



Ana Rita Marques Lopes

Impacto de Compostos Polifenólicos na Progressão do Cancro Renal

Orientador: Professor Doutor João Guilherme Costa

UNIVERSIDADE LUSÓFONA

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Lisboa

2023

Ana Rita Marques Lopes

Impacto de Compostos Polifenólicos na Progressão do Cancro Renal

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona no dia 27/09/2023, perante o Júri nomeado pelo despacho nº 349/2023, de 19 de setembro com a seguinte composição:

Presidente:

Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente:

Profª Doutora Ana Sofia Fernandes

Orientador:

Prof. Doutor João Guilherme Costa

UNIVERSIDADE LUSÓFONA

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Lisboa

2023

Agradecimentos

Antes de mais, gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Doutor João Guilherme Costa, por todo o apoio, disponibilidade, orientação e confiança prestada. Não podia ter escolhido melhor.

À Íris Guerreiro pelo apoio e amizade ao longo destes anos e principalmente pela paciência e disponibilidade prestada.

Às minhas colegas e amigas, Ana Custódio, Evellyn Almeida e Ângela Guerra por terem feito este percurso comigo. Foram muitas horas de estudo e risos que vão ficar sempre marcadas.

Um agradecimento especial à minha mãe Anabela, ao meu padrasto António, aos meus avós Maria Tomé e José Joaquim Canto, e ao meu namorado Rui pelo apoio incondicional, motivação e amor ao longo de toda a minha vida. Foram cruciais para o meu percurso pessoal e académico.

A todos, o meu enorme obrigada!

Resumo

O carcinoma renal das células claras é o tipo mais comum de cancro renal em adultos compreendendo até 80 % dos tumores renais. As abordagens terapêuticas variam de acordo com o estadio do cancro. As principais opções para o tratamento são a cirurgia e o tratamento farmacológico, nomeadamente imunoterapia ou terapêuticas dirigidas. De forma a complementar ou otimizar as terapêuticas existentes, têm sido realizados vários estudos com compostos de origem natural, presentes em alimentos, com o objetivo de explorar o seu potencial.

Nos últimos anos, vários estudos têm vindo a demonstrar as vantagens dos polifenóis em diversas doenças pelas suas diversas atividades, tais como anticarcinogénica e antioxidante. No entanto, o impacto dos polifenóis no cancro renal não está bem estabelecido, sendo necessários mais estudos para compreender melhor o seu potencial. Tendo em consideração a farmacocinética desfavorável e a extensa metabolização dos compostos polifenólicos, é útil verificar a ação dos seus metabolitos a nível renal para avaliar uma potencial ação anticancerígena. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo estudar o impacto de diferentes metabolitos de compostos polifenólicos no cancro renal. Para tal, realizou-se uma revisão bibliográfica sobre as propriedades farmacocinéticas dos compostos polifenólicos, a sua presença na dieta, os seus metabolitos e precursores e utilizaram-se bases de dados como *Phenol-Hub* e *Phenol Explorer*. Adicionalmente, estudou-se «in vitro» o impacto de vários metabolitos de compostos polifenólicos na migração coletiva das células 786-O de cancro renal humano, através do ensaio de cicatrização da ferida (*Wound-Healing*).

Os resultados do estudo experimental demonstraram que os compostos mais promissores foram os ácidos homovanílico, vanílico e protocatecuico, uma vez que foram aqueles que mais reduziram a migração celular.

Com este trabalho foi possível verificar a relação entre diversos metabolitos de compostos polifenólicos e o desenvolvimento do cancro renal. Contudo, são necessários mais estudos, sobre os efeitos anticancerígenos desta classe de compostos, incluindo os seus metabolitos.

Palavras-Chave: Cancro renal, células 786-O, polifenóis, metabolitos, migração celular, ensaio de Wound-Healing.

Abstract

Renal clear cell carcinoma is the most common type of renal cancer in adults comprising up to 80% of renal tumors. Therapeutic approaches vary according to the stage of the cancer. The main options for treatment are surgery and pharmacological treatment, namely immunotherapy or targeted therapies. In order to complement or improve existing therapies, several studies were carried out with compounds of natural origin, present in foods, with the aim of exploring their potential.

In recent years, several studies have demonstrated the advantages of polyphenols in various diseases due to their various activities, such as anticarcinogenic and antioxidant. However, the impact of polyphenols on kidney cancer is not well established, and more studies are needed to better understand their potential. Considering the unfavorable pharmacokinetics and extensive metabolization of polyphenolic compounds, it is useful to verify the action of their metabolites at the renal level to assess a potential anticancer action. Thus, the present study aimed to identify the impact of different metabolites of polyphenolic compounds on kidney cancer. To achieve this, a literature review was carried out on the pharmacokinetic properties of phenolic compounds, their presence in the diet, their metabolites, and precursors, and databases such as Phenol-Hub and Phenol Explorer were used. In addition, the impact of various metabolites of polyphenolic compounds on the collective migration of human kidney cancer 786-O cells was studied in vitro using the Wound-Healing Assay.

The results of the experimental study showed that the most promising compounds were homovanillic, vanillic and protocatechuic acids since they were the ones that most reduced cell migration.

With this work it was possible to verify a relationship between several metabolites of polyphenolic compounds and the development of kidney cancer. Nevertheless, it is necessary to carry out further studies on the anticancer effects of this class of compounds, including their metabolites.

Keywords: Renal cancer, 786-O cells, polyphenols, metabolites, cell migration, Wound-Healing Assay

Lista de abreviaturas

ADN - Ácido Desoxirribonucleico
APC - Célula Apresentadora de Antígeno
ATCC - *American Type Culture Collection*
CA - Ácido cafeico
CAIX - Anidrase Carbónica IX
CAPE - Estér fenético do ácido cafeico
CCR - Carcinoma de Células Renais
CCRcc - Carcinoma Renal de Células Claras
CRRm - Carcinoma de Células Renais Metastizado
CO₂ - Dióxido de Carbono
CTLA-4 - Anticorpo Citotóxico da Proteína 4 associado a linfócitos T
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
ERK - Cinase regulada por sinais extracelulares
EUA - Estados Unidos da América
FBS - Soro Fetal Bovino
HIF - Fator Induzível por Hipóxia
IFN - α - Interferão Alfa
IL-2 - Interleucina-2
NF- κ B- Fator de Transcrição Nuclear Kappa
KPS - Desempenho de Karnofsky
mCRRcc - Carcinoma Renal de Células Claras Metastizado
MEC – Matriz Extracelular
MHC - Complexo major de Histocompatibilidade
MMPs - Metaloproteínases
mTOR - Proteína alvo da Rapamicina em Mamíferos
PBRM -1 - Proteína polibromo-1
PBS - Tampão fosfato-salino
PD-1 - Proteína 1 de Morte Celular Programada
PDL - 1- Ligando 1 de Morte Programada
RB - Retinoblastoma
RM - Ressonância Magnética

SASP - Fenótipo Secretor Associado à Senescência

TC - Tomografia Computacional

TEM - Transição Epitélio- Mesenquimatosa

TME - Transição Mesenquimatosa-Epitélio

TGF- β - Fator de Crescimento Transformador Beta

TGI - Trato Gastrointestinal

TMN - Sistema Internacional de Classificação de Tumores

TP53 - Proteína Supressora de Tumores

TSP-1 - Trombospondina-1

US - Ultrassons

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial

VHL - *Von Hippel-Lindau*

WHA - *Wound Healing Assay*

786-O - Linha celular de Adenocarcinoma humano

Índice

Capítulo I. Introdução	12
1. Cancro.....	13
1.1. Cancerigénese.....	13
1.2. Características Cancerígenas (<i>Hallmarks of cancer</i>).....	14
1.3. Características Habilitantes	21
2. Cancro Renal	24
2.1. Fatores de risco	25
2.2. Sinais e Sintomas.....	27
2.3. Classificação	28
2.4. Diagnóstico.....	29
2.5. Prognóstico	30
2.6. Tratamento.....	32
2.6.1. Cirurgia.....	33
2.6.2. Tratamento Farmacológico.....	35
2.7. Estratificação do risco e escolha do tratamento.....	38
3. Compostos bioativos.....	40
3.1. Polifenóis.....	41
3.2. Fenóis simples	42
3.3. Farmacocinética.....	43
4. Técnicas de migração	48
4.1. Migração Coletiva	48
4.2. Migração individual.....	50
Capítulo II. Objetivo.....	51
Capítulo III. Trabalho Experimental	53
1. Materiais e Métodos	54

1.1. Reagentes.....	54
1.2. Métodos	56
1.2.1. Cultura celular	56
1.2.2. Ensaio <i>Wound-healing</i>	57
2. Resultados.....	59
3. Discussão de resultados	72
Capítulo IV: Conclusão	77
Capítulo V. Referências Bibliográficas	80

Índice de Figuras

Figura 1- Características das células cancerígenas (esquerda) e as suas características habilitantes (direita).....	14
Figura 2- Visão geral da cascata metastática.....	16
Figura 3- Regulação da glucose em células saudáveis e células cancerígenas	20
Figura 4- Incidência, mortalidade e prevalência do cancro em 2020.....	24
Figura 5- Incidência geográfica de CCR consoante o sexo.....	24
Figura 6- Histologia dos subtipos de CCR A: CCRcc, células com amplo citoplasma rica em lípidos. B: CCR papilar pequenas células basófilas com escasso citoplasma, organizadas em padrão fusiforme numa única camada de células envolvendo a membrana basal. C: CCR papilar células organizadas em padrão fusiforme com papilas recobertas por células com abundante citoplasma granular eosinofílico com nucléolos proeminentes. D: CCR cromóforo grandes células descoradas com citoplasma reticulado e halos perinucleares	28
Figura 7- Frequência de CCR de acordo com a sua localização	30
Figura 8- Diferentes locais e percentagens de metastização do CCRcc.....	30
Figura 9- Figuras do rim antes e depois da nefrectomia radical.....	34
Figura 10- Figura representativa do rim antes e depois da nefrectomia parcial.....	34
Figura 11- Esquema do mecanismo de ação dos fármacos anti-CTLA-4	36
Figura 12- Primeira linha de tratamento do CCRcc.....	38
Figura 13- Estrutura molecular geral dos flavonóides	42
Figura 14- Representação esquemática da absorção e da metabolização de polifenóis.	45
Figura 15- Resumo do fluxo de trabalho do ensaio in vitro de cicatrização de feridas. 1- Cultura celular e preparação das células; 2- Criação da ferida; 3- Aquisição de dados através da captura de imagens; 4- Análise dos dados.....	49
Figura 16- Ilustração do modelo de migração individual <i>Transwell</i>	50
Figura 17- Vista ao microscópio da zona de contagem da câmara de Neubauer	56
Figura 18- Determinação da área de fecho da ferida das células 786-O, através do software <i>ImageJ®</i> , <i>Fiji</i> com o plugin MRI ferida cicatrização. A- Controlo às 0 h; B- Controlo às 12 h; C- Células expostas ao ácido protocatecuico às 0 h; D- Células expostas ao ácido protocatecuico às 12 h.	57

Figura 19- Impacto do ácido 4-hidroxifenilacético na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n= 2).	63
Figura 20- Impacto do ácido fenilacético na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=4).	64
Figura 21- Impacto do ácido 3-hidroxifenilacético na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=2).	64
Figura 22- Impacto do ácido homovanílico na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=3).	65
Figura 23- Impacto do ácido protocatecuico na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=4).	65
Figura 24- Impacto do ácido vanílico na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=2).	66
Figura 25- Impacto do ácido 3-hidroxibenzóico na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=2).	66
Figura 26- Impacto do ácido benzóico na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=2).	67
Figura 27- Impacto do ácido pirocatecuico na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=2).	67
Figura 28- Impacto do ácido 4-hidroxibenzóico migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=2).	68
Figura 29- Impacto do ácido sirínico na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=2).	68

Figura 30- Impacto do ácido dihidrocafeico na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=4).....	69
Figura 31- Impacto do ácido m-coumárico na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=2).....	69
Figura 32- Impacto do ácido sinápico na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=2).....	70
Figura 33- Impacto do ácido 1,3,5-trimetoxibenzeno na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=2)	70
Figura 34- Percentagem de fecho de ferida de todos os metabolitos dos compostos fenólicos analisados quando normalizado ao controlo às 12 horas, n=2-7, * p<0,05, ** p<0,01 quando comparados com o controlo (teste t-Student).	71

Índice de Tabelas

Tabela 1- Previsão da Incidência e da mortalidade do cancro renal nos EUA em 2023.	25
Tabela 2- Tipos de agentes carcinogénicos e alguns exemplos.....	26
Tabela 3- Principais subtipos histológicos do CCR.	29
Tabela 4- Estádios do cancro renal de acordo com a classificação TNM.	33
Tabela 5- Metabolitos de compostos polifenólicos que serão estudados nesta dissertação, com as respetivas subclasses e fontes alimentares.....	46
Tabela 6- Concentrações estudadas dos diferentes compostos (metabolitos) estudados.	55
Tabela 7- Lista de precursores dos diferentes metabolitos de compostos polifenólicos analisados.....	61
Tabela 8- Média das percentagens de fecho da ferida às 12 h e os respetivos valores normalizados.....	63
Tabela 9- Compostos mais promissores estudados e a respetiva atividade anti-migratória das células 786-O observada.	71
Tabela 10- Estudos que demonstram o potencial anti-migratório de diversos compostos polifenólicos	75

Capítulo I. Introdução

1. Cancro

A palavra cancro vem do grego *Karkinos* que quer dizer caranguejo e foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates, o pai da medicina (Junior et al. 2009).

O cancro resulta da proliferação descontrolada de células originando uma massa anormal de tecido cujo crescimento é quase autónomo (Junior et al. 2009). É classificado de acordo com o tipo de célula saudável que o originou (V. L. de Almeida et al. 2005). Podem ser classificados em carcinoma (células epiteliais), sarcoma (células de tecidos de suporte como ossos e músculo), linfoma (derivam de linfócitos), leucemia (células da medula óssea), mieloma (plasmócitos), melanoma (melanócitos), glioma (células de suporte cerebral ou medula espinal), tumor de células germinativas (células germinativas) e neuroblastoma (células embrionárias malignas) (V. L. de Almeida et al. 2005).

A incidência e a mortalidade do cancro têm crescido em todo o mundo. As razões são complexas, mas refletem tanto o envelhecimento como o crescimento da população (Bray et al. 2018).

1.1. Cancerigénese

O processo de cancerigénese envolve várias etapas e complexos estadios até originar um tumor detetável, nomeadamente a iniciação, a promoção e a progressão (Lewandowska et al. 2016).

A iniciação envolve a exposição a um agente carcinogénico que irá provocar danos irreversíveis no ácido desoxirribonucleico (ADN) (Lewandowska et al. 2016). Nesta fase, as células já se encontram alteradas, mas ainda não é possível a deteção de um tumor (Almeida et al. 2005, Reddy, Odhav, and Bhoola 2003).

Na promoção, as células encontram-se geneticamente alteradas e ocorre transformação de forma lenta e gradual de células saudáveis em células malignas. Para que isso aconteça, é necessária uma exposição contínua a um agente cancerígeno (Almeida et al. 2005, Reddy, Odhav, and Bhoola 2003).

Por fim, a progressão, caracteriza-se pela multiplicação descontrolada originando um tumor detetável. Neste estadio já é possível detetar manifestações clínicas (V. L. de Almeida et al. 2005).

1.2. Características Cancerígenas (*Hallmarks of cancer*)

As características do cancro foram propostas como um grupo de capacidades funcionais adquiridas pelas células humanas durante o percurso entre células saudáveis e células malignas (Hanahan 2022).

O objetivo era fornecer uma base através da qual se poderiam racionalizar os fenótipos complexos, correspondentes aos diversos tipos de tumores humanos em termos de um grupo de parâmetros celulares comuns (Hanahan 2022, Darwiche 2020).

Na criação deste grupo de características foi tido como influência o facto de que o cancro se desenvolve através de múltiplos processos, e que a aquisição destas características pode estar de alguma forma relacionada com os diversos passos de desenvolvimento tumoral (Darwiche 2020, Hanahan 2022).

Atualmente existem dez características das células cancerígenas (autossuficiência na sinalização proliferativa, invasão e metástase, indução da angiogénese, potencial infinito de replicação, resistência à apoptose, evitar supressores de crescimento, reprogramação do metabolismo celular, resistência imunológica, instabilidade e mutação do genoma e inflamação promotora do tumor) e quatro características habilitantes que estabelecem as condições através das quais as células podem adquirir as características referidas (desbloqueio da plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbioma e a senescência celular (Hanahan 2022, Sasahira and Kirita 2018, Darwiche 2020).

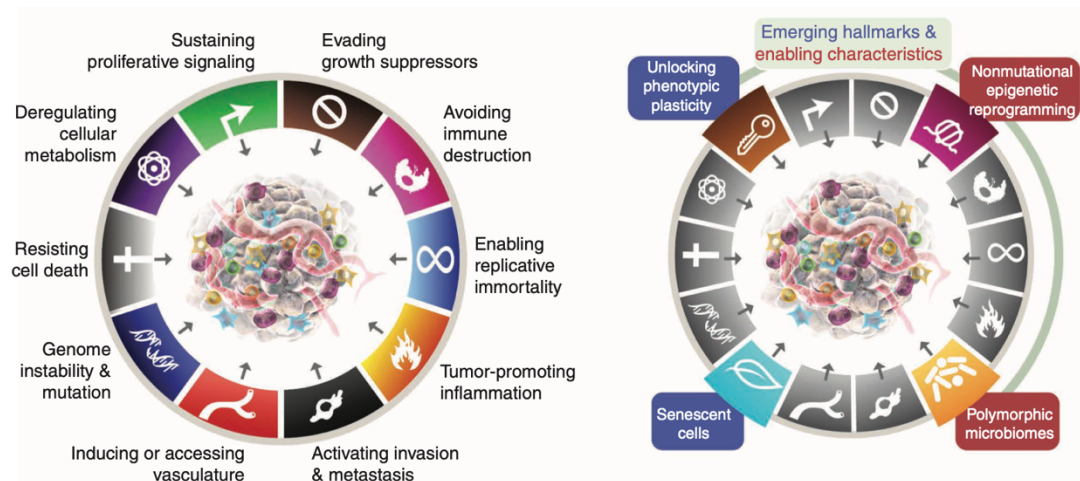


Figura 1- Características das células cancerígenas (esquerda) e as suas características habilitantes (direita). Reproduzido de (Hanahan 2022).

Autossuficiência na sinalização proliferativa

Os tecidos normais controlam cuidadosamente a produção e libertação de sinais promotores de crescimento, que instruem a entrada e progressão através do ciclo de crescimento e divisão celular garantido assim a homeostase do número de células e assim a manutenção da estrutura e função do tecido normal (Hanahan and Weinberg 2011, Darwiche 2020).

As células cancerígenas desregulam esses sinais através da produção de fatores de crescimento, produzidos pela própria célula, pela estimulação de células vizinhas, ou pela desregulação de recetores, através do aumento do número desses recetores ou alteração da sua estrutura (Hanahan and Weinberg 2011, Dembic 2020, Sasahira and Kirita 2018).

Invasão e metástase

O processo de invasão e metastização são uma sequência de várias etapas, designado de cascata invasão-metástase (Hanahan and Weinberg 2011, Fares et al. 2020, Dembic 2020). Essa cascata envolve cinco etapas, nomeadamente a invasão, intravasamento, circulação, extravasamento e por fim, a colonização (Fares et al. 2020).

A metástase é o termo geral para descrever a disseminação de células cancerígenas do tumor primário para tecidos circulantes e para órgãos distantes (Seyfried and Huysentruyt 2013, Dembic 2020). Estima-se que seja responsável por cerca de 90% dos casos de morte por cancro (Seyfried and Huysentruyt 2013, Fares et al. 2020).

O epitélio normal revestido por uma membrana basal pode proliferar localmente e formar um adenoma (Seyfried and Huysentruyt 2013, Dembic 2020). A transformação posterior por alterações epigenéticas e alterações genéticas leva a um carcinoma in situ, ainda delimitado por uma membrana basal intacta (Seyfried and Huysentruyt 2013). Outras alterações podem induzir a disseminação local de células de carcinoma, possivelmente através da Transição Epitélio-Mesenquimatosa (TEM) do inglês “*epithelial-mesenchymal transition*”, à medida que a membrana basal se torna fragmentada (Dembic 2020, Silva De Medeiros et al. 2018). O TEM é um processo responsável pela mudança ou transição do fenótipo epitelial para o mesenquimatoso, que pode levar à perda ou expressão reduzida de marcadores específicos das células epiteliais e ao aumento da expressão de marcadores típicos das células mesenquimais (Hanahan and Weinberg 2011, Dembic 2020, Manfioletti and Fedele 2022). Constitui um meio pelo qual as células epiteliais transformadas podem adquirir capacidade de invadir, resistir à apoptose e disseminar (Hanahan and Weinberg 2011, Dembic 2020, Manfioletti and

Fedele 2022, Katsuno and Derynck 2021). Este programa encontra-se silenciado em células saudáveis, contudo, em situações como inflamação e cancro encontra-se ativado (Silva De Medeiros et al. 2018, Ribatti, Tamma, and Annese 2020, Jayachandran, Srinivasan, and Mani 2021).

As células do carcinoma invasivo então intravasam na linfa ou nos vasos sanguíneos permitindo assim o seu transporte passivo para órgãos distantes (Seyfried and Huysentruyt 2013, Fares et al. 2020, Dembic 2020). Em locais secundários, as células do carcinoma solitário extravassam, permanecem isoladas formando nicho pré-metastático que se aglomera formando micrometástase. Na ausência de exposição contínua a sinais indutores de TEM, as células de carcinoma podem reverter para um estado não invasivo através de um processo reverso denominado de transição mesenquimatosa-epitelial (TME) e consequentemente um novo carcinoma por meio de TEM (Hanahan and Weinberg 2011, Fares et al. 2020, Dembic 2020, Manfioletti and Fedele 2022, Pei et al. 2019 (Seyfried and Huysentruyt 2013, Fares et al. 2020, Dembic 2020).

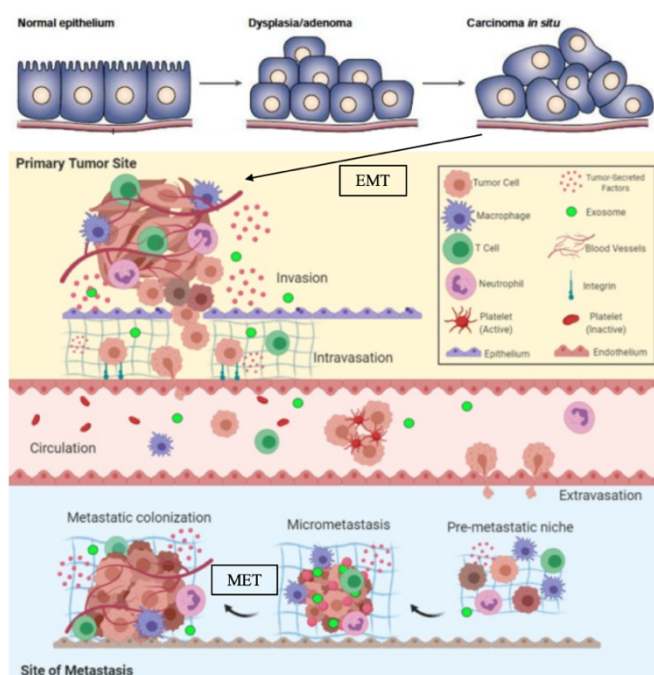


Figura 2- Visão geral da cascata metastática. Adaptado de (Fares et al. 2020, Seyfried and Huysentruyt 2013).

