

**MIGUEL ALEXANDRE BRILHANTE CAMILO**

**ÁCIDO CAFEICO E ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS:  
QUE IMPACTO TÊM NAS CÉLULAS TUMORAIS  
RENAIS?**

**Orientador: Professor Doutor João Guilherme Costa**

**Co-orientadora: Professora Doutora Ana Sofia Fernandes**

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde**

**Dissertação**

**Lisboa**

**2022**



**MIGUEL ALEXANDRE BRILHANTE CAMILO**

**ÁCIDO CAFEICO E ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS:  
QUE IMPACTO TÊM NAS CÉLULAS TUMORAIS  
RENAIS?**

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 3 de Março de 2022, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação nº 33/2022 de 22 de Fevereiro de 2022, com a seguinte composição

Presidente:

Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente:

Prof<sup>a</sup>. Doutora Regina Menezes

Orientador:

Prof. Doutor João Guilherme Costa

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde**

**Lisboa**

## **Agradecimentos**

Ao corpo docente, nomeadamente ao Professor João Costa e à Professora Ana Sofia Fernandes. Pela mentoria ao longo das unidades curriculares de Projeto I e II, pelo acompanhamento na elaboração desta dissertação e enquanto referências académicas de relevo durante o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

À Íris Guerreiro e à Rita Caparica, pelo apoio no desenvolvimento da análise laboratorial, acompanhando todos os processos que dela fizeram parte.

Aos colegas Joana Duarte e Duarte Pina, permitindo a nossa colaboração culminar num trabalho bem sucedido.

## Resumo

O cancro representa uma das maiores preocupações de saúde pública a nível mundial, devido às suas elevadas taxas de incidência e mortalidade. A variabilidade apresentada pelos mecanismos biológicos expressos no cancro dificulta, em larga escala, a sua total compreensão. Nesse sentido, reúnem-se esforços com vista à melhoria da prevenção e do seu tratamento. Tendo em conta que as opções terapêuticas existentes não demonstram a efetividade que a patologia exige, torna-se proveitosa a investigação de novos compostos bioativos que tragam vantagens e possam ser implementados no seu tratamento. Alguns ácidos hidroxicinâmicos, como é o caso do ácido cafeico, demonstram ação promissora neste âmbito, pelo que têm sido estudadas as suas possíveis aplicações.

Recorrendo à revisão da literatura, o presente trabalho objetivou o estudo da atividade citotóxica de ácido cafeico. Utilizando-se a base de dados *Phenol-Explorer* estudou-se a biodisponibilidade do ácido cafeico, pesquisando-se por fontes alimentares, precursores e metabolitos. Adicionalmente, foi avaliada «in vitro» a atividade citotóxica do ácido cafeico isoladamente, bem como a sua combinação com a cisplatina. Utilizaram-se células de adenocarcinoma renal humano (786-O) com um tempo de exposição aos reagentes de 48 h, recorrendo-se ao ensaio do cristal violeta (CV).

Nas concentrações estudadas de ácido cafeico (10 e 25  $\mu\text{M}$ ), não foi demonstrada uma diminuição da viabilidade celular. A combinação do ácido cafeico com a cisplatina reduziu os valores de viabilidade celular quando comparado com o controlo, mas não revelou diferença comparativamente à atividade da cisplatina isoladamente.

Apesar dos resultados aqui obtidos, torna-se pertinente a realização de mais estudos, com diferentes condições experimentais e em outras linhas celulares de cancro, de forma a clarificar se o ácido cafeico e os seus metabolitos, precursores e outros ácidos hidroxicinâmicos poderão impactar na progressão do cancro renal.

**Palavras-chave:** Cancro renal; Ácido Cafeico; Ácidos Hidroxicinâmicos; Citotoxicidade

## **Abstract**

Cancer represents one of the greatest public health concerns worldwide, due to its high incidence and mortality rates. The variability presented by the biological mechanisms expressed in cancer makes it difficult, on a large scale, to fully understand it. In this sense, efforts are being made to improve its prevention and treatment. Bearing in mind that the existing therapeutic options do not demonstrate the effectiveness that the pathology requires, the investigation of new bioactive compounds that bring advantages and can be implemented in its treatment becomes fruitful. Some hydroxycinnamic acids, such as caffeic acid, show promising action in this area, so their possible applications have been studied.

Using a literature review, the present work aimed to study the cytotoxic activity of caffeic acid. Using the *Phenol-Explorer* database, the bioavailability of caffeic acid was studied, searching for food sources, precursors and metabolites. Additionally, the «in vitro» cytotoxic activity of caffeic acid alone, as well as its combination with cisplatin, was evaluated. Human renal adenocarcinoma cells (786-O) with an exposure time to the reagents of 48 h were used, using the crystal violet (CV) assay.

At the studied concentrations of caffeic acid (10 and 25  $\mu\text{M}$ ), no decrease in cell viability was demonstrated. The combination of caffeic acid with cisplatin reduced cell viability values when compared to the control, but showed no difference compared to the activity of cisplatin alone.

Despite the results obtained here, it is pertinent to carry out further studies, with different experimental conditions and in other cancer cell lines, to clarify whether caffeic acid and its metabolites, precursors and other hydroxycinnamic acids may impact on the progression of kidney cancer.

**Keywords:** Kidney cancer; Caffeic Acid; Hydroxycinnamic Acids; Cytotoxicity

## **Abreviaturas e Siglas**

786-O – Linha celular de adenocarcinoma renal humano

AHC – Ácido Hidroxicinâmico

AKT – Proteína Cinase B

ATCC – *American Type Culture Collection*

CaSki – Linha celular de Vírus do Papiloma Humano-16 positivo

ccRCC – *Clear Cell Renal Cell Carcinoma*

CDKN2A – *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*

ChRCC – *Chromofobe Renal Cell Carcinoma*

CIP2A – *Cancerous Inhibitor of Protein Phosphatase 2A*

CV – Cristal Violeta

DALY – Anos de vida perdidos por incapacidade (*Disability Adjusted Life Years*)

DCV – Doenças Cardiovasculares

DGS – Direção Geral de Saúde

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

FBS – Soro Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*)

HeLa – Linha celular de carcinoma do colo do útero

HPV – Vírus do Papiloma Humano (*Human Papillomavirus*)

IL-2 – Interleucina-2

IMC – Índice de Massa Corporal

MCF-7 – Linha celular de adenocarcinoma da mama

MDA-MB-231 – Linha celular humana de adenocarcinoma da mama

MET – Proto-oncogene, *receptor tyrosine kinase*

MiRNA – MicroRNA

MTOR – Alvo de rapamicina nos mamíferos

MTT – Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazólio

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Tampão Fosfato-salino (*Phosphate-Buffered Saline*)

PI3K – Fosfoinosítídeo 3-cinase

ROS – Espécies Reativas de Oxigénio (*Reactive Oxygen Species*)

SETD2 – Histona Lisina Metiltransferase para lisina-36 e histona H3

SNS – Sistema Nacional de Saúde

SWI/SNF – *Switch/Sucrose Non-Fermentable*

TERT – Transcriptase Reversa de Telomerase (*Telomerase Reverse Transcriptase*)

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

VHL – Von Hippel-Lindau

XTT-NR-SRB – Tetrazolium hydroxide-Neutral Red-Sulforhodamine B

# Índice Geral

Introdução.....	1
1 – Cancro .....	4
1.1 – Epidemiologia .....	4
1.2 – Fatores de Risco.....	7
1.3 – Fisiopatologia.....	8
1.4 – Cancro Renal .....	11
2 – Ácidos Hidroxicinâmicos .....	17
2.1 – Ácido Cafeico .....	20
2.1.1 – Propriedades e Aplicações .....	20
2.1.2 – Fontes Alimentares e Metabolitos Resultantes .....	21
3 – Avaliação <i>In Vitro</i> da Atividade Citotóxica de Ácido Cafeico.....	24
3.1 – Materiais e Métodos .....	24
3.1.1 – Reagentes.....	24
3.1.2 – Cultura Celular .....	24
3.1.3 – Trabalho em Assepsia .....	24
3.1.4 – Passagem de Células.....	25
3.1.5 – Contagem de Células.....	25
3.1.6 – Ensaio Colorimétrico do Cristal Violeta .....	26
3.1.7 – Análise Estatística .....	27
3.2 – Resultados .....	27
3.3 – Discussão .....	30
4 – Conclusão .....	34
5 – Referências Bibliográficas .....	35

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Características essenciais das células cancerígenas e respetivos potenciais alvos terapêuticos. Reproduzido de (Hanahan & Weinberg, 2011).....	9
<b>Figura 2 - A:</b> Casos diagnosticados de cancro renal, no ano de 2020, por género; <b>B:</b> Número de mortos por cancro renal em 2020, por género. Adaptado de (International Agency for Research on Cancer (World Health Organization), 2020) .....	12
<b>Figura 3 - A:</b> Comparação da incidência de cancro renal em 2020, por continente; <b>B:</b> Comparação da mortalidade de cancro renal em 2020, por continente. Adaptado de (International Agency for Research on Cancer (World Health Organization), 2020).....	12
<b>Figura 4</b> - Vias terapêuticas e fármacos utilizados no tratamento direcionado de cancro renal. Reproduzido de (Barata & Rini, 2017) .....	15
<b>Figura 5</b> - Precursores, origem e formação de Ácidos Hidroxicinâmicos. Adaptado de (Taofiq et al., 2017). .....	18
<b>Figura 6</b> – Estrutura química do ácido cafeico. Reproduzido de (Merck, 2020) .....	20
<b>Figura 7</b> – Ácido Cafeico e alguns dos seus metabolitos com atividade biológica. Adaptado de (Sova & Saso, 2020).....	23
<b>Figura 8</b> - Viabilidade celular das células 786-O tratadas com ácido cafeico a 10 µM (48 h), comparadas com o controlo positivo. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico do CV. Os valores representam a média ± DP, sendo expressos como percentagem em função das células controlo (* p < 0,05 quando comparado com o controlo negativo). .....	29
<b>Figura 9</b> - Viabilidade celular das células 786-O tratadas com ácido cafeico a 20 µM, cisplatina a 25 µM e com ambos os compostos simultaneamente (48 h), comparadas com o controlo positivo. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico do CV. Os valores representam a média ± DP, sendo expressos como percentagem em função das células controlo (* p < 0,05 e ** p < 0,01 quando comparados com o controlo negativo). .....	30

