

JOANA DUARTE GABRIEL

**IMPACTO DE ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS
ALIMENTARES NA PROGRESSÃO DO CANCRO
RENAL**

Orientadora: Professora Doutora Ana Sofia Fernandes

Co-orientador: Professor Doutor João Guilherme Costa

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2021

JOANA DUARTE GABRIEL

**O IMPACTO DE ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS
ALIMENTARES NA PROGRESSÃO DO CANCRO
RENAL**

Dissertação defendida em provas públicas na
Universidade Lusófona de Humanidades e
Tecnologias, no dia 27/01/2022, perante o Júri,
nomeado pelo Despacho nº360/2021, de 19 de
janeiro, com a seguinte composição:

Presidente:

Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente:

Prof.^a Doutora Regina Menezes

Orientadora:

Prof.^a Doutora Ana Sofia Fernandes

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2021

Agradecimentos

Se hoje estou a escrever e apresentar esta dissertação é porque os meus pais o tornaram possível e, por isso, não posso deixar de iniciar esta página a agradecer-lhes... agradecer-lhes por todo o esforço que fizeram e por toda a força que me deram para que me pudesse formar na área que desejava e sentir-me realizada profissionalmente.

Os agradecimentos não terminam aqui pois também sinto a necessidade de demonstrar a minha gratidão à Professora Ana Sofia Fernandes e ao Professor João Guilherme Costa pelo acompanhamento imprescindível na realização deste projeto, mas sobretudo por me terem passado, de forma apelativa, tantos conhecimentos fundamentais, principalmente na Unidade Curricular de Farmacologia, para ser uma grande, assim desejo, farmacêutica e por terem despertado ainda mais a vaidade que sinto por ter esta profissão.

O meu obrigada à Íris Guerreiro e à Rita Caparica por todo o tempo dispensado e conhecimento partilhado ao longo do projeto, nem ao fim de semana se livravam das minhas perguntas!

Professora Catarina Leite, também a ela quero deixar uma palavra, que pela sua criatividade e vontade de inovar os métodos pedagógicos conseguiu despertar em mim um certo gosto por Unidades Curriculares que nada me diziam. O estudo para as frequências tornou-se tão mais fácil! Nunca esquecerei o seu carinho e sensibilidade.

Ricardo, o teu apoio ao longo dos 5 anos foram indispensáveis. Obrigada a ti também por me teres acompanhado, por toda a companhia que me fazias no estudo, por todas as lágrimas que limpaste quando achava que não ia conseguir terminar alguma cadeira e, principalmente, por acreditares em mim! Agradeço-te a ti, ao Pedro e à Mariana por festejarem comigo, como se fosse um grande feito, a aprovação a cadeiras que julgava nunca conseguir terminar.

Para terminar, agradeço à Beatriz, ao Duarte, à Jéssica e ao Miguel por terem feito parte deste percurso. Beatriz, obrigada por todas as palavras amigas e por me fazeres ter motivação para mim e para ti para estudar, que difícil era às vezes; Duarte, não sei se devia ser um agradecimento ou um puxão de orelhas, mas obrigada por destabilizares o estudo de grupo, sempre tão bem-disposto e brincalhão conseguias desanuviar a tensão do estudo; Jéssica, agradeço-te pelo equilíbrio que trazias ao estudo em grupo. Se o Duarte nos desconcentrava, eras tu que passado 5 minutos dizia “meninos, temos que estudar” e era este equilíbrio que tornava o meu estudo produtivo. Este equilíbrio e as perguntas que fazíamos para explicarmos a matéria uma à outra. Miguel, o meu braço direito, o meu companheiro de estudo às 7h da manhã e a pessoa que mais me enervava porque, mesmo a estudar em cima do joelho, horas antes da frequência me chamava à atenção e explicava coisas que não tinha estudado.

Resumo

Os compostos fenólicos, compostos bioativos naturais, têm sido amplamente estudados como potenciais agentes anticancerígenos devido às suas capacidades para modular mecanismos redox e inflamatórios. No entanto é necessário realizar estudos de forma a corroborar a ação anticancerígena destes compostos e, ainda, determinar as concentrações a que estes exercem efeito.

O presente trabalho tem como objetivo a avaliação da citotoxicidade in vitro dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico em células renais tumorais humanas (786-O).

Neste estudo avaliou-se a citotoxicidade de dois compostos fenólicos, os ácidos *p*-cumárico e ferúlico, a concentrações de 10 μ M e 20 μ M, isoladamente e em combinação com a cisplatina, nas células 786-O. Esta avaliação foi feita pelo método colorimétrico Cristal Violeta.

Os ácidos *p*-cumárico e ferúlico a concentrações de 10 μ M não produziram efeito citotóxico na linha celular utilizada. No entanto, a 20 μ M revelaram uma possível atividade antitumoral, ainda que pouco significativa, a qual foi corroborada na presença de cisplatina. Este estudo deverá continuar a ser aprofundado, de forma a considerar futuramente os benefícios da combinação de compostos fenólicos como agentes anticancerígenos.

Abstract

Phenolic compounds, natural bioactive compounds, have been widely studied as potential anticancer agents due to their ability to modulate redox and inflammatory pathways. However, it is necessary to carry out studies in order to corroborate the anticancer action of these compounds and also to determine the concentrations at which they exert an effect.

The present work aims to evaluate the in vitro cytotoxicity of *p*-coumaric and ferulic acids in human renal tumor cells (786-O).

In this study, was evaluated the cytotoxicity of two phenolic compounds, *p*-coumaric and ferulic acids, at concentrations of 10 μ M and 20 μ M, both isolated and combined with cisplatin, in 786-O cells. This evaluation was carried out by using the Violet Crystal colorimetric method.

The *p*-coumaric and ferulic acids at concentrations of 10 μ M did not produce cytotoxic effect in the cell line used. However, at 20 μ M they revealed a possible antitumoral activity, although not very significant, which was corroborated in the presence of cisplatin. This study should continue to be deepened, in order to consider the benefits of the combination of phenolic compounds as anti-cancer agents in the future.

Lista de abreviaturas

786-O – Linhagem de adenocarcinoma humano

CCR – Carcinoma de células renais

ccCCR – Carcinoma de células renais de células claras

pCCR – Carcinoma de células renais papilar

chCCR – Carcinoma de células renais cromóforo

VHL – Von Hippel-Lindau

FH – Fumarato-Hidratase

BHD – Síndrome de Hogg Dubé

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR-1 – Recetor 1 do fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR-2 – Recetor 2 do fator de crescimento endotelial vascular

PDGFR – Fator de crescimento derivado de plaquetas

c-KIT – Recetor do fator de células-tronco

RET – Recetor codificado pelo proto-oncogene RET

mTOR – Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

DNA – Ácido desoxirribonucleico

SOD – Superóxido dismutase

GPx – Glutathione peroxidase

CAT – Catalase

CoQ10 – Coenzima Q10

Caco2 – Linhagem celular imortalizada de células de adenocarcinoma colorretal humano

MCT – Ácido Monocarboxílico

DMSO – Dimetilsulfóxido

FBS – Soro Bovino Fetal

PBS – Tampão fosfato salino

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

CV – Cristal Violeta

Cisp – Cisplatina

Ác. – Ácido

Fer. – Ferúlico

p-cum. – *p*-cumárico

Ra – Replicado A

Rb – Replicado B

Rc – Replicado C

SD – Desvio-padrão

Índice

Introdução.....	9
Enquadramento Teórico.....	11
1. Cancro renal	11
2. Citotóxicos.....	17
2.1. Cisplatina	18
3. Antioxidantes alimentares	21
3.1 Ácidos hidroxicinâmicos	22
Materiais e métodos	28
Materiais	28
Métodos	28
Resultados e discussão	31
Conclusão	35
Bibliografia	36

Índice de Figuras

Figura 1 - Incidência dos diferentes tipos de cancro	11
Figura 2 - Incidência de CCR em diversas áreas do globo, consoante género.....	12
Figura 3 - Estrutura química da cisplatina	18
Figura 4 - Estruturas químicas dos ácidos <i>p</i> -cumárico (A) e ferúlico (B).....	23
Figura 5 - Biossíntese dos ácidos ferúlico e <i>p</i> -cumárico.....	26
Figura 6 - Viabilidade celular das células 786-O após 48h expostas aos ácidos <i>p</i> -cumárico e ferúlico comparando aos controlos negativo e positivo (primeiro ensaio).....	32
Figura 7 - Viabilidade celular das células 786-O após 48h expostas à cisplatina, aos ácidos <i>p</i> -cumárico e ferúlico e conjugados comparando aos controlos negativo e positivo (segundo ensaio)	33

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Exemplos de inibidores do recetor de VEGF e da tirosina quinase	15
Tabela 2 - Classificação dos principais grupos de antitumorais.....	17
Tabela 3 - Teor dos ácidos <i>p</i> -cumárico e ferúlico em alimentos.....	23
Tabela 4 - Teores de ácido <i>p</i> -cumárico na urina de humanos	25
Tabela 5 - Teores de ácido ferúlico na urina de humanos	25
Tabela 6 - Precursores e metabolitos do ácido <i>p</i> -cumárico e do ácido ferúlico	26
Tabela 7 - Tratamento dos resultados do ensaio A do primeiro estudo	31
Tabela 8 - Tratamento dos resultados do ensaio B do primeiro estudo.....	31
Tabela 9 – Viabilidade celular, média e desvio-padrão do primeiro estudo	31
Tabela 10 - Médias da viabilidade celular (%) sem branco e desvio-padrão do segundo estudo	32

Introdução

O cancro é uma das maiores causas de mortalidade, a nível global (Reddy, Odhav, & Bhoola, 2003). No caso do carcinoma das células renais, o mesmo assume o décimo quarto lugar na tabela de incidência dos diferentes tipos de cancro, com 431 288 novos casos, e o décimo quinto lugar na tabela de mortalidade dos diferentes tipos de cancro, com 179 368 mortes, no ano de 2020 (International Agency for Research on Cancer (World Health Organization), 2020).