A alteração mais característica é a diminuição/alteração da molécula E-caderina (marcador epitelial), componente chave na formação de junções aderentes essenciais à adesão celular (Hanahan and Weinberg 2011). A expressão aumentada de E-caderina foi bem estabelecida como um antagonista de invasão e metástase enquanto a diminuição da sua expressão, foi conhecida como potenciador desses fenótipos (Hanahan and Weinberg 2011, Silva De Medeiros et al. 2018). A N-caderina (marcador mesenquimatoso) também se encontra presente quando o programa TEM está ativado (Silva De Medeiros et al. 2018).

Indução da angiogénese

Nos adultos, o processo de angiogénese encontra-se ativo apenas transitoriamente em funções associadas ao ciclo reprodutivo e na cicatrização de feridas (Darwiche 2020). Nas células tumorais encontra-se praticamente sempre ativo (Kumar et al. 2005, Dembic 2020). A evidência demonstra que este mecanismo é controlado por um sistema de fatores que favorecem ou desfavorecem a sua ativação. São proteínas que se ligam a recetores celulares das células endoteliais e podem ser classificadas como indutoras, como o fator de crescimento endotelial (VEGF-A) ou inibidoras como a trombospondina-1 (TSP-1) (Kumar et al. 2005, Dembic 2020).

O gene Von Hippel-Lindau (*VHL*) é um gene supressor de tumor que reduz o crescimento tumoral e regula negativamente diversos fatores angiogénicos (Darwiche 2020). Este gene codifica a proteína pVHL que tem como alvo o fator induzível por hipóxia (HIF), que controla a expressão de VEGF (Darwiche 2020, Calzadilla 2021). A perda dessa proteína, aumenta o nível de HIF e consequentemente aumenta a capacidade angiogénica (Darwiche 2020, Singh 2021).

Os vasos resultantes da angiogénese apresentam características aberrantes. A ativação ocorre numa fase inicial, tendo uma importância relevante no desenvolvimento, o que demonstra ser uma característica importante do cancro (Hanahan and Weinberg 2011).

Potencial infinito de replicação

As células tumorais, ao contrário das células normais, têm replicação ilimitada (Hanahan and Weinberg 2011, Darwiche 2020). Essa limitação tem sido associada a duas barreiras distintas, a senescência e “crise” (Hanahan and Weinberg 2011). Quando as células são colocadas em cultura, em ciclos repetidos de divisão celular, primeiro entram num estado de senescência e depois na fase de “crise”, na qual a maioria das células morre

(Hanahan and Weinberg 2011). Em raras ocasiões, algumas células emergem de uma população em “crise” e exibem um potencial replicativo ilimitado. Essa transação denomina-se de imortalização (Hanahan and Weinberg 2011, Darwiche 2020).

Nestas células a capacidade de replicação depende dos telómeros que são encurtados com a replicação celular (Hanahan and Weinberg 2011, Kumar et al. 2005, Dembic 2020, Darwiche 2020).

Nas células tumorais, existe um equilíbrio entre a destruição e o crescimento dos telómeros havendo uma resistência destas células à entrada nos estados de senescência e “crise” (Darwiche 2020). Essa resistência deve-se, maioritariamente à enzima telomerase (enzima que insere nucleótidos levando ao aumento do tamanho dos telómeros) ou minoritariamente através de outros mecanismos de manutenção (Hanahan and Weinberg 2011, Antoine et al. 2022, Dembic 2020, Darwiche 2020).

Resistir à apoptose

A fuga à apoptose permite que as células cancerígenas sobrevivam por mais tempo, levando a uma acumulação de mutações (Sasahira and Kirita 2018).

A apoptose ocorre como resposta ao stress fisiológico que as células sofrem levando à desregulação de sinais como níveis elevados de sinalização oncogénica e danos no ADN (Hanahan and Weinberg 2011).

A maquinaria apoptótica é composta por reguladores e efetores sendo os primeiros os responsáveis pela monitorização do ambiente intra- e extracelular das condições de sobrevivência da célula (Hanahan and Weinberg 2000). Existem dois programas associados aos reguladores, nomeadamente apoptótico extrínseco e o apoptótico intrínseco (Sasahira and Kirita 2018). O primeiro está relacionado com a receção e processamento de sinais extracelulares, que induzem a apoptose, como por exemplo através da proteína supressora de tumor (Tp53), enquanto o último está associado ao processamento e integração de sinais intracelulares (Hanahan and Weinberg 2011). Cada um culmina na ativação de uma protease, nomeadamente as caspases 8 e 9, que iniciam uma cascata de proteólise envolvendo caspases efetoras responsáveis pela fase de execução da apoptose propriamente dita (Hanahan and Weinberg 2011, Kumar et al. 2005, Dembic 2020, Sasahira and Kirita 2018).

Evitar supressores de crescimento

Para além da célula se replicar de forma ilimitada, também tem de contornar sistemas que impedem a proliferação (Hanahan and Weinberg 2011, Darwiche 2020). Muitos destes programas estão dependentes da ação dos genes supressores de tumores (Hanahan and Weinberg 2011). Estes genes codificam para diversas proteínas, das quais as mais relevantes são as proteínas do retinoblastoma (RB) e Tp53 (Hanahan and Weinberg 2011). A proteína RB regula a entrada em senescência ou apoptose através da receção de sinais extracelulares, enquanto a proteína TP53 é regulada pela receção de sinais intracelulares e é responsável pela deteção de erros no genoma e interrupção do ciclo celular (Hanahan and Weinberg 2011, Dembic 2020, Darwiche 2020).

Uma das formas que as células cancerígenas utilizam é a corrupção da via de sinalização do Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β), que é uma via inibitória envolvida em diversos processos celulares como o crescimento celular, a diferenciação celular, a migração celular e a apoptose (Hanahan and Weinberg 2011, Silva De Medeiros et al. 2018).

Reprogramação do metabolismo celular

As células saudáveis, em condições aeróbicas, processam em primeiro lugar a glicose em piruvato no citosol e depois dióxido de carbono (CO₂) nas mitocôndrias num processo denominado fosforilação oxidativa (Hanahan and Weinberg 2011, Dembic 2020, Sasahira and Kirita 2018, Xia et al., 2021). Em condições anaeróbicas, a glicose é convertida em piruvato e posteriormente em lactato num processo denominado por glicólise aeróbica (Xia et al. 2021). As células cancerígenas podem utilizar a via da glicólise aeróbica e evitar a fosforilação oxidativa, mesmo na presença de oxigénio (Hanahan and Weinberg 2011, (Xia et al., 2021). Este processo, embora seja menos eficiente, leva ao aumento de lactato no microambiente tumoral tornando o ambiente mais ácido, originando vários precursores intermediários usados pelas células cancerígenas de modo a produzir proteínas, ADN e lípidos para sustentar a sua rápida proliferação (Hanahan and Weinberg 2011, Darwiche 2020).

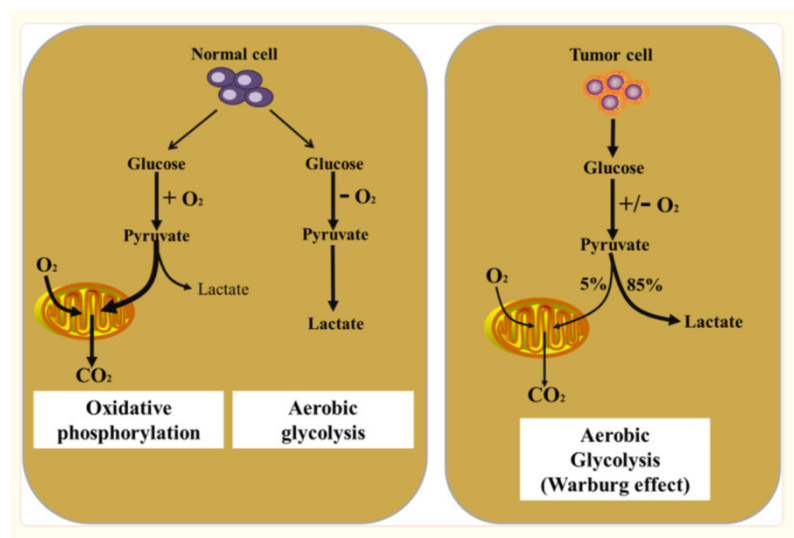


Figura 3- Regulação da glicose em células saudáveis e células cancerígenas. Reproduzido de (Xia et al., 2021).

Resistência imunológica

As células e tecidos são monitorizados constantemente pelo sistema imunológico que é responsável por reconhecer e eliminar a grande maioria das células cancerígenas (Hanahan and Weinberg 2011, Dembic 2020). Contudo, em alguns casos, estas conseguem escapar a esse controlo e proliferar (Hanahan and Weinberg 2011).

Um estudo realizado em murganhos geneticamente modificados para serem imunodeprimidos, demonstrou que estes apresentam uma maior probabilidade de desenvolvimento de tumores em comparação com os murganhos saudáveis (Hanahan and Weinberg 2011).

Instabilidade e mutação do genoma

A instabilidade do genoma leva à acumulação de mutações pontuais e alterações cromossômicas em todo o genoma (Darwiche 2020).

Defeitos nos genes afetam diversos componentes na maquinaria de manutenção do ADN podendo levar à formação de oncogenes e à perda de genes supressores de tumor (Hanahan and Weinberg 2011, Darwiche 2020).

A perda de ADN telomérico e mecanismos epigenéticos, tal como descrito anteriormente, também geram instabilidade cromossômica (Hanahan and Weinberg 2011, Darwiche 2020).

Inflamação promotora do tumor

A produção persistente de mediadores inflamatórios pode levar a danos nos tecidos e no ADN e consequentemente aumentar a probabilidade de desenvolvimento de cancro uma vez que células inflamatórias promovem o desenvolvimento e a metástase de células cancerígenas através da produção de citocinas (Sasahira and Kirita 2018, Dembic 2020). As células cancerígenas são capazes de criar um ambiente inflamatório que promove o crescimento, a sobrevivência e fatores angiogénicos e liberta substâncias químicas como espécies reativas de oxigénio que podem causar mutações adicionais nas células cancerígenas vizinhas (Hanahan and Weinberg 2011, Dembic 2020, Sasahira and Kirita 2018, Silva De Medeiros et al. 2018).

Foi também reconhecido que o TME, cuja composição se define por populações de células cancerígenas heterogéneas e interativas e pela multiplicidade de tipos celulares pertencentes ao estroma, tem um papel importante na formação de tumores e na progressão da malignidade (Hanahan 2022, Xu et al. 2019).

1.3. Características Habilitantes

Estas características estabelecem os mecanismos moleculares e celulares pelos quais as características cancerígenas são adquiridas (Hanahan and Weinberg 2011).

Desbloqueio da plasticidade fenotípica

A plasticidade fenotípica é uma propriedade de um determinado genótipo em produzir diferentes fenótipos, em resposta a diferentes condições ambientais distintas (Pigliucci 2001, Schlichting and Wund 2014).

A diferenciação terminal em células saudáveis está associada a uma interrupção permanente da proliferação (Hanahan 2022). As células cancerígenas conseguem evitar a diferenciação e desbloqueiam o que é conhecido como plasticidade fenotípica, de modo a conseguirem continuar a crescer (Hanahan 2022). Isso pode acontecer através de três mecanismos principais: (i) as células que se estão a aproximar da diferenciação total podem desdiferenciar-se de volta a um estado semelhante ao inicial; (ii) as células neoplásicas originárias de uma célula progenitora indiferenciada podem interromper o processo de diferenciação e permanecer num estado parcialmente diferenciado, semelhante à célula progenitora; e (iii) as células que estavam comprometidas com um determinado fenótipo de diferenciação podem transdiferenciar, adquirindo características

que não estão associadas à sua célula de origem (Hanahan 2022, Yating Wang and Abolhassani 2022, Schlichting and Wund 2014).

Reprogramação epigenética não mutacional

A reprogramação epigenética está relacionada com modificações ao nível do genoma que ocorrem na mitose e meiose e afetam a função de genes que não são dependentes da sequência de ADN (Darwiche 2020).

As células cancerígenas podem reprogramar um grande número de redes de regulação génica de modo a alterar a expressão genética e assim favorecer a aquisição de características marcantes (Hanahan 2022).

Microbioma

Os microrganismos contribuem para a saúde e doença humana, não só no diagnóstico, como também no prognóstico e no tratamento (Sepich-Poore et al. 2021, Hanahan 2022). Poucos microrganismos provocam cancro de forma direta, contudo contribuem para o crescimento tumoral, por exemplo através do seu efeito negativo sobre o sistema imunitário (Sepich-Poore et al. 2021, Hanahan and Weinberg 2011). Para além disso, existem bactérias com capacidade de produzir moléculas que mimetizam sinais extracelulares proliferativos e sinais que levam à senescência celular favorecendo o processo de cancerígenese (Hanahan 2022, Fares et al. 2020) Uma melhor compreensão dos papéis dos microrganismos no cancro pode melhorar o tratamento (Sepich-Poore et al. 2021).

Senescência celular

A senescência celular é um estado de interrupção permanente do ciclo celular que ocorre em células em proliferação, quando submetidas a um dano celular (Calcinotto et al. 2019, Campisi 2013, Hanahan and Weinberg 2011). Este processo está associado ao envelhecimento e à prevenção do cancro, contudo, também pode estar associado ao aparecimento de tumores (Calcinotto et al. 2019, Prieto and Baker 2019).

Em certas situações, quando o dano é irreversível, as células podem entrar em apoptose ou alternativamente podem tornar-se senescentes (Prieto and Baker 2019). Apesar de terem o seu ciclo celular interrompido, são altamente ativas e secretam diversos fatores como citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento, fatores pró-angiogénicos, espécies reativas de oxigénio e proteases que representam o “Fenótipo

secretor associado à senescência” (SASP) (Yating Wang and Abolhassani 2022, Ribatti, Tamma, and Annese 2020). O SASP está envolvido na reparação de danos que levam à senescência, no entanto, quando secretado em excesso, pode estar envolvido na cancerigénese (Prieto and Baker 2019). Por um lado, pode promover a dediferenciação e proliferação de células metastáticas vizinhas devido à secreção de quimiocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, consegue promover a tumorigénese através da produção de metaloproteinases (MMPs) que permitem a reestruturação da matriz extracelular e facilitam o crescimento do tumor (Banerjee et al. 2023).

2. Cancro Renal

As células epiteliais dos túbulos renais podem originar um tumor designado por carcinoma de células renais (CCR) (Padala and Kallam 2022, Caparica et al. 2020). Esse tumor é responsável por cerca de 80% de todos os cancros renais e representa o sétimo tipo histológico de cancro mais comum no mundo ocidental (Ljungberg et al. 2015, Escudier et al. 2019, Muglia and Prando 2015).

Os dados mais recentes encontrados foram respetivos aos anos entre 2016 e 2020 onde o CCR foi o décimo quarto cancro mais comum em todo o mundo e apresentou uma maior incidência em homens com o pico de incidência entre os 60 e 70 anos de idade (Kirner, Mayer-Mokler, and Reinhardt 2014, Ljungberg et al. 2015, Internation Agency for Research on Cancer 2020a). Para além disso, a incidência foi superior em países desenvolvidos, tendo uma possível justificação as exposições ocupacionais e ambientais a diversos agentes carcinogénicos (Internation Agency for Research on Cancer 2020a).

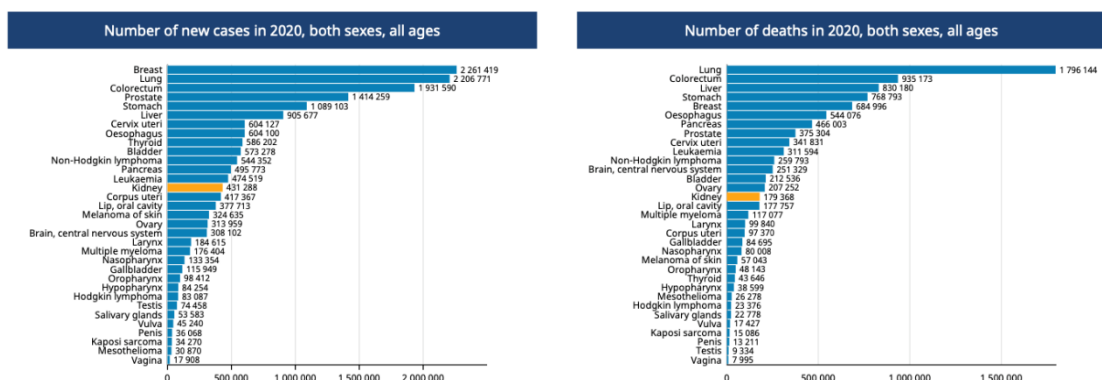


Figura 5- Incidência, mortalidade e prevalência do cancro em 2020. Reproduzido de: (Internation Agency for Research on Cancer 2020a).

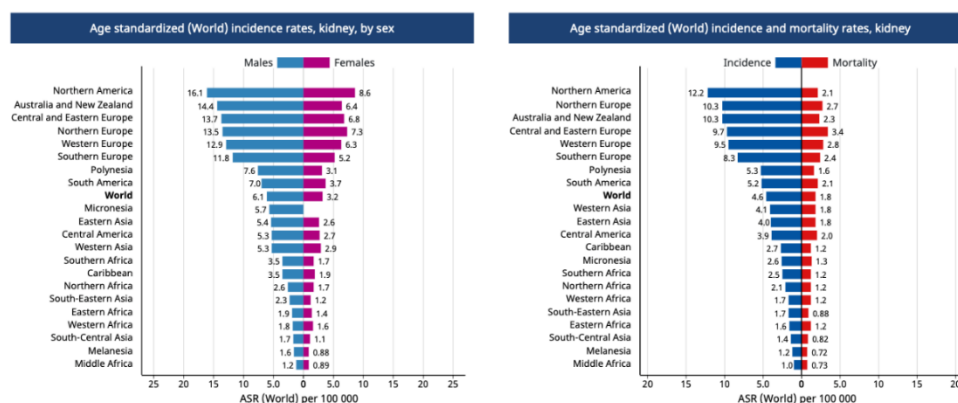


Figura 4- Incidência geográfica de CCR consoante o sexo. Reproduzido de (Internation Agency for Research on Cancer 2020a).

A pandemia da doença COVID-19 causou atrasos no diagnóstico e tratamento do cancro devido ao fecho de estabelecimentos de saúde, interrupções no emprego e seguro de saúde e medo da exposição ao vírus (Siegel et al. 2023). Deste modo, atrasos no diagnóstico e no tratamento podem levar ao aumento no estadió e da mortalidade (Siegel et al. 2023).

Em 2023, 1.958.310 novos casos e 609.820 mortes por cancro são esperados nos Estados Unidos da América (EUA) (Siegel et al. 2023). Desses números, 82.290 novos casos e 14.890 correspondem a cancro renal (Siegel et al. 2023).

Tabela 1- Previsão da Incidência e da mortalidade do cancro renal nos EUA em 2023. Adaptado de (Siegel et al. 2023).

	NÚMERO ESTIMADO DE NOVOS CASOS	NÚMERO ESTIMADO DE MORTES
MULHERES	29.440	4970
HOMENS	52.360	9920
TOTAL	82.290	14.890

Em Portugal, em 2020, o CCR constituiu o décimo quarto cancro mais comum com uma percentagem de novos casos de 2% e uma taxa de mortalidade de 1,7% (International Agency for Research on Cancer 2020b).

2.1. Fatores de risco

O cancro pode surgir a partir de fatores relacionados com a dieta, com o meio ambiente ou com predisposição genética (Reddy, Odhav, and Bhoola 2003, Ljungberg et al. 2015).

Os agentes carcinogénicos podem ser divididos em carcinogénicos genotóxicos, carcinogénicos epigenéticos e pro-carcinogénicos (Reddy, Odhav, and Bhoola 2003). Os agentes carcinogénicos genotóxicos são os compostos capazes de reagir com os ácidos nucleicos, induzindo diferentes tipos de mutações e alterações estruturais (Reddy, Odhav, and Bhoola 2003, Hendriks et al. 2013). Os agentes carcinogénicos epigenéticos não interagem diretamente com o ADN, atuando em grande parte como promotores e requerem, habitualmente, exposições prolongadas (Gomes-Carneiro, Ribeiro-Pinto, and Paumgartten 1997). Por fim, os pro-carcinogénicos requerem bioativação metabólica, convertendo-se em metabolitos capazes de induzir a carcinogénese (Reddy, Odhav, and Bhoola 2003).

Os fatores de risco para o CCR incluem hipertensão, tabagismo, obesidade, alimentação, fatores genéticos e doença renal cística adquirida no cenário de doença renal terminal (Richard E. Gray and Gabriel T. Harris 2019, Escudier et al. 2019).

Tabela 2- Tipos de agentes carcinogénicos e alguns exemplos. Adaptado de (Reddy, Odhav, and Bhoola 2003, (Diário da República 2007).

Tipos de agentes carcinogénicos	Exemplos
Genotóxicos	Dimetilsulfato, etileno, nitrosaminas
Epigenéticos	Nitrosaminas, nitroamidas
Pró-carcinogénicos	Promotores (sacarina), hormonas (estrogénios), imunossuppressores (análogos de purinas)
Co-carcinogénicos	Tabaco

Tabaco

O fumo do tabaco contém uma vasta gama de compostos cancerígenos, como aminas aromáticas e N-nitrosaminas, que podem desencadear a iniciação e promover o desenvolvimento de tumores. Um estudo desenvolvido por Cho et al. demonstrou que mulheres e homens fumadores têm um risco aumentado para desenvolvimento de CCR de 22% e 54%, respetivamente (Cho, Adami, and Lindblad 2011).

Obesidade

A obesidade é também um fator de risco bem estabelecido para o desenvolvimento de CCR, tanto em mulheres como em homens (Cho, Adami, and Lindblad 2011, Capitanio et al. 2019). De acordo com Cho et al., valores elevados de índice de massa corporal aumentam o risco de CCR em 24% nos homens e 34% nas mulheres. Outro estudo desenvolvido por Capitanio et al. demonstrou que a obesidade está significativamente associada ao desenvolvimento CCR com um aumento de risco de 25% para homens e 35% em mulheres (Capitanio et al. 2019).

Alimentação

De entre os diferentes tipos de alimentos, a carne aumenta o risco de desenvolvimento de CCR devido ao seu elevado teor em aminas heterocíclicas, nitritos e nitratos, nomeadamente em carnes curadas (Cho, Adami, and Lindblad 2011). Por outro lado,

frutas e vegetais contêm nutrientes antioxidantes e outros componentes capazes de reduzir o risco de CCR (Cho, Adami, and Lindblad 2011).

Fatores genéticos

Embora a maioria dos CCR seja esporádica, 2-4% têm causa hereditária. As duas alterações genéticas mais comuns encontram-se no gene *VHL* e no gene da proteína polibromo-1 (*PBRM-1*) (Padala and Kallam 2022).

A síndrome de VHL é uma doença hereditária dominante causada por uma mutação no gene *VHL*, o qual se encontra localizado no braço curto do cromossoma 3, que causa o desenvolvimento de diversos tumores, afetando órgãos como o rim, pâncreas, glândulas adrenais, entre outros (Cho, Adami, and Lindblad 2011). Esta síndrome leva ao aparecimento de CCRcc por meio de ativação do VEGF (Richard E. Gray and Gabriel T. Harris 2019). Assim, a particularidade genética da CCRcc é a ausência funcional do gene *VHL*, o qual é um gene supressor de tumores, o que implica o aumento da atividade dos genes responsáveis pela angiogénese e metastização, como por exemplo o VEGF (Cohen and McGovern 2005). O *PBRM1* é o segundo gene mais mutado no CCRcc. Quando silenciado promove a cancerigénese e proliferação tumoral (Carril-Ajuria et al. 2019).

