternativa vantajosa para suas funções fisiológicas e na saúde das populações. A rutina hidrolisada foi recentemente apontada com potencial antitumoral para células de cólon (DE ARAÚJO et al., 2013).

Desta forma, apesar do grande avanço na compreensão da função e da sinalização ATM nos últimos anos, os complexos mecanismos envolvidos na sua ativação, com vistas ao tratamento do câncer, ainda não estão completamente resolvidos. Os mecanismos celulares e moleculares precisos de flavonóides são em parte desconhecidos e várias hipóteses têm sido propostas para justificar seus efeitos protetores. Estas incluem a capacidade de flavonóides para atuar eliminadores diretos de radicais, agentes quelantes de íons de metais, inativadores de carcinógenos, efeitos hormonais (incluindo neurotransmissores), anti-hormonais, inibidores de enzima e indutores da apoptose, modulação da expressão de genes de reparação

do DNA e ação antioxidante (RICE-EVANS et al., 1996, NIVELTDT et al., 2001, HAVSTEEN et al., 2002), desta forma, seria possível sua atuação sobre a via ATM.

Nesta pesquisa será avaliada a ação da rutina hidrolisada obtida por desglicosilação pelo complexo enzimático hesperidinase (DE ARAÚJO et al., 2013) no adenocarcinoma colorretal, como potencial modificadora da via de sinalização ATM.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A realização deste estudo obedeceu à Lei Federal 6.638 e às orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CONCEA) da Universidade São Francisco (# 01.0226.2014).

2.1 Preparo de derivado de flavonóide por desglicosilação - obtenção da rutina hidrolisada

A obtenção da rutina hidrolisada seguiu orientações de publicação anterior (DE ARAUJO, 2013). Resumidamente, as reações de hidrólise foram realizadas utilizando a enzima hesperidinase de *Penicillium* sp (18U/g) adquiridas na Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA). As reações foram realizadas em incubadora refrigerada tipo shaker com agitação de 200 rpm utilizando 300 mL de uma solução de 100mg/mL de hesperidina e 2 mL da solução enzimática (100mg/mL) em tampão acetato 0,05M pH 3,9 a 40°C. Os substratos/produtos monitorados em espectrômetro de massa pelo método por ESI-MS modo negativo servirão a caracterização do composto.

2.2 Estudos *in vitro*

a) Cultura de células

A linha celular de tumor de cólon humano utilizada foi a HT-29. As células foram descongeladas e propagadas em cultura a 37°C, em câmara umidificada com 25% de CO₂ usando o Modified Dulbecco Eagle Medium (DMEM - Sigma D-5648), suplementado com 100 piruvato de sódio mM (Gibco-11- 360), 10% de soro fetal bovino (Gibco 2010-09) e 1% de antibióticos (100 U/ml de penicilina e 10 mg/ml de estreptomicina, Gibco 15140-122). As culturas celulares foram incubadas com 3 mL de tripsina-EDTA, 0,25% (Gibco 25 200), por três minutos para permitir a separação de células. O meio de cultura foi trocado a cada 24 horas. A viabilidade das células foi determinada em câmara de Neubauer e avaliada pelo Azul de Tripán.

b) Determinação da via de sinalização envolvida no dano ao DNA por meio de estudo do perfil de genes e proteínas associados à via ATM

Analisou-se a expressão de proteínas relacionadas a danos ao DNA associados com a via de sinalização ATM, a saber, p21, c-Myc, Ciclina D1, checkpoint ATM, TP53 em células de câncer e/ou tumores de adenocarcinoma colorretal tratadas ou não com a rotina hidrolisada por meio de PCR, imunohistoquímica e citometria de fluxo.

2.3 Estudos *in vivo*

a) Grupos experimentais

Utilizou-se 9 camundongos Balb c nu/nu, com seis a oito semanas de idade. Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em 3 grupos experimentais:

Grupo Controle – 3 animais. Os animais foram submetidos à gavagem com o composto teste.

Grupo pós – 3 animais. Os animais foram submetidos à gavagem por 7 dias com o biocomposto após implante de células tumorais.

Grupo pré – 3 animais. Os animais foram submetidos à gavagem com o biocomposto por 7 dias antes do implante tumoral.

b) Criação do modelo animal de adenocarcinoma de cólon/HT29

As células tumorais HT-29/adenocarcinoma de cólon humano foram suspensas em 40µl de solução meio. Foram implantadas 4×10^6 células tumorais por meio de injeção subcutânea no dorso do animal, utilizando-se seringa de 1ml, com agulha hipodérmica de calibre 30G.

c) Manuseio dos animais

Para o grupo pós, após o implante do tumor, o animal foi colocado em gaiola individual e recebeu a rotina hidrolisada por meio de gavagem 1x ao dia por 7 dias consecutivos além da ração padrão e água *ad libitum*.

Para o Grupo pré, 7 dias antes do implante do tumor, o animal foi colocado em gaiola individual e recebeu a rotina hidrolisada por meio de gavagem 1x ao dia, além da ração padrão e água *ad libitum*.

d) Monitoramento do crescimento tumoral

O animal foi monitorado após a inoculação, sendo aferido o volume tumoral (Gutmanet *al*, 1997) e determinada a curva de crescimento tumoral dos grupos distintos por cálculo de regressão sigmoidal.

2.4 Estudos ex vivo

a) Eutanásia dos animais

Depois de anestesiados os animais foram submetidos à eutanásia, onde o campo cirúrgico foi preparado e os instrumentais colocados em local de fácil acesso. A solução anestésica composta por 0,2 ml de Ketamina e 0,1 de Xilazina para cada animal sacrificado (0,3 ml de solução por animal). Foram preparados tubos de ensaio (4 por animal), enchendo-os até a metade com formol 10% e eppendorfs, adicionando 200µl de solução de congelamento em metade deles. Foi necessário que os tubos de ensaio e eppendorfs estivessem devidamente identificados com o codinome do animal, sexo e grupo à qual pertence. Foi realizada a exérese do tumor fracionando-o em três partes, separando-as em tubo de ensaio, eppendorf “seco” e eppendorf com solução de congelamento.

b) Análise Histopatológica

O estudo histopatológico dos tumores foi realizado. Todos os espécimes previamente fixados em solução de formalina a 10% foram incluídos em blocos de parafina. Três cortes de 4µm foram obtidos de cada bloco, sendo corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) para diagnóstico anatomopatológico. Presença e grau de diferenciação do tumor foram determinados. A análise microscópica das lâminas foi realizada com o auxílio de microscópio óptico comum, com ajuda de lente objetiva de 100x e com magnificação final de 400x.

c) Determinação da via de sinalização envolvida no dano ao DNA por meio de estudo do perfil de genes e proteínas associados à via ATM

Analisou-se a expressão de proteínas relacionadas a danos ao DNA associadas com a via de sinalização ATM, a saber, p21, CMYC, Ciclina D1, checkpoint ATM, p53 em células de câncer e/ou tumores de cólon incubadas ou não com a rotina hidrolisada por meio de PCR, imunohistoquímica e citometria de fluxo.