Em 2025, as previsões para a incidência e mortalidade do cancro renal são de 475 485 novos casos e 203 535 mortes. Desta forma, estima-se que em 5 anos haja o aumento de 432 357 novos casos e 44 197 mortes (International Agency for Research on Cancer (World Health Organization), 2020).

O facto de cada tipo de cancro ter características próprias conduz à procura incessante de novas abordagens para prevenção, diagnóstico e tratamento (Fitzmaurice et al., 2018).

As abordagens terapêuticas atualmente conhecidas, em alguns casos, apenas proporcionam o aumento da esperança de vida dos doentes oncológicos e estão geralmente associadas a efeitos adversos graves. Desta forma torna-se indispensável a investigação de novos métodos de atuação nesta doença, quer a nível terapêutico, quer a nível preventivo (Reddy et al., 2003).

A crescente taxa de incidência de carcinoma das células renais desperta cada vez mais a necessidade de investigar novas terapias para o tratamento e prevenção desta doença e, desta forma, diminuir a sua taxa de mortalidade. A importância de descobrir novas terapias centra-se, essencialmente, na obtenção de maior eficácia, mas também na redução de efeitos adversos ou outras complicações associadas a tratamentos já conhecidos.

Desta forma surge o estudo do **impacto de ácidos hidroxicinâmicos alimentares na progressão do cancro renal** que, para além de se focar na solução de uma doença cada vez mais comum, procura estratégias baseadas na alimentação que possam ter um impacto benéfico nestes doentes.

O presente estudo explorou os efeitos citotóxicos dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico, a concentrações de 10 μ M e 20 μ M, em células tumorais renais humanas (786-O), durante 48h.

A escolha dos compostos em estudo foi apoiada por estudos anteriores, nomeadamente de farmacocinética, que comprovam que os ácidos ferúlico e *p*-cumárico atingem os rins e em concentrações apreciáveis.

Enquadramento Teórico

1. Cancro renal

As células epiteliais dos túbulos renais podem originar um tumor designado por carcinoma de células renais (CCR) (Wang et al., 2019), o qual é mais prevalente nos homens do que nas mulheres (Mancini, Righetto, & Baggio, 2020). O risco de os homens contraírem CCR é, por estimativa, 1,85 vezes maior do que para as mulheres, principalmente na faixa etária dos 40-60 anos, sendo que esta desigualdade tende a diminuir a partir dos 70 anos. A diferença do risco, entre os géneros, de contrair a doença pode ser explicada pelo facto de as mulheres serem mais velhas do que os homens aquando do diagnóstico e evidencia a plausibilidade de as hormonas femininas, nomeadamente os estrogénios, terem um papel protetor (Mancini et al., 2020).

O carcinoma de células renais é o décimo quarto cancro mais comum (Figura 1) e a sua incidência é diferente para cada área do globo (Figura 2), sendo maior nos países desenvolvidos. A razão desta diferença ainda não é clara, mas cada vez mais se correlaciona a exposições genómicas, ocupacionais e ambientais (International Agency for Research on Cancer (World Health Organization), 2020).

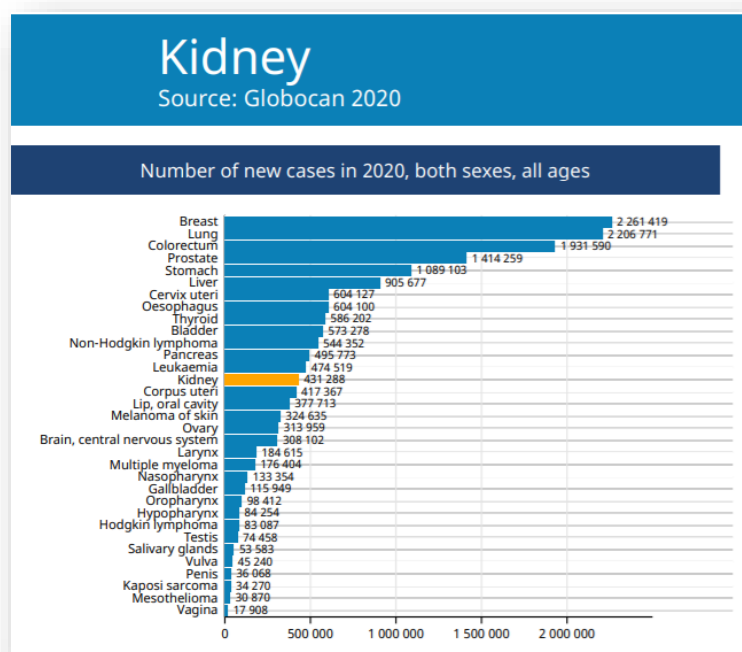


Figura 1 - Incidência dos diferentes tipos de cancro (Reproduzido de (International Agency for Research on Cancer (World Health Organization), 2020)).

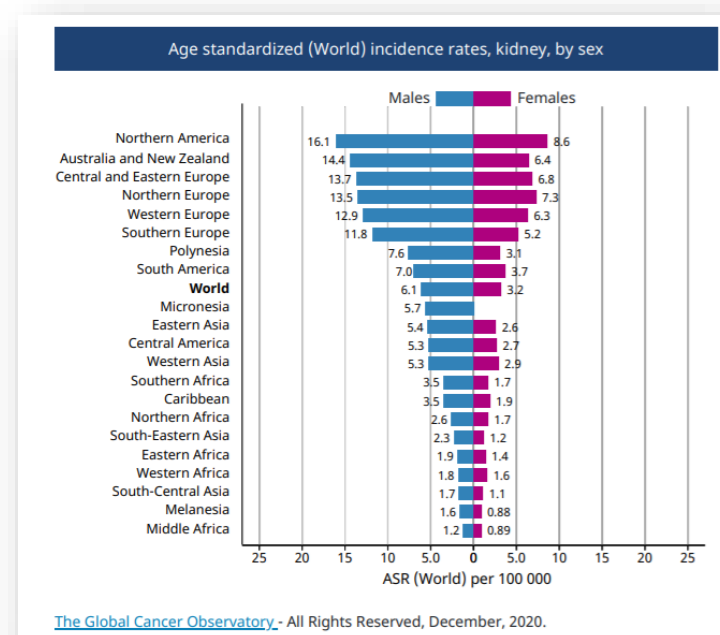


Figura 2 - Incidência de CCR em diversas áreas do globo, consoante género (Reproduzido de (International Agency for Research on Cancer (World Health Organization), 2020)).

Os principais fatores de risco para o CCR podem ter diversas origens: estilos de vida, como por exemplo, os hábitos tabágicos, a obesidade e o consumo de álcool; agentes químicos, os quais são comuns nas exposições ocupacionais, como por exemplo o tricloroetileno e o ácido aristolóquico; outras patologias coexistentes, como por exemplo, a Hipertensão Arterial, a Diabetes Mellitus e a Doença Renal Cística; e a própria genética de cada indivíduo (Safiri et al., 2020). No caso da exposição ao tricloroetileno, a qual é mais comum em mecânicos, lavandarias, fabricantes de cloreto de polivinilo e de tabaco, a Agência Internacional de Pesquisa do Cancro já considera esta substância química como um cancerígeno, classificado no Grupo 1, e vincula-o ao cancro renal (Gray & Harris, 2019).

Este tipo de cancro, o CCR, é reconhecido por diversas histologias, respostas terapêuticas e origem por múltiplos genes. Atualmente são conhecidos 17 genes distintos que podem estar associados a um maior risco de CCR e sabe-se que a ocorrência de mutações nos mesmos acarreta dificuldades para as células, ao nível da sua capacidade para refutar a mudanças no oxigénio, ferro, nutrientes e energia (Linehan et al., 2019).

O CCR pode ser classificado, consoante as suas particularidades citogenéticas e genéticas, em vários subtipos patológicos, sendo que os principais são o carcinoma de

células claras (ccCCR), o carcinoma papilar (pCCR), o qual é classificado no tipo I ou tipo II, e o carcinoma cromóforo (chCCR). O subtipo mais comum é o carcinoma de células renais de células claras (ccCCR), seguido do pCCR e, por fim, o chCCR uma vez que representam, respetivamente, aproximadamente 70%, 10-15% e 5% dos CCR (Mancini et al., 2020).

A particularidade genética correlacionada ao CCR de células claras é a ausência ou mutação de um gene supressor de tumores, o Von Hippel-Lindau (VHL), responsável por 60-90% dos casos pontuais. A ausência deste gene estimula os genes implicados no *feedback* à hipoxia que, por conseguinte, aumenta a atividade dos genes responsáveis pela angiogénese e metastização ((Jonasch, Gao, & Rathmell, 2014), (Pfaffenroth & Linehan, 2008)).

A particularidade genética do CCR papilar é a relação a duas síndromes hereditárias causadas por mutações no proto-oncogene *MET* e no gene da enzima fumarato-hidratase (FH), uma enzima presente no ciclo de Krebs e que funciona como supressora de tumores. Os indivíduos que sofrem mutações no proto-oncogene *MET* ficam mais propensos ao CCR papilar tipo I enquanto que as mutações no gene fumarato-hidratase predis põem ao CCR papilar tipo II, também designado por cancro de células renais e leiomiomatose hereditária ((Jonasch et al., 2014), (Pfaffenroth & Linehan, 2008)).