2.2. Sinais e Sintomas

Geralmente, os doentes com CCR são assintomáticos, até que a malignidade tenha avançado (Ljungberg et al. 2015). Os sintomas incluem dor, hematúria e massa renal palpável e são observados em apenas 9% dos casos (Padala and Kallam 2022, Cohen and McGovern 2005). Esta tríade clássica de dor no flanco, hematúria macroscópica e massa abdominal palpável está correlacionada com doença avançada e associada a um mau prognóstico (Ljungberg et al. 2015, Escudier et al. 2019). As síndromes paraneoplasias são encontradas em aproximadamente 30% dos doentes com CCR sintomáticos (Ljungberg et al. 2015).

Outras características comuns da doença podem ser inespecíficas, como fadiga, perda de peso ou anemia (Cohen and McGovern 2005).

2.3. Classificação

Existem 3 tipos de CCR, nomeadamente o carcinoma renal das células claras (CCRcc), o carcinoma renal papilar e o carcinoma renal cromóforo (J. Wang et al. 2019, Padala and Kallam 2022, Caparica et al. 2020). O CCRcc e o CCR papilar surgem nas células epiteliais do túbulo proximal, enquanto o CCR cromóforo surge nos túbulos distais (Bahadoram et al., 2022, Lopez-Beltran et al. 2006, Padala and Kallam 2022). Estes três subtipos juntos representam mais de 90% de todos os tipos de CCR (Lopez-Beltran et al. 2006, Caparica et al. 2020).

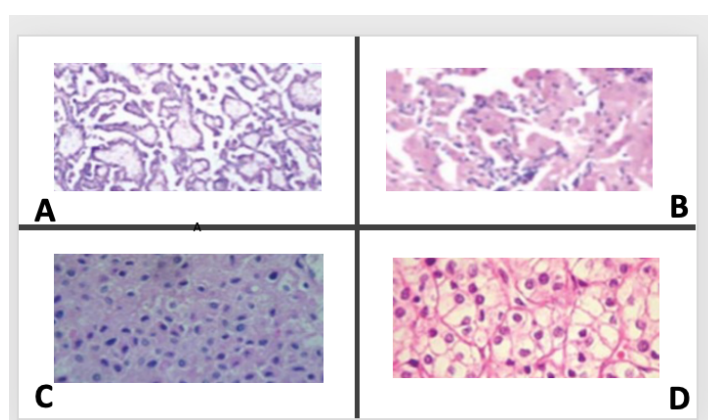


Figura 6- Histologia dos subtipos de CCR **A:** CCRcc, células com amplo citoplasma rica em lípidos. **B:** CCR papilar pequenas células basófilas com escasso citoplasma, organizadas em padrão fusiforme numa única camada de células envolvendo a membrana basal. **C:** CCR papilar células organizadas em padrão fusiforme com papilas recobertas por células com abundante citoplasma granular eosinofílico com nucléolos proeminentes. **D:** CCR cromóforo grandes células descoradas com citoplasma reticulado e halos perinucleares. Adaptado de (Muglia and Prando 2015).

O CCRcc é o tipo de carcinoma renal mais comum, sendo responsável por 75-80% de todos os tipos de CCR (Abdulla and Shukla 2014, Riazalhosseini and Lathrop 2016, Xu et al. 2019, Caparica et al. 2020). Este tipo de carcinoma, caracteriza-se pela secreção de VEGF e pode desenvolver-se devido a causas genéticas ou adquiridas (Padala and Kallam 2022, Ljungberg et al. 2015). O VEGF pertence a um grupo de proteínas com um papel fundamental na angiogénese durante a embriogénese, cicatrização de feridas, assim como no crescimento tumoral (Semeniuk-Wojtaś et al. 2016).

Tabela 3- Principais subtipos histológicos do CCR. Adaptado de (Muglia and Prando 2015, Padala and Kallam 2022, Lopez-Beltran et al. 2006).

Subtipo de CCR	Incidência	Localização	Idade	Comportamento biológico
Células Claras	75%	Túbulo proximal	Acima dos 50 anos	Agressivo
Papilar	10%	Túbulo proximal		Baixa mortalidade
Cromóforo	5%	Túbulo distal		Agressivo

2.4. Diagnóstico

Geralmente, a mortalidade devido ao cancro é reduzida quando os casos são detetados e tratados precocemente (Word Health Organization 2022).

Cerca de metade dos casos são diagnosticados através da deteção acidental de uma massa renal em exames radiológicos (Cohen and McGovern 2005, Richard E. Gray and Gabriel T. Harris 2019).

As abordagens tradicionais para detetar e caracterizar o tipo de cancro são as técnicas de ultrassons (US), tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM) (Ljungberg et al. 2015, Escudier et al. 2019, Brace 2011). Estas técnicas permitem a deteção frequente de CCR precoces e pequenos que são potencialmente curáveis (Escudier et al. 2019). Inicialmente, o diagnóstico é feito por US e posteriormente investigado por TC que permite avaliar a invasividade local e eventual envolvimento linfonodal ou detetar a existência de metástases (Escudier et al. 2019). A RM pode fornecer informações adicionais na investigação do avanço local e sobre o envolvimento venoso por trombo tumoral (Escudier et al. 2019). Nos casos em que não se consegue caracterizar radiologicamente o tumor ou em outras situações clínicas específicas pode ser necessário realizar uma biópsia (Muglia and Prando 2015).

Assim, o diagnóstico é essencial para o delineamento de um esquema farmacológico mais eficaz e dirigido.

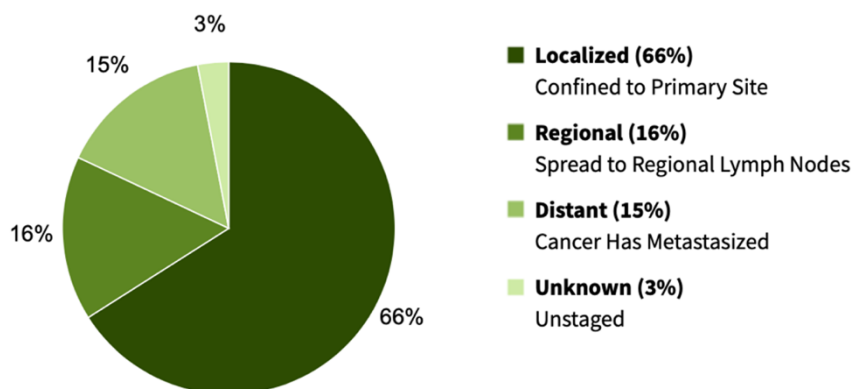


Figura 7- Frequência de CCR de acordo com a sua localização. Reproduzido de: (U.S. Department of Health and Human Services 2021).

2.5. Prognóstico

O prognóstico do CCR está diretamente relacionado com o estadio em que o tumor se encontra e a presença ou não de metástases (Brace 2011).

Os locais mais comuns de metástase do CCR são os pulmões, gânglios linfáticos, osso, fígado, glândula adrenal e cérebro (Dudani et al. 2021). Contudo, o CCR também pode metastizar para locais menos comuns como pâncreas, baço, tireoide e intestino (Dudani et al. 2021).

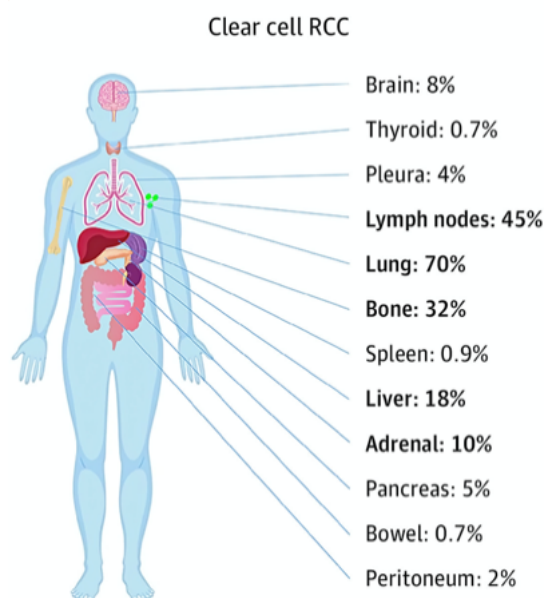


Figura 8- Diferentes locais e percentagens de metastização do CCRcc. Reproduzido de (Dudani et al. 2021).

Em geral, o prognóstico do CCRcc metastático é mau, com uma esperança média de vida de aproximadamente 13 meses (Padala and Kallam 2022). Contudo, a taxa de resposta à terapêutica sistémica é maior do que em outros tipos histológicos de CCR (Lopez-Beltran et al. 2006).

Após ressecção cirúrgica, a vigilância ativa é realizada para monitorizar o desenvolvimento de CCRs adicionais. A anidrase carbónica (CAIX) é uma enzima transmembranar que catalisa a hidratação do CO₂ e água em ácido carbónico e bicarbonato (Samberkar et al. 2019). Embora a localização das anidrases carbónicas no rim tenha sido bem estabelecida há bastante tempo, o interesse por estas enzimas aumentou, uma vez que desempenha um papel essencial no crescimento e progressão de CCR e está ausente em tecidos renais adjacentes normais, ou seja, apenas se expressa no CCRcc (Oosterwijk 2014, Samberkar et al. 2019).

Em situações de hipoxia, a afinidade entre HIF- α , e pVHL diminui o que leva à acumulação de HIF- α . Essa acumulação provoca acidificação do microambiente tumoral criando um ambiente favorável à migração de células cancerígenas e à formação de metástases. Para além disso, o aumento HIF- α vai ativar a transcrição de genes entre os quais CAIX (Courcier et al. 2020, van Kuijk et al. 2016, Samberkar et al. 2019).

A principal descoberta é que a alta expressão de CAIX no tecido está associado à evolução da doença, sendo assim um biomarcador de prognóstico e de sobrevivência útil para o CCR (van Kuijk et al. 2016; Samberkar et al. 2019, Calzadilla 2021).

Podem ser realizados outros exames laboratoriais complementares, que incluem marcadores como creatinina sérica, hemoglobina, contagem de leucócitos e plaquetas, proporção de linfócitos para neutrófilos e proteína C reativa, sendo que alguns desses são prognósticos de sobrevida e são usados para avaliação de risco em diferentes tipos de pontuação de diagnóstico (Escudier et al. 2019).

2.6. Tratamento

A escolha da abordagem terapêutica no tratamento do CCR depende da sua classificação histológica, grau de disseminação, saúde do doente e escolha do médico (Brace 2011). As melhores taxas de prognóstico de CCRcc são devidas a um diagnóstico precoce (Padala and Kallam 2022). O diagnóstico é realizado com base na classificação TNM que através do tamanho (T), Nódulos (N) e metástases (M) se traduzem em quatro estadios. O tratamento é realizado de acordo com esses estadios. Os estadios 1, 2 e 3 são caracterizados como localizados, enquanto o estadio 4 é considerado doença avançada (Padala and Kallam 2022).

O sistema TNM baseia-se em 3 parâmetros principais (Padala and Kallam 2022, Escudier et al. 2019).

T – Refere-se à localização e tamanho do tumor.

TX – O tumor primário não pode ser avaliado.

T0 – Sem evidência de tumor primário.

T1 – Tumor com tamanho menor ou igual a 7 centímetros (cm) e maior que 4 cm limitado ao rim.

T1a- Tumor com tamanho menor ou igual a 4 cm limitado rim.

T1b- Tumor com tamanho entre 4 e 7 cm limitado rim.

T2 – Tumor com tamanho maior que 7 cm confinado ao rim.

T2a- Tumor com tamanho entre 7 e 10 cm limitado ao rim.

T2b- Tumor com tamanho maior que 12 limitado ao rim.

T3 – O tumor invade as veias principais, a glândula adrenal ou os tecidos perirenais.

T3a- Tumor invade as veias renais ou tecidos perirenais ou sistema pielocalicinal ou invade tecido perirenal. Não invade Fáscia de Gerota.

T3b- Tumor invade a veia cava abaixo do diafragma.

T3c- Tumor invade a veia cava acima do diafragma ou invade a parede da veia cava.

T4 – O tumor invade Fáscia de Gerota.

N – Avalia a existência, ou não, de disseminação do tumor pelos gânglios linfáticos.

NX - Os gânglios linfáticos regionais não podem ser avaliados.

N0 – Sem evidência de metástases nos gânglios linfáticos regionais.

N1 – Evidência de metástases num único gânglio linfático regional.

N2 – Evidência de metástases em mais do que um gânglio linfático regional.

M – Avalia a capacidade do tumor de metastizar.

MX- Metástases não podem ser avaliadas.

M0 – Sem evidência de metástases.

M1 – Existem metástases distantes do tumor primário.

Tabela 4- Estádios do cancro renal de acordo com a classificação TNM. Adaptado de (Padala and Kallam 2022, George Daniel and Jonasch Daniel 2022).

Estadio	Tumor	Nódulo	Metástase
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1 ou T2	N1	M0
	T3	N0 ou N1	M0
IV	T4	Qualquer N	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

2.6.1. Cirurgia

A abordagem inicial de um doente com CCR tem em consideração a extensão da doença, bem como a idade e comorbilidades, nomeadamente, a função renal (Padala and Kallam 2022, George Daniel and Jonasch Daniel 2022).

A cirurgia é considerada o tratamento de eleição na maioria dos doentes com CCR que não apresentam metástases, sendo preferível nos estádios 1, 2 e 3 (Padala and Kallam 2022, George Daniel and Jonasch Daniel 2022).

O tratamento pode exigir nefrectomia radical, que inclui a remoção do rim, a glândula adrenal e os linfonodos regionais ou nefrectomia parcial em que é efetuada apenas a remoção da parte afetada do rim e tecidos adjacentes. A nefrectomia parcial é apenas realizada em tumores com menos de 4 cm (Cohen and McGovern 2005).

A cirurgia pode ser realizada por meio de uma abordagem invasiva ou por laparoscopia (George Daniel and Jonasch Daniel 2022). Outros procedimentos ablativos como radiofrequência e crioterapia podem ser uma alternativa para doentes com massas renais relativamente pequenas que não são candidatos a cirurgia (George Daniel and Jonasch Daniel 2022).

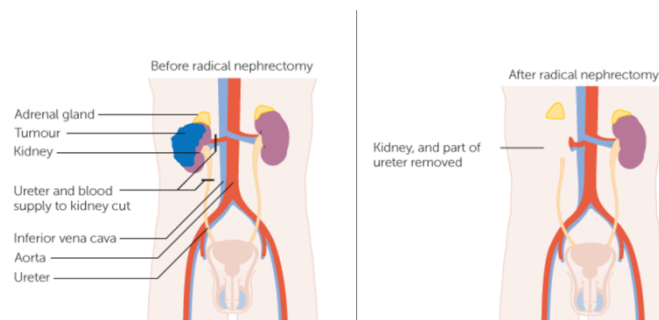


Figura 9- Figuras do rim antes e depois da nefrectomia radical. Reproduzido de: (Cancer Research UK n.d.).

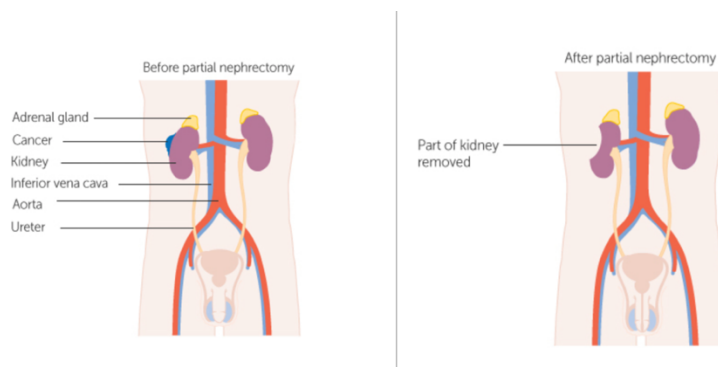


Figura 10- Figura representativa do rim antes e depois da nefrectomia parcial. Reproduzido de: (Cancer Research UK n.d.).

2.6.2. Tratamento Farmacológico

Atualmente existem dois tipos de tratamento sistémico para o cancro renal nomeadamente imunoterapia e terapêuticas dirigidas.

A imunoterapia é um tipo de tratamento que auxilia o sistema imunitário a combater o cancro (National Cancer Institute 2019). As terapêuticas dirigidas são um tipo de tratamento farmacológico em que se utilizam substâncias capazes de atuar em alvos específicos, havendo assim um menor impacto em células saudáveis (American Cancer Society 2021).

2.6.2.1. Imunoterapia

Por vários anos, a imunoterapia com doses elevadas de interleucina (IL-2) ou interferão alfa (IFN- α) permaneceu como o tratamento primário para doentes com CCRm (Makhov et al. 2018). Atualmente, esta terapêutica não é utilizada como primeira linha, devido à síndrome de extravasamento capilar provocada por altas doses de IL-2 e devido às baixas taxas de resposta ao IFN- α . Contudo, o IFN- α pode ser utilizado em combinação com outras opções terapêuticas (Cohen and McGovern 2005, Powles 2021).

2.6.2.2. Terapêuticas dirigidas

A terapia sistémica é geralmente administrada como uma combinação de agentes (Cohen and McGovern 2005):

1. Inibidores do *check-point* da Proteína 1 de Morte Celular Programada (PD-1)

O PD-1 é um recetor de superfície celular presente em linfócitos T e B ativados e células T específicas de tumor (Han, Liu, and Li 2020, Jorge 2019). Este é responsável pela regulação da tolerância e autoimunidade (Makhov et al. 2018, Jiang et al. 2019, Keir et al. 2006). A ligação dos seus ligandos presentes na superfície de células tumorais reduz a proliferação de células T durante a ativação de linfócitos, permitindo assim que as células tumorais escapem à vigilância das células T (Freeman et al. 2000).

Os fármacos que têm como alvo o PD-1 são o nivolumab e pembrolizumab (Cohen and McGovern 2005). Estes anticorpos monoclonais vão ligar-se ao PD-1 bloqueando-o potenciando a ação das células T e consequentemente a diminuição do crescimento tumoral (EUROPEAN MEDICINES AGENCY 2015).

2. Inibidores do *check-point* do Ligante 1 da Morte Celular Programada (PD-L1)

O PD-L1 é um recetor presente em células tumorais. O avelumab e atezolizumab são exemplos de fármacos que se ligam ao PDL-1 bloqueando-o (Cohen and McGovern 2005). Deste modo o PD-L1 não se consegue ligar, reduzindo assim as respostas antitumorais das células T (European Medicines Agency 2017).

3. Anticorpos Citotóxicos da Proteína 4 Associada a Linfócitos T (CTLA-4)

O CTLA-4 é um inibidor negativo presente nas células T, e a sua ativação promove a tolerância imunológica (Makhov et al. 2018).

A ativação de linfócitos T requer a ligação entre os seus recetores TCR e CD28 com recetores de células apresentadoras de antígeno (APC), nomeadamente o antígeno do complexo major de histocompatibilidade (MHC) e B7, respetivamente (Gato et al. 2013, Jorge 2019). Em resposta a essa ativação, o CTLA-4 induz tolerância imunológica através ligação com B7 nas APCs (Gato et al. 2013, Jorge 2019).

O ipilimumab é um anticorpo monoclonal recombinante humanizado, que atua através da ligação ao CTLA-4, impedindo a ligação ao ligando B7, ativando assim os linfócitos T e consequentemente aumenta a resposta antitumoral (Gato et al. 2013, European Medicines Agency 2011).

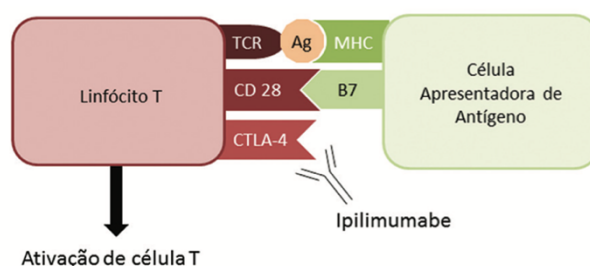


Figura 11- Esquema do mecanismo de ação dos fármacos anti-CTLA-4. Reproduzido de (Gato et al. 2013).

4. Inibidores do VEGF

O VEGF é expresso em todos os tecidos de CCRcc e pode ser o fator angiogénico tumoral mais importante, uma vez que se encontra implicado no crescimento tumoral e na progressão metastática (Cohen and McGovern 2005).

- Inibidores da tirosina-cinase dos recetores VEGF

O pazopanib, lenvatinib, cabozantinib, sunitinib e sorafenib são fármacos que inibem os recetores da tirosina-cinase que estão implicados no crescimento tumoral, angiogénese e progressão metastática (European Medicines Agency 2006, 2012, 2015, 2016, 2021b, 2021c).

- Bloqueio do VEGF

O bevacizumab liga-se ao VEGF secretado pelas células tumorais impedindo assim a sua ligação ao endotélio vascular e consequentemente a angiogénese (European Medicines Agency 2021a).

5. Inibidores da proteína alvo da Rapamicina Mamífero (mTOR)

A proteína alvo da rapamicina em mamíferos também conhecida como proteína associada à rapamicina é uma proteína cinase que regula funções celulares onde estão incluídas a tradução e a transcrição como crescimento celular, sobrevivência, metabolismo e imunidade (Singh 2021, Hua et al. 2019). A ativação desta via está relacionada com o comportamento agressivo traduzindo-se num mau prognóstico no CCR, uma vez que promove o crescimento tumoral e a metástase através de diversos mecanismos, como por exemplo, a sinalização do VEGF (Singh 2021, Hua et al. 2019, European Medicines Agency 2009). Deste modo, existe a necessidade de se identificarem alvos com potencial terapêutico e desenvolver novos fármacos para a sua inibição (Singh 2021). O everolimus é um exemplo de fármaco pertencente a este grupo farmacoterapêutico (Cohen and McGovern 2005). Este fármaco diminui os níveis do VEGF reduzindo assim os processos angiogénicos tumorais (European Medicines Agency 2009).

2.7. Estratificação do risco e escolha do tratamento

A escolha do tratamento para doentes com doença avançada é baseada em diferentes critérios, sendo o modelo de prognóstico do consórcio de CCRm o mais usado, o qual integra seis critérios decisivos (George Daniel and Jonasch Daniel 2022):

- I. Desempenho de *Karnofsky* (KPS) < 80 %
- II. Tempo desde o diagnóstico até ao tratamento < 1 ano
- III. Concentração de hemoglobina menor que o limite inferior do intervalo normal
- IV. Cálcio sérico maior que o limite superior do intervalo normal
- V. Contagem de neutrófilos maior que o limite superior do intervalo normal
- VI. Contagem de plaquetas maior que o limite superior do intervalo normal

Os doentes que não apresentem nenhum dos critérios descritos acima são considerados de risco baixo, enquanto aqueles que apresentam um ou dois desses critérios são considerados de risco intermédio (George Daniel and Jonasch Daniel 2022). Por fim, doentes com três ou mais critérios são considerados de elevado risco (George Daniel and Jonasch Daniel 2022).

CCRcc	
Risco elevado	Risco Intermédio e baixo
Recomendado: • Pembrolizumab + Axitinib • Cabozantinib + nivolumab Opções: • Sunitinib • Pazopanib • Tivozanib	Recomendado: • Pembrolizumab + Axitinib • Cabozantinib + nivolumab • Ipilimumab + nivolumab Opções: • Sunitinib • Pazopanib • Cabozantinib

Figura 12- Primeira linha de tratamento do CCRcc. Adaptado de (Powles 2021).

Apesar da cirurgia ser o tratamento de escolha para tumores primários localizados, e de se terem vindo a desenvolver e a introduzir no mercado terapêuticas farmacológicas mais dirigidas a alvos fisiopatológicos específicos, o sucesso do tratamento depende muito do grau e estadió da doença e da presença, ou não, de metástases (Caparica et al. 2020). Assim, torna-se essencial encontrar novos tratamentos para CCR (Caparica et al. 2020).