- **PCR em tempo real**

Após a extração do DNA da amostra a ser estudada, realizou-se a purificação do DNA, e a preparação do Master Mix (mistura necessária à síntese de novas cópias de DNA). Para cada amostra foi utilizada a mistura de 4,5µl de H₂O; 6µl de Master Mix e 0,25µl de primer Forward & Reverse (oligonucleotídeos específicos para cada amostra). Em uma cabine previamente esterilizada, realizou-se a pipetagem de 1µl da amostra em cada compartimento da placa de PCR (livre de RNases, DNases, inibidores de PCR e endotoxinas), deixando um livre de amostra, denominado branco. Após esse procedimento, pipetou-se 11µl da mistura em cada compartimento com amostra e 12µl no branco. A placa foi selada e centrifugada por 10 segundos. Em seguida, com o termociclador ajustado a placa foi incubada para execução dos ciclos, conforme quadro abaixo:

Genes	P21	c-Myc	cyclina D1
Localização	6p21.2	8q24.21	11q13
Exoncount	6	3	6
Primersense	CGATCCACACGGAGTACTTC	CCTCCACTCGGAAGGACTATC	GAACAAGCTCAAGTGGAAACC
Primer no sense	CGATCCACACGGAGTACTTC	TGTTTCGCCTCTTGACATTCTA	GAACCTCACATCTGTGGCA
Desnaturação	94-96°C	94-96°C	94-96°C
Anelamento	50-65°C	50-65°C	50-65°C
Extensão	72°C	72°C	72°C

Tabela 2. Contexto genômico. Sequência GTC sense e no sense, e o padrão de temperatura desde a desnaturação do DNA até sua extensão.

- **Análise imunohistoquímica**

Para a realização do estudo imunohistoquímico da proteína TP53 os espécimes foram previamente fixados em formalina e incluídos em blocos de parafina submetidos a dois cortes adicionais de 4 mm e depositados em lâminas previamente silanizadas. O complexo utilizado foi o estreptavidina-biotina-peroxidase (ABC- Dako Cytomation®, Copenhagen, Dinamarca) adaptado às condições laboratoriais. As lâminas foram incubadas com o anticorpo específico anti-TP53 (Monoclonal Mouse anti-human TP53 protein. Clone DO-7. Dako Cytomation®, Copenhagen) diluído em albumina bovina (Sigma Chemical CO®, Saint Louis, EUA) na

proporção de 1:500 durante 16 a 18 horas a 4°C. Em seguida, lavadas em tampão PBS, com 3 trocas de 3 a 5 minutos e incubadas com anticorpo secundário biotinilado (anti-IG - Dako Cytomation®, Copenhagen, Dinamarca) diluído em albumina bovina durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as etapas: lavagem com 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 (H₂O₂) 0,06%. Após isso foram confeccionadas lâminas coradas com hematoxilina de Harris e após isso passaram por desidratação 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. A determinação da quantidade de imunoexpressão foi efetuada por processamento de imagem assistido por computador.

- **Citometria de fluxo**

Essa técnica possibilita a identificação da fosforilação do checkpoint ATM e diferenciação de células nos diversos estágios do ciclo celular pela marcação do DNA com iodeto de propídio (PI), um intercalante de DNA que permite determinar a percentagem de células em G₀/G₁, S e G₂/M com base no conteúdo de DNA e na geração de fluorencências diferentes (KAJSTURA et al., 2007), assim como do Anti-p-ATM (Ser1981), clone 10H11.E12. Ensaio que pode ser utilizado para detectar a quantidade total de células nas diferentes fases do ciclo celular, assim como da fosforilação da ATM.

As células HT-29 de cólon humano foram plaqueadas em placas com 96 compartimentos a uma densidade de 2x10 células/mL, com rotina hidrolisada. A excitação foi realizada por um laser de argônio e as análises foram feitas por meio do software Guava (5000 eventos) que forneceu a porcentagem de células marcadas.

Análise estatística dos resultados

A análise dos resultados obtidos foi realizada adotando-se nível de significância menor que 5% ($p \leq 0,05$), mediante os seguintes modelos: estatística descritiva; medidas de tendência central; teste de normalidade; análise de variância; testes de associação, curva de regressão. Para análise estatística dos resultados utilizou-se o programa de análise estatística SPSS for Windows, versão 20.0.

3. RESULTADOS

3.1 Efeito antitumoral da RH em modelo animal

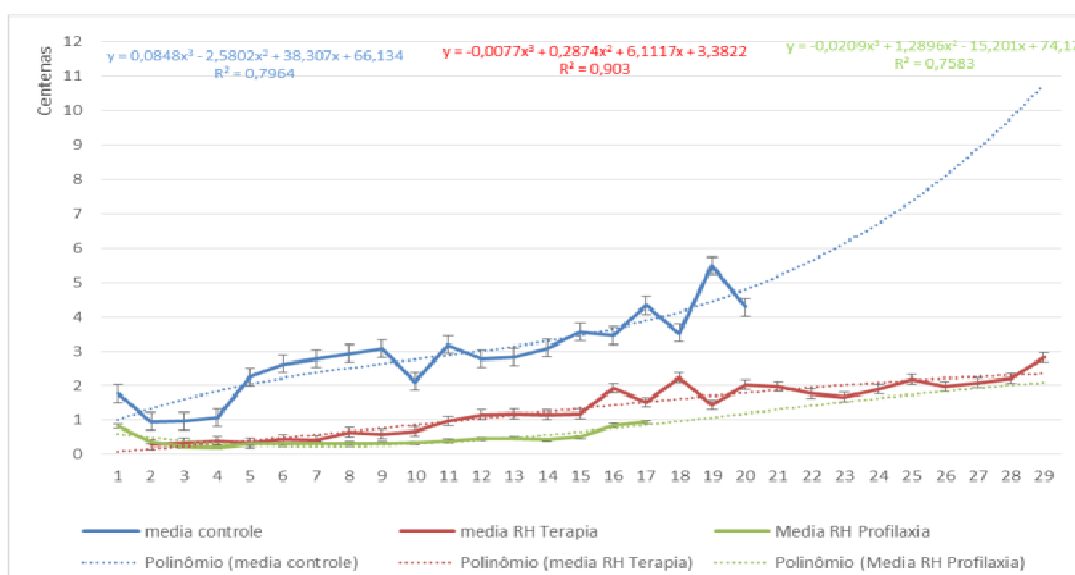


Figura 1. Efeito antitumoral da RH em modelo animal. Ação antitumoral da rotina hidrolisada projetada por regressão polinomial (linhas pontilhadas) para período de cerca de um mês em posologia profilática ou terapêutica com uso do biocomposto. Notar ação antitumoral no uso profilático e terapêutico da rotina hidrolisada. Teste de regressão polinomial; $p=0.01$