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Número de Ocorrências por Tipo de Cancro (em milhões). <b>A:</b> Tipos de cancro com maior número de casos diagnosticados, em 2020; <b>B:</b> Tipos de cancro com maior número de óbitos relacionados, em 2020. Adaptado de (WHO, 2021) .....	4
<b>Tabela 2</b> - Local de metastização mais recorrente para alguns tipos de cancro. Adaptado de (Nguyen et al., 2009).....	10
<b>Tabela 3</b> - Comparação de gastos totais em saúde, gastos totais em medicamentos e DALYs de cancro e DCV, no ano de 2006 em Portugal (Araujo, 2009). .....	10
<b>Tabela 4</b> – Quantidades de ácido cafeico doseadas em amostras de urina e plasma humanos, em variados estudos, a partir de diferentes fontes. Adaptado de (Phenol-Explorer, 2002) .....	22
<b>Tabela 5</b> – Metabolitos resultantes da administração de ácido cafeico em ratos, presentes na urina e no plasma após a administração de 250 µmol/dia de ácido cafeico, durante 8 dias. Adaptado de (Phenol-Explorer, 2002) .....	22
<b>Tabela 6</b> – Representação da distribuição dos compostos utilizados nas placas de 96 poços, nos ensaios colorimétricos de cristal violeta A e B. ....	26
<b>Tabela 7</b> - Representação da distribuição dos compostos utilizados nas placas de 96 poços nos ensaios colorimétricos de cristal violeta C a E. ....	26
<b>Tabela 8</b> - Valores de absorvância determinados para a placa A .....	28
<b>Tabela 9</b> - Valores de absorvância determinados para a placa A, após subtração da média do branco (0,038). .....	28
<b>Tabela 10</b> - <b>A:</b> Média, por coluna, dos valores apresentados na Tabela 9 e respetiva percentagem; <b>B:</b> Desvio-padrão calculado para cada coluna da Tabela 9 e respetiva percentagem. ....	28

## **Introdução**

Há décadas sem expectativa de abandonar a agenda internacional, o cancro é uma das principais preocupações ao nível da saúde, por ocupar um lugar de destaque nas listas de doenças incidentes na população mundial (Fidler, Bray, & Soerjomataram, 2018). Também comumente designado por neoplasma ou tumor maligno (WHO, 2021), esta patologia reúne cada vez mais esforços no sentido de se controlar a evolução (Whiteman & Wilson, 2016) das taxas de morbilidade e mortalidade associadas (Fidler et al., 2018).

Segundo a Direção Geral de Saúde (DGS), no ano de 2015, foram diagnosticados cinquenta mil novos casos de cancro em Portugal (DGS, 2016). O cancro ocupa também um lugar cimeiro nas causas de mortalidade do país, sendo apenas ultrapassado pelas doenças cardiovasculares (DCV) (Saúde, 2017). A incidência do cancro não apresenta sinais de abrandar, prevendo-se que atinja novos valores recorde nas próximas décadas (Zugazagoitia et al., 2016), podendo chegar aos 22 milhões de novos casos e 13 milhões de mortes em 2030 (Fidler et al., 2018). Portugal deverá seguir esta tendência ascendente, estimando-se 65 mil casos em 2035 (DGS, 2016).

A distribuição geográfica desta doença é abrangente, estando presente em todo o globo. As taxas de incidência têm vindo a apresentar algumas variações, de acordo com o nível de desenvolvimento socioeconómico do país, mas em todos eles é das principais causas de morte (Torre, Siegel, Ward, & Jemal, 2016). Tendo em conta o panorama internacional que se regista e a tendência de incremento constante da incidência dos novos casos de cancro, aumentam em igual medida os esforços para encontrar novos trajetos para a cura ou, pelo menos, no sentido de proporcionar melhor qualidade e esperança de vida àqueles que padecem da patologia (Zugazagoitia et al., 2016).

Tendo em conta a existência de diversos tipos de cancro, também os fatores de risco são diferenciados. Sejam intrínsecos ou extrínsecos ao nosso organismo (Wu, Zhu, Thompson, & Hannun, 2018), todos eles têm a capacidade de alterar o correto funcionamento das nossas células, podendo levar à formação de tumores (Lewandowska, Rudzki, Rudzki, Lewandowski, & Laskowska, 2019). Torna-se urgente atuar no sentido de prevenir a exposição a estes agentes (Whiteman & Wilson, 2016) e na alteração de hábitos que promovam o desenvolvimento da patologia (Miranda-Filho, Bray, Charvat, Rajaraman, & Soerjomataram, 2020).

A fisiopatologia do cancro é bastante heterogênea entre os seus variados subtipos, apresentando mecanismos e processos biológicos complexos que alteram as funções celulares de forma a se despoletar a formação de uma neoplasia (Bajaj, Diaz, & Reya, 2020). Apesar da heterogeneidade apresentada, as células cancerígenas adquirem funções base que as permitem manter a integridade celular necessária ao seu crescimento (Hanahan & Weinberg, 2011) e eventual progressão e metastização (Candido & Hagemann, 2013), como a resistência a mecanismos de morte celular e inibidores de crescimento (Peng & Croce, 2016).

O subtipo a ser estudado experimentalmente ao longo deste trabalho será o cancro renal. Dentro deste existem variações biológicas de destaque, sendo dividido dessa forma em diferentes classificações, principalmente: carcinoma de células renais claras (ccRCC), carcinoma renal papilar (PRCC) e carcinoma renal cromóforo (ChRCC) (Inamura, 2017). A variabilidade de processos biológicos entre os subtipos de cancro renal exige linhas de tratamento cada vez mais delineadas, evoluindo-se assim no sentido da terapêutica dirigida, com a investigação de alvos terapêuticos específicos (Atkins & Tannir, 2018), com recurso à imunoterapia (Soares et al., 2020). Com a identificação das moléculas-alvo, torna-se possível e necessária a investigação de novos compostos bioativos que apresentem, não só atividade tumoral promissora, como benefícios em relação aos fármacos em uso.

Os compostos fenólicos, nomeadamente os ácidos hidroxicinâmicos (AHC), têm ocupado um lugar promissor no combate a patologias crónicas, por apresentarem atividade antioxidante, antiproliferativa (Sova & Saso, 2020), anti-inflamatória e anticancerígena (Ding, Xu, Fang, & Jiang, 2020). No que diz respeito à sua utilização no cancro, alguns dos principais AHC, como é o caso do ácido cafeico, já demonstraram atividade antitumoral no fígado, mama, adenocarcinoma, cólon, entre outros (Sova & Saso, 2020).

Os AHC são encontrados naturalmente numa panóplia de elementos utilizados na nossa alimentação sendo o custo de obtenção relativamente reduzido, para além de apresentarem atividade biológica e baixa toxicidade (Bian, Wei, Zhao, & Li, 2020). O ácido cafeico, como AHC, apresenta características vantajosas para a sua aplicação, embora surja como ponto importante, a sua baixa biodisponibilidade nos fluidos biológicos. Esta foi evidenciada após pesquisa na base de dados *Phenol-Explorer*, relativamente às quantidades de ácido cafeico e dos seus metabolitos, presentes na urina e no plasma após ingestão a partir de diferentes fontes alimentares.

O trabalho desenvolvido teve como objetivo avaliar a atividade citotóxica do ácido cafeico no carcinoma renal, recorrendo-se a células de adenocarcinoma renal humano, mais especificamente à linha celular 786-O, de forma a estudar o impacto deste composto neste tipo de cancro. Foi também avaliada a atividade do ácido cafeico em associação com a cisplatina, fármaco antitumoral amplamente utilizado. Esta avaliação foi realizada através do ensaio do Cristal Violeta (CV).

## 1 – Cancro

### 1.1 – Epidemiologia

O cancro apresenta uma elevada prevalência de casos a nível mundial, sendo igualmente expressiva a sua taxa de mortalidade. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), só no ano de 2020, pereceram a esta doença cerca de dez milhões de pessoas (WHO, 2021). Na Tabela 1, dizendo respeito ao ano de 2020, apresentam-se os tipos de cancro com maior expressão nos números de casos diagnosticados, bem como aqueles com maior número de óbitos registados.

**Tabela 1** - Número de Ocorrências por Tipo de Cancro (em milhões). **A**: Tipos de cancro com maior número de casos diagnosticados, em 2020; **B**: Tipos de cancro com maior número de óbitos relacionados, em 2020. Adaptado de (WHO, 2021)

Número de Ocorrências por Tipo de Cancro (em milhões)	
A	B
Mama (2,26)	Pulmão (1,80)
Pulmão (2,21)	Colon e Reto (0,935)
Colon e Reto (1,93)	Fígado (0,830)
Próstata (1,41)	Estômago (0,769)
Pele (1,20)	Mama (0,685)

O crescimento dos números relacionados com o cancro pode ser justificado pelo aumento da população mundial, pelo envelhecimento da mesma devido a avanços na esperança média de vida (Fidler et al., 2018), reduzindo-se a eficácia da capacidade intrínseca de reparação celular (WHO, 2021), bem como por uma maior exposição a fatores de risco (Wild et al., 2019), muito relacionados com os estilos de vida adotados (Torre et al., 2016).

O sucesso que um país apresenta na gestão da doença está estreitamente relacionado com o seu contexto socioeconómico e as políticas de saúde implementadas. Países desfavorecidos neste prisma apresentam mais fatores de risco e, conseqüentemente, maior taxa de incidência e de mortalidade (Fidler et al., 2018).

Inicialmente, os países com um índice de desenvolvimento superior apresentavam taxas de incidência da doença numa maior escala de grandeza do que aqueles mais abaixo nesse índice (Torre et al., 2016). No entanto, tem-se registado, fruto de alterações demográficas e sociais promovidas pela globalização (Vineis & Wild, 2014), um conjunto de países em que a carga da

doença se tem acumulado, catapultando-os para a lista de países mais afetados pela mesma e movendo, assim, as percentagens de casos registados no sentido das populações de menor índice de desenvolvimento (Torre et al., 2015).