Diversos compostos naturais têm sido importantes para a investigação e desenvolvimento de novos fármacos (Caparica et al. 2020). Neste sentido, os compostos

polifenólicos que ocorrem naturalmente nas plantas, surgem como recursos promissores para prevenir e tratar doenças humanas, incluindo o cancro devido às suas propriedades biológicas muito promissoras (Caparica et al. 2020).

3. Compostos bioativos

A ideia de que a nutrição é um fator importante no desenvolvimento do cancro remota à antiguidade (Abdulla and Gruber 2000). No início do século XX, Abdulla et al, defenderam um regime alimentar rigoroso destinado a reduzir o risco de cancro, com base no consumo de alimentos de origem vegetal, e uma redução de carne, álcool e tabaco (Abdulla and Shukla 2014).

Também no início do último século, foram desenvolvidas duas hipóteses sobre as causas ambientais causadoras do cancro (Campbell 2017). A primeira era relacionada com a exposição ocupacional dos trabalhadores a agentes cancerígenos e a segunda, associada à ingestão de compostos presentes na dieta (Campbell 2017). Em 1931, Hoffman sugeriu que alimentos ricos em gordura e açúcar poderiam estar na lista de possíveis fatores contribuintes para o desenvolvimento do cancro (Abdulla and Shukla 2014, Campbell 2017). Por outro lado, evidências de estudos prospetivos e observacionais sugerem que consumir peixe gordo, três ou mais porções de fruta, vegetais, altos níveis de vitamina D e uma bebida alcoólica por dia pode reduzir o risco de desenvolver CCR (Richard E. Gray and Gabriel T. Harris 2019). De salientar que o ómega-3, presente em algumas espécies de peixes, possui um efeito protetor contra o cancro, uma vez que modula a produção de moléculas sinalizadoras inflamatórias denominadas de eicosanóides e o crescimento celular (Lee et al. 2020).

A escolha de uma dieta variada, equilibrada e saudável traz benefícios para a saúde, uma vez que o consumo de alimentos ricos em vitaminas, fibras e compostos bioativos está associada à prevenção do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, doenças autoimunes, doenças inflamatórias, diabetes e cancro (Alarcón-Flores et al. 2013, Balasundram, Sundram, and Samman 2006).

Os compostos fenólicos são metabolitos que derivam das vias da pentose fosfato, chiquimato e fenilpropanóides em plantas (Balasundram, Sundram, and Samman 2006). Estes compostos resultam do metabolismo secundário das plantas sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução (Balasundram, Sundram, and Samman 2006, Milene Priscila and Jorge Neuza 2006). Estes formam-se em condições de stresse como infeções, radiação UV, lesões, entre outros (Milene Priscila and Jorge Neuza 2006). Os compostos fenólicos estão presentes em quase todos os alimentos de origem vegetal. Em alimentos, os compostos fenólicos, são responsáveis pela cor, aroma e estabilidade oxidativa (Balasundram, Sundram, and Samman 2006, Milene Priscila and Jorge Neuza 2006). As

principais fontes de compostos fenólicos são frutas cítricas como laranja, limão e tangerina, mas também outras frutas como por exemplo cereja, ameixa, pera, maçã, sendo encontrados em maiores quantidades na polpa do que no sumo de fruta (Milene Priscila and Jorge Neuza 2006). Pimenta verde, brócolos, repolho roxo, cebola, alho e tomate também são excelentes fontes destes compostos (Milene Priscila and Jorge Neuza 2006).

Relativamente à sua estrutura química, estes compostos, apresentam hidroxilas e anéis aromáticos nas formas simples ou de polímeros que lhes conferem um poder antioxidante (Milene Priscila and Jorge Neuza 2006, Vaquero, Alberto, and de Nadra 2007).

Estes compostos têm vindo a ser estudados e apresentam diversas propriedades biológicas interessantes que os tornam como recursos promissores para prevenir e tratar algumas doenças humanas, incluído o cancro (Milene Priscila and Jorge Neuza 2006).

A atividade anticancerígena dos compostos fenólicos tem sido associada a diferentes tipos de cancro como colón, esófago, pulmão, fígado, mama e pele (Milene Priscila and Jorge Neuza 2006). Os compostos fenólicos que têm demonstrado maior atividade anticancerígena e potencial são o resveratrol, a quercetina, o ácido cafeico e os flavonóis (Milene Priscila and Jorge Neuza 2006).

Esses compostos podem ser naturais ou sintéticos e dentro deles destacam-se os polifenóis e fenóis simples (Milene Priscila and Jorge Neuza 2006)

3.1. Polifenóis

Taninos

Os taninos são substâncias de natureza fenólica, hidrolisáveis, com um peso molecular significativamente alto e capazes de formarem complexos insolúveis com os alcalóides e proteínas (Heim, Tagliaferro, and Bobilya 2002, Milene Priscila and Jorge Neuza 2006, Cunha et al. 2007). Podem ser classificados em taninos condensáveis e taninos hidrolisáveis (Cunha et al. 2007). Os primeiros são ésteres do ácido gálico formados a partir do chiquimato, enquanto os últimos, também denominados proantocianidinas, são oligómeros e polímeros de flavan-3-ol (catequina) e/ou flavan-3,4-diol (leucocianidina), produtos do metabolismo do fenilpropanol (Heim, Tagliaferro, and Bobilya 2002, Milene Priscila and Jorge Neuza 2006, Balasundram, Sundram, and Samman 2006).

Flavonóides

Os flavonóides são compostos largamente distribuídos na natureza e encontram-se presentes em folhas, frutas, sementes e em outras partes das plantas (Milene Priscila and

Jorge Neuza 2006). São compostos de baixo peso molecular e com cinco átomos de carbono (Milene Priscila and Jorge Neuza 2006).

A estrutura química destes compostos consiste em dois anéis aromáticos A e B unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico denominado anel C (Heim, Tagliaferro, and Bobilya 2002, Milene Priscila and Jorge Neuza 2006). O anel aromático A deriva da via do acetato/malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina através da via do chiquimato (Balasundram, Sundram, and Samman 2006). Variações nos padrões de substituição do anel C resultam nas principais classes de flavonóides, ou seja, flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (catequina), isoflavonas, flavonóides, antocianidinas (Balasundram, Sundram, and Samman 2006, Cunha et al. 2007). São exemplos das flavonas a pigenina e a luteolina; dos flavonóis, o campferol e a quercetina; e das flavononas, a naringenina (Cunha et al. 2007). De forma geral, os flavonóides são compostos capazes de diminuir a permeabilidade capilar e reforçar a sua resistência com marcada ação anti-inflamatória e atividade antioxidante relacionada com a inibição de vários sistemas enzimáticos (Cunha et al. 2007).

Um aspeto toxicológico a destacar diz respeito à ação mutagénica que os flavonóides livres manifestam sendo a quercetina, provavelmente o flavonóide com maiores propriedades mutagénicas (Cunha et al. 2007).

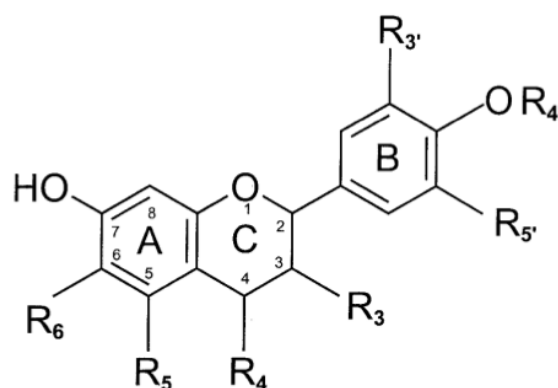


Figura 13- Estrutura molecular geral dos flavonóides. Reproduzido de: (Beecher 2003).

3.2. Fenóis simples

Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos, caracterizam-se por terem um anel benzénico, um grupo carboxílico e um ou mais grupos hidroxila, conferindo-lhe propriedades antioxidantes (Balasundram, Sundram, and Samman 2006). Compreendem dois grupos: os derivados

dos ácidos hidroxibenzóicos e os derivados dos ácidos hidroxicinâmicos (Mattila and Hellström 2007).

Os derivados dos ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e sirínico, enquanto os derivados dos ácidos hidroxicinâmicos são compostos aromáticos com três carbonos como os ácidos cafeico, ferúlico, p-coumárico e sinápico (Milene Priscila and Jorge Neuza 2006, Balasundram, Sundram, and Samman 2006).

Cumarinas

As cumarinas e os seus derivados hidroxilados são substâncias encontradas naturalmente numa ampla variedade de plantas, microrganismos e algumas espécies animais. A sua distribuição na planta é bastante heterogénea, sendo a sua concentração superior nas folhas e nos frutos, seguido dos caules e raízes (Cunha et al. 2007).

As propriedades farmacológicas, bioquímicas e as aplicações terapêuticas das cumarinas simples dependem dos seus padrões de substituição na sua estrutura química (Cunha et al. 2007).

3.3. Farmacocinética

Existem evidências de que os polifenóis oferecem potencial na proteção de doença renal (Guerreiro et al. 2022). Contudo, devido à sua desfavorável farmacocinética e extensa metabolização, a sua utilização clínica deve ser cuidadosa (Guerreiro et al. 2022, Johnson 2007).

Diversos estudos consideram o metabolismo e a biodisponibilidade de compostos fenólicos *in vivo*, aspetos cruciais para entender a contribuição benéfica para a saúde humana, no entanto, a maior parte dos estudos são realizados em indivíduos saudáveis e sabe-se que a maior parte das doenças renais pode alterar o destino *in vivo* de diversos compostos (Guerreiro et al. 2022). Deste modo, as modificações fisiopatológicas devem ser consideradas em estudos experimentais (Guerreiro et al. 2022).

Para melhor entender as implicações dos compostos fenólicos na saúde humana é importante perceber o mecanismo metabólico e a sua biodisponibilidade (Nardini et al. 2002). A estrutura química da maioria dos polifenóis é recebida pelo corpo como um xenobiótico, fazendo com que a biodisponibilidade destes compostos seja menor do que macro e micronutrientes (Kumar Singh et al. 2019, Ray and Mukherjee 2021).

A primeira parte do sistema digestivo é a boca, onde a saliva ajuda a lubrificar os alimentos e inclui enzimas que começam a digerir os compostos (Ray and Mukherjee 2021). De seguida passa para o estômago através do esófago (Ray and Mukherjee 2021, Teng and Chen 2019). Poucos polifenóis são absorvidos diretamente no estômago (Guerreiro et al. 2022). A absorção ocorre principalmente em dois locais, o intestino delgado e o colón sendo que o primeiro absorve principalmente glicosídeos com baixo peso molecular (L. Xie 2016). De salientar que estes compostos podem ainda sofrer efeito de primeira passagem, diminuindo a sua biodisponibilidade (D'Archivio et al. 2010).

No intestino delgado é onde são absorvidos a maior parte dos nutrientes presentes nos alimentos (Ray and Mukherjee 2021). A absorção de polifenóis no intestino delgado é bastante baixa (5-10%) (Kumar Singh et al. 2019, de Araújo et al. 2021). Os compostos polifenólicos de menor complexidade podem passar por biotransformação nos enterócitos e depois nos hepatócitos via reações de fase I (oxidação, redução e hidrólise) e principalmente fase II (conjugação) (Mithul Aravind et al. 2021, L. Xie 2016, D'Archivio et al. 2010, Kumar Singh et al. 2019). Estas transformações produzem cadeias de metabolitos conjugados solúveis em água que são libertados na corrente sistémica para entrega aos diversos órgãos e para excreção pela urina (Mithul Aravind et al. 2021).

Os restantes polifenóis não absorvidos, com maior peso molecular, acumulam-se com os conjugados biliares libertados no lúmen e são expostos às atividades enzimáticas microbianas do colon dando origem a metabolitos (Kumar Singh et al. 2019, Ray and Mukherjee 2021, Xie 2016, D'Archivio et al. 2010, Mithul Aravind et al. 2021). A transformação de compostos polifenólicos pelos microrganismos intestinais influencia positivamente a sua biodisponibilidade e bioatividade (Mithul Aravind et al. 2021, Kumar Singh et al. 2019). Uma vez metabolizados, são excretados pela bÍlis para retornar ao trato gastrointestinal (TGI) (Serreli and Deiana 2019, Teng and Chen 2019). Para além disso, podem atingir a circulação sanguínea onde são distribuídos pelos vários órgãos onde chegam ao rim para serem excretados pela urina (Teng and Chen 2019). Os metabolitos não absorvidos são eliminados pelas fezes (Marín et al. 2015).

Os metabolitos dos polifenóis podem seguir assim duas vias de excreção, a via biliar ou urinária sendo que metabolitos maiores e amplamente conjugados têm maior probabilidade de serem eliminados na bÍlis, enquanto pequenos conjugados são preferencialmente excretados na urina (Manach et al. 2004, Vladimir-Kneevi et al. 2012, Bohn 2014).

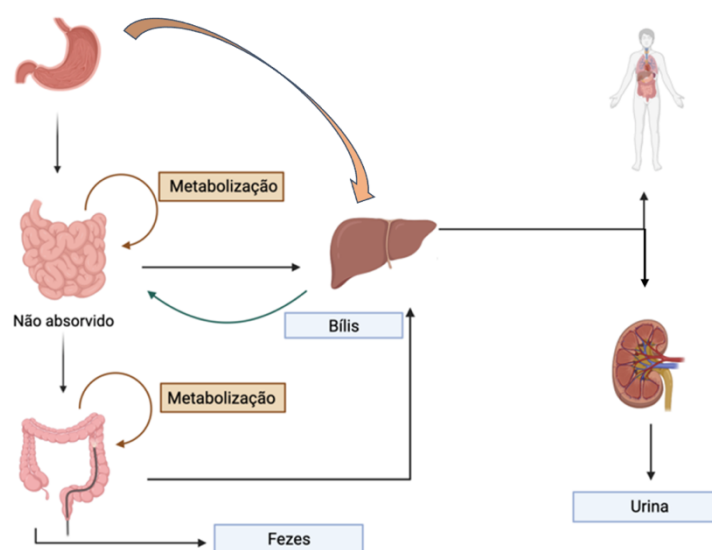


Figura 14- Representação esquemática da absorção e da metabolização de polifenóis. Adaptado de (Cipolletti et al. 2018, L. Xie 2016, Guerreiro et al. 2022) criado através biorender.com.

Assim, é essencial compreender a biodisponibilidade e o metabolismo dos compostos polifenólicos, de forma a estabelecer uma associação entre os metabolitos e os efeitos biológicos desta classe de compostos (Mcdade et al. 2021). Contudo, são ainda necessários mais estudos para determinar a sua eficácia na prevenção e/ou tratamento de diferentes doenças (Amawi et al. 2017). A realização de mais estudos e de ensaios em humanos tem sido encorajada, a fim de confirmar a eficácia dos polifenóis e os seus benefícios na saúde humana (Teng and Chen 2019).

Os compostos (metabolitos) estudados na presente dissertação são compostos fenólicos à exceção do ácido 1,3,5- trimetoxibenzene que é um metabolito não fenólico. A Tabela 5 indica as diferentes subclasses dos diversos metabolitos estudados, assim como as fontes alimentares onde se podem encontrar. Esta informação foi obtida através da pesquisa em bases de dados, nomeadamente *Phyto-Hub* e *Phenol-Explorer*.

Tabela 5- Metabolitos de compostos polifenólicos que serão estudados nesta dissertação, com as respetivas subclasses e fontes alimentares. Adaptado de (Phenol-Explorer 2005b, Dey et al. 2003, Phenol-Explorer 2011, Phenol-Explorer 2010b, Phenol-Explorer 2002a, Perestrelo et al. 2012, Owumi, Ajijola, and Agbeti 2019, Phenol-Explorer 2005d, Phenol-Explorer 2004d, Phenol-Explorer 2003, Phenol-Explorer 2004b, Bravo et al. 2006, Ramos et al. 1999, Gorinstein et al. 2002, Phenol-Explorer 2005a, Phenol-Explorer 2005c, Ramos et al. 1999, Phenol-Explorer 2010a).

Nome	Subclasse	Fontes alimentares	Referências bibliográficas
Ácido 4-hidroxifenilacético	Ácidos hidroxifenilacéticos	Cerveja, vinhos tinto e rosé, aveia, farinha, azeitonas verde e preta, azeite, cacau	(Phenol-Explorer 2005b, Dey et al. 2003)
Ácido fenilacético	Ácidos hidroxifenilacéticos	Chocolate preto, cápsulas de casca de amêndoa, cacau em pó em leite integral	(Phenol-Explorer 2011)
Ácido 3-hidroxifenilacético	Ácidos hidroxifenilacéticos	Chá preto sólido, cápsulas de extrato de pele amêndoa, cacau em pó em leite integral, chocolate preto	(Phenol-Explorer 2010b)
Ácido protocatecuico	Ácidos hidroxibenzóicos	Cerveja, licores, champanhe, vinhos rosé, tinto e branco, farinha, aveia, uvas, maçã verde, kiwi, amêndoas, azeite, vinagre, lentilhas, azeitonas verde e preta, cebola, sumo de laranja, cacau em pó em leite desnatado, nozes, amora	(Phenol-Explorer 2002a, Perestrelo et al. 2012, Owumi, Ajijola, and Agbeti 2019, Olthof et al. 2003)
Ácido homovanílico	Ácidos hidroxifenilacéticos	Cerveja, azeite, azeitonas verde e preta	(Phenol-Explorer 2005d)
Ácido vanílico	Ácidos hidroxifenilacéticos	Cerveja, vinhos tinto e rosé, pão, farinha, arroz, vinagre, azeitonas verde e preta, azeite, amêndoas	(Phenol-Explorer 2004d)
Ácido dihidrocafeico	Ácidos hidroxifenilpropanóicos	Azeitonas verdes e pretas	(Phenol-Explorer 2003)
Ácido m-coumárico	Ácidos hidroxicinâmicos	Cervejas, azeite, azeitonas verde e preta, sumos de laranja e uva, pó de cacau em leite integral, extrato de chá verde, pêssago, maçã	(Phenol-Explorer 2004b, Bravo et al. 2006, Ramos et al. 1999, Perestrelo et al. 2012, Gorinstein et al. 2002)
Ácido 3-hidroxibenzóico	Ácidos hidroxibenzóicos	Arando, cerveja	(Phenol-Explorer 2005a, Perestrelo et al. 2012)

Ácido benzóico	Ácidos hidroxibenzóicos	Arando, pó de cacau	(Phenol-Explorer 2005c, Ramos et al. 1999)
Ácido pirocatecuico	Ácidos hidroxibenzóico	Pó de mirtilo liofilizado	(Feliciano et al. 2016)
Ácido 4-hidroxibenzóico	Ácidos hidroxibenzóicos	Cerveja, cereja, champanhe, vinhos tinto, branco e rosé, farinha, arroz, aveia, arando, vinagre amêndoas, azeite, cenoura, <i>eggplant</i> , azeitonas verde e preta	(Phenol-Explorer 2004a)
Ácido sinápico	Ácidos hidroxicinâmicos	Cerveja, licores, vinhos tinto, rosé e branco, arroz, farinha, aveia, feijão, azeitonas preta e verde, maçã, pêssego, beringela, ameixa, batata, café	(Phenol-Explorer 2002b, Ramos et al. 1999, Gorinstein et al. 2002, Janiques et al. 2013)
Ácido sirínico	Ácidos hidroxibenzóicos	Cerveja, rum, <i>whisky</i> , vinho tinto, branco e rosé, aveia, farinha, arroz, maçã, sumo de uva, azeite, vinagre, noz-moscada, azeitonas pretas e verdes	(Phenol-Explorer 2004c, Ramos et al. 1999)
Ácido 1,3,5-trimetoxibenzeno	Metabolitos não fenólicos	Maças, azeitona preta e verde, <i>whisky</i>	(Phenol-Explorer 2010 ^a)

4. Técnicas de migração

Tal como descrito anteriormente, a maior parte das mortes por cancro deve-se à disseminação metastática (Pijuan et al. 2019). Assim, o estudo da migração celular *in vitro* na investigação na área do cancro apresenta um interesse particular (Justus et al. 2014).

A migração celular é definida como o movimento real de células individuais de um local para outro e pode acontecer de forma individual ou coletiva (Grada et al. 2017, Justus et al. 2014). Essa migração é essencial para que o cancro consiga disseminar-se pelo corpo e aderir a um local distante do tumor primário (Justus et al. 2014).

4.1. Migração Coletiva

A migração coletiva é o movimento coordenado de um grupo de células que mantêm as suas conexões intercelulares e polaridade coletiva (Grada et al. 2017). Este movimento celular permite que as células móveis carreguem outros tipos de células imóveis e permite que as células em migração influenciem outras, garantido assim a distribuição celular adequada (Pijuan et al. 2019).

Este tipo de migração ocorre com um grupo de células coesas que retêm junções célula-célula e coordena a atividade do citoesqueleto entre as células vizinhas (Pijuan et al. 2019).

O ensaio de cicatrização de ferida ou *Wound Healing Assay* (WHA) é um método utilizado para estudar a migração celular coletiva. Este consiste na realização de uma fenda formando uma lacuna numa monocamada de células confluentes, com posterior captação de imagens em tempos regulares, onde é possível verificar o preenchimento da lacuna criada (Rodriguez, Wu, and Guan 2005, Grada et al. 2017, Justus et al. 2014). Esta técnica compreende quatro etapas:

1. Preparação da monocamada

O número necessário de células para formar a monocamada confluyente é determinado de acordo com o tipo de linha celular e o tamanho dos poços utilizados (Grada et al. 2017). Após inoculação, os poços são incubados para formar uma monocamada confluyente (Grada et al. 2017).

2. Criação da fenda

É utilizada uma ponta de uma micropipeta de plástico estéril para simular uma fenda *in vivo* criando assim uma zona livre de células em cada poço (Grada et al. 2017). É

importante inclinar a pipeta corretamente e aplicar pressão consistente para criar uma largura de espaço consistente (Grada et al. 2017).

3. Adição dos compostos

A monocamada é lavada com meio basal para remover detritos celulares e é adicionado meio celular completo. A maior parte dos ensaios são realizados sob as seguintes condições: 37 °C e 5% de CO₂ (Grada et al. 2017).

4. Aquisição de imagens

As medições são geralmente feitas por 24 h na tentativa de limitar o estudo à migração celular e minimizar a contribuição da proliferação celular para o preenchimento da lacuna. No entanto, o tempo deve ser ajustado de acordo com o tipo de célula utilizado (Grada et al. 2017). A área da ferida pode ser calculada usando o software de domínio público *ImageJ*® (Pijuan et al. 2019).

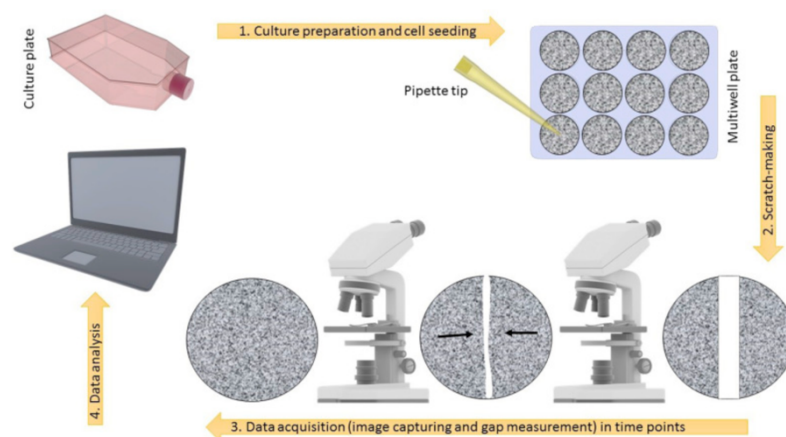


Figura 15- Resumo do fluxo de trabalho do ensaio in vitro de cicatrização de feridas. 1- Cultura celular e preparação das células; 2- Criação da ferida; 3- Aquisição de dados através da captura de imagens; 4- Análise dos dados. Reproduzido de (Grada et al. 2017).