3.2 Expressão das proteínas nos diferentes grupos tratados e controle

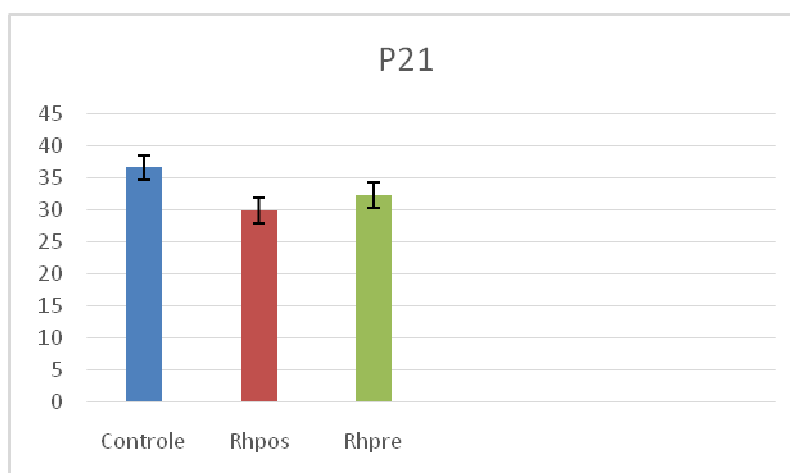


Figura 2. Expressão da proteína P21 nos diferentes grupos tratados e controle. Notar que não há diferença entre os grupos tratados e o controle em relação à expressão da proteína P21. Teste ANOVA; $p > 0,05$.

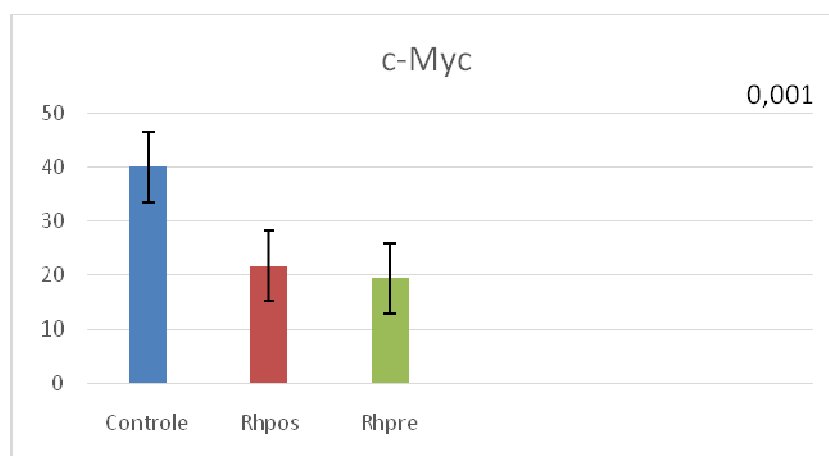


Figura 3. Expressão da proteína c-Myc nos diferentes grupos tratados e controle. Notar que o grupo tratado com RH pré demonstrou menor expressão de c-Myc em relação ao controle quando comparada a RH pós. Teste ANOVA; $p = 0,001$.

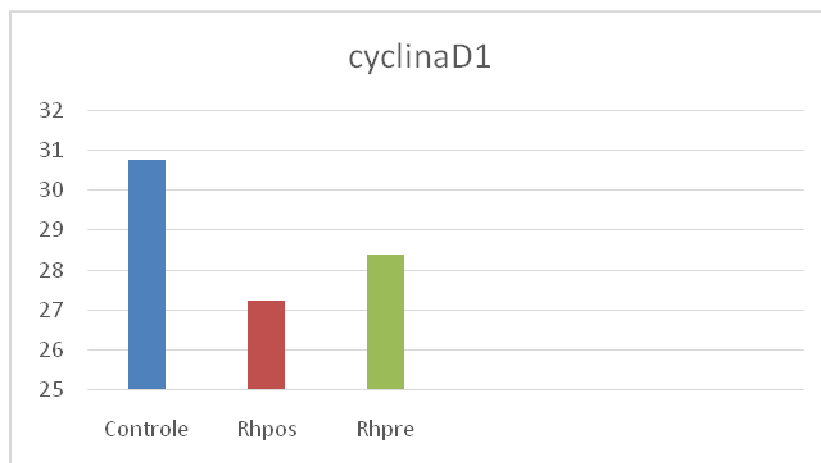


Figura 4. Expressão da proteína cyclina D1 nos diferentes grupos tratados e controle.

Notar que não há diferença entre os grupos tratados e o controle em relação à expressão da proteína cyclina D1. Teste ANOVA; $p > 0,05$.

3.3 Expressão de TP53 nos tumores

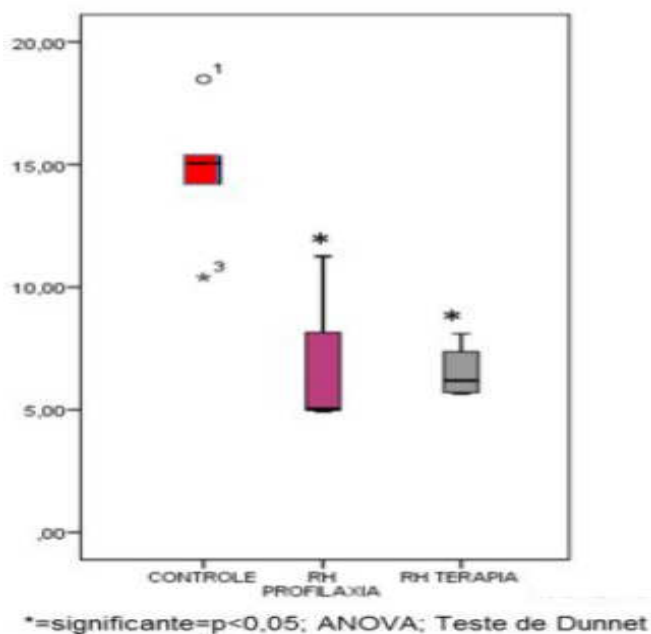


Figura 5. Expressão de TP53 nos tumores. Imunoexpressão de TP53 nos tumores de animais que receberam ou não tratamento com a rutina hidrolisada. Notar a diferença entre os grupos pré tratados e o controle. Teste ANOVA; $p < 0,05$.