Quanto ao CCR cromóforo, a sua particularidade genética estreita-se às perdas cromossómicas, inclusive de cromossomas inteiros, como por exemplo, os cromossomas 1, 2, 6, 10, 13, 17, 21 e 24, ainda que as consequências destas perdas não sejam bem compreendidas (Jonasch et al., 2014). O presente subtipo de carcinoma de células renais, tal como o subtipo CCR de células claras, pode, em alguns casos, advir de pacientes com a Síndrome de Hogg Dubé (BHD) (Pfaffenroth & Linehan, 2008).

Para além do carcinoma das células renais existem outros tumores que, apesar de raros, afetam o sistema renal e que, muitas vezes, são classificados incorretamente em subtipos do CCR, como é o caso do carcinoma do ducto coletor, de tumores uroteliais e do carcinoma medular renal (Jonasch et al., 2014).

O diagnóstico de CCR está a tornar-se mais fácil uma vez que as radiografias abdominais são feitas com mais frequência (Jonasch et al., 2014), no entanto, atualmente, aproximadamente 30% dos doentes detetam esta patologia numa fase mais avançada, na

fase metastática (Luo et al., 2019). O atraso no diagnóstico da doença deve-se, muitas vezes, ao facto de que a maioria dos doentes oncológicos com CCR são assintomáticos e o seu diagnóstico é feito acidentalmente, aquando da realização de exames de imagem abdominal por razões não relacionadas (Gray & Harris, 2019).

O carcinoma das células renais, em fase avançada, pode manifestar-se com dores no flanco, massas abdominais palpáveis, varicocele, edema bilateral nas pernas e outros sintomas mais comuns, como por exemplo, febre, perda de peso, tosse, adenopatia e dores ósseas. Para além destes sintomas, sabe-se que cerca de 20% dos doentes sofrem de síndromes paraneoplásicas, as quais são evidenciadas pela hipertensão, hipercalcemia e policitemia (Gray & Harris, 2019).

No que diz respeito ao tratamento desta patologia, o mesmo depende da fase em que é diagnosticado, isto é, se o CCR é identificado através de massas renais localizadas ou se já se trata da fase metastática. Se o CCR for diagnosticado através de massas renais localizadas, a terapia passa pela sua remoção através intervenções cirúrgicas e pela sua vigilância ativa (Ditri, 2017). Assim sendo, as massas renais localizadas podem ser tratadas por ablação térmica, ablação por radiofrequência, nefrectomia parcial, nefrectomia radical e cirurgia ((Ditri, 2017), (Gill, 2009)).

A principal vantagem da nefrectomia radical é a capacidade de ser utilizada em massas com diversos tamanhos, independentemente do seu estágio clínico. Já a nefrectomia parcial é mais utilizada, geralmente, em massas renais com tamanho inferior a 7 cm de diâmetro, o que corresponde ao estágio clínico T1 (Ditri, 2017).

A cirurgia para pequenas massas renais, ainda que seja uma técnica invasiva, evidencia respostas promissoras uma vez que se estima que 97% dos pacientes aumentam a sua sobrevida em 5 anos (Gill, 2009).

A ablação por radiofrequência e a crioablação apresentam-se como alternativa à cirurgia para pequenas massas renais uma vez que são procedimentos menos invasivos e o seu sucesso é simétrico à cirurgia. Por estas razões, as técnicas de ablação têm-se tornado a primeira opção para pequenas massas renais simples (Gill, 2009).

Se na terapia de massas renais localizadas se optar por utilizar a ablação térmica, o procedimento é feito por laparoscopia ou percutâneo. Este método de tratamento abrange a crioablação e a ablação por radiofrequência (Ditri, 2017).

A vigilância ativa é sempre importante no seguimento de um doente oncológico, mas é ainda mais importante em pacientes cujo diagnóstico seja em estágio inicial, com massas renais de tamanhos reduzidos, inferiores a 4 cm, baixa probabilidade de malefícios agressivos ou expectativa de vida é limitada (Ditri, 2017). No caso do CCR metastático, a terapia de primeira linha é a terapia sistémica (Zhang et al., 2019).

Como referido anteriormente, o diagnóstico de carcinoma de células renais em fase metastática acontece em cerca de 30% dos pacientes. O tratamento desta patologia enfrenta diversos desafios devido à resistência que as células cancerígenas adquirem aos medicamentos (Gray & Harris, 2019).

Atualmente, a terapia sistémica para o CCR metastático engloba os inibidores do recetor VEGF, inibidores da tirosina quinase e imunoterapias. Se o doente ainda não foi alvo de intervenções medicamentosas, o tratamento pode ser feito através de uma associação de inibidores do recetor de VEGF ou inibidores da tirosina quinase com interferão- α (Gray & Harris, 2019) e grandes concentrações de interleucina 2 (Wang et al., 2019). A taxa de resposta dos dois últimos fármacos situa-se entre os 10% a 20% e correspondem a remissões completas com maior durabilidade (Pfaffenroth & Linehan, 2008). Posteriormente, se o doente evidenciar progressão da patologia, mesmo com o tratamento, este passa a ser feito em associação com inibidores do recetor de VEGF ou inibidores da tirosina quinase com imunoterapia e um imunossupressor. A imunoterapia é feita com Nivolumab (Opdivo) e a imunossupressão com Everolimus (Gray & Harris, 2019), um inibidor do mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) (Semeniuk-Wojtaś, Lubas, Stec, Szczylik, & Niemczyk, 2016).

Tabela 1 - Exemplos de inibidores do recetor de VEGF e da tirosina quinase (adaptado de (Gray & Harris, 2019), (Semeniuk-Wojtaś et al., 2016)).

Substância ativa	Nome comercial	Alvo terapêutico (Semeniuk-Wojtaś et al., 2016)
Sunitinib	Sutent	Tirosina quinase (VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR, c-KIT, RET)
Pazopanib	Votrient	Tirosina quinase (VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR, c-KIT, RET)
Sorafenib	Nexavar	Tirosina quinase (VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR, c-KIT, RET)
Bevacizumab	Avastin	VEGF

A terapia sistêmica, anteriormente referida, melhora efetivamente a esperança de vida dos doentes com CCR, no entanto, a terapêutica deste cancro é ainda um desafio devido à toxicidade e aos efeitos colaterais dos medicamentos, bem como à sensibilidade de cada paciente aos diversos fármacos ((Wang et al., 2019), (Luo et al., 2019)). Os efeitos tóxicos mais recorrentes dos inibidores do recetor VEGF são os transtornos gastrointestinais e cutâneos, fadiga e hipertensão (Semeniuk-Wojtaś et al., 2016). No caso dos carcinomas graves, os mesmos desenvolvem resistências aos medicamentos surgindo a necessidade de substituir os medicamentos utilizados chegando a um ponto em que os doentes ficam sem fármacos eficazes (Zhang et al., 2019). Por todos estes obstáculos, a pesquisa de novos alvos terapêuticos e biomarcadores para esta patologia é cada vez mais importante ((Wang et al., 2019), (Luo et al., 2019)) embora, no caso da imunoterapia estudada atualmente, o sucesso seja de aproximadamente 10% (Zhang et al., 2019).

A pesquisa de novos alvos terapêuticos torna-se mais fácil ao nível que o conhecimento sobre os mecanismos patológicos do CCR vai aumentando. O conhecimento, já existente, sobre o CCR proporcionou a conceção de fármacos que inibem a angiogénese através do VEGF - inibição direta, e da inibição da mTOR - inibição indireta (Wei, Wang, Ye, & Chen, 2018).

2. Citotóxicos

Os antineoplásicos empregues na terapia do cancro podem ser classificados em agentes “ciclo celular específicos” e agentes “ciclo celular não específicos”, sendo este último grupo de fármacos o mais frequentemente utilizado. Além desta classificação, cada um dos grupos é, posteriormente, dividido em subgrupos (Tabela 2) (Almeida et al., 2005).

Tabela 2 - Classificação dos principais grupos de antitumorais (Adaptado de (Almeida et al., 2005)).

Fármacos ciclo-celular específico	Fármacos ciclo-celular não específicos
Anti-metabolitos	Antibióticos
Alcalóides de plantas	Alquilantes de complexos de coordenação de Platina
	Outros Agentes alquilantes

Os antineoplásicos podem ser classificados, de acordo com a interação que têm com o DNA, em inibidores da síntese de nucleotídeos, inibidores da DNA-girase e agentes que atuam diretamente no DNA (Almeida et al., 2005).

Os principais representantes dos agentes que atuam diretamente no DNA são os agentes alquilantes, os quais podem ser subclassificados em mustardas, nitrosureias, compostos de platina e outros, como por exemplo, a bleomicina. No caso dos inibidores da síntese de nucleotídeos, os fármacos principais são os análogos das bases nitrogenadas, sendo eles os antifolatos, antipirimidinas e antipurinas. Por fim, os inibidores da DNA-girase estreitam-se, essencialmente, às antraciclinas (Almeida et al., 2005).

A terapia sistémica com citotóxicos, também designada quimioterapia citotóxica, começou a ser utilizada no tratamento de doenças oncológicas há mais de 60 anos. É um tratamento que se baseia, geralmente, na utilização de substâncias genotóxicas cujo alvo são as células com maior taxa de proliferação (Hans, Senarisoy, Bhaskar Naidu, & Timmins, 2020).

A ação dos agentes genotóxicos pode ser direta ou indireta, sendo exemplos, respetivamente, os fármacos à base de platina e os inibidores de topoisomerase (Hans et al., 2020).