A prevalência do cancro deve ser necessariamente diminuída (Trendowski, 2014), mas o conhecimento que temos atualmente sobre a patologia não é suficiente para que a mudança seja tão drástica como a mesma exige (Toftgård, 2021). O esclarecimento dos processos da origem celular dos tumores e dos mecanismos de metastização (Toftgård, 2021), bem como o estudo da sua restante etiologia e epidemiologia (Trendowski, 2014), são os passos primordiais no combate ao desenvolvimento da doença (Bajaj et al., 2020).

No combate ao cancro como ameaça de saúde pública, a prevenção surge destacada, sendo uma das etapas fulcrais no controlo da doença (Whiteman & Wilson, 2016). Acredita-se que um terço a metade dos casos de cancro registados seriam passíveis de ser prevenidos (Vineis & Wild, 2014). Com políticas eficazes, os valores de incidência e de mortalidade seriam menores, tal como os gastos em saúde, uma vez que, apesar de envolver um grande esforço financeiro, continuaria a ser um investimento substancialmente menor ao realizado para sustentar tratamentos e terapêutica participados (Vineis & Wild, 2014). Se não existirem medidas que priorizem a prevenção, o tratamento de cancro não é custo-efetivo a nível económico para um país (Wild et al., 2019).

Nesta prevenção surgem diferentes formas de atuação. Na fase primária, reúnem-se esforços para atuar na redução da exposição, por parte da população, aos fatores de risco (Whiteman & Wilson, 2016), estudando-se as metodologias que resultem numa maior adesão (Di Sebastiano, Murthy, Campbell, Desroches, & Murphy, 2019). As redes sociais surgem como uma possível plataforma a utilizar para, mais facilmente, se fazer passar a mensagem pretendida. No entanto, as publicações *online* com teor científico em que se promova a prevenção em saúde, não têm resultado no *feedback* esperado e necessário (Plackett et al., 2020).

À intervenção junto da população, envolvendo a sensibilização acerca da doença, começando nas escolas (Trendowski, 2014), devem estar associadas ações de rastreio e promoção do mesmo (Allemani et al., 2015). Assim, alia-se a prevenção primária à secundária, na qual há a possibilidade de detetar eventuais neoplasias (Wild et al., 2019) num estado precoce de desenvolvimento, que tornará um eventual tratamento menos complexo (Loud & Murphy, 2017), para além de reduzir os DALY (Anos de vida perdidos por incapacidade)

associados à patologia (Wild et al., 2019). A prevenção terciária, que representa a última fase, envolve uma intervenção junto de sobreviventes da patologia, monitorizando-se a evolução dos parâmetros que demonstrem uma possível recorrência ou ressurgimento da doença (Wild et al., 2019).

No sentido de melhorar os números da doença a nível mundial, realça-se a necessidade de se encontrar, comparando taxas de sobrevivência registadas em vários países, as políticas mais corretas a implementar, não só no tratamento, mas também na prevenção da doença (Miranda-Filho et al., 2020), com o intuito de reduzir a incidência, analisando-se os planos de ação daqueles com resultados mais positivos (Allemani et al., 2015).

Foi neste sentido que, num estudo, se utilizaram registos populacionais de taxas de sobrevivência a 5 anos, para diferentes tipos de cancro, em 67 países. Esses registos incluíam 25,7 milhões de adultos e 75 mil crianças com diagnóstico de cancro entre 1999 e 2009 (Allemani et al., 2015). Podendo determinar-se e utilizar-se este tipo de dados, através de uma análise mais intensiva e extensiva dos mesmos, será possível avaliar que fatores estão por detrás do sucesso ou insucesso de um país ou região (Miranda-Filho et al., 2020), sendo porventura aplicáveis a outras partes do globo, de forma a colmatar falhas nas suas políticas e sistemas de saúde (Allemani et al., 2015). Em países subdesenvolvidos, as condições demográficas e socioeconómicas exercem uma influência avassaladora nos resultados obtidos, sendo este tipo de estudos uma via útil de determinação dos pontos em que outros países podem auxiliar na implementação das políticas corretas (Miranda-Filho et al., 2020).

Ne generalidade do globo, há um longo caminho a percorrer no que diz respeito a estratégias preventivas eficazes (Krstic, Mijac, Popovic, Pavlovic Markovic, & Milosavljević, 2019). A evolução tem sido positiva em alguns países, com redução da mortalidade em certos tipos de cancro, atribuída à implementação de políticas e procedimentos de qualidade superior, mas não é suficiente para colmatar o problema de saúde pública existente (Loud & Murphy, 2017). A monitorização desta evolução deve ser assegurada em todos os países, de forma avaliar o possível sucesso das políticas impostas e comparar com outros países (Mema, Yang, Vaska, Elnitsky, & Jiang, 2016). Claramente, podemos também constatar que a pandemia da COVID-19 veio dificultar ainda mais a implementação de planos de saúde, atrasando muitas ações de rastreio com o encerramento provisório de serviços (Feletto, Grogan, Nickson, & Canfell, 2020). Está nas mãos dos decisores políticos e da população, a elevação da prevenção em saúde ao patamar necessário.

## 1.2 – Fatores de Risco

O aparecimento de tumores malignos deve-se, em grande escala, à exposição a fatores de risco, os quais têm a capacidade de interagir direta ou indiretamente com o genoma ou ainda conduzir a alterações epigenómicas e mediar a formação destas anomalias (Herceg et al., 2018) por desregulação do normal funcionamento celular (Lewandowska et al., 2019). O género e idade de um indivíduo são fatores de risco que se tornam, na maioria dos casos, dominantes (Thomas, Miller, & Ward, 2022). E fatores intrínsecos ao organismo humano, como a existência de mutações génicas que aumentem a predisposição à formação de neoplasias, são características a ter em conta (Wu et al., 2018). No entanto, o impacto de fatores potencialmente modificáveis na incidência de cancro é elevado, estando na génese de uma grande percentagem dos casos (Islami et al., 2018), envolvendo, entre outros, o fumo do tabaco, a poluição ambiental, o sedentarismo, representado especialmente pela falta de atividade física e a ausência de uma dieta equilibrada (WHO, 2021).

Estima-se que o fumo do tabaco dê origem a mais de metade dos casos de cancro do pulmão registados (Whiteman & Wilson, 2016), tendo sido o tipo de cancro mais fatal em 2020 (WHO, 2021), com uma expressão acentuada também em Portugal (Forjaz et al., 2020). Um estudo de 2012 atribuiu cerca de 3,6% de todos os cancros diagnosticados nesse ano, à existência de um IMC elevado, tomando maior expressão no género feminino (5,4%) em relação ao masculino (1,9%) (Arnold et al., 2015). Relacionado com as opções alimentares, também se podem fazer associações entre os alimentos ingeridos em maiores quantidades e a formação de tumores malignos. É o caso de carnes vermelhas ou processadas que aumentam a probabilidade de desenvolver estas anomalias no cólon, reto e estômago (Lippi, Mattiuzzi, & Cervellin, 2016), outros dos tipos de cancro com maior mortalidade (WHO, 2021), sendo que, às carnes brancas, não se associa um incremento destes riscos (Lippi et al., 2016). Também a radiação ultravioleta representa um fator de risco a considerar, em casos de exposição crónica e prolongada, podendo-se desenvolver carcinoma na pele (Lewandowska et al., 2019).

A relativa redução das taxas de mortalidade que se tem registado em países mais desenvolvidos centra-se na diminuição da exposição a fatores de risco, bem como em tratamentos cada vez mais eficazes e diagnósticos precoces (Torre et al., 2016). Por outro lado, o aumento denotado nos países em crescimento socioeconómico é associado à adoção de estilos de vida que o potenciam, como hábitos tabágicos, sedentarismo e pobre alimentação, que induz um aumento do IMC médio da população (Torre et al., 2016). A estes fatores juntam-se aqueles

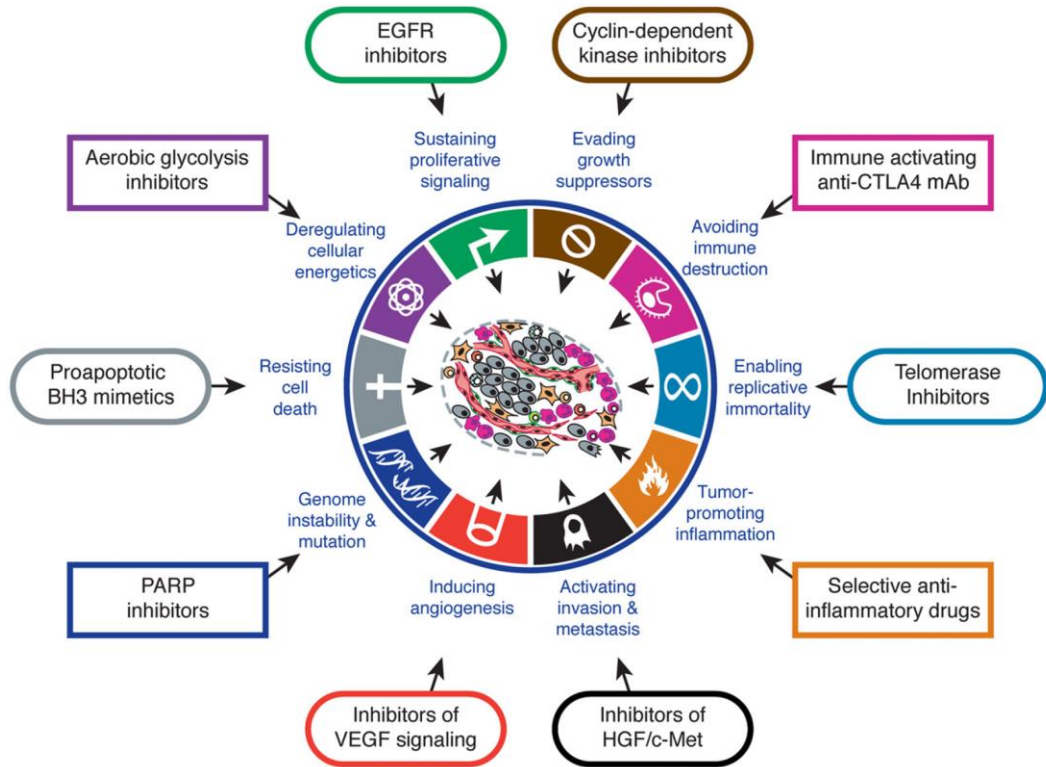
já existentes no país, principalmente de origem infecciosa (Vineis & Wild, 2014) como os vírus da hepatite B e C, *Helicobacter pylori* e HPV (WHO, 2021), que continuam a representar uma ameaça, apesar dos esforços para a sua mitigação (Islami et al., 2018).