3.4 Citometria de fluxo

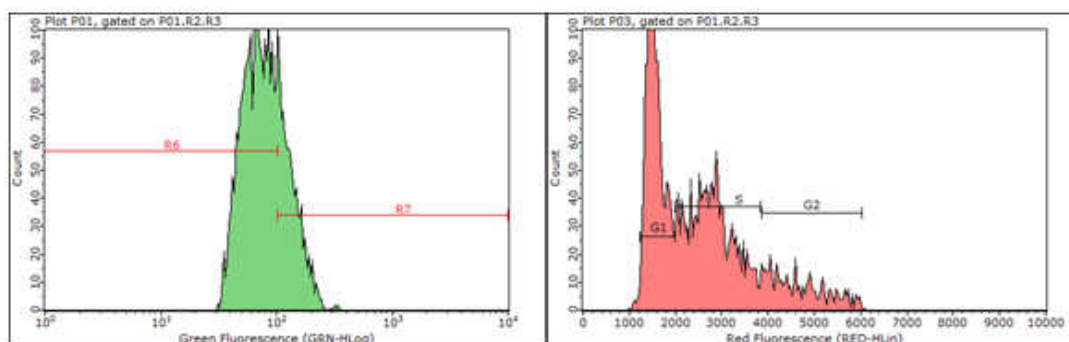


Figura 6.A

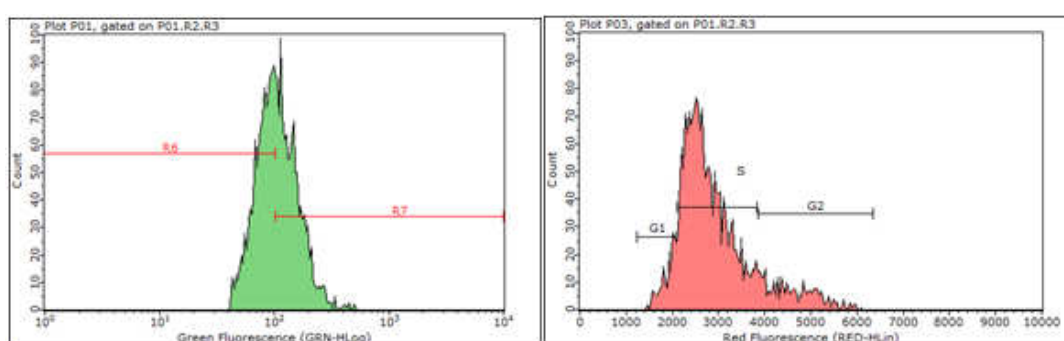


Figura 6.B

Figura 6. Fosforilação da ATM no adenocarcinoma de cólon. Notar em A, a ausência da fosforilação e em B a presença da fosforilação com retardo da fase S para G2 do ciclo.

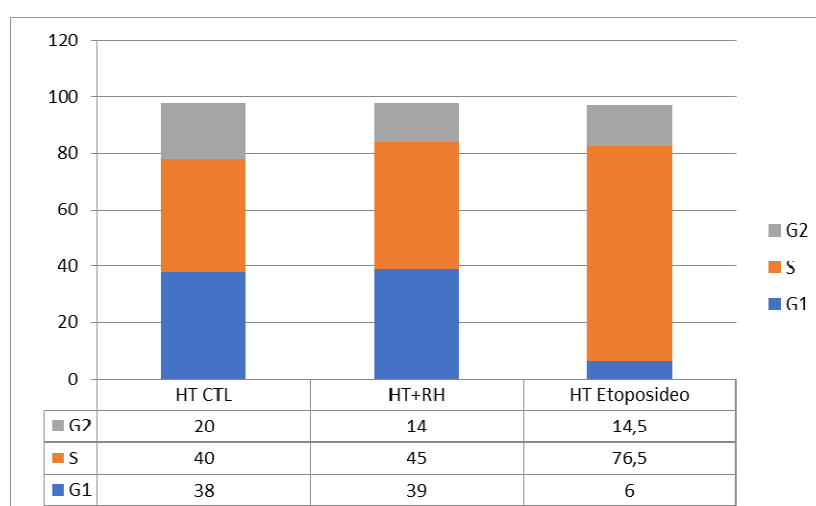


Figura 7. Gráfico comparativo da porcentagem de células em cada ponto do ciclo celular de células HT-29 sem tratamento, tratadas com RH e com etoposídeo,

respectivamente. Sugere a fosforilação da proteína ATM e ativação da via de reparo ATM. Pode-se notar a ação da RH na passagem de S para G2 do ciclo celular. Teste ANOVA; $p < 0,05$.

4. DISCUSSÃO

Os flavonóides são um grupo de compostos polifenólicos amplamente distribuídos na natureza em frutas e vegetais, podem ser encontrados na forma de agliconas ou sob a forma de glicosídeos e/ou derivados metilados e/ou acilados. Modificações no anel central destas substâncias levam a diferenciação em subclasses como segue a figura abaixo: antocianidinas, catequinas, flavonóis, flavanonas, flavonas e isoflavonas.

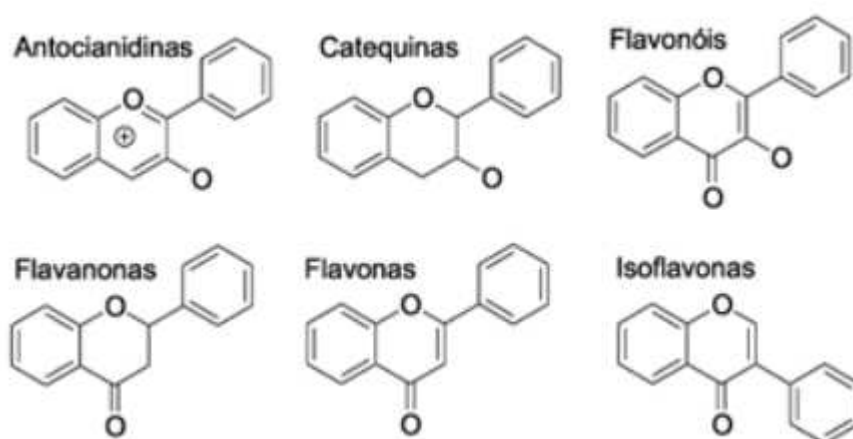


Figura 8. Estrutura dos flavonóides. Classificação das diferentes classes de flavonóides.