O sucesso do tratamento com citotóxicos de ação direta no DNA torna-se difícil, uma vez que depende da lesão que os mesmos causam ao DNA e do tipo de células em

que se pretende atuar. Se o grau de lesão no DNA for reduzido, a célula estimula a sua reparação visando a suspensão do ciclo celular de forma a conservar o genoma e evitar a ocorrência de mutações e reduzir as hipóteses de cancerigénese. Por outro lado, se o grau de lesão no DNA for elevado, a célula inicia a morte celular para que as células mais lesadas sejam excluídas (Hans et al., 2020).

Os genes responsáveis pela reparação do DNA são expressos em maior quantidade em células cancerígenas, forma a fortalecer a reparação destas células, o que se pode converter numa desvantagem, uma vez que esta condição beneficia o processo de metastização. Esta é uma das formas pelas quais as células cancerígenas desenvolvem resistência aos agentes citotóxicos que outrora foram eficazes (Hans et al., 2020).

Os citotóxicos revelam benefícios na terapia do cancro, no entanto, estes fármacos, principalmente os agentes alquilantes, também podem causar danos nos tecidos não tumorais, devido à interação que têm com o DNA e ao stress oxidativo (Hans et al., 2020).

2.1. Cisplatina

A cisplatina, também designada por [(SP-4-2)-diaminodicloroplatina] (Makrilia, Syrigou, Kaklamanos, Manolopoulos, & Saif, 2010), é um citotóxico incluído nos compostos de coordenação com platina e, devido à sua capacidade para alquilar o DNA, é dos antineoplásicos mais utilizados na quimioterapia ao longo dos últimos 30 anos, embora tenha sido descoberta há mais de 150 anos (Almeida et al., 2005).

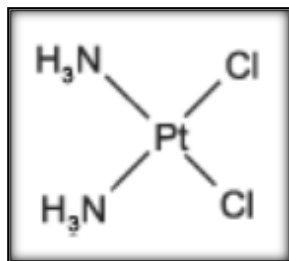


Figura 3 - Estrutura química da cisplatina (Reproduzido de (Almeida et al., 2005))

O principal mecanismo de ação da cisplatina é a alquilação que ocorre, preferencialmente, no N7 da Guanosina, uma base azotada do DNA, mas também pode formar ligações covalentes com a Adenosina e a Citosina. Desta forma pode concluir-se que a ação deste citotóxico está associada à inibição específica da síntese do DNA

(Almeida et al., 2005), ou seja, impede o aumento do número de células cancerígenas, tal como à indução de ruturas na dupla hélice do DNA, conduzindo à paragem do ciclo celular (Tserga et al., 2019).

A capacidade da cisplatina para se ligar ao DNA revelou-se benéfica para o combate contra o cancro (Almeida et al., 2005) uma vez que é o tratamento de primeira linha para diversos tipos de cancro metastático ou quando se pretende preservar algum órgão. A sua taxa de sucesso é de 6,5% no aumento de 5 anos de sobrevida (Rivelli, Mak, Martins, da Costa e Silva, & de Castro, 2015). Contudo, os benefícios desta utilização devem ser contrabalançados com os malefícios, dado que a cisplatina tem evidenciado toxicidade celular, uma vez que é capaz de causar mutações no DNA e alterar a ligação deste às proteínas (Almeida et al., 2005). Os principais efeitos tóxicos conhecidos são a nível neuronal, otorrino, emético e nefrológico (Makrilia et al., 2010), sendo a principal consequência a necrose tubular aguda (Zazuli et al., 2018).

Em termos de farmacocinética, a excreção da cisplatina ocorre, essencialmente, por via renal, pelo que é possível que esta se acumule nos túbulos renais (Crona et al., 2017). A taxa de excreção, ao fim de 48h, situa-se no intervalo de 27% a 50%. São estes dados farmacocinéticos que podem fundamentar a nefrotoxicidade, uma vez que os rins presenciam elevadas concentrações de cisplatina e os seus mecanismos de transporte são repetidamente alterados. As condições anteriormente referidas proporcionam transtornos intermédios à nefrotoxicidade, como por exemplo, a inflamação renal, o dano oxidativo e a morte celular programada (Zazuli et al., 2018).

A nefrotoxicidade associada à cisplatina dificulta a sua utilização de forma eficaz, visto que a eficácia deste citotóxico é dose-dependente e, por isso, a utilização de concentrações maiores potencia a sua ação, mas também aumenta os riscos do doente contrair efeitos nocivos para os rins. Além disso, sabe-se que mesmo após a descontinuação do tratamento com cisplatina, a platina pode ser detetada alguns anos mais tarde, o que aumenta, ainda mais, as inquietações relativas à sua nefrotoxicidade (Zazuli et al., 2018).

Os efeitos nefrotóxicos causados pela cisplatina foram demonstrados em estudos antecedentes e os mesmos revelaram que a nefrotoxicidade afeta cerca de 20% dos pacientes. A incidência nos idosos corresponde aproximadamente a 66%, enquanto que nas crianças ultrapassa os 70% (Zazuli et al., 2018), sendo os efeitos perceptíveis ao fim

de 10 dias de terapia (Crona et al., 2017). Todavia, a lesão do túbulo renal pode ser atenuada com a suplementação de magnésio, visando restabelecer a perda deste eletrólito causada pela cisplatina. A hidratação é também uma medida adjuvante na contenção das lesões renais, uma vez que o aumento da ingestão de líquidos promove o aumento de fluxo urinário e, por conseguinte, a excreção da cisplatina, levando à redução do período de circulação deste agente alquilante no túbulo proximal (Crona et al., 2017).

3. Antioxidantes alimentares

O stress oxidativo é causado pelo desequilíbrio entre a formação de radicais livres e componentes antioxidantes conduzindo ao dano oxidativo nas células, o qual pode resultar em doenças cardiovasculares, doenças degenerativas, diabetes e cancro. Pode conduzir, por exemplo, ao aumento da expressão de oncogenes (Sangsefidi, Yaghoubi, Hajiahmadi, & Hosseinzadeh, 2020), bem como à estimulação do envelhecimento (Baptista, Gonçalves, Bressan, & Pelúzio, 2018).

Além das doenças associadas ao stress oxidativo, este também está envolvido na estimulação de vias de sinalização celular, relacionadas com a proliferação, migração de células cancerígenas e angiogénese. As vias de sinalização celular são igualmente fulcrais na apoptose uma vez que podem combater a progressão e metastização do cancro, sendo este o motivo de se utilizarem terapias anti-neoplásicas que, entre outros mecanismos, atuem através do stress oxidativo, induzindo a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) para eliminar as células tumorais (Lee, Cai, Shu, & Nechuta, 2017).

As ROS, como por exemplo radicais superóxidos, hidroxilos e peróxidos de hidrogénio, e as espécies reativas de nitrogénio (Baptista et al., 2018), podem ser originados a partir dos mecanismos fisiológicos do organismo humano, como por exemplo, a produção de energia a nível mitocondrial, o metabolismo lipídico e inflamação (Melini, Melini, Luziatelli, Ficca, & Ruzzi, 2019).

O organismo humano está preparado fisiologicamente para combater o stress oxidativo, uma vez que possui enzimas capazes de eliminar ROS, ou pelo menos reduzir a sua concentração e quebrar a cadeia de formação de radicais (Sangsefidi et al., 2020). No caso dos sistemas enzimáticos responsáveis serem bloqueados pode haver acumulação de ROS e, por consequência, danos no DNA, proteínas e lípidos, conduzindo à lesão e morte celular (Hernández-Ruiz et al., 2019). As principais enzimas pertencentes ao sistema de defesa antioxidante são a superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPX) e a catalase (CAT) (Melini et al., 2019).

Os antioxidantes são moléculas, endógenas ou exógenas, que são capazes de neutralizar os radicais livres ao ceder-lhes um eletrão e, desta forma, torná-los mais estáveis. A reação que ocorre entre antioxidantes e radicais livres finaliza a cadeia de stress oxidativo que, por consequência, impede ou atrasa a lesão das células ou tecidos. Os tocoferóis, vitamina C, compostos fenólicos, a glutatona, o ubiquinol, o ácido úrico e

a coenzima Q10 são alguns dos exemplos de antioxidantes (Melini et al., 2019), sendo que muitos destes compostos podem ser obtidos a partir da dieta (Tonin, Steimbach, Wiens, Perlin, & Pontarolo, 2015).

Entre os antioxidantes naturais destacam-se ainda os polifenóis, que são obtidos através da dieta ao ingerir alimentos como frutas frescas e vegetais (Baptista et al., 2018).

3.1 Ácidos hidroxicinâmicos

A deficiência de compostos bioativos na dieta humana integra os fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como o cancro, doenças cardiovasculares e muitas outras (Oliveira & Bastos, 2011).

O papel fundamental dos compostos bioativos na dieta humana deve-se à sua capacidade de regular os sistemas de defesa antioxidante, anti-inflamatória e mutagénica, os quais são cruciais para evitar as doenças crônicas não transmissíveis (Oliveira & Bastos, 2011). Dietas ricas em compostos fenólicos, um exemplo de compostos bioativos, estão associadas à redução do risco de alguns cancros. Os mecanismos de ação das substâncias fenólicas têm vindo a ganhar destaque nos últimos anos, sendo alvo de muitos estudos. Os estudos mais recentes sugerem que estas substâncias são capazes de modular a atividade de diferentes enzimas como a telomerase, interagir com recetores e vias de transdução de sinais e, ainda, regular o ciclo celular (Oliveira & Bastos, 2011).

Os ácidos fenólicos são dos compostos mais abundantes nos alimentos e são constituídos por anéis aromáticos ligados a um grupo funcional hidroxilo. Os ácidos fenólicos podem dividir-se, de acordo com o número de anéis fenólicos e com os grupos funcionais, aos quais estão ligados, em dois grupos: os ácidos hidroxibenzoicos e os hidroxicinâmicos. Como exemplo dos ácidos hidroxicinâmicos temos o ácido *p*-cumárico e o ácido ferúlico (Figura 4), que nos alimentos podem ser encontrados na forma livre, mas principalmente na forma esterificada de ácido quínico, ácido tartárico ou carboidratos e derivados (Oliveira & Bastos, 2011).