Este ensaio é um dos mais simples e económicos e é útil para determinar a capacidade de migração de massas celulares inteiras. Pode ser aplicado em qualquer substrato, as células movem-se numa determinada direção para fechar a ferida e a migração pode ser observada e registada ao longo do tempo (Justus et al. 2014, Liang, Park, and Guan 2007, Rodriguez, Wu, and Guan 2005). Contudo, este ensaio apresenta algumas limitações tais como: não ser adequado para células não aderentes, o facto de não medir a quimiotaxia celular e o risco de poder existir algum destacamento das células (Justus et al. 2014, Rodriguez, Wu, and Guan 2005).

4.2. Migração individual

A migração celular individual é mediada pela atividade do citoesqueleto sem interações célula-célula com células vizinhas, e tem sido descrito como importante em muitos processos fisiológicos *in vivo*, como no desenvolvimento embrionário e nos estádios iniciais de invasão no processo metastático (Rodriguez, Wu, and Guan 2005). Por exemplo, as células cancerígenas podem migrar individualmente através do tipo de movimento mesenquimatoso ou amebóide (Pijuan et al. 2019).

Este tipo de migração individual ocorre em células cujas interações com o substrato são fracas tais como linfócitos, neoplasias hematopoiéticas, células de carcinoma de pequenas células do pulmão e células de carcinoma mamário (Pijuan et al. 2019).

O ensaio de *Boyden Chamber* ou *Transwell* é uma técnica frequentemente utilizada para avaliar a migração celular individual (Rodriguez, Wu, and Guan 2005). Neste ensaio as células são colocadas num lado de uma membrana porosa e observa-se a migração individual até ao outro lado da mesma, contabilizando-se o número células que migraram (Gau and Roy 2020).

Uma vantagem deste método é permitir a quimiotaxia e funciona tanto para células aderentes como não aderentes (Gau and Roy 2020). Contudo, também apresenta limitações tais como a dificuldade em visualizar células e a sua morfologia, devido ao estado transitivo das células durante a migração através dos poros (Gau and Roy 2020, (Pijuan et al. 2019).

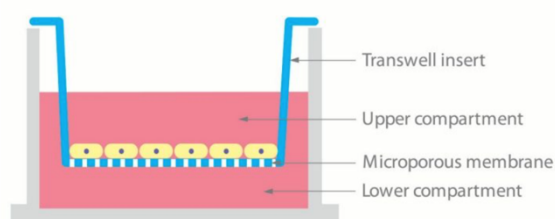


Figura 16- Ilustração do modelo de migração individual *Transwell*. Reproduzido de: (Corning n.d.).

Capítulo II. Objetivo

A presente dissertação teve como objetivo o estudo do impacto de diferentes metabolitos de compostos polifenólicos na migração de células renais tumorais humanas, através da:

- Realização de uma revisão bibliográfica sobre cancro, cancro renal, o impacto desta patologia a nível da saúde pública, características fisiopatológicas e opções terapêuticas disponíveis;
- Realização de uma revisão bibliográfica sobre os metabolitos de compostos polifenólicos, as suas propriedades biológicas, incluindo a sua potencial ação anti-tumoral;
- Pesquisa de metabolitos de compostos polifenólicos presentes na dieta, assim como dos seus metabolitos e precursores em bases de dados como *Phenol-Hub* e *Phenol Explorer*;
- Realização de um estudo experimental «in vitro» utilizando as células 786-O de carcinoma renal humano, para avaliar o impacto de diferentes metabolitos de compostos polifenólicos na migração celular, através do ensaio de *Wound Healing*.

Capítulo III. Trabalho Experimental

1. Materiais e Métodos

1.1. Reagentes

A linha celular humana 786-O (Carcinoma Renal de Células Claras) foram adquiridas à *American Type Culture Collection* (ATCC). Esta linha celular é proveniente de um adenocarcinoma primário de células renais claras de um homem caucasiano de 58 anos (ATCC 2022).

Os reagentes e solventes utilizados adquiridos à Corning (USA) foram o FBS (Soro Fetal Bovino), PBS (Tampão fosfato-salino), DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) e FBS (Soro Fetal Bovino). O ácido protocatecuico e ácido sinápico foram adquiridos à Sigma Aldrich e os ácidos 3-hidroxifenilacético, dihidrocafeico, m-coumárico e siríngico foram adquiridos à Alfa Aesar (EUA). Os restantes compostos foram cedidos pelo laboratório da Doutora Cláudia Nunes dos Santos da Universidade NOVA de Lisboa.

Os compostos analisados foram escolhidos com base em estudos de farmacocinética descritos em bases de dados, nomeadamente *Phenol-Explorer* (<http://phenol-explorer.eu>) e *Phyto-Hub* (<https://phytohub.eu>), que indicam os compostos que se encontram em maior quantidade no rim. As concentrações dos compostos utilizadas nos ensaios de migração celular foram estabelecidas com base em ensaios de viabilidade celular previamente realizados no grupo de investigação, nomeadamente através do ensaio de cristal violeta. Foram utilizadas concentrações dos compostos onde a viabilidade celular foi mantida, usando as mesmas condições experimentais do ensaio, nomeadamente a presença de 2% de FBS. As concentrações utilizadas são descritas na tabela seguinte.

Tabela 6- Concentrações estudadas dos diferentes compostos (metabolitos) estudados.

Compostos analisados	Concentração (μM)
Ácido 4-hidroxifenilacético	400
Ácido fenilacético	150
Ácido 3-hidroxifenilacético	150
Ácido protocatecuico	100
Ácido homovanílico	100
Ácido vanílico	100
Ácido dihidrocafeico	100
Ácido m-coumárico	100
Ácido 3-hidroxibenzóico	100
Ácido benzóico	100
Ácido pirocatecuico	100
Ácido 4-hidroxibenzóico	100
Ácido sinápico	50
Ácido sirínico	50
Ácido 1,3,5-trimetoxibenzeno	50

1.2. Métodos

1.2.1. Cultura celular

1.2.1.1. Subcultura ou passagem de células

As células 786-O foram mantidas em meio DMEM com 10 % de FBS e solução de penicilina-estreptomicina 1% e mantidas a 37°C em atmosfera húmida com 5% de CO₂ em frascos T25 ou T75. Quando atingiram a confluência de 80 %, as células foram destacadas pelo processo de tripsinização e colocadas num novo frasco numa diluição 1:4 e/ou utilizadas para ensaios de acordo com as metodologias abaixo.

1.2.1.2. Contagem de células

Para obter o número de células indicado para a realização do ensaio utiliza-se o método de contagem de células. É retirada uma alíquota de 10 µL para uma câmara de *Newbauer* onde é colocada uma lamela. A câmara deve estar dividida em quatro partes. As células são contadas em cada quadrante, faz-se a média e aplica-se o fator de diluição. Para a realização deste ensaio foi necessária uma densidade de aproximadamente 4×10^4 células.

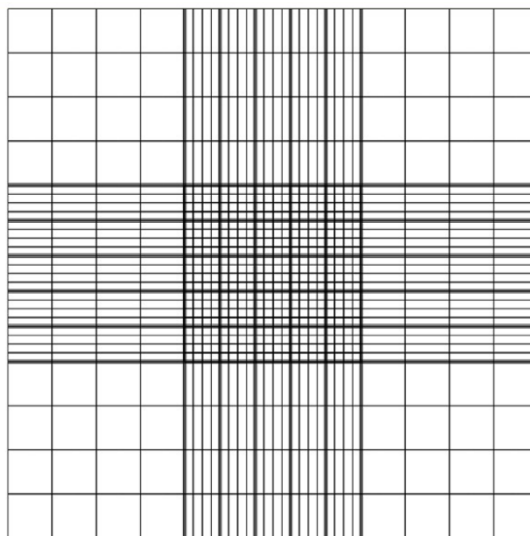


Figura 17- Vista ao microscópio da zona de contagem da câmara de Neubauer. Reproduzido de: (Barbedo 2013).

1.2.2. Ensaio *Wound-healing*

Com base na densidade celular pretendida é calculado o volume necessários de células em suspensão por mL e de meio completo contendo 10 % FBS, de forma a obter um volume final de 500 μ L por poço numa placa de 24 poços com posterior incubação por 24 horas.

A solução inicial de cada composto designada de solução *stock* tem uma concentração padrão. Deste modo são necessários diversos cálculos para obter a concentração desejada. O primeiro cálculo diz respeito ao cálculo da concentração que é necessária para a solução de trabalho de modo que a concentração final no poço seja a pretendida. O segundo cálculo diz respeito ao volume do composto a pipetar da solução *stock* de forma a obter a concentração obtida no primeiro cálculo correspondente à solução de trabalho.

No dia seguinte, é realizada uma fenda com o auxílio de uma ponta de uma pipeta P200, retira-se o meio, lava-se com PBS 1x e coloca-se 25 μ L do composto e 475 μ L do novo meio agora contendo 2 % FBS. Nesta fase foi realizada a primeira captura de imagem observada ao microscópio com objetiva 10X sendo, posteriormente, captadas aos tempos 4 h, 6 h, 10 h e 12 h. Os poços foram marcados com caneta de acetato de modo que fossem fotografados sempre na mesma zona. A área do fecho da ferida foi medida através do Software ImageJ®, Fiji com o plugin MRI ferida cicatrização.

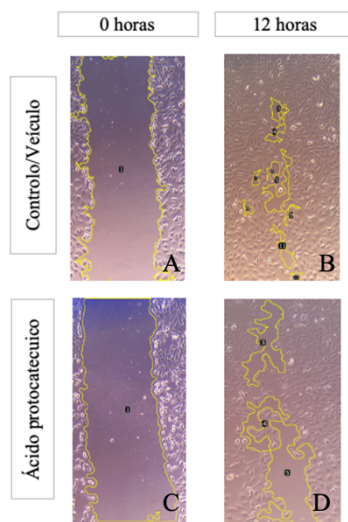


Figura 18- Determinação da área de fecho da ferida das células 786-O, através do software *ImageJ*®, *Fiji* com o plugin MRI ferida cicatrização. **A-** Controlo às 0 h; **B-** Controlo às 12 h; **C-** Células expostas ao ácido protocatecuico às 0 h; **D-** Células expostas ao ácido protocatecuico às 12 h.

Para comparar os resultados entre as diferentes condições experimentais, foi realizado o teste de t-Student após a análise da normalidade através do teste Shapiro Wilk e da homogeneidade das variâncias, através do teste de Levene.

2. Resultados

Tal como referido anteriormente, os metabolitos estudados são obtidos através da metabolização de outros compostos polifenólicos, obtidos através da alimentação. Os precursores são apresentados na Tabela 7 que foi construída a partir das bases de dados *Phenol-Explorer* e *Phyto-hub*. Muitos dos metabolitos apresentados podem ter origem em diferentes compostos e, por sua vez, estes podem originar diversos metabolitos.

O ácido 4-hidroxifenilacético pertence à subclasse dos ácidos hidroxifenilacéticos e tem como precursores a epicatequina catequina, ácido cafeico, quercetina, cianidina 3-glicosídeo e dímero de rocianidina A2 (Phyto-Hub 2018c).

O ácido fenilacético pertence à subclasse dos ácidos hidroxifenilacéticos e tem como precursor a quercetina (A. F. Almeida et al. 2018).

O ácido 3-hidroxifenilacético pertence à subclasse dos ácidos hidroxifenilacéticos e tem como precursores a epicatequina, dímero de rocianidina A2, quercetina, ácido cafeico, rutina, ácido clorogénico e ácido quínico (Phyto-Hub 2018b, Gonthier et al. 2003).

O ácido protocatecuico pertence à subclasse dos ácidos hidroxibenzóicos e tem como precursores o ácido ferúlico, o ácido cafeico, a quercetina e a cianidina 3-O- glicosídeo (Phyto-Hub 2018g, Vitaglione et al. 2007).

O ácido homovanílico pertence à subclasse dos ácidos hidroxifenilacéticos e tem como precursores a rutina e a quercetina (Phyto-Hub 2018e).

O ácido vanílico pertence à subclasse dos ácidos hidroxibenzóicos e tem como precursores o ácido ferúlico, ácido cafeio, ácido dihidrocafeico e cianidina 3-O-glicosídeo (Phyto-Hub 2018i).

O ácido dihidrocafeico pertence à subclasse dos ácidos hidroxifenilpropanóicos e tem como precursores o ácido ferúlico, o ácido cafeico, o ácido dihidrocafeico e a cianidina 3-O-glicosídeo (Phyto-Hub 2018d, Santana-Gálvez et al. 2020).

O ácido m-coumárico pertence à subclasse dos ácidos hidroxicinâmicos e tem como precursores o ácido cafeico, a rutina e o ácido rosmarínico (Gonthier et al. 2003).

O ácido 3-hidroxibenzóico pertence à subclasse dos ácidos hidroxibenzóico e tem como precursores a cianidina 3-O-glicosídeo, o ácido cafeico, o ácido ferúlico e o ácido clorogénico (Phyto-Hub 2018a, A. F. Almeida et al. 2018, Vitaglione et al. 2007, Gonthier et al. 2003).

O ácido benzóico pertence à subclasse dos ácidos hidroxibenzóicos e tem como precursor o ácido p-coumárico (Phyto-Hub 2018f).

O ácido pirocatecuico pertence à classe dos ácidos hidroxibenzóicos (Muljono, Scheffer, and Verpoorte 2002, Grootveld and Halliwell 1988).

O ácido 4-hidroxibenzóico pertence à subclasse dos ácidos hidroxibenzóicos e tem como precursores o ácido cafeico, o ácido ferúlico, a quercetina, o ácido clorogénico e o ácido quínico (A. F. Almeida et al. 2018, Gonthier et al. 2003).

O ácido sinápico pertence à subclasse dos ácidos hidroxicinâmicos e tem como precursor o aldeído sinápico (Nair et al. 2004)

O ácido siríngico pertence à subclasse dos ácidos hidroxibenzóicos e tem como precursor a malvidina-3-O-glicosídeo (Phyto-Hub 2018h).

O ácido 1,3,5-trimetoxibenzeno pertence à subclasse dos metabolitos não fenólicos e tem como precursor a malvidina-3-O-glicosídeo (Wu et al. 2004).

Tabela 7- Lista de precursores dos diferentes metabolitos de compostos polifenólicos analisados.

Precusores	Metabolitos	Referências bibliográficas
Epicatequina, catequina, ácido cafeico, quercetina, cianidina 3-O-glicosídeo, dímero de rocianidina A2	Ácido 4-hidroxifenilacético	(Phyto-Hub 2018c)
Quercetina	Ácido fenilacético	(A. F. Almeida et al. 2018)
Epicatequina, dímero de rocianidina A2, quercetina, ácido cafeico, rutina, ácido clorogénico, ácido quínico	Ácido 3-hidroxifenilacético	(Phyto-Hub 2018b, Gonthier et al. 2003)
Ácido ferúlico, ácido cafeico, quercetina, cianidina 3-O-glicosídeo	Ácido protocatecuico	(Phyto-Hub 2018g, Vitaglione et al. 2007)
Rutina, quercetina	Ácido homovanílico	(Phyto-Hub 2018e)
Ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido dihidrocafeico, cianidina 3-O-glicosídeo	Ácido vanílico	(Phyto-Hub 2018i)
Ácido cafeico, ácido ferúlico, eriocitrina, eriodictiol, ácido 5-O-cafeoilquínico, ácido clorogénico	Ácido dihidrocafeico	(Phyto-Hub 2018d)(Phyto-Hub 2018d) (Santana-Gálvez et al. 2020)
Ácido rosmarínico, ácido clorogénico, ácido cafeico	Ácido m-coumárico	(Gonthier et al. 2003)
Cianidina 3-O-glicosídeo, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido 5-O-cafeoilquínico, ácido clorogénico	Ácido 3-hidroxibenzóico	(Phyto-Hub 2018a ^a , A. F. Almeida et al. 2018, Vitaglione et al. 2007, Gonthier et al. 2003)
Ácido p-coumárico	Ácido benzóico	(Phyto-Hub 2018f)
Corismato	Ácido pirocatecuico	(Muljono, Scheffer, and Verpoorte 2002, Grootveld and Halliwell 1988)

Quercetina, ácido ferúlico, clorogénico, ácido cafeico, ácido quínico	Ácido 4- hidroxibenzóico	(A. F. Almeida et al. 2018, Gonthier et al. 2003)
Aldeído sinápico	Ácido sinápico	(Nair et al. 2004)
Malvidina-3-O-glicosídeo	Ácido sirínico	(Phyto-Hub 2018h)
Floroglucinol	1,3,5-trimetoxibenzeno	(Wu et al. 2004)

Neste trabalho avaliou-se o impacto de diversas subclasses de compostos polifenólicos, nomeadamente, dos ácidos hidroxifenilacéticos (Figuras 19-22), dos ácidos hidroxibenzóicos (Figuras 23-29), dos ácidos hidroxifenilpropanóicos (Figura 30), dos ácidos hidroxicinâmicos (Figuras 31 e 32) e por fim, dos metabolitos não fenólicos (Figura 33) na migração das células 786-O, ao longo do tempo (0-12 h).

Após a recolha das percentagens de fecho da ferida de cada composto às 12 h, esses valores foram normalizados ao seu controlo, de forma a ser possível comparar o efeito anti migratório.

Tabela 8- Média das percentagens de fecho da ferida às 12 h e os respetivos valores normalizados.

Compostos	Nº de Ensaaios	Média ± Desvio Padrão do fecho da ferida às 12 h	Valores do fecho da ferida normalizados às 12 h (%)
Controlo	7	87,16 ± 10,36 %	100 ± 0 %
Ácido 4-hidroxifenilacético	2	91,40 ± 11,77 %	104,86 ± 13,50 %
Ácido fenilacético	4	88,90 ± 6,71 %	102,00 ± 7,70 %
Ácido 3-hidroxifenilacético	2	94,63 ± 2,60 %	108,57 ± 2,99 %
Ácido protocatecuico	4	76,06 ± 6,86 % **	87,26 ± 2,84 % **
Ácido homovanílico	3	72,06 ± 6,86 %	82,67 ± 7,87 %
Ácido vanílico	2	74,22 ± 1,08 % *	85,16 ± 1,24 % *
Ácido dihidrocafeico	4	84,89 ± 6,23 % *	97,39 ± 7,15 % *
Ácido m-coumárico	2	95,83 ± 5,89 %	109,95 ± 6,76 %
Ácido 3-hidroxibenzóico	2	98,85 ± 1,62 %	113,42 ± 1,86 %
Ácido benzóico	2	89,41 ± 13,30 %	102,59 ± 15,26 %
Ácido pirocatecuico	2	86,10 ± 17,65 %	98,79 ± 20,25 %
Ácido 4-hidroxibenzóico	2	99,11 ± 1,26 % *	113,71 ± 1,44 % *
Ácido sinápico	2	84,36 ± 19,89 %	96,79 ± 11,82 %
Ácido siríngico	2	86,55 ± 16,39	99,30 ± 18,80 %
Ácido 1,3,5-trimetoxibenzeno	2	86,23 ± 14,75	98,94 ± 16,92 %

* (p < 0,05), ** (p < 0,01), quando comparados com o controlo (teste t-Student).

Relativamente à classe dos ácidos hidroxifenilacéticos, o ácido 4-hidroxifenilacético, o ácido fenilacético, o ácido 3-hidroxifenilacético e o ácido homovanílico apresentaram percentagens de fecho da ferida, quando comparados ao controlo de 104,86 ± 13,50 % (n=2), 102,00 ± 7,70 % (n=4), 113,42 ± 1,86 % (n=2) e 82,67 ± 7,87 % (n=3), respetivamente.

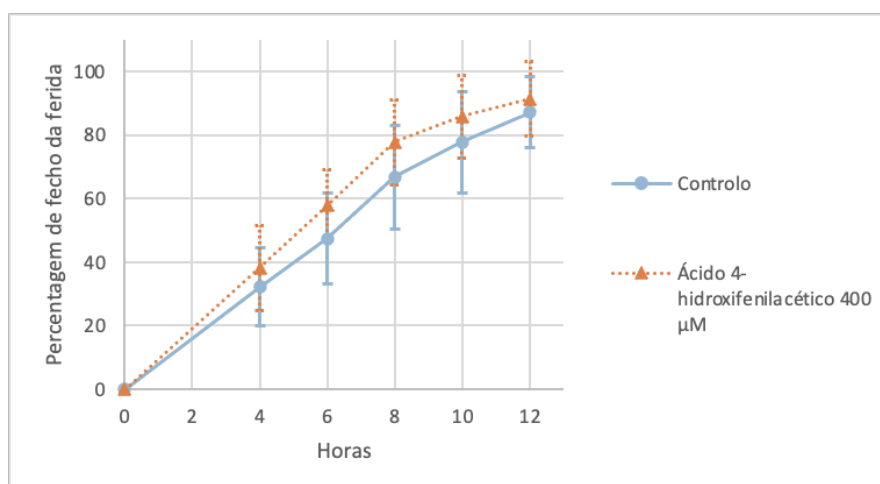


Figura 19- Impacto do ácido 4-hidroxifenilacético na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média ± desvio padrão (n= 2).

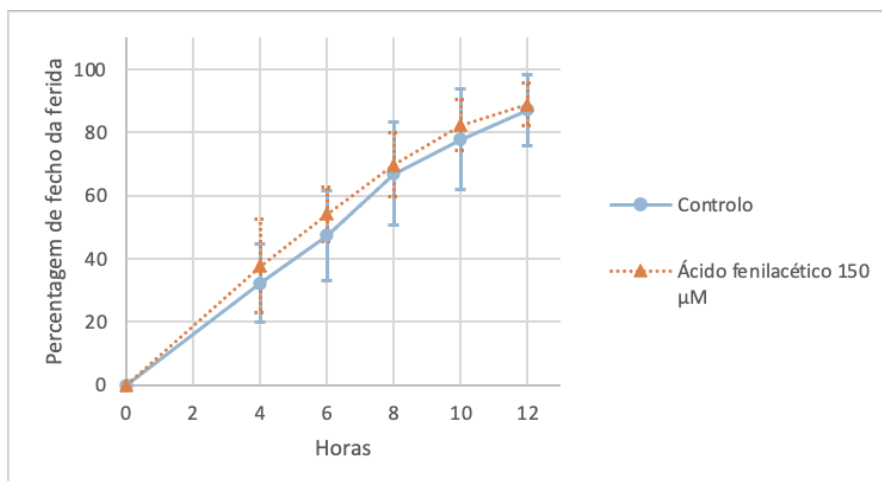


Figura 20- Impacto do ácido fenilacético na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=4).

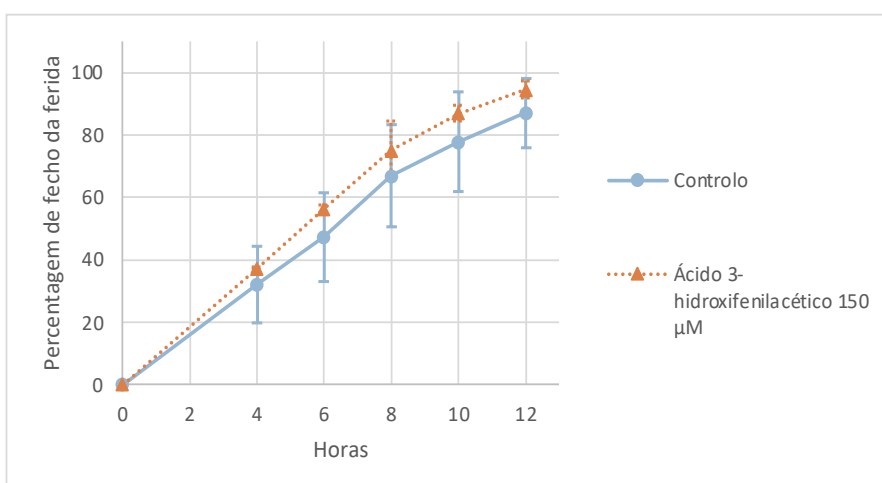


Figura 21- Impacto do ácido 3-hidroxifenilacético na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=2).