A modificação influencia a eficiência de absorção dos flavonoides (CRESPY et al., 1999). É sabido que os efeitos biológicos dependem da estrutura química dos flavonóides que são naturalmente encontrados, assim, uma mudança em sua estrutura gera uma nova molécula bioativa.

A literatura demonstrou que os animais que receberam dietas suplementadas com rutina exibiram um aumento nas taxas de apoptose das células tumorais (YANG, 2009),

corroborando os dados de estudo que mostra que a modificação da rotina em RH melhora a atividade antiproliferativa deste composto *in vitro* (DE ARAUJO, 2013). Entretanto, até a presente data estudos *in vivo* não foram publicados sobre os efeitos antitumorais da RH.

Os modelos animais são necessários não só para busca de mecanismos de patogênese, mas também para os ensaios pré-clínicos de novas drogas utilizadas em oncologia. A introdução do camundongo atímico no início dos anos 60 foi seguida por grandes possibilidades em pesquisa com modelos de tumor implantável. Desde 1968 camundongos atímicos são usados como uma importante ferramenta biomédica (PANTELOURIS, 1968; RYGAARD&POLVSEN, 1969) já que estes animais são imunocomprometidos e aceitam enxertos alogênicos ou xenogênicos, incluindo os tumores malignos humanos.

O transplante de tumores malignos em camundongos é amplamente utilizado em muitos tipos de pesquisa em câncer, porque o animal pode manter as características histológicas originais do tumor, tais como cariótipo, expressão de oncogenes, estrutura molecular e evolução clonal (RYGAARD et al., 1990). O modelo de tumor humano tem alta taxa de sucesso tumoral e fornece informação sobre a resposta do tumor as drogas testadas (PRIOLLI et al., 2011; PRIOLLI et al., 2014). O modelo de inoculação subcutânea é mais facilmente realizado e é adequado para a observação do tumor (RYGAARD & POLVSEN, 1969). Pode-se confirmar, no decorrer do estudo, que os tumores implantados no subcutâneo proporcionaram fácil acesso para acompanhamento macroscópico, com possibilidade de medição diária dos tumores. Os experimentos *in vivo* permitiram estudar a curva de crescimento tumoral e, portanto, a ação antitumoral da RH, tanto em administração profilática como terapêutica de forma adequada e facilmente executada.

A administração da RH, na forma profilática, determinou redução do crescimento tumoral de forma significativa quando comparados ao grupo controle (Figura 1). Como todos os flavonoides, a rutina hidrolisada tem ação bifásica, como indutora de dano oxidativo ou

preventiva do dano oxidativo, dependendo da dose (ORFALLI et al., 2016). Isto justifica o estudo do grupo profilático, onde se pretende diminuir o estresse e, terapêutico, para saber se a droga consegue induzir dano oxidativo por mecanismos diferentes, em ambos com ação antitumoral.

Por outro lado, os processos de morte celular são determinados por características morfológicas e bioquímicas e podem ser classificados em: apoptose, necrose, necroptose, autofagia, mitose catastrófica e senescência (GRIVICICH, 2007). Alterações nestes processos de morte celular implicam na tumorigênese, por isso é necessário ressaltar a importância de se conhecer todos esses processos, e descobrir qual o mecanismo de morte celular foi induzido pela RH.

Durante muito tempo a morte celular foi caracterizada como um processo passivo de caráter degenerativo, que ocorre quando estímulos levam a degenerações celulares. Como resposta a esse estímulo, a célula altera a integridade da membrana plasmática, aumenta seu volume e perde suas funções metabólicas. Todavia, a morte não ocorre apenas passivamente, mas também de forma programada, como resposta a estímulos intracelulares e extracelulares (ANAZETTI, 2007).

Apoptose é a morte celular programada, processo essencial para a continuidade do desenvolvimento dos seres vivos. Sua importância se dá pela eliminação de células desnecessárias ou defeituosas e também para células que precisam ser renovadas, processo muito importante durante a fase embrionária e a morfogênese. Este evento ocorre de maneira rápida, onde há uma retração da célula com perda de aderência entre a matriz extracelular e células vizinhas. O citoplasma fica denso, a cromatina torna-se condensada e disposta em grumos acoplados às projeções formando brotamentos contendo fragmentos do núcleo, esta fragmentação celular modifica a membrana nuclear. A seguir, o núcleo se fragmenta (cariorrexe), a membrana citoplasmática emite múltiplos brotos (corpos apoptóticos), assim

ocorre endocitose dos fragmentos pelas células vizinhas. Estas alterações morfológicas decorrem de uma cascata de eventos bioquímicos e moleculares específicos e geneticamente regulados pela TP53 (GRIVICICH, 2007).

O gene *TP53* pode induzir a apoptose ao regular a expressão de mediadores anti ou pró-apoptóticos, envolvidos em atividades celulares (PECORINO, 2008). Vários genes podem ser recrutados simultaneamente dentro da mesma célula. A escolha dos genes específicos parece ter envolvimento com a interação de uma variedade de outras proteínas, favorecendo a transativação de genes pró-apoptóticos. Qualquer alteração genética que tenha impacto sobre a competência de outras proteínas envolvidas com a apoptose, controle do ciclo celular ou reparo aos danos do DNA, também são capazes de modular a resposta da TP53 ao estresse (OREN, 2003).

A TP53 vai atuar em diversas vias biológicas principalmente nas espécies genotóxicas, dano ao DNA, sinalização de oncogênese, na regulação da apoptose, senescência celular que bloqueia o ciclo celular e modifica o DNA gerando instabilidade genética. É codificada pelo gene *TP53*, localizado no braço curto do cromossomo 17; o terminal *n* se liga no receptor nuclear para induzir a ação de transcrição de proteínas, cada parte de sua estrutura vai induzir a produção de diferentes genes, codificando diferentes proteínas para diferentes ações (KLUMB, 2002; BAI, 2006). No CCR há 60% a 80% de *TP53* mutada, sendo o gene supressor tumoral mais encontrado em todas as linhagens tumorais, por isso sua importância em estudos de terapia anticâncer (MARTINEZ et al., 2008).