Figura 4 - Estruturas químicas dos ácidos *p*-cumárico (A) e ferúlico (B) (reproduzida de ("PhytoHub," n.d.)).

A ingestão diária de ácidos hidroxicinâmicos é estimada em 211 mg por dia (Lafay & Gil-Izquierdo, 2008).

Os ácidos hidroxicinâmicos são encontrados em diversos alimentos, principalmente cereais, frutas e legumes, tal como em algumas bebidas (Oliveira & Bastos, 2011). No entanto, a concentração dos diversos ácidos hidroxicinâmicos nos alimentos não é equivalente (Lafay & Gil-Izquierdo, 2008). Por exemplo, o ácido ferúlico [ácido 3- (4-hidroxi-3-metoxifenil) prop-2-enóico] está presente em maiores concentrações no feijão branco, farelo de milho, farelo de trigo, beringela, beterraba, mirtilo e chocolate negro enquanto que o ácido *p*-cumárico [ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-propenóico] está presente em maiores concentrações nas azeitonas cruas, amendoins, ameixa, arando americano e arando europeu (Tabela 3). Considerando estes dados, estudos recentes afirmam ser possível um indivíduo ingerir 80-165 mg de ácido ferúlico numa refeição (Paiva, Goldbeck, Santos, & Squina, 2013).

Tabela 3 - Teor dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico em alimentos (adaptado de (Rothwell JA, Pérez-Jiménez J, Neveu V, Medina-Ramon A, M'Hiri N, Garcia Lobato P, Manach C, Knox K, Eisner R, Wishart D, 2013)).

Fonte		Teor	
		Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido ferúlico
Bebidas alcoólicas			
Cervejas	Cerveja normal	0,10 mg/ 100 ml	0,26 mg/ 100 ml
Licor	Noz	0,26 mg/ 100 ml	-
Vinhos	Vermelho	0,55 mg/ 100 ml	0,08 mg/ 100 ml
	Branco	0,15 mg/ 100 ml	0,09 mg/ 100 ml
	Rosé	0,13 mg/ 100 ml	-
Cereais e derivados			
Produtos de cereal	Pão, centeio, farinha integral	-	3,90 mg/ 100 g
Cereais	Milho, farinha refinada	0,33 mg/ 100 g	-
	Aveia, farinha grão integral	0,16 mg/ 100 g	0,19 mg/ 100 g
	Centeio, farinha integral	0,23 mg/ 100 g	0,45 mg/ ml
	Arroz refinado (branco)	0,11 mg/ 100 g	-
	Trigo comum, farinha refinada	-	8,08 mg/ 100 g
	Trigo duro, farinha refinada	-	14,11 mg/ 100 g
	Trigo duro, farinha grão integral	-	72,21 mg/ 100 g
Café e cacau			
Cacau-chocolate	Chocolate negro	-	24,00 mg/100g
Frutos e produtos de frutas			
Drupas secas	Ameixa	1,11 mg/ 100 g	-
Bagas	Arando americano	1,08 mg/ 100 g	0,81 mg/ 100 g
	Arando europeu	2,02 mg/ 100 g	-
	Arando vermelho	3,93 mg/ 100 g	-

	Framboesa amarela	4,30 mg/ 100 g	1,00 mg/ 100 g
	Morango	0,21 mg/ 100 g	-
Pomes	Maçã (sobremesa), inteira, crua	0,27 mg/ 100 g	0,07 mg/ 100 g
	Pêra descascada	0,18 mg/ 100 g	-
Bebidas não alcoólicas			
Sumos de frutas	Maçã (cidra), sumo concentrado	0,11 mg/ 100 ml	0,20 mg/ 100 ml
	Maçã (cidra), sumo puro	0,93 mg/ 100 ml	0,19 mg/ 100 ml
	Maçã (sobremesa), sumo puro	0,19 mg/ 100 ml	0,07 mg/ 100 ml
Temperos			
Ervas	Sálvia comum seca	4,95 mg/ 100 g	5,80 mg/ 100 g
	Tomilho comum seco	4,95 mg/ 100 g	5,65 mg/ 100 g
	Manjerona seca	2,40 mg/ 100 g	7,10 mg/ 100 g
	Oregão seco	5,75 mg/ 100 g	5,20 mg/ 100 g
	Alecrim seco	3,67 mg/ 100 g	2,00 mg/ 100 g
Outros temperos	Vinagre	0,29 mg/ 100 ml	0,11 mg/ 100 ml
Sementes			
Nozes	Amendoim descascado	2,53 mg/ 100 g	-
	Amendoim descascado torrado	6,46 mg/ 100 g	-
Feijão	Preto, descascado, cru	-	0,35 mg/ 100 g
	Outros, descascado, cru	-	0,30 mg/ 100 g
	Branco, descascado, cru	-	0,43 mg/ 100 g
Vegetais			
Azeitonas	Preta	1,43 mg/ 100 g	0,21 mg/ 100 g
	Verde	5,90 mg/ 100 g	3,01 mg/ 100 g
Vegetais	Beringela	0,08 mg/ 100 g	0,22 mg/ 100 g
	Tomate, inteiro, cru	-	0,27 mg/ 100 g
Couves	Couve-flor crua	-	0,53 mg/ 100 g

Além das diferenças de concentrações, destes compostos fenólicos, deve ter-se em consideração que as quantidades presentes nos alimentos, nem sempre são as que chegam ao rim pois depende da respetiva farmacocinética (Tabelas 4 e 5) ((Paiva et al., 2013), (Rothwell JA, Pérez-Jiménez J, Neveu V, Medina-Ramon A, M'Hiri N, Garcia Lobato P, Manach C, Knox K, Eisner R, Wishart D, 2013)).

Estudos anteriores realizados em animais, mostram que a absorção dos ácidos hidroxicinâmicos, ingeridos isoladamente, começa no estômago e continua no intestino delgado, sendo que é aqui que ocorre a absorção dos ácidos hidroxicinâmicos livres que anteriormente não foram absorvidos (Oliveira & Bastos, 2011). A absorção dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico nas células Caco-2 é semelhante à de modelos animais uma vez que utilizam o sistema transportador de ácido monocarboxílico (MCT) para permear a membrana epitelial do intestino. Todavia, no caso das células Caco-2, a difusão passiva não é menosprezada para explicar a absorção (Alam et al., 2016).

A concentração de ácidos hidroxicinâmicos que chega ao rim depende do grau de absorção no intestino delgado (Paiva et al., 2013) e do grau de metabolização, que ocorre no intestino e no fígado, por intermédio das enzimas de fase II, ou seja, as

sulfotransferases, UDP-glucotransferases e catecol-o-metiltransferases. As enzimas de fase II transformam os ácidos hidroxycinâmicos em conjugados sulfatados, glucuronados ou metilados, dependendo da enzima de quem são alvos, para promover a excreção biliar e urinária, uma vez que os conjugados se tornam mais hidrofílicos (Oliveira & Bastos, 2011).

Apesar da metabolização dos ácidos fenólicos ser feita essencialmente por sistemas enzimáticos, a mesma também pode ocorrer através da flora microbiana do cólon (Oliveira & Bastos, 2011).

Tabela 4 - Teores de ácido *p*-cumárico na urina de humanos (adaptado de (Rothwell JA, Pérez-Jiménez J, Neveu V, Medina-Ramon A, M'Hiri N, Garcia Lobato P, Manach C, Knox K, Eisner R, Wishart D, 2013)).

Fonte do ácido <i>p</i> -cumárico	Doses administradas	Duração da administração	Dados cinéticos
Ácido cítrico na água	0,5 g / dia	7 dias	3,5 µmol / 24 h após 1 semana
Cacau em pó no leite desnatado	40 g / dia	4 semanas	0,31 µmol após 24 h
Cacau em pó na água	40 g	Dose única	0,05 nmol / mg de creatinina após 24 h
Cacau em pó no leite integral	40 g	Dose única	0,004 nmol / mg de creatinina após 24 h

Tabela 5 - Teores de ácido ferúlico na urina de humanos (adaptado de (Rothwell JA, Pérez-Jiménez J, Neveu V, Medina-Ramon A, M'Hiri N, Garcia Lobato P, Manach C, Knox K, Eisner R, Wishart D, 2013)).

Fonte do ácido ferúlico	Doses administradas	Duração da administração	Dados cinéticos
Chá preto	4 g / dia	7 dias	34 µmol / 24 h após 1 semana
Ácido cítrico na água	0,5 g / dia	7 dias	26 µmol / 24 h após 1 semana
Cacau em pó no leite desnatado	40 g / dia	4 semanas	4,28 µmol / 24 h após 1 semana
Cacau em pó na água	40 g	Dose única	10,52 µmol / mg de creatinina após 24 h
Cacau em pó no leite integral	40 g	Dose única	2,31 nmol / mg de creatinina após 24 h
Chocolate negro	80 g	Dose única	160 nmol / g de creatinina após 24 h

O ácido *p*-cumárico e o ácido ferúlico são sintetizados na via do mevalonato e do xiquimato, a partir da tirosina e da L-fenilalanina (Figura 5), e podem ter diversos precursores e metabolitos (Tabela 6) ((Alam et al., 2016); (Paiva et al., 2013); (“PhytoHub,” n.d.)). Além das vias principais, o ácido ferúlico também pode resultar da metilação do ácido cafeico (Oliveira & Bastos, 2011).