### **1.3 – Fisiopatologia**

O desenvolvimento de um tumor inicia-se com um processo complexo de modificações genéticas que permitem divisões celulares ininterruptas, escapando a mecanismos celulares de regulação do crescimento, como indutores de apoptose e inibidores de crescimento (Bajaj et al., 2020), não sendo um processo que, numa fase inicial, seja facilmente detetado através de uma alteração morfológica visível (Curtius, Wright, & Graham, 2018). Uma célula normal pode multiplicar-se, transformando-se num grupo de células, vindo a desenvolver uma neoplasia (Curtius et al., 2018). Dentro desse grupo de células, decorrem diversas interações que guiam o tumor através das suas fases de crescimento, envolvendo a progressão, metastização e angiogénese (Candido & Hagemann, 2013).

(Hanahan & Weinberg, 2011) descreveram as principais características das células cancerígenas nos diversos tipos de cancro (Figura 1), podendo os processos biológicos e mecanismos funcionais da tumorigénese e etapas seguintes ser distintos entre eles. Consideram como característica fundamental a capacidade das células cancerígenas perpetuarem a sua proliferação, mantendo a integridade celular a nível estrutural e funcional, podendo assim desenvolver as restantes funções (Hanahan & Weinberg, 2011). Esta manutenção é possível através de moléculas como microRNA (miRNA) que ultrapassam mecanismos de morte celular, inibidores de crescimento (Peng & Croce, 2016) e estimulam a indução da angiogénese (Zheng & Hou, 2021), sendo outras das características essenciais identificadas por (Hanahan & Weinberg, 2011). Outras das mencionadas são a perpetuação da replicação (Hanahan & Weinberg, 2011), na qual é imperativa a ativação de porções cromossómicas como a transcriptase reversa da telomerase (TERT), que permite o alongamento dos telómeros e a replicação por tempo indefinido (Dratwa, Wysoczańska, Łacina, Kubik, & Bogunia-Kubik, 2020), bem como a ativação da metastização (Hanahan & Weinberg, 2011). A revisão elaborada por (Hanahan & Weinberg, 2011) é a base de grande parte da investigação realizada no sentido de compreender a fisiopatologia do cancro, dada a organização dos mecanismos e a identificação de potenciais alvos terapêuticos. Com a evolução das técnicas utilizadas na

investigação, torna-se natural o incremento da especificidade da literatura associada aos mecanismos da patologia (Senga & Grose, 2021).



**Figura 1** - Características essenciais das células cancerígenas e respetivos potenciais alvos terapêuticos. Reproduzido de (Hanahan & Weinberg, 2011).

No sentido de controlar a doença e entender os processos mais críticos da mesma, a metastização é uma das fases mais importantes a ser estudada, tendo em conta o peso que representa na sua mortalidade e morbidade (Seyfried & Huysentruyt, 2013). Esta fase envolve o alastramento de células cancerígenas do órgão de origem para outros adjacentes ou mais distantes (Nguyen, Bos, & Massagué, 2009), identificando-se uma cascata de metástase, na qual células do tumor principal entram na circulação sanguínea e linfática, escapando ao sistema imunitário, invadindo e desenvolvendo um tumor secundário noutra órgão (Hanahan & Weinberg, 2011). A metastização varia consoante o órgão em que o tumor principal se localiza, não se conhecendo nenhuma origem concreta deste processo (Seyfried & Huysentruyt, 2013). Apesar de não se conseguir ainda estabelecer uma relação direta entre esta localização e o órgão que virá a ser afetado, existem alguns tipos de cancro onde é possível estimar o destino da metastização (Nguyen et al., 2009), como representado na Tabela 2.

**Tabela 2** - Local de metastização mais recorrente para alguns tipos de cancro. Adaptado de (Nguyen et al., 2009).

Órgão do Tumor Principal	Local de Metastização
Mama	Ossos, Pulmões, Fígado e Cérebro
Pancreático	Fígado e Pulmões
Próstata	Ossos
Colorretal	Fígado e Pulmões

As características de um tumor são amplamente heterogénicas, moduladas por mecanismos celulares e moleculares (Visvader, 2011). Começando nas alterações verificadas nas células cancerígenas (Fortunato et al., 2017) até às diferentes expressões da doença consoante o órgão em que se implementa inicialmente (Nguyen et al., 2009), toda a patologia possui variações imprevisíveis que dificultam a atuação das medidas de saúde (Visvader, 2011). Esta heterogeneidade é o principal inimigo da terapêutica, pois conduz a resistência à mesma (Bajaj et al., 2020).

Expectavelmente, tal como a própria patologia, a dispensa de medicamentos oncológicos apresenta uma evolução ascendente, aumentando também os encargos para o SNS (DGS, 2016). Dados de 2006 refletindo sobre a saúde em Portugal (Tabela 3), comparam o cancro com as DCV em diversos parâmetros (Araujo, 2009), conhecendo-se os lugares cimeiros de ambas as patologias na incidência e mortalidade nacional.

**Tabela 3** - Comparação de gastos totais em saúde, gastos totais em medicamentos e DALYs de cancro e DCV, no ano de 2006 em Portugal (Araujo, 2009).

	Gastos Totais em Saúde	Gastos Totais em Medicamentos	DALYs
Cancro	3,91%	5,6%	15,3%
DCV	9,14%	21,6%	18,6%

Vista a rápida progressão dos números de incidência da doença, morbilidade e mortalidade, os gastos totais efetuados não acompanham as reais necessidades que os mesmos impõem. Tornam subfinanciados os esforços e planos a implementar, quando comparados com as DCV, uma vez que o cancro se aproxima cada vez mais destas no topo das doenças que infligem a comunidade (Araujo, 2009).

Interpretando dados comparativos de 2014 e 2015, registou-se um incremento de 9,8% na despesa com medicamentos oncológicos. No entanto, em termos de quantidades de

medicamentos, esse aumento foi de apenas 4,5%, justificado pela aquisição de medicamentos cada vez mais inovadores e, por conseguinte, dispendiosos (DGS, 2016).

Um dos caminhos estudados para evoluir no tratamento do cancro envolve a utilização de terapia molecular, com o intuito de impedir a progressão e metastização do cancro (Lee, Tan, & Oon, 2018). Estas linhas de ação contribuem para uma medicina personalizada, deixando de consistir numa terapêutica-padrão, mas numa cada vez mais específica para as necessidades do paciente (Jackson & Chester, 2015).

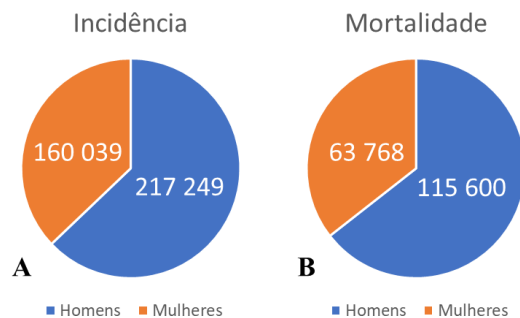
Essa especificidade é, precisamente, das características mais difíceis de alcançar dada o perfil genético heterogéneo da patologia nas suas diversas manifestações (Zugazagoitia et al., 2016). Mais ainda, o investimento necessário é extenso, tendo em conta que se torna basal a determinação de alvos moleculares específicos para cada tipo de cancro, bem como fármacos de diferentes classes capazes de desenvolver a resposta adequada (Jackson & Chester, 2015). É nesta necessidade que a Genómica se torna fulcral. Contribui, não só na identificação dos referidos alvos, mas também na previsão da resposta do organismo a um certo imunossupressor, seja em termos de tratamento ou de desenvolvimento de resistência (Berger & Mardis, 2018). A capacidade e probabilidade das células tumorais se tornarem resistentes a compostos em estudo é amplamente documentada, evidenciando alterações genéticas que dificultam a implementação de novas linhas terapêuticas (Fortunato et al., 2017).

Tendo em conta o trabalho que falta desenvolver, existe um longo caminho a percorrer ao nível de investigação para que a terapia molecular se torne uma opção fiável e utilizada extensivamente no tratamento do cancro (Zugazagoitia et al., 2016). Uma das alternativas a estas metodologias pode ser encontrada nos compostos que ocorrem naturalmente na natureza, visto que são facilmente obtidos, e várias classes possuem atividade biológica de interesse para o cancro (Bian et al., 2020).

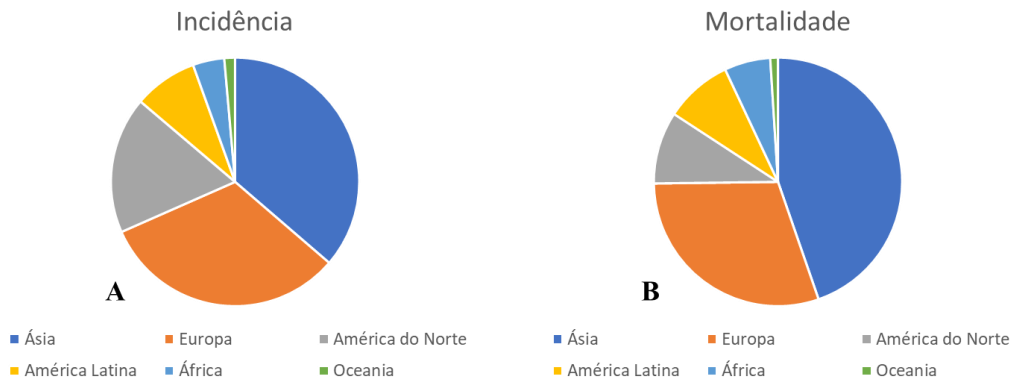
## **1.4 – Cancro Renal**

O cancro renal, também designado adenocarcinoma renal, apresenta uma expressão significativa nos números associados ao cancro a nível mundial. Durante o ano de 2020, foram diagnosticadas 431.288 pessoas com cancro renal e pereceram ao mesmo 179.368 (International Agency for Research on Cancer (World Health Organization), 2020). Os géneros não são

igualmente afetados, tal como demonstram os dados da Figura 1, tanto em termos de incidência (Figura 1A) como de mortalidade (Figura 1B), sendo evidente um maior número de casos afeto ao sexo masculino (International Agency for Research on Cancer (World Health Organization), 2020). No que diz respeito à distribuição geográfica destes números, a mesma não é homogênea por todo o globo, à semelhança do que acontece com os restantes tipos de cancro, pelas razões discutidas em 1.1 – Epidemiologia. Na Figura 2 encontra-se representada a comparação da incidência (Figura 2A) e da mortalidade (Figura 2B) entre os diferentes continentes, tendo a Ásia e Europa como os dois mais afetados.