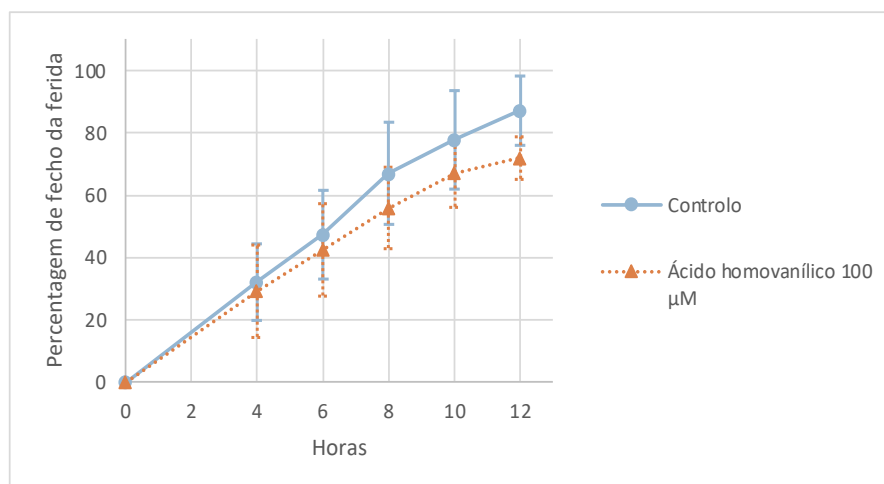


Figura 22- Impacto do ácido homovanílico na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=3).

No que diz respeito à classe dos ácidos hidroxibenzoicos, os ácidos protocatecuico, vanílico, 3-hidroxibenzoico, benzoico, pirocatecuico, 4-hidroxibenzoico e sirínigico obtiveram percentagens de fecho da ferida de $87,26 \pm 2,84$ % ($p < 0,05$) (n=2), $85,16 \pm 1,24$ % ($p < 0,01$) (n=2), $113,42 \pm 1,86$ (n=2), $102,59 \pm 15,26$ (n=2), $98,79 \pm 20,25$ (n=2), $113,71 \pm 1,44$ % ($p < 0,01$) (n=2), $99,30 \pm 18,80$ (n=2) respetivamente, quando comparados ao controlo.

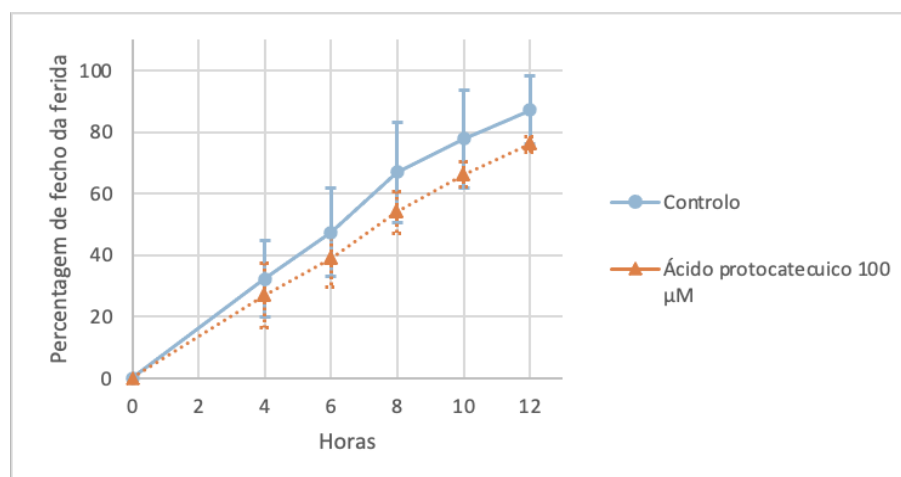


Figura 23- Impacto do ácido protocatecuico na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=4).

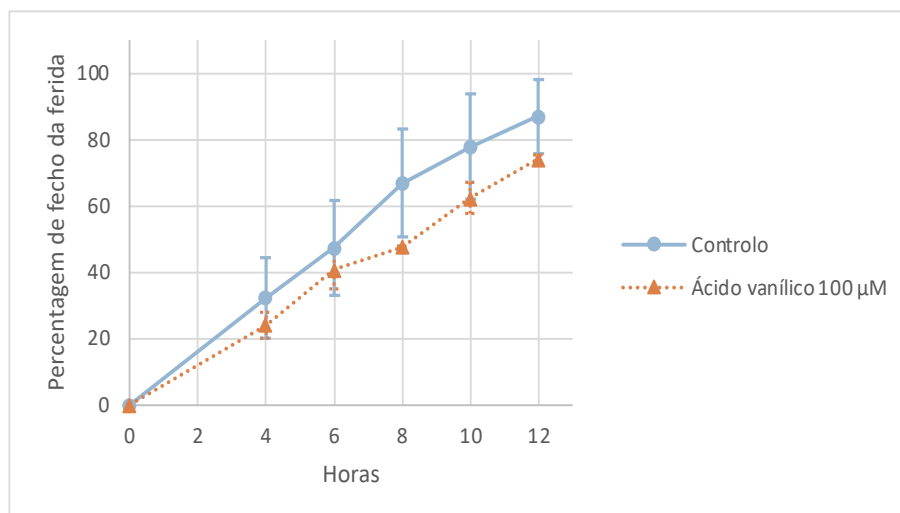


Figura 24- Impacto do ácido vanílico na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=2).

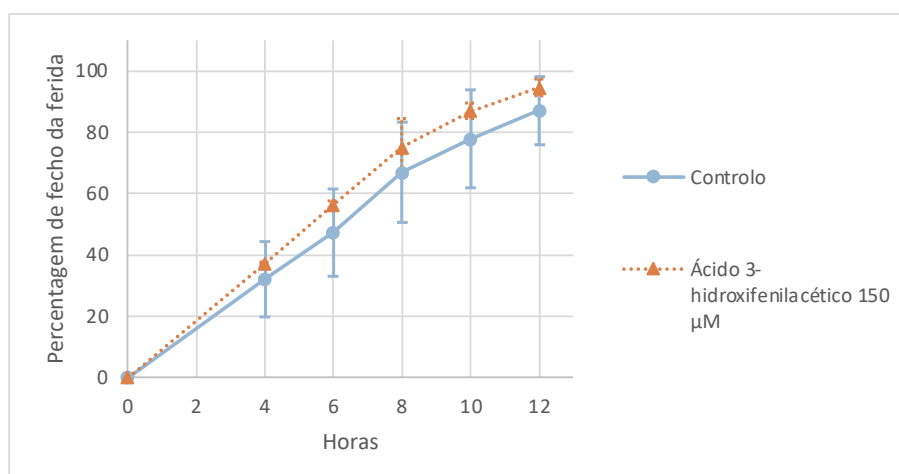


Figura 25- Impacto do ácido 3-hidroxibenzoico na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=2).

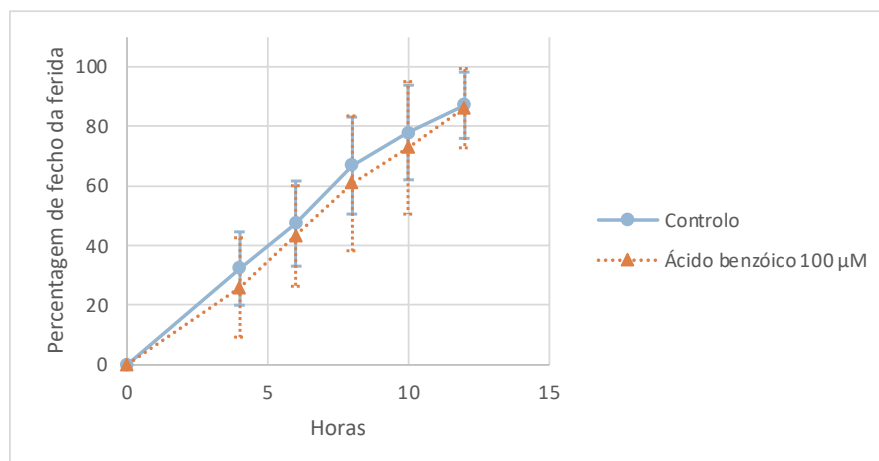


Figura 26- Impacto do ácido benzóico na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=2).

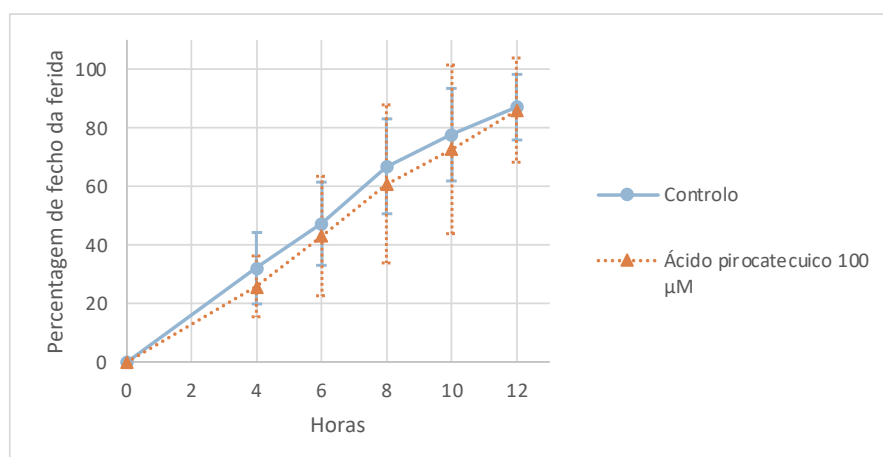


Figura 27- Impacto do ácido pirocatecuico na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=2).

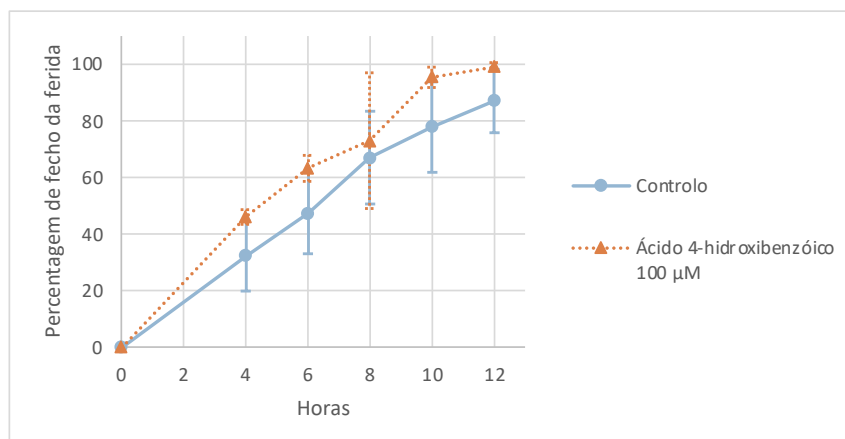


Figura 28- Impacto do ácido 4-hidroxibenzoico migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=2)

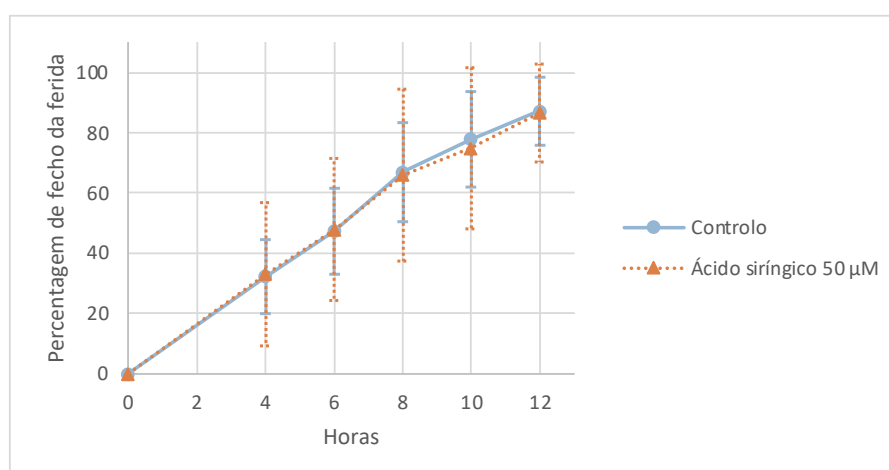


Figura 29- Impacto do ácido sirínico na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=2).

O ácido dihidrocafeico, pertencente à subclasse dos ácidos hidroxifenilpropanóicos apresentou uma percentagem de fecho da ferida de $97,39 \pm 7,15 \%$ ($p < 0,01$) ($n=4$).

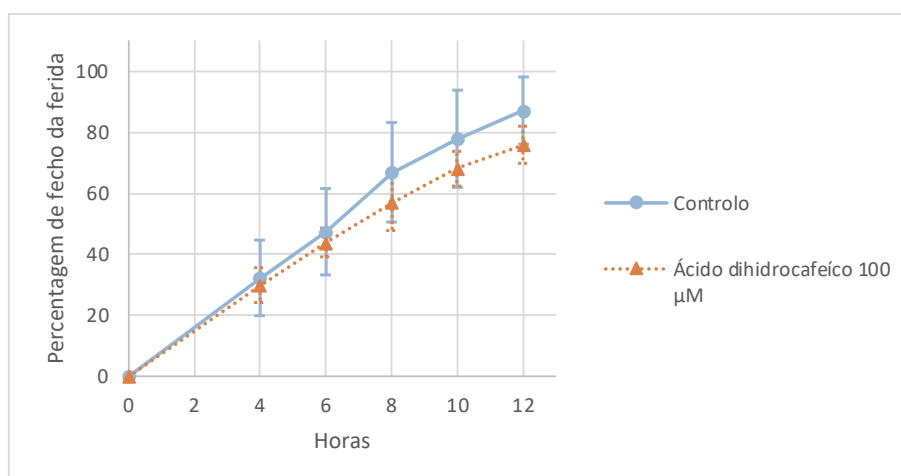


Figura 30- Impacto do ácido dihidrocafeico na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão ($n=4$).

O ácido m-coumárico e sinápico pertencentes à classe dos ácidos hidroxicinâmicos apresentaram percentagens de fecho da ferida de $109,95 \pm 6,76 \%$ ($n=2$) e $96,79 \pm 11,82 \%$ ($n=2$), respetivamente, quando comparados com o controlo.

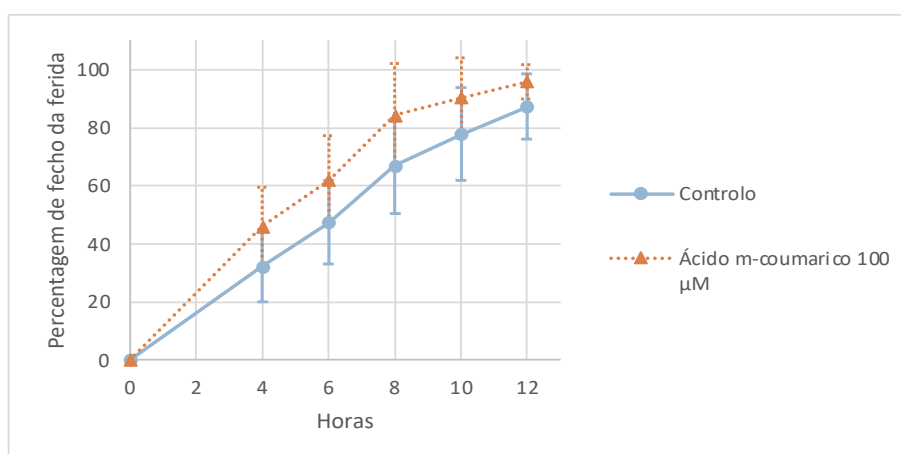


Figura 31- Impacto do ácido m-coumárico na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão ($n=2$).

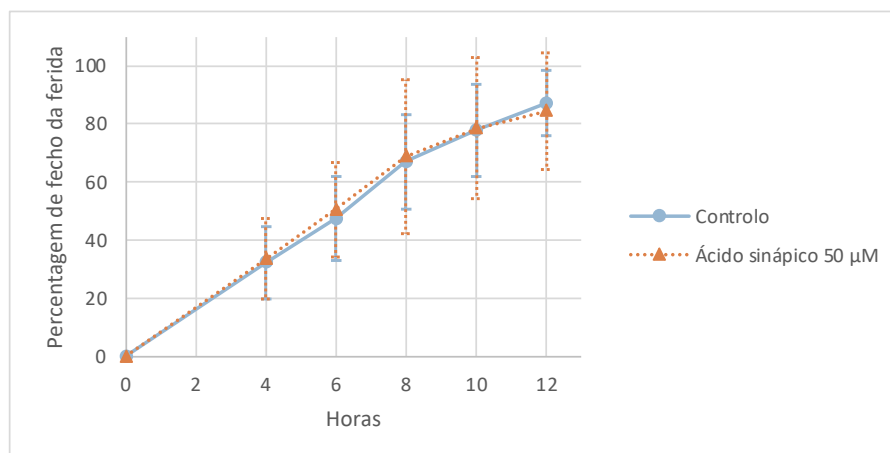


Figura 32- Impacto do ácido sinápico na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=2)

Por fim, o ácido 1,3,5- trimetoxibenzeno pertence à subclasse dos metabolitos não fenólicos apresentou uma percentagem de fecho de $98,94 \pm 16,92$ % (n=2).

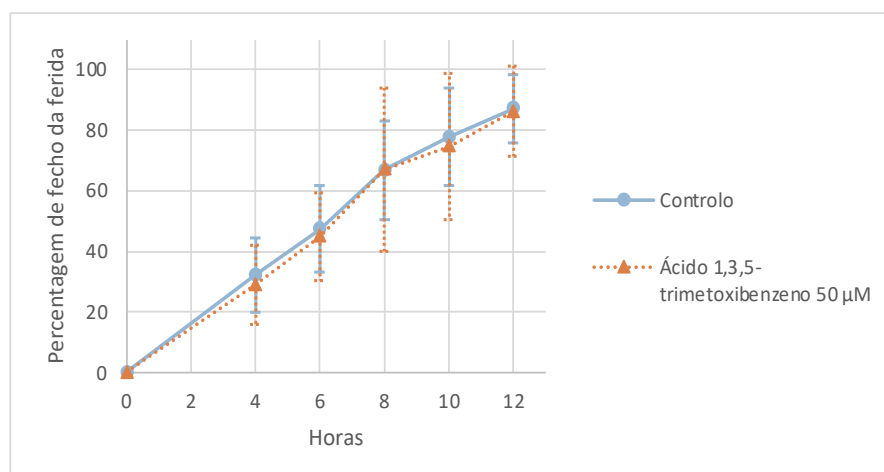


Figura 33- Impacto do ácido 1,3,5-trimetoxibenzeno na migração de células 786-O (0-12 h), por comparação com o controlo através do ensaio de WHA. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=2)

Globalmente, após análise estatística das diferenças observadas na migração celular ao longo do tempo, verificou-se que os compostos não demonstraram um grande efeito inibitório na migração das células 786-O. Os compostos menos promissores, ultrapassando os valores do controlo (atendendo ao diferencial com o controlo), foram o ácido 4-hidroxibenzóico (13,71 %), o ácido 3-hidroxibenzóico (8,57 %), o ácido m-

coumárico (9,95 %), o ácido 3-hidroxifenilacético (8,57 %), o ácido 4-hidroxifenilacético (4,86 %), o ácido benzóico (2,59 %), o ácido fenilacético (2,00 %).

Os compostos mais promissores, apresentando uma maior redução da migração celular, foram o ácido homovanílico (17,33 %), o ácido vanílico (14,84 %) e o ácido protocatecuico (12,74 %). De seguida, o ácido dihidrocafeico (2,61 %), o ácido pirocatecuico (1,21 %), o ácido 1,3,5-trimetoxibenzeno (1,06 %) e por fim o ácido sirínico (0,7 %).

Tabela 9- Compostos mais promissores estudados e a respetiva atividade anti-migratória das células 786-O observada.

Compostos	Redução da Migração celular (valores normalizados ao controlo)
Ácido homovanílico	17,33 ± 7,87 %
Ácido vanílico	14,84 ± 1,24 % *
Ácido protocatecuico	12,74 ± 2,84 % **
Ácido dihidrocafeico	2,61 ± 7,15 % *
Ácido pirocatecuico	1,24 ± 20,25 %
Ácido 1,3,5-trimetoxibenzeno	1,06 ± 16,92 %
Ácido sirínico	0,7 ± 18,80 %

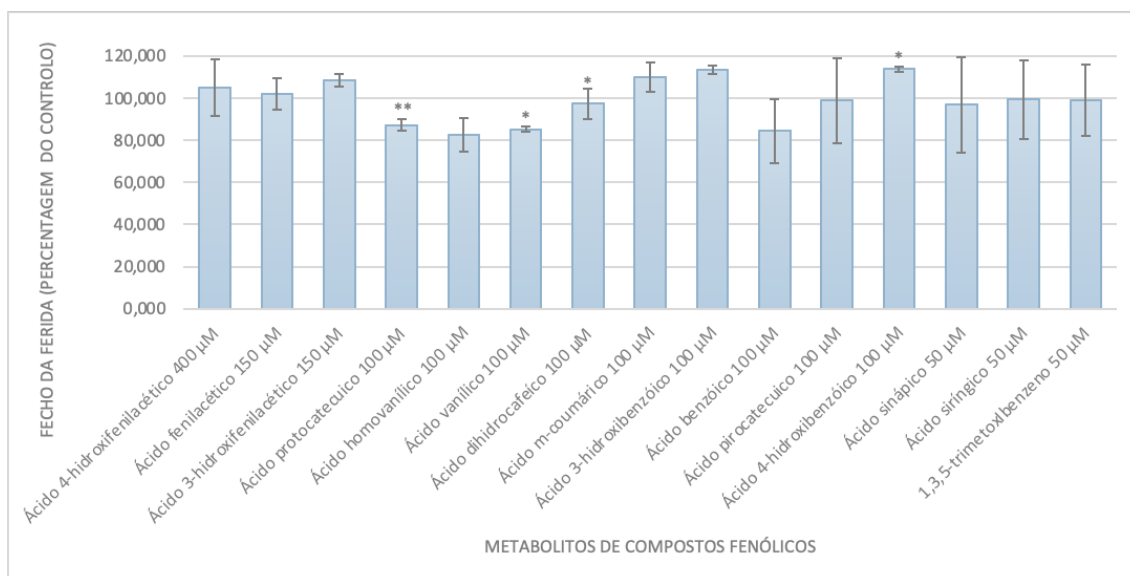


Figura 34- Percentagem de fecho de ferida de todos os metabolitos dos compostos fenólicos analisados quando normalizado ao controlo às 12 horas, n=2-7, * p<0,05, ** p<0,01 quando comparados com o controlo (teste t-Student).

3. Discussão de resultados

Apesar do estudo do impacto dos compostos polifenólicos e seus metabolitos no cancro renal ainda estar pouco explorado, alguns compostos têm vindo a ser estudados noutros modelos tumorais (Amawi et al. 2017, (Teng and Chen 2019).