Figura 5 - Biossíntese dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico (reproduzido de (Kumar&Pruthi, 2014)).

Tabela 6 - Precursores e metabolitos do ácido *p*-cumárico e do ácido ferúlico (elaborado a partir da informação disponível em ("PhytoHub", n.d.)).

Ácido cafeico	Ácido ferúlico	Rato, humano	Plasma, urina
Ácido clorogênico		Rato	
Cianidina-3-O-glucósido		Humano	Fezes, soro, urina
Ácido ferúlico	Ácido 3-hidroxibenzóico	Rato, humano	Plasma, urina
	Ácido 4-hidroxibenzóico	Humano	
	Ácido protocatecuico		
	Ácido vanílico	Rato, humano	Urina
	Ácido 3', 4'-di-hidroxifenilacético		
	Ácido di-hidrocafeico	Humano	
	Ácido di-hidro-p-cumarico		
	Ácido 3-(3'-hidroxifenil) propiônico	Rato, humano	Plasma, urina
	Ácido 3-fenilpropiônico	Humano	Plasma
	Ácido di-hidroferúlico	Rato	Urina
	Ácido ferúlico-4'-O-glucuronido		
	Ácido ferúlico-4'sulfato		Plasma
	Sulfoglucuronídeo de ácido ferúlico		
	Ferulolilglicina		Urina
	Ácido hipúrico	Humano	Plasma, urina
	Ácido 3,4-dimetoxibenzóico		

Os metabolitos dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico são diversos, no entanto, os principais são o ácido 4-hidrobenczóico, o ácido hipúrico, ácido vanílico, o ácido *p*-cumárico e o ácido ferúlico. O ácido vanílico, um dos principais metabolitos do ácido ferúlico, resulta da oxidação do ácido di-hidroferúlico, produto da redução do ácido ferúlico (Oliveira & Bastos, 2011).

O facto destes ácidos, ferúlico e *p*-cumárico, serem facilmente obtidos a partir da dieta, diretamente ou como metabolitos de outros compostos alimentares, e serem detetados na urina, motiva ao estudo para a melhor compreensão dos seus mecanismos de ação, bem como o seu impacto na progressão tumoral.

Desta forma surge o presente estudo, cujo objetivo é avaliar o impacto de ácidos hidroxicinâmicos alimentares, mais especificamente dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico, na progressão do cancro renal.

Materiais e métodos

Materiais

Os equipamentos empregues nos ensaios foram câmara de fluxo laminar vertical, microscópio invertido de contraste de fase, incubadora para cultura celular e um leitor de placas SYNERGY|HTX multimode reader da BioTek.

As células renais tumorais humanas (786-O) foram adquiridas à ATCC (American Type Culture Collection). O ácido *p*-cumárico, a cisplatina, o PBS, tripsina, a solução de penicilina-estreptomicina, o dimetilsulfóxido (DMSO), o etanol, o ácido acético e o cristal violeta foram adquiridos à Sigma-Aldrich. O soro bovino fetal (FBS) e o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) foram adquiridos à Biowest. O ácido ferúlico foi adquirido à Byoformula.

Métodos

Cultura celular

As células de adenocarcinoma humano 786-O foram cultivadas em meio DMEM com elevada concentração de glucose (4,5 g/L) suplementado com 10% de FBS e 1% de solução de penicilina-estreptomicina e foram mantidas a 37 °C sob uma atmosfera húmida contendo 5% de CO₂.

Cálculo de confluência

O cálculo de confluência permite determinar o volume que se deve retirar de uma suspensão celular, na passagem de células. Neste cálculo deve ter-se em conta que as células 786-O têm um ciclo de replicação de, aproximadamente, 18h.

$$\text{Volume}_{\text{retirar}} = \frac{\text{quantidade de suspensão no frasco (*)}}{\text{número de ciclos de replicação (2)}}$$

(*) geralmente é 2 mL (0,5 mL tripsina + 1,5 mL meio) – num Frasco de cultura T₂₅

(2) o número de ciclos de replicação equivale a 2 porque, num ciclo, uma célula origina duas células

Passagem de células

O presente procedimento deve decorrer sempre na câmara de fluxo laminar, a qual deve ser limpa antes e após a sua utilização. O primeiro passo, após limpeza do local de trabalho e desinfecção das mãos e material a utilizar, será descartar o meio. Posteriormente pipeta-se, para o canto do frasco de forma a não lesar mecanicamente as células, 1 mL de verseno. Seguidamente descarta-se o verseno e, com o mesmo cuidado, pipeta-se 0,5 mL de tripsina, no caso de um frasco T₂₅. Se o frasco fosse um T₇₅, a quantidade de tripsina a pipetar seria 1 mL. A tripsina deve manter-se em contacto com as células cerca de 3 minutos para que haja o destacamento destas, no entanto, não é necessário incubar a 37 °C, pois as células 786-O destacam facilmente. No final da espera, pipetam-se 1,5 mL de meio suplementado para o frasco inicial onde ainda se mantêm as células para inativar a tripsina. De seguida pipetam-se, no caso de um T₂₅, 5 mL de meio para um frasco novo devidamente identificado. Homogeniza-se o conteúdo do frasco inicial com a técnica “up-down” para se ter a certeza de que, quando retirarmos a quantidade pretendida para o novo frasco, previamente calculada, mantemos a concentração celular. Finalizando o procedimento verifica-se, ao microscópio, a confluência do novo frasco e incuba-se durante 3 dias, no máximo, até nova passagem. O transporte do frasco deve ser feito na vertical para que não se corra o risco de molhar e romper o filtro das trocas gasosas, o qual está na tampa, e assim comprometer a esterilidade.

Contagem de células

A contagem de células ocorre na Câmara de Neubauer pelo que o primeiro passo deve ser a sua montagem. Posteriormente pipeta-se 10 µL, de meio com células, para cada um dos lados da Câmara de Neubauer. Seguidamente procede-se à contagem de células no microscópio, com a objetiva de 10x. Note-se que devemos escolher dois limites do quadrante para que só as células desses limites sejam incluídas na contagem de células e que, geralmente, procede-se à contagem de células em três quadrantes. Depois faz-se a média e multiplica-se por 10⁴ de forma a conhecer o número de células por mL e, assim, calcularmos o volume necessário para inocular o número de células pretendido.

Ensaio colorimétrico de cristal violeta (CV)

O ensaio do CV é um método não enzimático que calcula a biomassa de células aderentes, ou seja, através da afinidade entre o corante e o DNA. Este ensaio foi utilizado para avaliar o efeito citotóxico dos compostos fenólicos nas células 786-O, as quais foram inoculadas em placas de 96 poços. Cada poço da placa continha 6000 células, as quais foram incubadas durante 24h.

No primeiro ensaio, após as 24h, tratou-se as células com os ácidos *p*-cumárico e ferúlico, à concentração final de 10 μ M, durante 48h. O controlo positivo utilizado foi uma solução de DMSO 5% enquanto o controlo negativo utilizado foi o solvente, DMSO 0,5%. No fim da incubação das 48h procedeu-se à lavagem das células com PBS 1x para que as células não aderentes fossem removidas. Posteriormente adicionou-se etanol a 96% frio por 10 min, para fixar as células, e seguidamente coraram-se as células, adicionando o cristal violeta a 0,1% por 5 min à temperatura ambiente. O corante deve ser removido emergindo cuidadosamente a placa em água. Por fim adicionou-se ácido acético a 1%, ressuspendeu-se e mediu-se a absorbância a 595 nm, utilizando um leitor de placas. Para este estudo foram feitos 2 ensaios independentes.

No segundo ensaio, o procedimento foi semelhante, sendo que a única diferença foi no tratamento das células. Neste ensaio, as células foram tratadas com cisplatina, à concentração final de 25 μ M, com os ácidos *p*-cumárico e ferúlico, à concentração final de 20 μ M, e ainda com a cisplatina combinada com cada um dos ácidos, mantendo a concentração individual. O estudo contou com 3 ensaios independentes.

Resultados e discussão

A avaliação do efeito dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico foi feita em comparação com o controlo positivo e o controlo negativo.

No primeiro estudo avaliou-se, em células 786-O, o efeito citotóxico dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico à concentração de 10 μ M.

Tabela 7 - Tratamento dos resultados do ensaio A do primeiro estudo.

	<i>Média Abs</i>	<i>Percentagem</i>	<i>Desvio-padrão</i>
Controlo -	0,555	55,5%	0,0620
Ácido <i>p</i>-cumárico	0,556	55,6%	0,0871
Ácido ferúlico	0,555	55,5%	0,0786
Controlo -	0,532	53,2%	0,0945
Controlo +	0,124	12,4%	0,0350

Tabela 8 - Tratamento dos resultados do ensaio B do primeiro estudo.

	<i>Média Abs</i>	<i>Percentagem</i>	<i>Desvio-padrão</i>
Controlo -	0,369	36,9%	0,0617
Ácido <i>p</i>-cumárico	0,348	34,8%	0,0518
Ácido ferúlico	0,379	37,9%	0,0546
Controlo -	0,382	38,2%	0,0890
Controlo +	0,094	9,40%	0,0229

Tabela 9 – Viabilidade celular, média e desvio-padrão do primeiro estudo.