**Figura 2 - A:** Casos diagnosticados de cancro renal, no ano de 2020, por género; **B:** Número de mortos por cancro renal em 2020, por género. Adaptado de (International Agency for Research on Cancer (World Health Organization), 2020)



**Figura 3 - A:** Comparação da incidência de cancro renal em 2020, por continente; **B:** Comparação da mortalidade de cancro renal em 2020, por continente. Adaptado de (International Agency for Research on Cancer (World Health Organization), 2020)

Os fatores de risco para o desenvolvimento de cancro renal incluem obesidade e tabagismo, tal como em outros tipos de cancro, mas algumas características genéticas exercem uma predisposição para um indivíduo desenvolver cancro renal, como é exemplo a síndrome

de von Hippel-Lindau (VHL) (Hancock & Georgiades, 2016), caracterizada pela perda de função de um ou ambos os alelos do gene com o mesmo nome, desenvolvendo diversos tipos de tumores (Chittiboina & Lonser, 2015), e a síndrome de Birt-Hogg-Dubé (Hancock & Georgiades, 2016), caracterizada por tumores de pele benignos e quistos nos rins e pulmões (Napolitano et al., 2020). Também existe evidência que alguns analgésicos, como é o caso do paracetamol, podem representar um fator de risco para o desenvolvimento de cancro renal, em situações de uso crónico (Karami et al., 2016).

Em casos detetados em fase inicial sem apresentar metastização, se for viável a realização de cirurgia, decorre uma nefrectomia, ou seja, remoção parcial ou total do rim (Martinez Chanza, Tripathi, & Harshman, 2019). A ablação térmica e por radiofrequência eliminando células afetadas tem sido utilizada com melhorias na complexidade do pós-operatório (Hancock & Georgiades, 2016). A quimioterapia é uma vertente bastante utilizada em diversos tipos de cancro, tal como no carcinoma renal. Um dos fármacos utilizados é a cisplatina, que atua causando danos no DNA das células tumorais. Como, simultaneamente, interfere com os mecanismos de reparação celular, promove a sua apoptose (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014). No entanto, a expressão de algumas oncoproteínas como a CIP2A (*Cancerous Inhibitor of Protein Phosphatase 2A*), aumentam a resistência dos tumores ao tratamento com cisplatina, reduzindo a sua eficácia (Y. Zhang, Fang, Zang, Ren, & Xu, 2018).

O cancro renal apresenta diferentes variações, dando origem a subtipos biologicamente distintos (Haake & Rathmell, 2017). Cada um apresenta as suas próprias características patológicas e genéticas (Inamura, 2017), sendo possível o seu estudo e distinção por evolução das técnicas utilizadas, com um aumento do peso da genómica na compreensão dos mecanismos inerentes a estes tumores (Jonasch, Gao, & Rathmell, 2014). Desta forma, é possível identificar e caracterizar os principais tipos de cancro renal: carcinoma de células renais claras (ccRCC), carcinoma renal papilar (PRCC) e carcinoma renal cromóforo (ChRCC) (Inamura, 2017).

O ccRCC representa 65 a 70 % dos casos de cancro renal em adultos, caracterizado por lesões de cor amarelada e com sinais de hemorragia e necrose. A nível celular, apresentam parede fina e vasculatura irregular, sendo o citoplasma límpido por acumulação de lípidos e glicogénio (Inamura, 2017). Apresentam mutação no gene VHL em 90% dos casos, sendo que, caso ambos os alelos estejam silenciados, desencadeia-se uma via de ativação de genes pró-angiogénicos (Inamura, 2017). Pode apresentar mutações na via PI3K/AKT/MTOR, com um papel importante na angiogénese (Karar & Maity, 2011), responsável pela proliferação e

metastização de vários tumores (Roudsari et al., 2021), em SETD2, uma histona metiltransferase responsável pela integridade genómica (Lu et al., 2021) e no complexo SWI/SNF que reconstrói cromatina (Inamura, 2017).

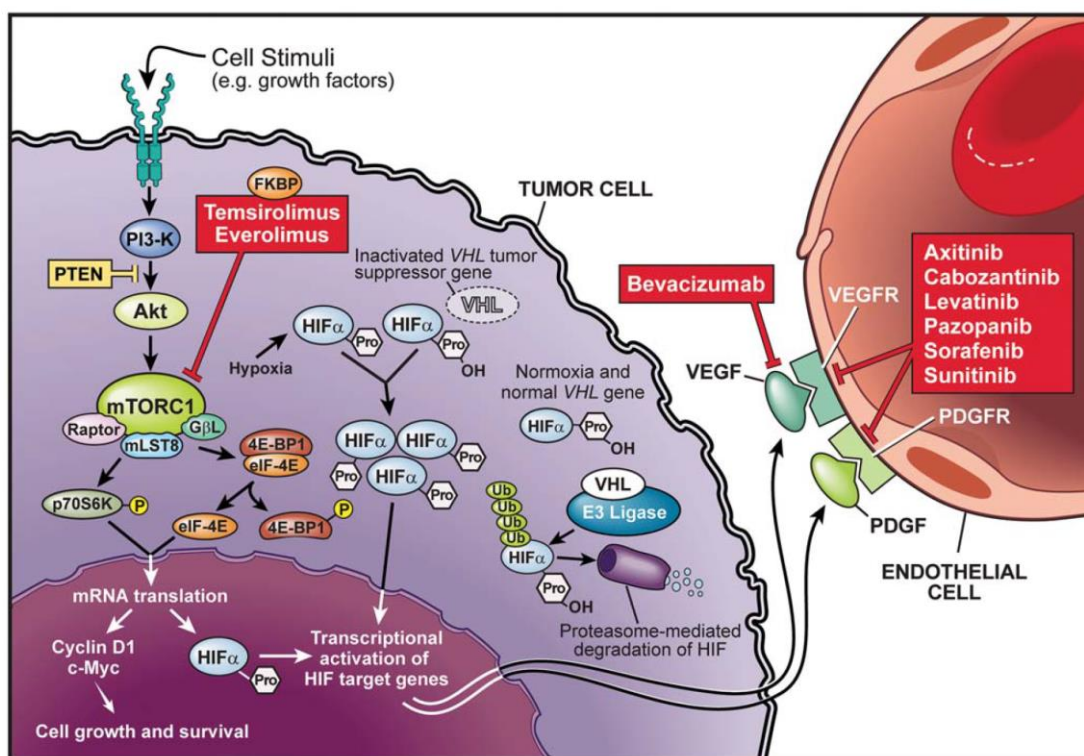
O PRCC representa 15 a 20 % dos cancros renais em adultos, podendo ser dividido em tipo 1 e 2, apresentando o primeiro melhor prognóstico que o segundo. As lesões características têm aparência friável, com hemorragia e necrose (Inamura, 2017). No tipo 1, estão presentes papilas cobertas por células de citoplasma e núcleos reduzidos, com macrófagos, sendo que no tipo 2 os citoplasmas e núcleos são grandes, com papilas fibrovasculares, podendo ou não incluir macrófagos (Inamura, 2017). A nível de mutações genéticas, o tipo 1 apresenta alterações em MET (Inamura, 2017), um gene cuja expressão aumentada tem implicação em vias patológicas de adenocarcinomas (J. Zhang, Guo, Liu, Li, & Ying, 2017). O tipo 2 envolve silenciamento de CDKN2A (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*), que pode potenciar a metastização (Qiao et al., 2021), e mutações em SETD2 (Inamura, 2017).

O ChRCC representa 5 a 7 % dos casos de carcinoma renal em adultos, traduzindo-se num prognóstico favorável, existindo ainda relação entre a síndrome Birt-Hogg-Dubé e uma maior incidência deste tipo de cancro. As lesões apresentam uma tonalidade acastanhada, tendo a nível celular grandes membranas, núcleos irregulares e citoplasmas com eosinófilos granulares (Inamura, 2017). Inclui comumente mutações somáticas no DNA mitocondrial e expressão aumentada de TERT (Inamura, 2017), uma subunidade catalítica dos telómeros que influencia a sua manutenção (Dratwa et al., 2020).

O tratamento de cancro renal tem passado por uma evolução constante, devido a avanços na compreensão da sua fisiopatologia que permitem a identificação de novos alvos terapêuticos (Atkins & Tannir, 2018). Antes destas descobertas, a terapêutica farmacológica baseava-se numa abordagem não específica com a utilização de citoquinas, nomeadamente interleucina-2 (IL-2) (Braun et al., 2021) que influencia os números de linfócitos T, tendo apresentado resultados satisfatórios ao nível do tratamento da doença, mas não ao nível da toxicidade para o paciente (Wrangle et al., 2018). A primeira linha de tratamento baseia-se agora na inibição do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que bloqueia a angiogénese tumoral (Martinez Chanza et al., 2019), uma terapêutica mais dirigida e específica que a anterior (Barata & Rini, 2017). Esta envolve a utilização de inibidores de tirosina-cinase ou de anticorpos anti-VEGF, como é o caso do bevacizumab (Braun et al., 2021). Mais recentemente, o estudo da imunoterapia tem estado em destaque, apresentando mais oportunidades de tratamento para os

pacientes e, em conjunto com a terapia convencional, tem vindo a reduzir a mortalidade em países que a adotam (Soares et al., 2020), com uma resposta favorável e duradoura no caso de cancro renal (Bates, Derakhshandeh, Jones, & Webb, 2018). Na Figura 4 estão esquematicamente representados alguns dos fármacos atualmente utilizados ou em estudo para o tratamento de cancro renal, bem como as suas moléculas-alvo e vias terapêuticas.

A investigação de novos fármacos exige também a identificação de biomarcadores cada vez mais específicos que permitam prever a sua eficácia (Deleuze et al., 2020), de forma a conjugar-se as necessidades do paciente ao mecanismo de ação e finalidade do tratamento, podendo até ser utilizada uma combinação de terapêuticas (Barata & Rini, 2017).