A quercetina, precursora dos metabolitos ácido 4-hidroxifenilacético, ácido fenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético, ácido protocatecuico, ácido homovanílico e ácido 4-hidroxibenzóico tem apresentado resultados promissores no WHA em outras linhas tumorais celulares. Um estudo com objetivo de investigar o efeito de diferentes concentrações de quercetina (10, 30, 60 μM) em células de pulmão não pequenas (A549) foi realizado com 1 % de FBS e avaliado às 0 h, 3 h, 6 h, 12 h e 29 h (Klimaszewska-Wiśniewska et al. 2017). Nesse estudo, observaram que as células quando tratadas com 10 μM de quercetina demonstravam áreas de ferida detetáveis e com concentrações de 30 e 60 μM demonstravam áreas consideráveis comparativamente ao controlo (Klimaszewska-Wiśniewska et al. 2017). Este estudo demonstrou que a quercetina inibiu a migração de células A549 altamente metastáticas de forma dependente da concentração (Klimaszewska-Wiśniewska et al. 2017). Outro estudo, com o objetivo de investigar a ação da quercetina no cancro da mama através de ensaio WHA e *transwell* demonstrou que na concentração de 10 μM durante 48 h este composto foi capaz de reduzir as taxas de migração para 38 % e 26 % ($p < 0,05$) e reduzir as taxas de invasão celular para 55 % e 43 % ($p < 0,001$) das células MDA-MB-231 e MCF-7 respetivamente (Cao et al. 2018). Este estudo demonstrou não só que a quercetina teve efeitos inibitórios marcantes nas capacidades migratórias e invasivas das células de cancro de mama, como também foi capaz de inibir de forma considerável a migração e a invasão de células do cancro da mama sensível a hormonas. Cao et al. sugerem ainda que estes efeitos poderão ser devido à supressão da indução de TEM evidenciado pela expressão de E-caderina e expressão diminuída de MMP2. Para além disso, existem evidências de que a quercetina consegue suprimir a via de sinalização fosfatidilinositol 3-cinase / alvo da rapamicina em mamíferos (PI3K/AKT/mTOR), responsável pela regulação de funções como sobrevivência, proliferação, migração e metabolismo celulares, angiogénese e apoptose. Esta via encontra-se ativada na maioria dos cancros, pelo que a sua superatividade está associada ao aumento da proliferação celular (Cao et al. 2018). Kim et al. desenvolveram um estudo com o objetivo de estudar os efeitos anti migratórios da quercetina em células de carcinoma epidermóide oral (OSCC). As condições utilizadas foram 40 μM de

quercetina, 1 % FBS, 1 % penicilina e estreptomicina e avaliou-se o impacto deste composto na migração celular, através do ensaio WHA, às 12 e 24 h. Após 24 horas, a área da ferida do controlo foi quase completamente fechada, em comparação com a área inicial (Kim et al. 2020). Nas células tratadas com quercetina, verificou-se uma redução da migração (Kim et al. 2020). O TGF- β 1 pode promover a formação de tumores, induzindo metástase mesenquimatosa (via TEM) no epitélio em várias células cancerígenas (Kim et al. 2020). Adicionalmente, esse estudo demonstrou que a quercetina inibiu fatores relacionados com TEM induzidos por TGF- β 1, através do aumento da expressão de marcadores epiteliais como E-caderina e diminuição da expressão de marcadores mesenquimatosos como fibronectina. Para além disso, as ativações das MMP2 e MMP9 encontravam-se diminuídas após tratamento com quercetina (Kim et al. 2020). Lan et al., com o objetivo de investigarem os efeitos da quercetina na migração e invasão de células de osteossarcoma (HOS e MG63), as quais foram mantidas em 0% FBS, nas concentrações de 25, 50 e 100 μ M demonstrou que a quercetina inibiu a migração celular nas linhas celulares de osteossarcoma de maneira dependente de concentração e de tempo (Lan et al. 2017). O tratamento com quercetina (25, 50 e 100 μ M por 12 e 24 h) originou uma diminuição nas taxas de migração em células HOS e MG63. Ao fim de 24 h de exposição destas células na concentração máxima de 100 μ M de quercetina, os autores verificaram, respetivamente, uma redução de 46,1% e 21,3% na taxa de migração. A quercetina conseguiu inibir a migração e invasão de células de osteossarcoma regulando negativamente a expressão de HIF- β 1, MMP2 e MMP9 (Lan et al. 2017).

O ácido clorogénico é um precursor dos ácidos 3-hidroxifenilacético, ácido dihidrocafeico, ácido m-coumárico, ácido 3-hidroxibenzóico e ácido 4-hidroxibenzóico. Foi realizado um estudo para investigar a capacidade deste precursor em inibir a TEM de células de cancro da mama (MCF-7). Este composto, conseguiu na concentração de 2,5 μ M, inibir a migração celular, através do ensaio WHA, ao fim de 48 horas (Xue et al. 2023). O ácido clorogénico aumentou significativamente a expressão de E-caderina (marcador epitelial) e diminuiu a expressão de N-caderina (marcador mesenquimatoso) (Xue et al. 2023). Além disso, diminuiu as atividades de MMP-2 e MMP-9 e reduziu a capacidade de migração e invasão das células MCF-7, o que indicou que o ácido clorogénico tem um efeito inibitório no cancro de mama (Xue et al. 2023).

Os ácidos cafeico e ferúlico precursores dos metabolitos ácido vanílico, ácido dihidrocafeico e 3-hidroxibenzóico têm apresentado resultados promissores no WHA em

outras linhas tumorais celulares. Um estudo com objetivo de analisar o efeito dos ácidos ferúlico e cafeico na migração celular em células de cancro do pulmão (A549) foi realizado com 1 % de FBS e avaliado ao final de 24 horas. Na maior concentração testada (200 μ M) a superfície coberta de células A549 foi de apenas 7,7 % para o ácido cafeico e de 35 % para o ácido ferúlico, quando comparado com o controlo. Estudos anteriores sugerem que estes ácidos conseguem bloquear a via de sinalização da cinase regulada por sinais extracelulares (ERK). O efeito inibitório dos ácidos cafeico, cumárico e ferúlico na migração celular provavelmente deve-se à redução da ligação às proteínas da matriz extracelular (MEC) observada na presença desses ácidos fenólicos (Nasr Bouzaiene et al. 2015). O ácido cafeico é precursor do ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético, ácido protocatecuico, ácido vanílico, ácido dihidrocafeico, ácido m-coumárico, ácido 3-hidroxibenzóico e ácido 4-hidroxibenzóico. Um estudo realizado com o objetivo de avaliar a inibição da taxa de migração do ácido cafeico e do seu estér fenético (CAPE) em células MCF-7 foi realizado com 0,5 % FBS e avaliado ao longo de 24 horas (Kabała-Dzik et al. 2018). As percentagens de área da ferida para CA/CAPE 50 μ M foram de 58 % e 104 %, respetivamente e para CA/CAPE 100 μ M foram de 86 % e 106 %, respetivamente (Kabała-Dzik et al. 2018). Um dos mecanismos possíveis da inibição da migração por parte do CAPE é a inibição específica do Fator de Transcrição Nuclear Kappa (NF- κ B) que é necessário para TEM e metástase do cancro da mama (Kabała-Dzik et al. 2018).

O ácido rosmarínico é o precursor do metabolito ácido m-coumárico e demonstrou efeitos anti-migratórios em células de carcinoma hepático (Hep-G2) que foram tratadas com 0 % FBS (Jin et al. 2020). Esse estudo teve como objetivo investigar a ação anticancerígena do ácido rosmarínico nas concentrações de 7 μ M, 14 μ M e 28 μ M e demonstrou resultados positivos sobre a migração celular, uma vez que este composto suprimiu a capacidade de migração celular de forma dependente da concentração (Jin et al. 2020). Para além disso, o ensaio *transwell* demonstrou também uma diminuição da invasão celular de forma concentração dependente (Jin et al. 2020). De salientar que o ácido rosmarínico aumentou a expressão das caspases 3 e 9, essenciais no processo apoptótico (Jin et al. 2020).

A malvidina é o precursor do ácido siríngico e apresentou efeitos anti-migratórios em células de hepatocarcinoma (HepG2) com o objetivo de avaliar a proliferação, migração e invasão das células através da regulação da expressão de diversas proteínas (Yuehua Wang et al. 2019). Foram testadas as concentrações de 50, 100 e 200 μ g/mL e a migração

foi avaliada ao longo de 72 horas. O ensaio WHA demonstrou que a malvidina reduziu a migração e invasão de células HepG2 via redução de MMP-2 e MMP-9 (Yuehua Wang et al. 2019).

A rutina, precursora dos metabolitos ácido 3-hidroxifenilacético e ácido homovanílico, demonstrou efeitos anti migratórios em células de carcinoma epitelial de pulmão humano (A549). O objetivo do estudo era explorar a atividade anticancerígena da rutina a 20 μM incorporada em nanopartículas cristalinas líquidas com 0,4 % de FBS (Paudel et al. 2021, Karki, Kim, and Kim 2013). Este composto foi capaz de inibir a migração celular através da inibição da expressão de MMP9 (Paudel et al. 2021). Num estudo anterior, a atividade anti-migratória foi alcançada pela rutina na concentração de 200 μM (ben Sghaier et al. 2016) Neste estudo, essa atividade foi alcançada com uma concentração de 20 μM ao fim de 24 horas (Paudel et al. 2021).

Existem outros compostos polifenólicos que demonstraram efeito anti-migratório tal como o hiperosídeo, taxofolina, curcumina, ambos flavonóides e ácido elágico, punicalagina que são compostos taninos e por fim resveratrol, um composto estilbeno, em diferentes modelos celulares (Alqarni et al. 2022; Cheng et al. 2017; Jiang et al. 2022; Pan et al. 2020; Qiu et al. 2019; Song et al. 2019; J. Xie, Pang, and Wu 2021). Os resultados são apresentados de forma resumida na Tabela 10.

Tabela 10- Estudos que demonstram o potencial anti-migratório de diversos compostos polifenólicos. Adaptado de: (Alqarni et al. 2022, Cheng et al. 2017, Jiang et al. 2022, Pan et al. 2020; Qiu et al. 2019, Song et al. 2019, J. Xie, Pang, and Wu 2021).

Objetivo	Composto (Concentração)	Celulas	Resultados	Referências Bibliográficas
Explorar o potencial terapêutico do hiperosídeo no cancro da mama.	Hiperosídeo 25, 50 e 100 μM	MCF-7, 4T1	Inibição da migração de forma concentração dependente por 24 horas.	Qiu et al. 2019
Explorar os efeitos da taxofolina no cancro gástrico.	Taxofolina 1, 3, 10, 30 e 100 μM	AGS, NCI-N87	Diminuiu significativamente as atividades migratórias e invasivas das células AGS e NCI-N87 por 48 horas.	Xie, Pang, and Wu 2021
Investigar a eficácia anticancerígena de uma mistura polifenólica em células de adenocarcinoma de mama humano.	Curcumina, resveratrol, epigallocatequina e quercetina 30 $\mu\text{g/ml}$	MCF-7	A mistura polifenólica inibiu a migração em células MCF-7 em 48 horas.	Alqarni et al. 2022
Efeito do ácido elágico em células PANC-1 de carcinoma pancreático humano in vivo e in vitro.	Ácido elágico 0,25; 5; 7,5 e 10 $\mu\text{g/ml}$	PANC-1	Inibiu significativamente o crescimento celular, atividade de reparação celular e a migração e invasão celular de maneira concentração dependente. Para além disso, reverteu a transição epitelial para mesenquimatosa ao aumentar a regulação da E-caderina por 24 horas.	Cheng et al. 2017
Investigar os efeitos da punicalagina no processo celular no cancro mama e o seu mecanismo molecular.	Punicalagina 50 μM	MCF-7	Concentrações altas de punicalagina (50 μM e acima) suprimiu a viabilidade de células cancro mama, migração e invasão celular por 24 horas.	Pan et al. 2020
TGF- β 1 para induzir EMT em células GBM.	Resveratrol 40 μM	GBM	Resveratrol inibiu a EMT e a migração associada e EMT e a invasão em células GBM durante 48 horas.	Song et al. 2019

Como a doença metastática é o principal fator que leva à mortalidade por cancro, entender os mecanismos de migração celular e analisar o potencial de cada composto na migração celular é extremamente importante (Seyfried and Huysentruyt 2013, Merck KGaA 2023).

Embora a técnica de WHA seja bastante promissora, existe pouca informação sobre a ação destes metabolitos e dos seus precursores na migração de células 786-O e noutras linhas celulares tumorais através da técnica WHA.

Apesar de os resultados de alguns compostos não terem sido muito promissores nesta linha celular, não significa que não tenham ação anticancerígena noutros tipos de células tumorais. Para além disso, neste trabalho apenas foi avaliada a migração coletiva das células, podendo um composto ter atividade anti migratória e afetar apenas a migração individual celular, o que poderá ser explorado futuramente. Como o objetivo do presente ensaio experimental foi verificar a migração celular, a percentagem de FBS foi a menor possível (2% FBS) de modo a garantir a viabilidade celular por um lado, e por outro lado assegurar que seria medida apenas a migração celular e não a proliferação celular. Este é um ponto muito importante que deve ser sempre tido em conta ao realizar este ensaio, o qual poderá variar consoante a linha celular utilizada. As concentrações dos vários compostos estudados foram fisiológicas, contudo, com base na literatura consultada a ação anti migratória é dependente da concentração, ou seja, quanto maior a concentração maior será o efeito anti migratório. Deste modo, poderemos estar também na presença de alguns compostos que poderão ter um efeito na migração celular em concentração suprafisiológicas ou farmacológicas, mas que não foram aqui estudadas, por não se encontrarem no âmbito deste projeto. Este, deverá ser mais um ponto a ter em conta na continuação deste trabalho experimental ou noutra perspetiva sobre o potencial efeito antitumoral dos compostos polifenólicos.

Capítulo IV: Conclusão

O cancro representa um problema de saúde pública sendo uma das principais causas de morte em todo o mundo. Diversos fatores podem ter influência no aparecimento e desenvolvimento desta patologia tais como fatores ambientais, genéticos e ocupacionais.

O carcinoma renal é um tipo de cancro renal responsável por diversas mortes em todo o ano. Pode ser classificado em cromóforo, papilar e de células claras sendo este último associado à mutação nos genes *VHL* e *PBRM1*.

A maior parte dos doentes com CCR são assintomáticos, o que dificulta não só o diagnóstico como também o prognóstico. Deste modo, consultas de rastreio são necessárias para uma deteção precoce.

No passado, o tratamento era realizado com cirurgia se localizado, ou com imunoterapia. Contudo, devido aos efeitos adversos e à baixa taxa de resposta tanto a IL-2 como interferão- α já não são utilizados como primeira linha de tratamento, atualmente, são utilizadas terapêuticas dirigidas combinadas.

De forma a complementar ou otimizar as terapêuticas existentes, têm sido realizados vários estudos com compostos de origem natural, presentes em alimentos, com o objetivo de explorar o seu potencial.

Muitos fitoquímicos presentes numa alimentação rica em frutos e hortícolas têm sido sugeridos como agentes bloqueadores da carcinogénese ou como agentes supressores atuando no decorrer das fases de iniciação, promoção e progressão. Os compostos fenólicos são divididos em duas grupos principais nomeadamente ácidos fenólicos e polifenóis. A grande maioria dos estudos são realizados *in vitro*, não considerando a biodisponibilidade destes compostos, o que constitui uma limitação, uma vez que a maioria desses compostos bioativos presentes nos alimentos sofrem uma rápida metabolização, sendo biotransformados noutros compostos.

O ensaio de cicatrização de ferida ou *Wound-Healing Assay* foi o método selecionado para estudar a migração celular *in vitro*. Este método baseia-se na observação da migração celular coletiva, através de uma “ferida” criada numa monocamada de células em cultura.

Os compostos mais promissores foram o ácido homovanílico, o ácido vanílico seguido do ácido protocatecuico. Contudo, as concentrações utilizadas nestes ensaios foram concentrações fisiológicas e de acordo com a literatura concentrações mais elevadas poderão ter uma maior possibilidade de inibição da migração celular.

Futuramente, seria interessante avaliar o impacto das combinações destes compostos sobre a migração celular, uma vez que muitos destes compostos encontram-se presentes na dieta em misturas complexas, procurando-se um possível sinergismo. Por outro lado,

também seria interessante aumentar a concentração destes compostos para concentrações farmacológicas.

Capítulo V. Referências Bibliográficas

- Abdulla, Mohamed, and Per Gruber. 2000. "Role of Diet Modification in Cancer Prevention." *BioFactors* 12(1–4): 45–51.
- Abdulla, Mohamed, and Sangeeta Shukla. 2014. "Dietary Aspects in Cancer Prevention — A Mini-Review." In *Pharmacology and Nutritional Intervention in the Treatment of Disease*, InTech.
- Alarcón-Flores, María Isabel, Roberto Romero-González, José Luis Martínez Vidal, and Antonia Garrido Frenich. 2013. "Multiclass Determination of Phytochemicals in Vegetables and Fruits by Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry." *Food Chemistry* 141(2): 1120–29.
- Almeida, A. Filipa et al. 2018. "Bioavailability of Quercetin in Humans with a Focus on Interindividual Variation." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 17(3): 714–31.
- Almeida, Vera Lúcia de et al. 2005. "Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos Que Interagem Com o DNA: Uma Introdução." *Química Nova* 28(1): 118–29.
- Alqarni, Afnan A. et al. 2022. "The Influence of Antioxidant Dietary-Derived Polyphenolic Combination on Breast Cancer: Molecular Study." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 149: 112835.
- Amawi, Haneen et al. 2017. "Polyphenolic Nutrients in Cancer Chemoprevention and Metastasis: Role of the Epithelial-to-Mesenchymal (EMT) Pathway." *Nutrients* 9(8): 911.
- American Cancer Society. 2021. "Targeted Drug Therapy for Kidney Cancer." *American Cancer Society*.
- Antoine, P. et al. 2022. "Téloméropathies de Recrutement Hématologique : Étude de 15 Cas." *La Revue de Médecine Interne* 43(1): 3–8.
- Araújo, Fábio Fernandes, David de Paulo Farias, Iramaia Angélica Neri-Numa, and Glaucia Maria Pastore. 2021. "Polyphenols and Their Applications: An Approach in Food Chemistry and Innovation Potential." *Food Chemistry* 338: 127535.
- ATCC. 2022. "786-O [786-0]." *ATCC*. <https://www.atcc.org/products/crl-1932> (January 20, 2023).
- Balasundram, Nagendran, Kalyana Sundram, and Samir Samman. 2006. "Phenolic Compounds in Plants and Agri-Industrial by-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses." *Food Chemistry* 99(1): 191–203.

- Banerjee, Priyanka, Niyanshi Gaddam, Tej K. Pandita, and Sanjukta Chakraborty. 2023. "Cellular Senescence as a Brake or Accelerator for Oncogenic Transformation and Role in Lymphatic Metastasis." *International Journal of Molecular Sciences* 24(3): 2877.
- Barbedo, Jayme. 2013. "Automatic Object Counting In Neubauer Chambers." *XXXI Simpósio Brasileiro de Telecomunicações*.
- Bohn, Torsten. 2014. "Dietary Factors Affecting Polyphenol Bioavailability." *Nutrition Reviews* 72(7): 429–52.
- Brace, Chris. 2011. "Thermal Tumor Ablation in Clinical Use." *IEEE Pulse* 2(5): 28–38.
- Bravo, M.N. et al. 2006. "Analysis of Phenolic Compounds in Muscatel Wines Produced in Portugal." *Analytica Chimica Acta* 563(1–2): 84–92.
- Bray, Freddie et al. 2018. "Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68(6): 394–424.
- Calcinotto, Arianna et al. 2019. "Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury." *Physiological Reviews* 99(2): 1047–78.
- Campbell, T. Colin. 2017. "The Past, Present, and Future of Nutrition and Cancer: Part 1—Was A Nutritional Association Acknowledged a Century Ago?" *Nutrition and Cancer* 69(5): 811–17.
- Campisi, Judith. 2013. "Aging, Cellular Senescence, and Cancer." *Annual Review of Physiology* 75(1): 685–705.
- Cancer Research UK. "Removing Part or All of a Kidney." *Cancer Research UK*. <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/kidney-cancer/treatment/surgery/removing-part-all> (June 4, 2023).
- Cao, Longbin et al. 2018. "Quercetin-3-methyl Ether Suppresses Human Breast Cancer Stem Cell Formation by Inhibiting the Notch1 and PI3K/Akt Signaling Pathways." *International Journal of Molecular Medicine*.
- Caparica, Rita et al. 2020. "Anticancer Activity of Rutin and Its Combination with Ionic Liquids on Renal Cells." *Biomolecules* 10(2): 233.
- Capitanio, Umberto et al. 2019. "Epidemiology of Renal Cell Carcinoma." *European Urology* 75(1): 74–84.
- Carril-Ajuria, Lucía et al. 2019. "Prognostic and Predictive Value of PBRM1 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma." *Cancers* 12(1): 16.

- Cheng, Hao et al. 2017. “Ellagic Acid Inhibits the Proliferation of Human Pancreatic Carcinoma PANC-1 Cells *in Vitro* and *in Vivo*.” *Oncotarget* 8(7): 12301–10.
- Cho, Eunyoung, Hans-Olov Adami, and Per Lindblad. 2011. “Epidemiology of Renal Cell Cancer.” *Hematology/Oncology Clinics of North America* 25(4): 651–65.
- Cipolletti, Manuela et al. 2018. “Beyond the Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols in Cancer: The Modulation of Estrogen Receptors (ERs) Signaling.” *International Journal of Molecular Sciences* 19(9): 2624.
- Cohen, Herbert T., and Francis J. McGovern. 2005. “Renal-Cell Carcinoma.” *New England Journal of Medicine* 353(23): 2477–90.
- Corning. “Transwell, Snapwell, Netwell, and Falcon Permeable Supports.” *Corning* . <https://www.corning.com/in/en/products/life-sciences/products/permeable-supports/transwell-snapwell-netwell-falcon-permeable-supports.html> (December 22, 2022).
- Courcier, Jean et al. 2020. “Carbonic Anhydrase IX in Renal Cell Carcinoma, Implications for Disease Management.” *International Journal of Molecular Sciences* 21(19): 7146.
- Cunha, Proença, Frederico Teixeira, Silva Alda, and Roque Odete. 2007. *Plantas Na Terapêutica. Farmacologia e Ensaio Clínicos*. ed. Fundação Calouste Gulbenkian. Fundação Calouste Gulbenkian.
- Darwiche, Nadine. 2020. “Epigenetic Mechanisms and the Hallmarks of Cancer: An Intimate Affair.” *American journal of cancer research* 10(7): 1954–78.
- Dembic, Zlatko. 2020. “Antitumor Drugs and Their Targets.” *Molecules* 25(23): 5776.
- Dey, Gargi, Ashish Sachan, Shashwati Ghosh, and Adinpunya Mitra. 2003. “Detection of Major Phenolic Acids from Dried Mesocarpic Husk of Mature Coconut by Thin Layer Chromatography.” *Industrial Crops and Products* 18(2): 171–76.
- Diário da República. 2007. “Decreto-Lei n.º 352/2007, de 23 de Outubro.” *Diário da República*.
- Dudani, Shaan et al. 2021. “Evaluation of Clear Cell, Papillary, and Chromophobe Renal Cell Carcinoma Metastasis Sites and Association With Survival.” *JAMA Network Open* 4(1): e2021869.
- Escudier, B. et al. 2019. “Renal Cell Carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up.” *Annals of Oncology* 30(5): 706–20.
- European Medicines Agency. 2006. “ANEXO I RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTOS SORAFENIB.” *European Medicines Agency* .