Resultados do presente estudo demonstraram modulação da TP53 com a utilização da RH, tanto no seu uso profilático quanto terapêutico no CCR (Figura 5). Relatos na literatura demonstraram a ação dos flavonoides na modulação de *TP53* (YOUN et al., 2013), corroborando os resultados do presente estudo.

As fases funcionais do ciclo celular são bem conhecidas. Fase de Síntese onde ocorre a duplicação do DNA e fase da Mitose onde ocorre a segregação desse material em duas células filhas. Existem as fases preparatórias que antecedem essas fases citadas anteriormente, sendo elas G1, onde se ajustam biologicamente as células para fase S, e G2, fase preparatória para mitose. As fases G1, S e G2 constituem a intérfase. Os acontecimentos do ciclo celular são ordenados, e a progressão de uma fase para outra só ocorrerá após o término e avaliação da fase precedente. Os locais onde ocorrem essa checagem são chamados de pontos de controle (*check points*), sendo esses regulados por sinais intra e extracelulares (ROSSI, 1999). No ciclo celular, a c-Myc tem seu papel relacionado à promoção da transição das fases G1 para S o qual ativa o complexo ciclina/CDK, com transcrição E2F-dependente e incentivo ao crescimento celular (FARIA, 2005).

Autor sugeriu que a c-Myc pode atuar na indução da apoptose, tendo sido observada que em TP53, p21 e BAX há regiões interativas à c-Myc em seus promotores (EVAN, 1999). A proteína c-Myc é caracterizada como um fator de transcrição por conter domínios estruturais e duas sequências de localização. Contém uma porção N-terminal caracterizando seu domínio de transativação e uma porção C-terminal que contempla três domínios: a região básica, a qual atua no reconhecimento específica de uma sequência de DNA, a helix-loop-helix e o zipper de leucina, sendo estes dois últimos encarregados pela formação de heterodímeros específicos entre c-Myc e seus ligantes. Um dos ligantes mais importantes para a maior parte das atividades biológicas realizadas pela c-Myc é a proteína MAX. A qual dimerizada junto a c-Myc que exerce função de ativadora transcricional (FARIA, 2005).

Existem várias maneiras de uma ativação errônea do c-Myc, a qual acarretará, junto às demais mutações, o desenvolvimento das neoplasias humanas. No carcinoma de cólon pode-se observar estímulo da transcrição gênica (FARIA, 2005). No câncer a c-Myc determina transcrição e aumento da taxa de proliferação celular, ao mesmo tempo em que inibe a

apoptose mediada por TP53. Com o tratamento com RH pode-se observar uma subexpressão de c-Myc (Figura 3), gerando, desta forma, inibição da proliferação tumoral, ao mesmo tempo em que induziu a apoptose mediada por TP53, esta que havia sido modulada pelo tratamento com a RH, corroborando dados da literatura (LUTZ, 2002; YOUN et al., 2013).

A ciclina D1 forma um complexo com CDK e funciona como uma subunidade reguladora de CDK4 ou CDK6 cuja atividade é necessária para a transição G1/S do ciclo celular. Esta proteína tem sido citada na interação com a proteína supressora de tumor Rb e a expressão deste gene é regulada positivamente por Rb. As mutações, amplificação e superexpressão desse gene, alteram a progressão do ciclo celular e são freqüentemente observadas numa variedade de tumores, podendo contribuir para a tumorigênese (GUERRA, 2005). Foi demonstrado, na literatura, que a atividade de transcrição do gene ciclina D1 é reprimida pelo complexo c-Myc/MAX (MILLER, 2013), discordando destes achados, no presente estudo, não foi encontrada alteração significativa na expressão da ciclina D1 (Figura 4). Este resultado talvez possa ser explicado pela ausência da ativação da ATR neste tumor, possivelmente devido à característica da mutação sofrida por este tipo tumoral, em comparação aos descritos na literatura (*DNA double strand breaks X Stalled DNA replication forks*- Figura 9).

Outra proteína importante na regulação da apoptose é a p21. Por meio da ativação da p21, proteína reguladora da transmissão da fase G1 para S no ciclo celular, a TP53 controla a fosforilação do complexo molecular ativo ciclina-CdK (ciclina quinase dependente), interrompendo o ciclo celular (PECORINO, 2008). Por outro lado, pela conjugação da p21 à proteína PCNA (proliferating cell nuclear antigen), a TP53 promove o reparo ao DNA. Este também ocorre pelo estímulo direto à proteína codificada pelo gene XPC (Xeroderma pigmentosum-complementation), que está envolvido com o reparo por excisão de nucleotídeos (PECORINO, 2008). No presente estudo não houve diferença na expressão da

p21 (Figura 2), discordando da literatura, já que com a modulação da TP53 o esperado seria que houvesse um aumento da expressão da proteína p21 para a parada do ciclo celular em G1/S, podendo-se dizer que a modulação da TP53 não foi mediada pela p21 (Figura 9).