**Figura 4** - Vias terapêuticas e fármacos utilizados no tratamento direcionado de cancro renal. Reproduzido de (Barata & Rini, 2017)

Dada a investigação realizada sobre as vias terapêuticas a seguir e quais as moléculas-alvo essenciais na terapêutica do cancro renal, o próximo passo envolve a aquisição de conhecimento acerca de potenciais agentes anticancerígenos que possam integrar esta terapêutica, mas que apresentem melhores perfis de segurança, com reduzidas reações adversas e custo-benefício mais favorável (Liviu Preda & Galieta Mincă, 2018). Com estas

características apresentam-se compostos naturais como os polifenóis, que exibem atividade biológica potencialmente interessante na terapêutica anticancerígena.

## 2 – Ácidos Hidroxicinâmicos

Os polifenóis estão abundantemente presentes na natureza, ocorrendo naturalmente nas plantas (Cardona, Andrés-Lacueva, Tulipani, Tinahones, & Queipo-Ortuño, 2013). Por consequência, são constituintes assíduos da nossa dieta, encontrados principalmente em vegetais (Shen et al., 2020), chás (Khan & Mukhtar, 2018), leguminosas (Liu, Ragaee, Marcone, & Abdel-Aal, 2020) e frutas (Zhou et al., 2016). Adquirem formas solúveis ou insolúveis, conjugados ou não com moléculas de inferior tamanho no caso das primeiras (Bento-Silva et al., 2020), sendo raro adotarem uma forma livre (Sova & Saso, 2020).

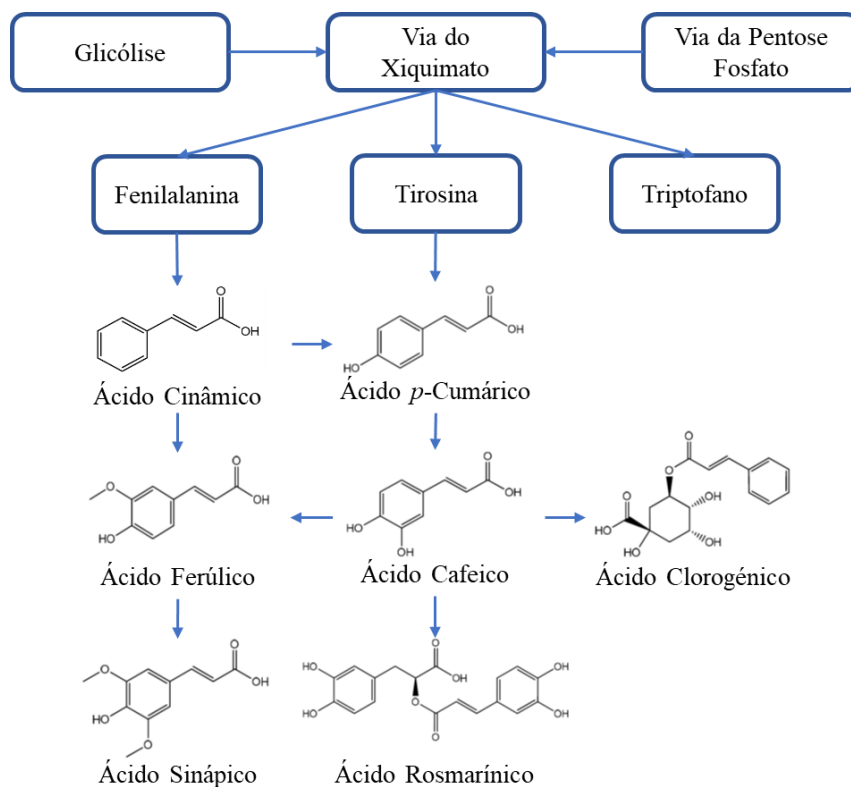
São atribuídas diferentes propriedades a estes compostos, incluindo atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena (Ding et al., 2020), defendendo-se a sua utilização contra patologias crônicas (Luca et al., 2020) como DCV e neurológicas, diabetes e cancro, não só no tratamento mas também na prevenção (Khan & Mukhtar, 2018). Alguns dos efeitos estão relacionados com a modulação da atividade enzimática e indução de alterações na transdução de vias de sinalização moleculares (Martini, Conte, & Tagliazucchi, 2019). No cancro, a sua intervenção incide principalmente sobre mecanismos de controlo celular, envolvendo promoção da apoptose e regulação da autofagia (Bian et al., 2020), assim como em vias moleculares da carcinogénese (Zhou et al., 2016).

A atividade antioxidante reconhecida nestes compostos tem vindo a ser estudada, de forma a ser aplicada em patologias crônicas (Martini et al., 2019), como as referidas anteriormente. Nessas, o stress oxidativo próprio do organismo humano é um mecanismo comum das suas patogénese, visto ser uma das vias de resposta possíveis ao desenvolvimento das doenças, caracterizado por uma produção excessiva de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Koroleva et al., 2014). Os compostos fenólicos colmatam este desequilíbrio através da sua ação *scavenger*, pela transferência de um próton ( $H^+$ ) ou de um eletrão entre as ROS e a sua própria estrutura (Koroleva et al., 2014).

Os polifenóis são caracterizados por múltiplos anéis de benzeno hidroxilados, podendo ser classificados em ácidos fenólicos, estilbenos (ex: resveratrol (Kiokias, Proestos, & Oreopoulou, 2020)), lignanas (ex: silimarina (Cui, Du, Liu, & Rong, 2020)) e flavonoides (ex: quercetina e catequinas (Kiokias et al., 2020)) (Bian et al., 2020), fazendo-se a distinção de acordo com o número de anéis fenólicos e qual a estrutura ligante que apresenta (Sova & Saso, 2020). O primeiro grupo, os ácidos fenólicos, detêm esta nomenclatura devido ao seu principal

grupo funcional: um ácido carboxílico (Sova & Saso, 2020). Podem ser divididos em duas grandes classes: ácidos hidroxibenzoicos e ácidos hidroxicinâmicos (Russo et al., 2017). Destas destacam-se os AHC, pois incluem estruturas moleculares que indiciam e demonstram atividades biológicas mais promissoras (Zhou et al., 2016).

Os AHC têm a sua origem natural a partir de três aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano. Estes são formados na via do xiquimato por conversão de intermediários provenientes da glicólise e da via da pentose fosfato, (Figura 5) (Taofiq, González-Paramás, Barreiro, & Ferreira, 2017). Dos vários AHC sintetizados nesta via, demarca-se o ácido *p*-cumárico, uma vez que ele próprio atua como precursor de outros compostos de destaque, como os ácidos ferúlico e cafeico, dos mais abundantes na natureza (Taofiq et al., 2017).



**Figura 5** - Precursores, origem e formação de Ácidos Hidroxicinâmicos. Adaptado de (Taofiq et al., 2017).

A estrutura dos ácidos hidroxicinâmicos baseia-se num fenilpropanoide C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (Leonard, Zhang, Ying, & Fang, 2021) com um grupo carboxilo na cadeia lateral e grupos hidroxilo no anel aromático (Sova & Saso, 2020). A posição e quantidade destes últimos permitem a

existência de uma ampla diversidade biológica nesta classe de substâncias (Sova & Saso, 2020), sendo-lhes atribuído um papel fulcral na captação de radicais livres (Taofiq et al., 2017) e nos seus efeitos antitumorais (Sova & Saso, 2020).

Uma das palavras-chave a reter na investigação e eventual aplicação destes compostos obtidos nos alimentos, é a sua biodisponibilidade. Este é o fator que, influenciado pela absorção e pelo metabolismo, define quais são as reais vantagens dos ácidos em questão no funcionamento do organismo e combate a patologias (Martini et al., 2019). O reconhecimento, por parte do corpo humano, dos AHC como xenobióticos, impacta diretamente a extensão da sua decomposição (Cardona et al., 2013). A circulação entero-hepática tem, aqui, protagonismo na redução da biodisponibilidade por via oral (Shen et al., 2020), ao desenvolver reações de biotransformação mediadas por enzimas, entre os enterócitos no intestino e o fígado (Luca et al., 2020). É nessas células intestinais que decorre a pouca absorção registada, uma vez que o restante é transformado em metabolitos noutras porções do intestino (Leonard et al., 2021).

A transformação referida altera a estrutura da molécula fenólica original, deixando de possuir as mesmas características, resultando em metabolitos que, tanto podem perder atividade, como aumentá-la significativamente (Sova & Saso, 2020). Estas reações são levadas a cabo pela microbiota intestinal (Cardona et al., 2013), composta por  $10^{13}$  organismos, incluindo fungos, bactérias e vírus, tendo possibilidade de interagir com uma ampla gama de xenobióticos (Shen et al., 2020). Resultante desta metabolização, originam-se compostos de tamanho inferior (Cardona et al., 2013) e estrutura díspar, passando a ser absorvíveis pelo organismo humano para a circulação sistémica (Luca et al., 2020).

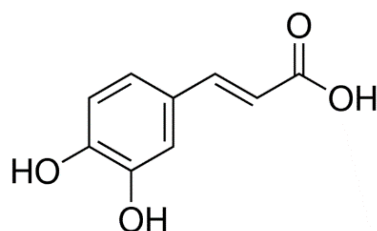
Esta metabolização tem a capacidade, também, de atuar diretamente a favor do organismo, uma vez que os metabolitos fenólicos podem favorecer o crescimento de espécies benéficas na microbiota (Fraga, Croft, Kennedy, & Tomás-Barberán, 2019), auxiliando o sistema imunitário a prevenir algumas doenças (Leonard et al., 2021), graças à sua atividade imunomoduladora (Cueva, Silva, Pinillos, Bartolomé, & Moreno-Arribas, 2020).

As possíveis utilizações destes ácidos carecem de uma estratégia mais eficaz na aplicação clínica, tendo em conta que o seu potencial se prende pelas investigações *in vitro* e *in vivo* realizadas, utilizando-se compostos puros (Kiokias et al., 2020), nas quais apresentam resultados promissores. As limitações na biodisponibilidade e distribuição sistémica precisam de ser ultrapassadas, de forma a se poder considerar a aplicação destes compostos na terapêutica anticancerígena, explorando novas técnicas como a nanoencapsulação (Tabrez et al., 2020).