	<i>Ácido <i>p</i>-cumárico</i>	<i>Ácido ferúlico</i>	<i>Controlo +</i>	<i>Controlo -</i>
Viabilidade Ra	102,65%	102,39%	22,97%	100%
Viabilidade Rb	99,87%	108,72%	26,90%	100%
Média	101,26%	105,85%	24,94%	100%
Desvio-padrão	7%	7%	3%	0%

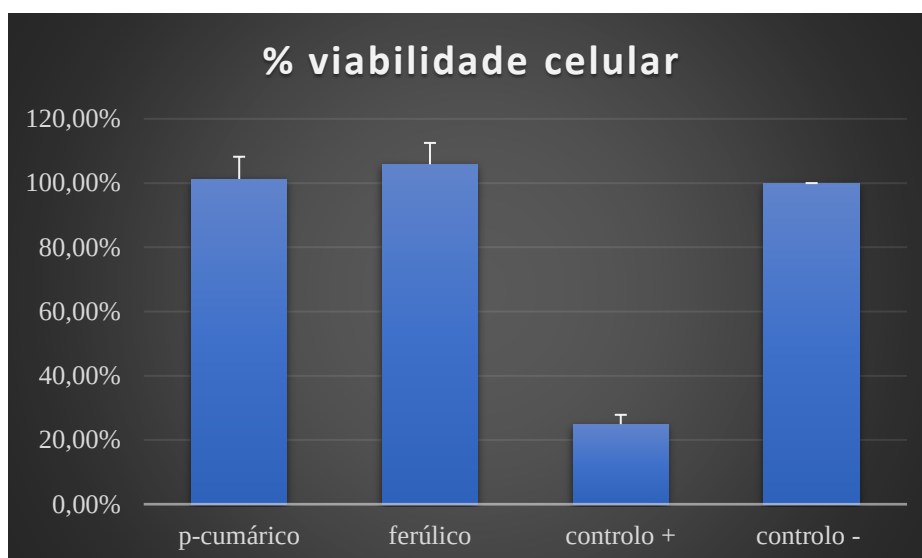


Figura 6 - Viabilidade celular das células 786-O após 48h expostas aos ácidos *p*-cumárico e ferúlico, avaliada pelo método Cristal Violeta. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de 2 ensaios independentes.

No controlo positivo deve observar-se morte celular pelo que a viabilidade celular deve ser significativamente inferior a 100%, tendo sido neste primeiro estudo de 24,94%. O controlo negativo representa a viabilidade das células 786-O a 100%, não havendo morte destas. Assim sendo, podemos verificar que o presente ensaio não evidenciou atividade antitumoral, uma vez que a viabilidade celular das células 786-O, determinada pelo método colorimétrico cristal violeta, não sofreu alterações significativas quando tratadas com 10 μ M dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico, em comparação à viabilidade do controlo. A viabilidade celular das células tratadas, individualmente, com os ácidos *p*-cumárico e ferúlico foi de 101,26% e 105,56%, respetivamente (Gráfico 1).

Após o tratamento e discussão dos resultados do primeiro estudo procedeu-se à realização de um novo estudo, o qual contou novamente com os ácidos *p*-cumárico e ferúlico, mas desta vez à concentração de 20 μ M. Neste segundo estudo inseriu-se uma nova variável, a cisplatina à concentração de 25 μ M, para comparar o seu efeito citotóxico com o dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico e estudar um potencial efeito sinérgico destes compostos.

Tabela 10 - Médias da viabilidade celular (%) sem branco e desvio-padrão do segundo estudo.

Composto	Ra	Rb	Rc	Média	SD
DMSO 5%	12,62%	28,36%	6,31%	15,76%	9%
Cisplatina 25 μ M	61,65%	40,11%	47,63%	49,80%	9%
Controlo -	100%	100%	100%	100%	0%
Ferúlico	96,59%	96,84%	96,44%	96,62%	0%

<i>Ferúlico + Cisplatina</i>	49,76%	54,00%	42,09%	48,62%	5%
<i>P-cumárico</i>	106,04%	94,58%	94,67%	98,43%	8%
<i>P-cumárico + cisplatina</i>	59,39%	41,06%	42,16%	47,54%	15%

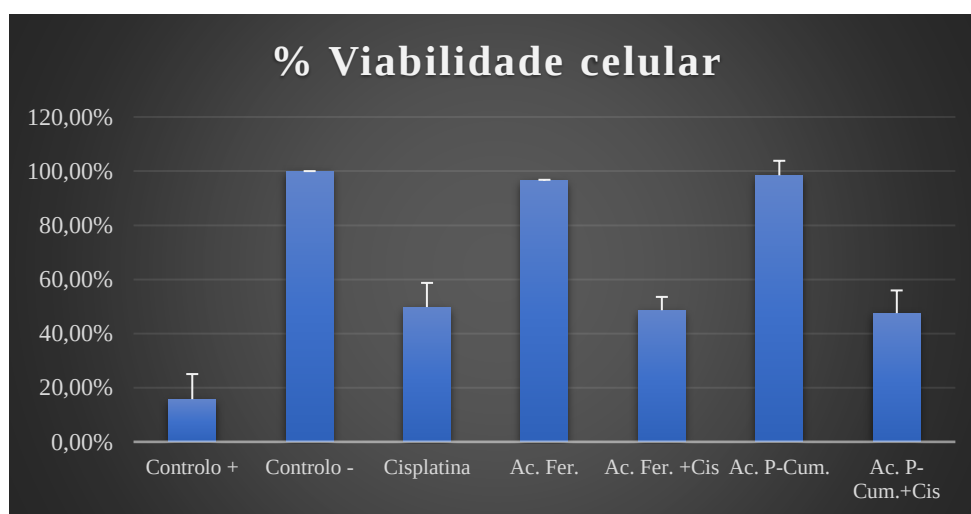


Figura 7 - Viabilidade celular das células 786-O após 48h expostas à cisplatina, aos ácidos *p*-cumárico e ferúlico e a combinações destes compostos, avaliada pelo método Cristal Violeta. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 ensaios independentes.

Tal como no primeiro estudo, o controlo positivo deve apresentar morte celular pelo que a sua viabilidade celular deve ser significativamente inferior a 100%, tendo-se verificado (15,76%), e o controlo negativo representa a viabilidade das células 786-O a 100%, não havendo morte destas.

Assim sendo, com este segundo estudo, pode constatar-se, se compararmos com os resultados do primeiro estudo, que o aumento na concentração dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico trouxe uma diminuição na viabilidade celular, ainda que as diferenças não tenham sido significativamente inferiores a 100% para que se possa afirmar que a 20 μ M, estes compostos fenólicos apresentam efeitos citotóxicos. A viabilidade celular do ácido ferúlico foi de 96,62% e a do ácido *p*-cumárico foi de 98,43% (Gráfico 2).

No caso da cisplatina, a viabilidade celular das células tratadas com este composto isoladamente foi de 49,80%, ou seja, houve morte celular. Este resultado está de acordo com o esperado, visto tratar-se de um fármaco antitumoral amplamente utilizado e que em estudos *in vitro* anteriormente realizados, reduziu a viabilidade celular (SHI et al., 2016).

As células tratadas com cisplatina combinada com os ácidos *p*-cumárico e ferúlico apresentaram uma redução da viabilidade, ainda que pouco significativa, tendo sido os valores de 47,54% e 48,62%, respetivamente.

Os resultados obtidos são sustentados por estudos anteriores, que mostram que os ácidos *p*-cumárico e ferúlico em concentrações variadas entre 1 μ M e 500 μ M, durante 48h, não causaram impacto significativo na viabilidade celular das células 786-O. A viabilidade celular foi, no entanto, influenciada por uma concentração mais elevada do ácido *p*-cumárico ((Caparica, Júlio, Baby, de Almeida, & Costa, 2020), (Lopes, 2012)).

Conclusão

O presente estudo investigou o efeito citotóxico dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico numa linha celular renal tumoral humana. A utilização destes compostos foi motivada pelo conhecimento das suas capacidades antioxidantes. Os resultados, na concentração de 10 μM , não revelaram ação anticancerígena. No entanto, na concentração de 20 μM , dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico, verificou-se uma diminuição da viabilidade celular, ainda que muito reduzida e insuficiente para validar a atividade citotóxica.

O decréscimo constatado na viabilidade celular encaminha para a premissa de que concentrações mais elevadas destes compostos possam originar efeitos citotóxicos realmente consideráveis. Sabe-se, por estudos já existentes, que o ácido *p*-cumárico a concentrações de 1000 μM produziu efeitos citotóxicos nas células 786-O. Assim sendo, espera-se que concentrações mais elevadas dos compostos fenólicos em causa, pelo menos do ácido *p*-cumárico, exerçam ação anticancerígena, no entanto, têm de ser realizados mais estudos para que tal seja comprovado.

Antes de se descartar a possibilidade do ácido ferúlico ser um agente anticancerígeno no cancro renal, devem-se realizar estudos a concentrações mais altas pois pode ser um composto menos potente e que necessite de maior concentração para atuar como anticancerígeno.

Deve ter-se em consideração que, apesar do ácido *p*-cumárico apresentar efeito citotóxico a 1000 μM , tendo em conta os estudos farmacocinéticos da Tabela 4, é pouco provável que se atinjam concentrações citotóxicas fisiológicas de ácido *p*-cumárico uma vez que a concentração deste que chega aos rins é baixa.

A corroboração efetiva dos efeitos citotóxicos por parte dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico traria maior conforto para os pacientes oncológicos, no entanto, cada paciente teria de estudar profundamente, em conjunto com profissionais de saúde, a respetiva nutrição, dado que os alimentos com altos teores nestes compostos fenólicos são específicos e que seria necessário calcular a quantidade de cada alimento a ingerir de forma a se obter, no rim, a concentração necessária para tratamento.