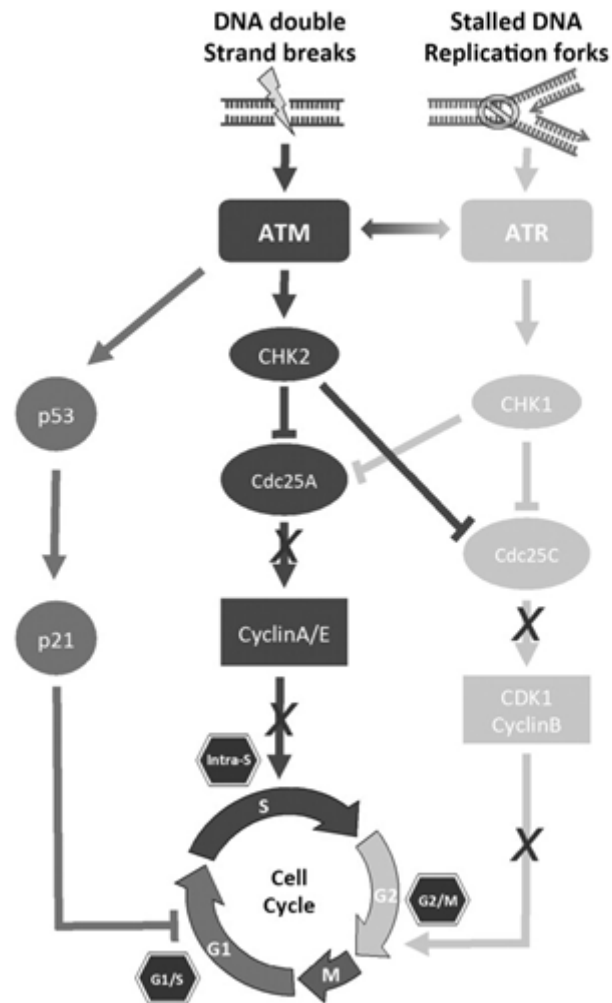


Figura 9. Esquema da via ATM/ATR

A proteína ATM tem sido alvo de estudos devido seu papel central na cascata de sinalização de lesões citotóxicas relacionadas à quebra da dupla fita de DNA via fosforilação de vários efetores, como a proteína CHK2 que tem sua ação na transição da fase G1/S para S e que fosforila TP53. É semelhante aos membros da família das fosfatidilinositol 3'-quinases e apresenta atividade quinase através de exposição à radiação ionizante (BERRA, 2006). Os

membros da família ATM estão ligados de várias maneiras na detecção de danos ao DNA e progressão do ciclo celular. Existem muitos substratos alvos de ATM, porém muitos ainda são desconhecidos (BERRA, 2006). No presente estudo, os grupos tratados expressaram ATM, indicando parada do ciclo celular na passagem S/G2 (Figura 7), corroborando dados da literatura (KOCHER, 2013).

Estudos recentes têm demonstrado que centenas de substratos são fosforilados de forma ATM-dependente, demonstrando claramente a complexidade da via ATM DDR-mediadas (DNA damage response) (MATSUOKA et al., 2007, BENNETZEN et al., 2010 e BENSIMON et al., 2010). No entanto, evidências sugerem que o papel de DDR independente de ATM também é emergente. Têm sido demonstradas funções de ATM na regulação de vias de sinalização envolvidas na manutenção da homeostase celular, incluindo o metabolismo celular, respostas à hipóxia e estresse oxidativo (DITCH & PAULL, 2012).

Os sinais que, de maneira crucial, levam à célula a divisão celular são controlados por mudanças na concentração intracelular e atividade de dois grupos de proteínas. O primeiro são as quinases proteicas dependentes das ciclinas (CDK). A segunda família de proteínas são as ciclinas. Estas se unem a CDKs e as ativam, formando o conjunto CDK-ciclina. A ativação da CDK e a desativação destes complexos são de suma importância para o ciclo celular. Os complexos CDK-ciclina fosforilam um número de substratos protéicos envolvidos na duplicação do DNA, formação do fuso mitótico entre outros eventos do ciclo celular (ROSSI, 1999).

Mecanismos similares foram demonstrados na atividade de células cancerígenas do tipo melanoma em diversas linhagens (KAUFFMANN, et al., 2007), glioma maligno e melanoma metastático (EICH, 2013), sendo que neste último o tratamento utilizado com temozolomida (TMZ) apresentou sucesso por ativar a via ATM e induzir apoptose através da fosforilação de alvos como a histona 2AX, CHK1 e CHK2, corroborando os resultados do

presente estudo, onde a ativação da via ATM induziu a subexpressão de c-Myc, além da modulação de TP53.

Desta forma pode-se dizer, pela primeira vez na literatura, que a RH teve ação na fosforilação da ATM levando a subexpressão de c-Myc, ou seja, inibição da proliferação tumoral; modulando a TP53, com indução de morte tumoral por apoptose, e consequente redução do volume tumoral, em especial quando utilizada de maneira profilática. Estudos clínicos deverão ser executados para a real apreciação dos resultados. Esperando-se que a RH possa ser utilizada uma potencial droga antitumoral, com ação na via ATM, ou seja, não apenas no CCR como também em outras neoplasias dependentes desta via.

Desta forma pode-se dizer, pela primeira vez na literatura, que a RH teve ação na fosforilação da ATM levando a subexpressão de c-Myc, ou seja, inibição da proliferação tumoral, modulação da TP53 com indução de morte tumoral por apoptose, com consequente redução do volume tumoral, em especial quando utilizada de maneira profilática. Estudos clínicos deverão ser executados para a real apreciação dos resultados. Esperando-se que a RH possa ser utilizada uma potencial droga antitumoral, com ação na via ATM, ou seja, não apenas no CCR como também em outras neoplasias dependentes desta via.

5. CONCLUSÃO

Ocorreu modificação da via ATM com inibição do checkpoint S/G2, subexpressão de c-Myc e modulação da TP53 pela rutina hidrolisada (RH) no adenocarcinoma colorretal.

REFERÊNCIAS

AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013. Disponível em: < <https://www.cancer.org/>>. Acessado em: 02/06/2017.

ANAZETTI M.C.; MELO P.S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**. v. 1, n. 1, p. 37-58, jan./jun. 2007.

BAI L.; ZHU W.G. p53:Structure,Function and Therapeutic Applications. **Med Union Press**, 2006.

BENNETZEN M.V.et al. Site-specific phosphorylation dynamics of the nuclear proteome during the DNA damage response. **Mol Cell Proteomics**. 2010 Jun; 9(6):1314-23.

BENSIMON A. et al. ATM-dependent and -independent dynamics of the nuclear phosphoproteome after DNA damage. **Sci Signal**. 2010 Dec 7;3(151):rs3.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quim. Nova**, v.29, n.6, p.1340-1344, 2006.

COTTI G.C.C. et al. Genética do câncer colorretal. **Rev Med**, São Paulo, 2000 abr./dez.;79(2/4):45-64.

CRESPY V. et al. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. **Agric Food Chem**. 2002; 50(3): 618-21.

DE ARAÚJO M.E. et al. Enzymatic de-glycosylation of rutin improves its antioxidant and antiproliferative activities. **Food chemistry**. 2013;141(1): 266-73.

DESCHNER E.E. et al. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. **Carcinogenesis**. 1991;12(7):1193-6.

DITCH S.; PAULL T.T. The ATM protein kinase and cellular redox signaling: beyond the DNA damage response. **Trends Biochem Sci**. 2012;37(1):15-22.

EICH M. et al. Contribution of ATM and ATR to the resistance of glioblastoma and malignant melanoma cells to the methylating anticancer drug temozolomide. **Mol Cancer Ther**. 2013 Nov;12(11):2529-40.