## 2.1 – Ácido Cafeico

### 2.1.1 – Propriedades e Aplicações

O Ácido Cafeico (Figura 6) é um polifenol da classe dos ácidos fenólicos e da subclasse dos ácidos hidroxicinâmicos (Phenol-Explorer, 2002). Por fazer parte da constituição de alimentos como batatas, fruta e grãos de café, passa a ser o principal AHC na dieta dos humanos (Espíndola et al., 2019), sendo que na fruta, representa entre 75 a 100% da totalidade de AHC (Silva, Oliveira, & Borges, 2014).



**Figura 6** – Estrutura química do ácido cafeico. Reproduzido de (Merck, 2020)

O ácido cafeico é um polifenol produzido naturalmente por plantas, como metabolito secundário da via do xiquimato (Silva et al., 2014), por desaminação da fenilalanina ou tirosina, catalisada pela enzima fenilalanina amônia-liase (El-Seedi et al., 2012), bem como por hidroxilação do ácido *p*-cumárico (Taofiq et al., 2017). O ácido cafeico, visto ser um dos intermediários na biossíntese de lignina nas plantas, elemento-chave da sua estrutura é encontrado abundantemente nas mesmas (Maruyama, Kawakami, Lwin, Imai, & Shamsa, 2018).

Ao ácido cafeico, é-lhe reconhecido atividade antioxidante, anti-inflamatória e antineoplásica (National Center for Biotechnology Information, 2004). A primeira possui vários mecanismos de atuação, influenciada pela estrutura da molécula (Sidoryk, Jaromin, Filipczak, Cmoch, & Cybulski, 2018), sendo a principal por eliminação de ROS, com recurso a transferência de elétrões ou doação de átomos de hidrogénio (Silva et al., 2014). O ácido cafeico, desempenha diversas funções específicas, incluindo ação inibitória sobre o araquidonato 15-lipoxigenase e 5-lipoxigenase, glutathione transferase e histona deacetilase (ChEBI, 2019). Outra dessas funções, característica dos ácidos desta classe, envolve a interação com a microbiota intestinal, possuindo a capacidade de inibir o crescimento de bactéria

intestinais. Comparativamente a outros AHC, o ácido cafeico é dos que exerce maior ação nesse sentido (Leonard et al., 2021).

### **2.1.2 – Fontes Alimentares e Metabolitos Resultantes**

É possível obter o ácido cafeico a partir de diferentes fontes alimentares como alface, uvas, chá, café (El-Seedi et al., 2012), própolis (Assumpção, Takeda, Sforcin, & Rainho, 2020), bagas (Silva et al., 2014), entre outros. Nestas, destaca-se a presença em *Aronia melanocarpa*, cujo conteúdo em ácido cafeico pode atingir os 645,5 mg/100 g (El-Seedi et al., 2012). O ácido cafeico encontra-se também presente em diversas especiarias, com valores médios entre 20,20 e 26,40 mg/100 g em sálvia-comum, tomilho, hortelã-verde (as três na sua forma desidratada), canela de Ceilão e estrela de anis, com muitas outras acima de 10 mg/100 g, como orégãos e gengibre (forma desidratada), cominhos e noz-moscada (Phenol-Explorer, 2002).

Das diversas fontes alimentares originam-se valores farmacocinéticos distintos. As quantidades de ácido cafeico presentes nos alimentos não são totalmente absorvidas pelo organismo, levando a valores muito inferiores na urina e no plasma, comparativamente àqueles que são ingeridos (Oliveira & Bastos, 2011). Isto deve-se, principalmente, ao facto dos compostos fenólicos, como é o caso do ácido cafeico, serem reconhecidos como xenobióticos, sendo metabolizados e excretados rapidamente (Oliveira & Bastos, 2011). Com esta metabolização formam-se diversos compostos, possíveis de quantificar em fluidos biológicos. Para se demonstrar as variações mencionadas, entre as quantidades ingeridas e as presentes nos fluidos biológicos, realizou-se uma pesquisa com recurso à base de dados *Phenol-Explorer*, analisando-se as quantidades de ácido cafeico excretadas, representadas pelos valores na urina, bem como as quantidades registadas no plasma em circulação, em comparação com as quantidades ingeridas a partir de algumas fontes alimentares (Tabela 4). É possível confirmar a excreção aumentada referida, visto que as quantidades na urina tendem a ser superiores às registadas no plasma. Utilizando a mesma base de dados, pesquisaram-se alguns dos principais metabolitos do ácido cafeico e correspondentes quantidades presentes na urina e plasma, após a sua administração em ratos (Tabela 5).

**Tabela 4** – Quantidades de ácido cafeico doseadas em amostras de urina e plasma humanos, em variados estudos, a partir de diferentes fontes. Adaptado de (Phenol-Explorer, 2002)

Fonte de ácido cafeico	Dose	Duração do Ensaio	Urina	Plasma
Ácido 5-cafeoilquínico	2 g/dia	7 dias	56 $\mu\text{mol}/24\text{h}$ após 1 semana	---
Café instantâneo	4 g	Dose única	2.1 $\mu\text{mol}$ após 24 h	---
Extrato de casca de uva	18 g	Dose única	0.7 $\mu\text{mol}$ após 24 h	---
Extrato de chá verde	0,3 g	Dose única	0.3 $\mu\text{mol}$ após 24 h	---
Pó de cacau em leite desnatado	40 g/dia	4 semanas	0.07 $\mu\text{mol}$ após 24 h	0.08 $\mu\text{mol}/\text{L}$ após 24 horas

O uso de “---” significa que não há dados nesse parâmetro

**Tabela 5** – Metabolitos resultantes da administração de ácido cafeico em ratos, presentes na urina e no plasma após a administração de 250  $\mu\text{mol}/\text{dia}$  de ácido cafeico, durante 8 dias. Adaptado de (Phenol-Explorer, 2002)

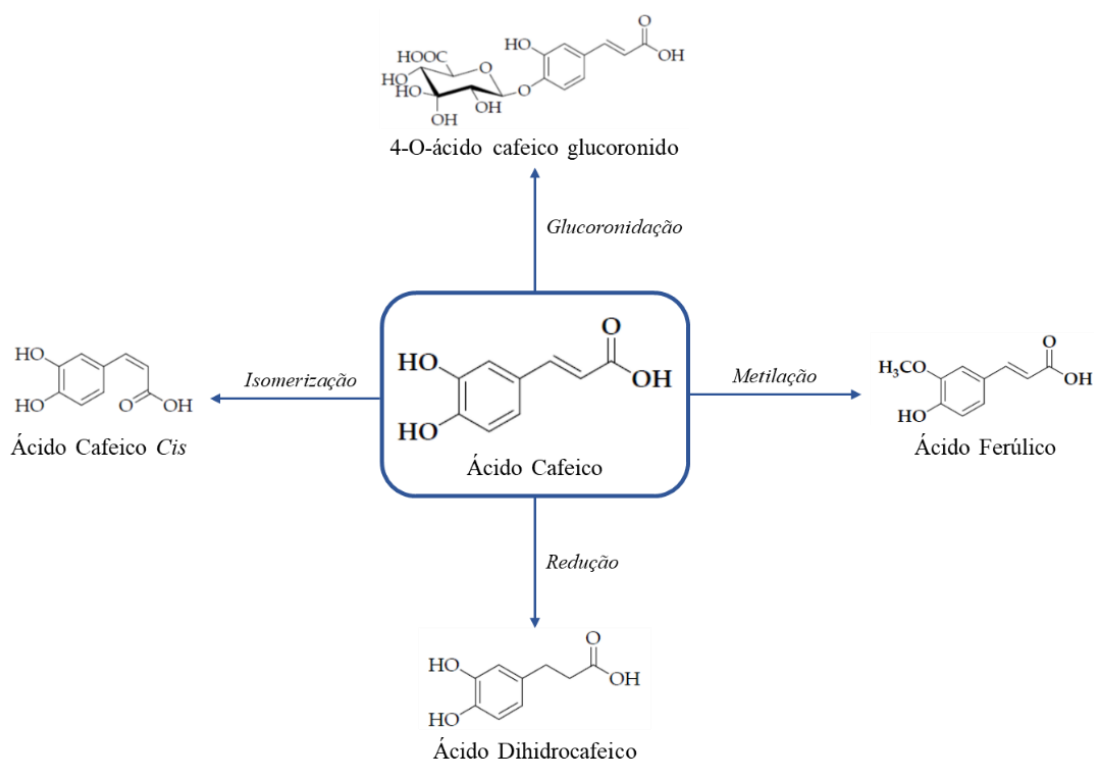
Metabolito	Urina	Plasma
Ácido hipúrico	428 $\mu\text{mol}$ após 8 dias	54.8 $\mu\text{mol}/\text{L}$ após 8 dias
Ácido cafeico	181 $\mu\text{mol}$ após 8 dias	41.3 $\mu\text{mol}/\text{L}$ após 8 dias
Ácido 3-hidroxifenilpropiónico	63.2 $\mu\text{mol}$ após 8 dias	1.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ após 8 dias
Ácido ferúlico	14.5 $\mu\text{mol}$ após 8 dias	7.3 $\mu\text{mol}/\text{L}$ após 8 dias

É possível verificar que as quantidades ingeridas são bastante díspares das quantificadas presentes nos fluidos biológicos, exacerbando o papel da dose de ácido cafeico necessária para se conseguir a atividade biológica pretendida (Selvakumar et al., 2020). Para além disso, evidencia-se a diversidade de compostos que se formam após a metabolização, em qualquer um dos modelos, sendo apenas uma amostra da totalidade verificada biologicamente (Sova & Saso, 2020).

Como referido anteriormente, os metabolitos fenólicos, neste caso de ácido cafeico, possuem atividade biológica, por vezes diferente do composto precursor. De entre outros, temos

como exemplo, o ácido dihidrocafeico, obtido por redução do ácido cafeico, que se destaca por apresentar atividade antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatória e efeitos protetores a nível neurológico, cardíaco e hepático - Figura 7 (Sova & Saso, 2020).

Desta forma, debruçando-se a investigação na possível aplicação de ácido cafeico no tratamento de patologias como o cancro, será de igual importância avaliar os metabolitos que apresentam maior atividade biológica nesse âmbito, pois podem ser obtidos naturalmente a partir dos seus precursores e, porventura, possuir atividade mais específica e elevada para o tecido-alvo escolhido (Martini et al., 2019).