Bibliografia

- Alam, M. A., Subhan, N., Hossain, H., Hossain, M., Reza, H. M., Rahman, M. M., & Ullah, M. O. (2016). Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutrition & Metabolism*, 13(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0080-3>
- Almeida, V. L. de, Leitão, A., Reina, L. del C. B., Montanari, C. A., Donnici, C. L., & Lopes, M. T. P. (2005). Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, 28(1), 118–129. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021>
- Baptista, A., Gonçalves, R. V., Bressan, J., & Pelúzio, M. do C. G. (2018). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Crude Extracts and Fractions of Cashew (*Anacardium occidentale* L.), Cajui (*Anacardium microcarpum*) , and Pequi (*Caryocar brasiliense* C.): A Systematic Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2018/3753562>
- Caparica, R., Júlio, A., Baby, A. R., de Almeida, T. S., & Costa, J. G. (2020). In vitro cytotoxicity assessment of ferulic, caffeic and p-coumaric acids on human renal cancer cells. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 17(1). <https://doi.org/10.19277/bbr.17.1.225>
- Crona, D. J., Faso, A., Nishijima, T. F., McGraw, K. A., Galsky, M. D., & Milowsky, M. I. (2017). A Systematic Review of Strategies to Prevent Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *The Oncologist*, 22(5), 609–619. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0319>
- Ditri, E. L. Z. and J. W. (2017). Manejo de masas renales y cáncer de riñón localizado: revisión sistemática y metaanálisis. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.04.081>.Management
- Fitzmaurice, C., Akinyemiju, T. F., Al Lami, F. H., Alam, T., Alizadeh-Navaei, R., Allen, C., ... Naghavi, M. (2018). Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016. *JAMA Oncology*, 4(11), 1553. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.2706>

- Gill, I. S. (2009). Focal therapy for kidney and prostate cancer. *Current Opinion in Urology*, 19(2), 125–126. <https://doi.org/10.1097/MOU.0b013e328324f8bb>
- Gray, R. E., & Harris, G. T. (2019). Renal Cell Carcinoma: Diagnosis and Management. *American Family Physician*, 99(3), 179–184. Retrieved from <https://www.aafp.org/afp/2019/0201/p179.html>
- Hans, F., Senarisoy, M., Bhaskar Naidu, C., & Timmins, J. (2020). Focus on DNA Glycosylases—A Set of Tightly Regulated Enzymes with a High Potential as Anticancer Drug Targets. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9226. <https://doi.org/10.3390/ijms21239226>
- Hernández-Ruiz, Á., García-Villanova, B., Guerra-Hernández, E., Amiano, P., Ruiz-Canela, M., & Molina-Montes, E. (2019). A Review of A Priori Defined Oxidative Balance Scores Relative to Their Components and Impact on Health Outcomes. *Nutrients*, 11(4), 774. <https://doi.org/10.3390/nu11040774>
- International Agency for Research on Cancer (World Health Organization). (2020). Kidney: Globocan 2020 - The Global Cancer Observatory. *Globocan 2020*, 419, 1–2. Retrieved from <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/29-Kidney-fact-sheet.pdf>
- Jonasch, E., Gao, J., & Rathmell, W. K. (2014). Renal cell carcinoma. *BMJ*, 349(nov10 11), g4797–g4797. <https://doi.org/10.1136/bmj.g4797>
- Lafay, S., & Gil-Izquierdo, A. (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 301–311. <https://doi.org/10.1007/s11101-007-9077-x>
- Lee, J. D., Cai, Q., Shu, X. O., & Nechuta, S. J. (2017). The Role of Biomarkers of Oxidative Stress in Breast Cancer Risk and Prognosis: A Systematic Review of the Epidemiologic Literature. *Journal of Women's Health*, 26(5), 467–482. <https://doi.org/10.1089/jwh.2016.5973>
- Linehan, W. M., Schmidt, L. S., Crooks, D. R., Wei, D., Srinivasan, R., Lang, M., & Ricketts, C. J. (2019). The Metabolic Basis of Kidney Cancer. *Cancer Discovery*, 9(8), 1006–1021. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1354>
- Lopes, S. (2012). *UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO* Susane

*Lopes ESTUDO IN VITRO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS
CAROTENOÍDICO E POLIFENÓLICO CELULARES NEOPLÁSICAS*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia. 153. Retrieved from
<https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/100711/303750.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Luo, Y., Shen, D., Chen, L., Wang, G., Liu, X., Qian, K., ... Ju, L. (2019). Identification of 9 key genes and small molecule drugs in clear cell renal cell carcinoma. *Aging*, 11(16), 6029–6052. <https://doi.org/10.18632/aging.102161>
- Makrilia, N., Syrigou, E., Kaklamanos, I., Manolopoulos, L., & Saif, M. W. (2010). Hypersensitivity Reactions Associated with Platinum Antineoplastic Agents: A Systematic Review. *Metal-Based Drugs*, 2010, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2010/207084>
- Mancini, M., Righetto, M., & Baggio, G. (2020). Gender-Related Approach to Kidney Cancer Management: Moving Forward. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3378. <https://doi.org/10.3390/ijms21093378>
- Melini, F., Melini, V., Luziatelli, F., Ficca, A. G., & Ruzzi, M. (2019). Health-Promoting Components in Fermented Foods: An Up-to-Date Systematic Review. *Nutrients*, 11(5), 1189. <https://doi.org/10.3390/nu11051189>
- Oliveira, D. M. de, & Bastos, D. H. M. (2011). Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Química Nova*, 34(6), 1051–1056. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000600023>
- Paiva, L. B. de, Goldbeck, R., Santos, W. D. dos, & Squina, F. M. (2013). Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(3), 395–411. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502013000300002>
- Pfaffenroth, E. C., & Linehan, W. M. (2008). Genetic basis for kidney cancer: opportunity for disease-specific approaches to therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 8(6), 779–790. <https://doi.org/10.1517/14712598.8.6.779>
- PhytoHub. (n.d.). Retrieved July 14, 2020, from <http://phytohub.eu/>
- Reddy, L., Odhav, B., & Bhoola, K. D. (2003). Natural products for cancer prevention:

- a global perspective. *Pharmacology & Therapeutics*, 99(1), 1–13.
[https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(03\)00042-1](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(03)00042-1)
- Rivelli, T. G., Mak, M. P., Martins, R. E., da Costa e Silva, V. T., & de Castro, G. (2015). Cisplatin based chemoradiation late toxicities in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Discovery Medicine*, 20(108), 57–66. Retrieved from <https://www.discoverymedicine.com/Thomas-G-Rivelli/2015/08/cisplatin-based-chemoradiation-late-toxicities-in-head-and-neck-squamous-cell-carcinoma-patients/>
- Rothwell JA, Pérez-Jiménez J, Neveu V, Medina-Ramon A, M’Hiri N, Garcia Lobato P, Manach C, Knox K, Eisner R, Wishart D, S. A. (2013). Phenol Explorer. Retrieved from <http://phenol-explorer.eu/metabolism/origins/454>
- Safiri, S., Kolahi, A.-A., Mansournia, M. A., Almasi-Hashiani, A., Ashrafi-Asgarabad, A., Sullman, M. J. M., ... Fitzmaurice, C. (2020). The burden of kidney cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990–2017. *Scientific Reports*, 10(1), 13862. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70840-2>
- Sangsefidi, Z. S., Yaghoubi, F., Hajiahmadi, S., & Hosseinzadeh, M. (2020). The effect of coenzyme Q10 supplementation on oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Food Science & Nutrition*, 8(4), 1766–1776. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1492>
- Semeniuk-Wojtaś, A., Lubas, A., Stec, R., Szczylik, C., & Niemczyk, S. (2016). Influence of Tyrosine Kinase Inhibitors on Hypertension and Nephrotoxicity in Metastatic Renal Cell Cancer Patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 2073. <https://doi.org/10.3390/ijms17122073>
- SHI, S., TAN, P., YAN, B., GAO, R., ZHAO, J., WANG, J., ... MA, Z. (2016). ER stress and autophagy are involved in the apoptosis induced by cisplatin in human lung cancer cells. *Oncology Reports*, 35(5), 2606–2614.
<https://doi.org/10.3892/or.2016.4680>
- Tonin, F., Steimbach, L., Wiens, A., Perlin, C., & Pontarolo, R. (2015). Impact of Natural Juice Consumption on Plasma Antioxidant Status: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Molecules*, 20(12), 22146–22156.
<https://doi.org/10.3390/molecules201219834>

- Tserga, E., Nandwani, T., Edvall, N. K., Bulla, J., Patel, P., Canlon, B., ... Baguley, D. M. (2019). The genetic vulnerability to cisplatin ototoxicity: a systematic review. *Scientific Reports*, 9(1), 3455. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40138-z>
- Wang, J., Zhao, H., Dong, H., Zhu, L., Wang, S., Wang, P., ... Tan, J. (2019). LAT, HOXD3 and NFE2L3 identified as novel DNA methylation-driven genes and prognostic markers in human clear cell renal cell carcinoma by integrative bioinformatics approaches. *Journal of Cancer*, 10(26), 6726–6737. <https://doi.org/10.7150/jca.35641>
- Wei, C., Wang, S., Ye, Z., & Chen, Z. (2018). Efficacy of targeted therapy for advanced renal cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *International Braz j Urol*, 44(2), 219–237. <https://doi.org/10.1590/s1677-5538.ibju.2017.0315>
- Zazuli, Z., Vijverberg, S., Slob, E., Liu, G., Carleton, B., Veltman, J., ... Maitland-van der Zee, A.-H. (2018). Genetic Variations and Cisplatin Nephrotoxicity: A Systematic Review. *Frontiers in Pharmacology*, 9(September). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01111>
- Zhang, Y., Schoenhals, J., Christie, A., Mohamad, O., Wang, C., Bowman, I., ... Hannan, R. (2019). Stereotactic Ablative Radiation Therapy (SAbR) Used to Defer Systemic Therapy in Oligometastatic Renal Cell Cancer. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 105(2), 367–375. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2019.07.023>