EVAN, G.I. et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. **Cell Press**. 1992; Apr 3;69(1):119-28.

FARIA, M.H.G.; RABENHORST, S.H.B., Impacto do oncogene c-Myc no câncer. **Revista brasileira de Cancerologia**. 2006; 52(2): 165-171.

GRIVICICH I.; REGNER A.; DA ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de Cancerologia**, 2007.

GUERRA, E.N.S. et al. Expressão imunoistoquímica da ciclina D1 e do p16 em carcinoma epidermóide de boca: correlação com sistema TNM e localização. **Revista Brasileira de Cancerologia** 2005; 51(1): 31-37.

GUERRA, M. R. et al. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Rev Bras de Cancerologia**. vol.51(3), p. 227-234, 2005.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol Ther**. 2002;96:67-202.

HOPKIN K; BRAY D.; ALBERT B. **Fundamentos da Biologia Celular**. 3ª Ed. 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, Ministério da saúde 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dmdc/2016/numeros-cancer-brasil.asp>>; Acessado em 02/06/17.

ISHIKAWA T. et al. Metabolome analysis of response to oxidative stress in rice suspension cells overexpressing cell death suppressor Bax inhibitor-1. **Plant Cell Physiol**. 2010;51(1):920.

KAUFMANN, W. K. et al. Defective Cell Cycle Checkpoint Functions in Melanoma Are Associated with Altered Patterns of Gene Expression. **J. Invest Dermatol**. vol. 128, n.1, p.175-187, 2007.

KLUMB C.E.; CAVALCANTI J.G.B. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. **Rev. Bras. Hematol.** vol.24, n.2, pp.111-125. ISSN 1516-8484, 2002.

KOCHER.S. et al. ATM is required for the repair of Topotecan-induced replication associated double-strand breaks. **Radiother Oncol.** 2013 Sep;108(3):409-14. 2013.06.024.

LESLIE A. et al. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. **Br J Surg.** 2002 Jul;89(7):845-60.

LIPKIN M. Update of preclinical and human studies of calcium and colon cancer prevention. **World J Gastroenterol.** 1999;5(6):461-464.

LUTZ W.; LEON J.; EILERS M. Contributions of Myc to tumorigenesis. **Biochim Biophys Acta.** 2002;1602:61-71.

MARTINEZ, C. A. R. et al. Influência da localização do tumor na expressão tecidual da proteína p53 em doentes com câncer colorretal. Estudo de 100 casos. **Rev. Col. Bras. Cir.**, 35(4), 235–243, 2008.

MATSUOKA M. et al. The frequency of drug resistance mutations in Mycobacterium leprae isolates in untreated and relapsed leprosy patients from Myanmar, Indonesia and the Philippines. **Lepr Rev.** 2007; 78(4):343-52.

MOTOYAMA K. et al. Over-and under-expressed micro RNAs in human colorectal cancer. **Int J Oncol.** 2009;34(4):1069-75.

NIJVELDT, R.J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr.** 2001; 74:418-425.

OREN M. Decision making by p53: life, death and cancer. **Cell Death Differ.** 2003; 10(4):431-42.

ORFALI G.D. et al. Review of anticancer mechanisms of isoquercitin. **World J Clin Oncol.** 2016 Apr 10;7(2):189-99. doi: 10.5306/wjco.v7.i2.189.

PANTELOURIS E.M. Absence of thymus in a mouse mutant. **Nature.** 1968;217(5126):3701.

PECORINO, L. **Molecular Biology of Cancer - Mechanisms, Targets and Therapeutics.** 2.ed. New York: Oxford University Press, 2008. p.

PEREIRA M.A. et al. Effects of the phytochemicals, curcumin and quercetin, upon azoxymethane-induced colon cancer and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary cancer in rats. **Carcinogenesis.** 1996;17(6):1305-11.

PRIOLLI D.G. et al. A novel model of distal colon cancer in athymic mice. **Acta Cir Bras.** 2011; 27(6): 355-60.

PRIOLLI D.G. et al. Microenvironment influence on human colon adenocarcinoma phenotypes and matrix metalloproteinase-2, p53 and β -catenin tumor expressions from identical monoclonal cell tumor in the orthotopic model in athymic nude rats. **Scand Journal of Gastroenterol.** 2014; 49(3): 309-16.

PRIOLLI D.G. et al. Oxidative DNA damage and β -catenin expression in colorectal cancer evolution. **Int J Colorectal Dis.** 2013; 28(5): 713-22.

RIBEIRO M.L. et al. Analysis of Oxidative DNA Damage in Patients with Colorectal Cancer. **Clinical Colorectal Cancer.** 2008;7(4):267-272.

RICE-EVANS C.A.; MILLER, N.J. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. **Biochem Soc Trans.** 1996;24:790-795.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. **Biochem Soc Trans.** 1996; 24:790-795.

ROSSI, B.M.; PINHO, M. Genética e biologia molecular para o cirurgião. São Paulo, SP: Lemar, 1999. xxi, 301 p. ISBN 85-86652-05-9.

RYGAARD J.; POVLSEN C.O. Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. **Acta Pathol Microbiol Scand.** 1969;77(4):758-60.

RYGAARD K. et al. Abnormalities in structure and expression of the retinoblastoma gene in small cell lung cancer cell lines and xenografts in nude mice. **Cancer Res.** 1990;50(17):53127.

SCALISE J.R. et al. DNA Damage Is a Potential Marker for TP53 Mutation in Colorectal Carcinogenesis. **Journal of Gastrointestinal Cancer.** December 2016, Volume 47, Issue 4, pp 409–416.

SEYOUM A.; ASRES K.; EL-FIKY F.K. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Phytochemistry.** 2006; 67(18):2058-70.

SILVA M.P.N. Anorexia-cachexia syndrome in cancer patients. **Rev Bras de Cancer.** 2006; 52(1): 59-7.

UTESCH D. et al. Evaluation of the potential in vivo genotoxicity of quercetin. **Mutat Res.** 2008; 654(1):38-44.

VAN GENT D.C.; HOEIJMAKERS J.H.; KANAAR R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. **Nat Rev Genet.** 2001; 2(3):196-206.

YANG K. et al. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. **Carcinogenesis.** 2000; 21(9):1655-60.

YOUN H. et al. Quercetin Potentiates Apoptosis by Inhibiting Nuclear Factor-kappaB Signaling in H460 Lung Cancer Cells. **Biol. Pharm. Bull.** 36(6) 944–951 (2013).