- European Medicines Agency. 2009. “ANEXO I RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO EVEROLIMUS.” *European Medicines Agency*.
- European Medicines Agency. 2011. “ANEXO I RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO IPILIMUMAB.” *European Medicines Agency*.
- European Medicines Agency. 2012. “ANEXO I RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO AXITINIB.” *European Medicines Agency*.
- European Medicines Agency. 2015. “ANEXO I RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO LENVATINIB.” *European Medicines Agency*.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. 2015. “ANEXO I RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO NIVOLUMAB.” *EUROPEAN MEDICINES AGENCY*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/opdivo-epar-product-information_pt.pdf (July 28, 2023).
- European Medicines Agency. 2016. “ANEXO I RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO CABOZANTINIB.” *European Medicines Agency*.
- European Medicines Agency. 2017. “ANEXO I RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO AVELUMAB.” *European Medicines Agency*.
- European Medicines Agency. 2021a. “ANEXO I RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO BEVACIZUMAB.” *European Medicines Agency*.
- European Medicines Agency. 2021b. “ANEXO I RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO SUNITINIB.” *European Medicines Agency*.
- European Medicines Agency. 2021c. “ANEXO I RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO SUNITINIB.” *European Medicines Agency*.
- Fares, Jawad et al. 2020. “Molecular Principles of Metastasis: A Hallmark of Cancer Revisited.” *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5(1): 28.
- Feliciano, Rodrigo, Geoffrey Istas, Christian Heiss, and Ana Rodriguez-Mateos. 2016. “Plasma and Urinary Phenolic Profiles after Acute and Repetitive Intake of Wild Blueberry.” *Molecules* 21(9): 1120.
- Freeman, Gordon J. et al. 2000. “Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation.” *The Journal of Experimental Medicine* 192(7): 1027–34.
- Gato, Maria et al. 2013. “Manejo de Pacientes Com Melanoma Avançado Em Uso de Ipilimumabe.” *Revista Brasileira de Oncologia Clínica* 9(34).
- Gau, David, and Partha Roy. 2020. “Single Cell Migration Assay Using Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Line.” *BIO-PROTOCOL* 10(8).

- George Daniel, and Jonasch Daniel. 2022. “Systemic Therapy of Advanced Clear Cell Renal Carcinoma.”
- Gomes-Carneiro, Maria Regina, Luís Felipe Ribeiro-Pinto, and Francisco José Roma Paumgartten. 1997. “Fatores de Risco Ambientais Para o Câncer Gástrico: A Visão Do Toxicologista.” *Cadernos de Saúde Pública* 13(suppl 1): S27–38.
- Gonthier, Marie-Paule et al. 2003. “Chlorogenic Acid Bioavailability Largely Depends on Its Metabolism by the Gut Microflora in Rats.” *The Journal of Nutrition* 133(6): 1853–59.
- Gorinstein, Shela et al. 2002. “Comparative Content of Some Phytochemicals in Spanish Apples, Peaches and Pears.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82(10): 1166–70.
- Grada, Ayman et al. 2017. “Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay.” *Journal of Investigative Dermatology* 137(2): e11–16.
- Grootveld, Martin, and Barry Halliwell. 1988. “2,3-Dihydroxybenzoic Acid Is a Product of Human Aspirin Metabolism.” *Biochemical Pharmacology* 37(2): 271–80.
- Guerreiro, Íris et al. 2022. “Polyphenols and Their Metabolites in Renal Diseases: An Overview.” *Foods* 11(7): 1060.
- Han, Yanyan, Dandan Liu, and Lianhong Li. 2020. “PD-1/PD-L1 Pathway: Current Researches in Cancer.” *American journal of cancer research* 10(3): 727–42.
- Hanahan, Douglas. 2022. “Hallmarks of Cancer: New Dimensions.” *Cancer Discovery* 12(1): 31–46.
- Hanahan, Douglas, and Robert A Weinberg. 2000. “The Hallmarks of Cancer.” *Cell* 100(1): 57–70.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. “Hallmarks of Cancer: The Next Generation.” *Cell* 144(5): 646–74.
- Heim, Kelly E, Anthony R Tagliaferro, and Dennis J Bobilya. 2002. “Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships.” *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13(10): 572–84.
- Hendriks, Giel, Bob van de Water, Willem Schoonen, and Harry Vrieling. 2013. “Cellular-Signaling Pathways Unveil the Carcinogenic Potential of Chemicals.” *Journal of Applied Toxicology* 33(6): 399–409.

- International Agency for Research on Cancer. 2020a. “Kidney Globocan 2020.” *World Health Organization*. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/29-Kidney-fact-sheet.pdf> (December 20, 2022).
- International Agency for Research on Cancer. 2020b. “Portugal Globocan 2020 .” *World Health Organization*. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/620-portugal-fact-sheets.pdf> (December 20, 2022).
- Janiques, Alessandra Grau de Paula Ramos et al. 2013. “Compostos Fenólicos: Possíveis Aplicações Na Doença Renal Crônica.” *Nutrire* 38(3): 322–37.
- Jiang, Jie et al. 2022. “Resveratrol Induces Apoptosis, Suppresses Migration, and Invasion of Cervical Cancer Cells by Inhibiting the Hedgehog Signaling Pathway.” *BioMed Research International* 2022: 1–10.
- Jin, Boxun et al. 2020. “Detailed Studies on the Anticancer Action of Rosmarinic Acid in Human Hep-G2 Liver Carcinoma Cells: Evaluating Its Effects on Cellular Apoptosis, Caspase Activation and Suppression of Cell Migration and Invasion.” *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology* 25(3): 1383–89.
- Johnson, Ian T. 2007. “Phytochemicals and Cancer.” *Proceedings of the Nutrition Society* 66(2): 207–15.
- Jorge, Juliano José. 2019. “Imunoterapia No Tratamento Do Câncer.” *Arquivos de Asmas Alergia e Imunologia* 3(2).
- Junior, Casemiro, Eduardo Ramos, José Tebel, and Giuliana Jacomini. 2009. *Manual Técnico de Oncologia* . Panamá.
- Justus, Calvin R., Nancy Leffler, Maria Ruiz-Echevarria, and Li v. Yang. 2014. “In Vitro Cell Migration and Invasion Assays.” *Journal of Visualized Experiments* (88).
- Kabala-Dzik, Agata et al. 2018. “Caffeic Acid Versus Caffeic Acid Phenethyl Ester in the Treatment of Breast Cancer MCF-7 Cells: Migration Rate Inhibition.” *Integrative Cancer Therapies* 17(4): 1247–59.
- Keir, Mary E. et al. 2006. “Tissue Expression of PD-L1 Mediates Peripheral T Cell Tolerance.” *The Journal of Experimental Medicine* 203(4): 883–95.
- Kim, So Ra et al. 2020. “Quercetin Inhibits Cell Survival and Metastatic Ability via the EMT-Mediated Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma.” *Molecules* 25(3): 757.

- Kirner, Alexandra, Andrea Mayer-Mokler, and Carsten Reinhardt. 2014. "IMA901: A Multi-Peptide Cancer Vaccine for Treatment of Renal Cell Cancer." *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 10(11): 3179–89.
- Klimaszewska-Wiśniewska, Anna et al. 2017. "Antiproliferative and Antimetastatic Action of Quercetin on A549 Non-Small Cell Lung Cancer Cells through Its Effect on the Cytoskeleton." *Acta Histochemica* 119(2): 99–112.
- Kumar Singh, Amit et al. 2019. "Beneficial Effects of Dietary Polyphenols on Gut Microbiota and Strategies to Improve Delivery Efficiency." *Nutrients* 11(9): 2216.
- Kumar, Vinay, Nelson Fausto, Ramzi Cotran, and Abul Abbas. 2005. *Bases Patológicas Da Doença*. 7th ed. Portugal : Elsevier.
- Lan, Haifeng et al. 2017. "Quercetin Inhibits Cell Migration and Invasion in Human Osteosarcoma Cells." *Cellular Physiology and Biochemistry* 43(2): 553–67.
- Lee, Keum Hwa et al. 2020. "Consumption of Fish and ω -3 Fatty Acids and Cancer Risk: An Umbrella Review of Meta-Analyses of Observational Studies." *Advances in Nutrition* 11(5): 1134–49.
- Lewandowska, Hanna et al. 2016. "The Role of Natural Polyphenols in Cell Signaling and Cytoprotection against Cancer Development." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 32: 1–19.
- Liang, Chun-Chi, Ann Y Park, and Jun-Lin Guan. 2007. "In Vitro Scratch Assay: A Convenient and Inexpensive Method for Analysis of Cell Migration in Vitro." *Nature Protocols* 2(2): 329–33.
- Ljungberg, Borje et al. 2015. "EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma: 2014 Update." *European Urology* 67(5): 913–24.
- Lopez-Beltran, Antonio, Marina Scarpelli, Rodolfo Montironi, and Ziya Kirkali. 2006. "2004 WHO Classification of the Renal Tumors of the Adults." *European Urology* 49(5): 798–805.
- Makhov, Peter et al. 2018. "Resistance to Systemic Therapies in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Mechanisms and Management Strategies." *Molecular Cancer Therapeutics* 17(7): 1355–64.
- Manach, Claudine et al. 2004. "Polyphenols: Food Sources and Bioavailability." *The American Journal of Clinical Nutrition* 79(5): 727–47.
- Marín, Laura, Elisa M. Miguélez, Claudio J. Villar, and Felipe Lombó. 2015. "Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties." *BioMed Research International* 2015: 1–18.

- Mcdade, David et al. 2021. *Dietary Polyphenol*. ed. Wiley Blackwell. IFT.
- M. D'Archivio, C. Filesi, R. Vari, B. Scazzocchio, and R. Masella, "Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 11, no. 4, pp. 1321–1342, 2010.
- Merck KGaA. 2023. "Cell Migration & Invasion Assays." *Sigma-Aldrich*. <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/products/cell-culture-and-analysis/cell-analysis/cell-migration-and-invasion-assays> (June 2, 2023).
- Milene Priscila, and Jorge Neuza. 2006. "Phenolic Compounds in Foods- A Brief Review." *Universidade Estadual Paulista*.
- Mithul Aravind, S. et al. 2021. "Role of Dietary Polyphenols on Gut Microbiota, Their Metabolites and Health Benefits." *Food Research International* 142: 110189.
- Muglia, Valdair F., and Adilson Prando. 2015. "Renal Cell Carcinoma: Histological Classification and Correlation with Imaging Findings." *Radiologia Brasileira* 48(3): 166–74.
- Muljono, Retno A.Budi, Johannes J.C. Scheffer, and Robert Verpoorte. 2002. "Isochorismate Is an Intermediate in 2,3-Dihydroxybenzoic Acid Biosynthesis in *Catharanthus Roseus* Cell Cultures." *Plant Physiology and Biochemistry* 40(3): 231–34.
- Nair, Ramesh B. et al. 2004. "The *Arabidopsis Thaliana* *REDUCED EPIDERMAL FLUORESCENCE1* Gene Encodes an Aldehyde Dehydrogenase Involved in Ferulic Acid and Sinapic Acid Biosynthesis." *The Plant Cell* 16(2): 544–54.
- Nardini, M., E. Cirillo, F. Natella, and C. Scaccini. 2002. "Absorption of Phenolic Acids in Humans after Coffee Consumption." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(20): 5735–41.
- Nasr Bouzaiane, Nouha et al. 2015. "The Effects of Caffeic, Coumaric and Ferulic Acids on Proliferation, Superoxide Production, Adhesion and Migration of Human Tumor Cells in Vitro." *European Journal of Pharmacology* 766: 99–105.
- National Cancer Institute. 2019. "Immunotherapy to Treat Cancer." *National Cancer Institute*.
- Olthof, Margreet R. et al. 2003. "Chlorogenic Acid, Quercetin-3-Rutinoside and Black Tea Phenols Are Extensively Metabolized in Humans." *The Journal of Nutrition* 133(6): 1806–14.
- Oosterwijk, Egbert. 2014. "Carbonic Anhydrase Expression in Kidney and Renal Cancer: Implications for Diagnosis and Treatment." In , 181–98.

- Owumi, SE, IJ Ajijola, and OM Agbeti. 2019. "Hepatorenal Protective Effects of Protocatechuic Acid in Rats Administered with Anticancer Drug Methotrexate." *Human & Experimental Toxicology* 38(11): 1254–65.
- Padala, Sandeep A., and Avyakta Kallam. 2022. *Clear Cell Renal Carcinoma*.
- Pan, Lei, Yin Duan, Feixia Ma, and Lihua Lou. 2020. "Punicalagin Inhibits the Viability, Migration, Invasion, and EMT by Regulating GOLPH3 in Breast Cancer Cells." *Journal of Receptors and Signal Transduction* 40(2): 173–80.
- Paudel, Keshav Raj et al. 2021. "Rutin Loaded Liquid Crystalline Nanoparticles Inhibit Non-Small Cell Lung Cancer Proliferation and Migration in Vitro." *Life Sciences* 276: 119436.
- Perestrelo, Rosa et al. 2012. "Phenolic Profile of Sercial and Tinta Negra Vitis Vinifera L. Grape Skins by HPLC–DAD–ESI–MSn." *Food Chemistry* 135(1): 94–104.
- Phenol-Explorer. 2002a. "Showing Polyphenol Metabolite Protocatechuic Acid." *Phenol-Explorer* . <http://phenol-explorer.eu/metabolites/412> (January 20, 2023).
- Phenol-Explorer. 2002b. "Showing Polyphenol Metabolite Sinapic Acid." *Phenol-Explorer* . <http://phenol-explorer.eu/metabolites/464> (January 20, 2023).
- Phenol-Explorer. 2003. "Showing Polyphenol Metabolite Dihydrocaffeic Acid." *Phenol-Explorer* . <http://phenol-explorer.eu/metabolites/579>.
- Phenol-Explorer. 2004a. "Showing Polyphenol Metabolite 4-Hydroxybenzoic Acid." *Phenol-Explorer* . <http://phenol-explorer.eu/metabolites/418> (January 20, 2023).
- Phenol-Explorer. 2004b. "Showing Polyphenol Metabolite M-Coumaric Acid." *Phenol-Explorer* . <http://phenol-explorer.eu/metabolites/463> (January 20, 2023).
- Phenol-Explorer. 2004c. "Showing Polyphenol Metabolite Syringic Acid." *Phenol-Explorer* . <http://phenol-explorer.eu/metabolites/420> (January 20, 2023).
- Phenol-Explorer. 2004d. "Showing Polyphenol Metabolite Vanillic Acid." *Phenol-Explorer* . <http://phenol-explorer.eu/metabolites/414> (January 20, 2023).
- Phenol-Explorer. 2005a. "Showing Polyphenol Metabolite 3-Hydroxybenzoic Acid." *Phenol-Explorer* . <http://phenol-explorer.eu/metabolites/429> (January 20, 2023).
- Phenol-Explorer. 2005b. "Showing Polyphenol Metabolite 4-Hydroxyphenylacetic Acid." *Phenol-Explorer* .
- Phenol-Explorer. 2005c. "Showing Polyphenol Metabolite Benzoic Acid." *Phenol-Explorer* . <http://phenol-explorer.eu/metabolites/427> (January 20, 2023).
- Phenol-Explorer. 2005d. "Showing Polyphenol Metabolite Homovanillic Acid." *Phenol-Explorer* . <http://phenol-explorer.eu/metabolites/574> (January 20, 2023).

- Phenol-Explorer. 2010a. “Showing Polyphenol Metabolite 1,3,5-Trimethoxybenzene.” *Phenol-Explorer* . <http://phenol-explorer.eu/metabolites/1063> (January 20, 2023).
- Phenol-Explorer. 2010b. “Showing Polyphenol Metabolite 3-Hydroxyphenylacetic Acid.” *Phenol-Explorer* . <http://phenol-explorer.eu/metabolites/952> (January 20, 2023).
- Phenol-Explorer. 2011. “Showing Polyphenol Metabolite Phenylacetic Acid.” *Phenol-Explorer* .
- Phyto-Hub. 2018a. “3-Hydroxybenzoic Acid.” *Phyto-Hub*.
- Phyto-Hub. 2018b. “3-Hydroxyphenylacetic Acid.” *Phyto-Hub*.
- Phyto-Hub. 2018c. “4’-Hydroxyphenylacetic Acid.” *Phyto-Hub* .
- Phyto-Hub. 2018d. “Dihydrocaffeic Acid.” *Phyto-Hub*.
- Phyto-Hub. 2018e. “Homovanillic Acid.” *Phyto-Hub*.
- Phyto-Hub. 2018f. “P- Coumaric Acid .” *Phyto-Hub*.
- Phyto-Hub. 2018g. “Protocatechuic Acid.” *Phyto-Hub*.
- Phyto-Hub. 2018h. “Syringic Acid.” *Phyto-Hub*.
- Phyto-Hub. 2018i. “Vanillic Acid.” *Phyto-Hub*.
- Pigliucci, Massimo. 2001. *Phenotypic Plasticity Beyond Nature and Nurture* . ed. Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland : Johns Hopkins University Press.
- Pijuan, Jordi et al. 2019. “In Vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7.
- Prieto, Luis I., and Darren J. Baker. 2019. “Cellular Senescence and the Immune System in Cancer.” *Gerontology* 65(5): 505–12.
- Qiu, Jinxia et al. 2019. “Hyperoside Induces Breast Cancer Cells Apoptosis via ROS-Mediated NF-KB Signaling Pathway.” *International Journal of Molecular Sciences* 21(1): 131.
- Ramos, R. et al. 1999. “A Preliminary Study of Non-Coloured Phenolics in Wines of Varietal White Grapes (Códaga, Gouveio and Malvasia Fina): Effects of Grape Variety, Grape Maturation and Technology of Winemaking.” *Food Chemistry* 67(1): 39–44.
- Ray, Suman Kumar, and Sukhes Mukherjee. 2021. “Evolving Interplay Between Dietary Polyphenols and Gut Microbiota—An Emerging Importance in Healthcare.” *Frontiers in Nutrition* 8.
- Reddy, L., B. Odhav, and K.D. Bhoola. 2003. “Natural Products for Cancer Prevention: A Global Perspective.” *Pharmacology & Therapeutics* 99(1): 1–13.

- Riazalhosseini, Yasser, and Mark Lathrop. 2016. "Precision Medicine from the Renal Cancer Genome." *Nature Reviews Nephrology* 12(11): 655–66.
- Richard E. Gray, and Gabriel T. Harris. 2019. "Renal Cell Carcinoma: Diagnosis and Management." *American Family Physician* 99(3): 179–84.
- Rodriguez, Luis G., Xiaoyang Wu, and Jun-Lin Guan. 2005. "Wound-Healing Assay." In *Cell Migration*, New Jersey: Humana Press, 023–030.
- Samberkar, S et al. 2019. "Carbonic Anhydrase IX Immunohistochemistry Has Potential to Predict Renal Cell Carcinoma Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analyses." *The Malaysian journal of pathology* 41(3): 233–42.
- Santana-Gálvez, Jesús et al. 2020. "Synergistic Combinations of Curcumin, Sulforaphane, and Dihydrocaffeic Acid against Human Colon Cancer Cells." *International Journal of Molecular Sciences* 21(9): 3108.
- Sasahira, Tomonori, and Tadaaki Kirita. 2018. "Hallmarks of Cancer-Related Newly Prognostic Factors of Oral Squamous Cell Carcinoma." *International Journal of Molecular Sciences* 19(8): 2413.
- Schlichting, Carl D., and Matthew A. Wund. 2014. "PHENOTYPIC PLASTICITY AND EPIGENETIC MARKING: AN ASSESSMENT OF EVIDENCE FOR GENETIC ACCOMMODATION." *Evolution* 68(3): 656–72.
- Semeniuk-Wojtaś, Aleksandra et al. 2016. "Influence of Tyrosine Kinase Inhibitors on Hypertension and Nephrotoxicity in Metastatic Renal Cell Cancer Patients." *International Journal of Molecular Sciences* 17(12): 2073.
- Sepich-Poore, Gregory D. et al. 2021. "The Microbiome and Human Cancer." *Science* 371(6536).
- Serrelli, Gabriele, and Monica Deiana. 2019. "In Vivo Formed Metabolites of Polyphenols and Their Biological Efficacy." *Food & Function* 10(11): 6999–7021.
- Seyfried, Thomas N., and Leanne C. Huysentruyt. 2013. "On the Origin of Cancer Metastasis." *Critical Reviews™ in Oncogenesis* 18(1–2): 43–73.
- Sghaier ben, Mohamed et al. 2016. "Rutin Inhibits Proliferation, Attenuates Superoxide Production and Decreases Adhesion and Migration of Human Cancerous Cells." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 84: 1972–78.
- Siegel, Rebecca L., Kimberly D. Miller, Nikita Sandeep Wagle, and Ahmedin Jemal. 2023. "Cancer Statistics, 2023." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 73(1): 17–48.

- Silva De Medeiros¹, Andréa et al. 2018. “REVISTA SAÚDE & CIÊNCIA ONLINE O PAPEL DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL NO POTENCIAL METASTÁTICO DE TUMORES MALIGNOS.”
- Singh, Deepika. 2021. “Current Updates and Future Perspectives on the Management of Renal Cell Carcinoma.” *Life Sciences* 264: 118632.
- Song, Yang et al. 2019. “Resveratrol Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition in GBM by Regulating Smad-Dependent Signaling.” *BioMed Research International* 2019: 1–14.
- Teng, Hui, and Lei Chen. 2019. “Polyphenols and Bioavailability: An Update.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59(13): 2040–51.
- U.S. Department of Health and Human Services. 2021. “Cancer Stat Facts: Kidney and Renal Pelvis Cancer.” *National Cancer Institute* .
<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/kidrp.html> (January 20, 2023).
- van Kuijk, Simon J. A. et al. 2016. “Prognostic Significance of Carbonic Anhydrase IX Expression in Cancer Patients: A Meta-Analysis.” *Frontiers in Oncology* 6.
- Vaquero, M.J. Rodríguez, M.R. Alberto, and M.C. Manca de Nadra. 2007. “Antibacterial Effect of Phenolic Compounds from Different Wines.” *Food Control* 18(2): 93–101.
- Vitaglione, Paola et al. 2007. “Protocatechuic Acid Is the Major Human Metabolite of Cyanidin-Glucosides , ,3.” *The Journal of Nutrition* 137(9): 2043–48.
- Vladimir-Kneevi, Sanda, Biljana Blaekovi, Maja Bival, and Marija Babac. 2012. “Plant Polyphenols as Antioxidants Influencing the Human Health.” In *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*, InTech.
- Wang, Jie et al. 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): 6726–37.
- Wang, Yating, and Hassan Abolhassani. 2022. “Updates of Cancer Hallmarks in Patients with Inborn Errors of Immunity.” *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology* 22(6): 352–63.
- Wang, Yuehua et al. 2019. “Blueberry Malvidin-3-Galactoside Suppresses Hepatocellular Carcinoma by Regulating Apoptosis, Proliferation, and Metastasis Pathways *In Vivo* and *In Vitro*.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67(2): 625–36.

- World Health Organization. 2022. “Cancer- Early Detection .” *Word Health Organization* .
- Wu, Shuiqin et al. 2004. “The Key Role of Phloroglucinol *O* -Methyltransferase in the Biosynthesis of *Rosa Chinensis* Volatile 1,3,5-Trimethoxybenzene.” *Plant Physiology* 135(1): 95–102.
- Xia, Longzheng et al. 2021. “The Cancer Metabolic Reprogramming and Immune Response.” *Molecular Cancer* 20(1): 28.
- Xie, Jiebin, Yueshan Pang, and Xiaoting Wu. 2021. “Taxifolin Suppresses the Malignant Progression of Gastric Cancer by Regulating the AhR/CYP1A1 Signaling Pathway.” *International Journal of Molecular Medicine* 48(5): 197.
- Xie, Liyang. 2016. “Significance of Polyphenol Metabolism in Explaining the Bioactivity of Polyphenol-Rich Foods.” University of Connecticut Graduate School . <https://opencommons.uconn.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=7257&context=disser tations> (January 25, 2023).
- Xu, Wen-Hao et al. 2019. “Prognostic Value and Immune Infiltration of Novel Signatures in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Microenvironment.” *Aging* 11(17): 6999–7020.
- Xue, Wei et al. 2023. “Chlorogenic Acid Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition and Invasion of Breast Cancer by Down-Regulating LRP6.” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 384(2): 254–64.