**Figura 7** – Ácido Cafeico e alguns dos seus metabolitos com atividade biológica. Adaptado de (Sova & Saso, 2020)

### **3 – Avaliação *In Vitro* da Atividade Citotóxica de Ácido Cafeico**

#### **3.1 – Materiais e Métodos**

##### **3.1.1 – Reagentes**

O soro bovino fetal (FBS) e o meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) foram adquiridos à Biowest (Nuaille, França). O tampão fosfato (0,01 M, pH 7,4), a tripsina, o etanol, a solução de penicilina-estreptomicina, o ácido acético, o dimetilsulfóxido (DMSO), o cristal violeta (CV), a cisplatina e o ácido cafeico foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). O verseno foi preparado no laboratório. O ácido cafeico foi preparado em DMSO, tendo sido a concentração final de DMSO igual a 0.5% (v/v).

##### **3.1.2 – Cultura Celular**

As células de adenocarcinoma humano 786-O foram cultivadas em meio DMEM com elevada concentração de glucose (4.5 g/L), suplementado com 10% de FBS e 1% de solução de penicilina-estreptomicina, tendo sido mantidas a 37 °C, sob uma atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub>. As células 786-O foram adquiridas à American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, EUA).

##### **3.1.3 – Trabalho em Assepsia**

Para assegurar a assepsia de todos os procedimentos envolvendo a utilização de culturas celulares, estes foram realizados no interior de uma câmara de fluxo laminar vertical. Esta câmara permite a circulação de ar filtrado no interior da mesma, protegendo as superfícies e material em utilização. Desta forma, os movimentos realizados pelo operador devem ser cautelosos, não interrompendo o fluxo de ar na parte superior de todos os pontos mais suscetíveis a contaminações, como é o caso de frascos de reagentes abertos.

A utilização de álcool a 70% é fulcral para manter a assepsia no interior da câmara, devido à sua capacidade desinfetante, reduzindo o risco de possíveis contaminações. Todo o interior da câmara deve ser limpo com recurso a álcool a 70%, antes e depois da sua utilização. O mesmo se aplica a todo o material que entra na câmara, incluindo luvas, pipetas e frascos de reagentes.

### 3.1.4 – Passagem de Células

As células foram incubadas em frascos que permitem a sua proliferação até à confluência desejada de, aproximadamente, 80-90%. Para se perpetuar a utilização da linha celular, é necessário efetuar a passagem das células para um novo frasco, de forma a crescerem novamente. Esta passagem de células tem lugar no interior da câmara de fluxo laminar, seguindo um procedimento rigoroso, de forma a não afetar a viabilidade das mesmas.

Após a desinfecção das luvas e material a utilizar, abriu-se o frasco das células, descartando o meio do seu interior. Os valores de cada reagente, de seguida indicados, são adequados para frascos T<sub>25</sub>, podendo-se também utilizar frascos T<sub>75</sub> com quantidades adequadas de reagente. Pipetou-se 1 mL de verseno para um dos cantos do frasco, de forma a não se danificar as células aderidas na base do frasco, só depois passando cuidadosamente este reagente por toda a base, antes de ser descartado. O verseno tem como principal função limpar o conteúdo do frasco e preparar as células nele presentes para se destacarem. Indica-nos também o pH, mudando de vermelho a amarelo com o incremento de metabolitos presentes, podendo ser necessário efetuar esta limpeza mais do que uma vez. De seguida, pipetou-se 0,5 mL de tripsina para o interior do frasco, aguardando-se três a quatro minutos com o frasco fechado. Este reagente quebra a aderência das células ao frasco, preparando-as para a transferência. No passo seguinte, pipetou-se 5 mL de meio para um novo frasco e 1,5 mL para o frasco inicial, com posterior homogeneização por *up and down*, certificando-se que na transferência se passam as células na concentração pretendida. Assegurando-se ao microscópio que o novo frasco possui as células transferidas, é depois armazenado de novo na incubadora. Durante todos os passos, é de extrema importância impedir o contacto do filtro existente na tampa do novo frasco com algum dos reagentes, uma vez que iria afetar as trocas gasosas a decorrer no interior da incubadora, influenciando as condições no interior do frasco.

### 3.1.5 – Contagem de Células

Para efetuar a contagem de células é necessária uma câmara de Neubauer. Na parte superior desta, após colocação de uma lamela, pipetou-se 10 µL de meio com as células que se pretendem contar, para cada lado da câmara. Posto isto, com recurso ao microscópio e à objetiva de 10x, efetuou-se a contagem das células de três dos quatro quadrantes da câmara de Neubauer. Cada quadrante apresenta quatro limites, sendo escolhidos dois desses para inclusão de células na contagem. Após estar concluída, calcula-se a média e multiplica-se o valor por 10<sup>4</sup>,

resultando no número de células por mL que o frasco apresenta, podendo ser calculado o volume a utilizar para se obter o número de células necessário.

### 3.1.6 – Ensaio Colorimétrico do Cristal Violeta

Para avaliar a influência do ácido cafeico na viabilidade celular foi utilizado o ensaio do cristal violeta (CV), seguindo a mesma metodologia em todos os cinco ensaios (A a E), mas não a mesma distribuição dos compostos pelos poços das placas. Foram utilizadas placas de 96 poços, com uma densidade de 6000 células por poço e incubadas por 24 horas. Findo este período, nos ensaios A e B, foram tratadas células de 8 poços com ácido cafeico (10  $\mu\text{M}$ ), durante 48 horas (Tabela 6).

**Tabela 6** – Representação da distribuição dos compostos utilizados nas placas de 96 poços, nos ensaios colorimétricos de cristal violeta A e B.

	1	2	3	4	5
A	VEÍCULO DMSO 0.5% (v/v)	VEÍCULO DMSO 0.5% (v/v)	<b>ÁCIDO CAFEICO (10 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	VEÍCULO DMSO 0.5% (v/v)	CONTROLO + DMSO 5% (v/v)
B					
C					
D					
E					
F					
G					
H					

Nos restantes três ensaios (C a E), adicionou-se a 4 poços ácido cafeico (20  $\mu\text{M}$ ) e a outros 4 poços uma combinação de ácido cafeico (20  $\mu\text{M}$ ) e cisplatina (25  $\mu\text{M}$ ) - Tabela 7.

**Tabela 7** - Representação da distribuição dos compostos utilizados nas placas de 96 poços nos ensaios colorimétricos de cristal violeta C a E.

	1	2	3	4	
A	CONTROLO + DMSO 5% (v/v)	VEÍCULO DMSO 0.5% (v/v)	<b>ÁCIDO CAFEICO (20 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	VEÍCULO DMSO 0.5% (v/v)	
B					
C					
D	CISPLATINA (25 $\mu\text{M}$ )		VEÍCULO DMSO 0.5% (v/v)	<b>ÁCIDO CAFEICO (20 <math>\mu\text{M}</math>) + CISPLATINA (25 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	CISPLATINA (25 $\mu\text{M}$ )
E					
F					
G					
H					

O DMSO, a concentração final de 5% (v/v), foi utilizado como controlo positivo e a 0.5% (v/v) como veículo, ou controlo negativo. O volume final de cada poço utilizado foi de 200 µL. No fim das 48h de incubação, as células foram lavadas com PBS 1x, para remoção das células não aderidas ao poço. Seguidamente, adicionou-se etanol 96% a frio durante 10 minutos, para fixar as células. Após este período, corou-se as células com cristal violeta a 0.1% em 10% de etanol, durante 5 minutos à temperatura ambiente. Para remoção do corante não ligado às células, imergiu-se a placa em água, com a precaução necessária para não provocar a remoção das células aderidas aos poços. Seguidamente, adicionou-se ácido acético a 1% em etanol 96% a cada poço e ressuspendeu-se a solução cuidadosamente. De seguida, mediu-se a absorvância a um comprimento de onda de 595 nm. recorrendo-se a um leitor de placas Synergy HTX da Biotek. A viabilidade celular é representada na sua totalidade (100%) pelos valores de absorvância correspondentes ao controlo, ou seja, às células tratadas com DMSO a 0.5 % (v/v).

### **3.1.7 – Análise Estatística**

Os valores apresentados correspondem a valores médios e aos respetivos desvios-padrão. A normalidade e a homogeneidade de variâncias foram verificadas e as diferenças nos valores médios dos resultados foram avaliadas pelo Teste-t *Student*. A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* SPSS.

## **3.2 – Resultados**

De forma a poder-se entender os passos seguidos, com o intuito de determinar uma percentagem de viabilidade celular correspondente a um determinado composto e concentração, as seguintes tabelas representam o tratamento de dados a que os valores de absorvância, referentes à placa A, foram sujeitos.

Após a leitura das absorvâncias, a cada poço corresponde um valor específico, como apresentado na Tabela 8.

**Tabela 8** - Valores de absorvância determinados para a placa A

	1	2	3	4	5
A	0,554	0,501	0,507	0,394	0,122
B	0,5	0,528	0,457	0,542	0,13
C	0,577	0,626	0,613	0,505	0,125
D	0,592	0,628	0,661	0,617	0,149
E	0,581	0,642	0,656	0,672	0,184
F	0,637	0,646	0,673	0,639	0,185
G	0,619	0,644	0,582	0,658	0,192
H	0,548	0,529	0,621	0,533	0,212
Branco	0,042	0,036	0,038	0,038	0,038

A estes valores subtraiu-se o valor médio das leituras de absorvância correspondentes ao branco do ensaio (ácido acético a 1% em 96% de etanol), registadas no mesmo comprimento de onda de 595 nm. Dos valores obtidos foi calculada uma média, neste caso igual a 0,038, a qual se subtraiu aos valores da Tabela 8, traduzindo-se nos valores apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9** - Valores de absorvância determinados para a placa A, após subtração da média do branco (0,038).

	1	2	3	4	5
A	0,516	0,463	0,469	0,356	0,084
B	0,462	0,490	0,419	0,504	0,092
C	0,539	0,588	0,575	0,467	0,087
D	0,554	0,590	0,623	0,579	0,111
E	0,543	0,604	0,618	0,634	0,146
F	0,599	0,608	0,635	0,601	0,147
G	0,581	0,606	0,544	0,620	0,154
H	0,510	0,491	0,583	0,495	0,174

Para cada uma das colunas, calculou-se a média dos valores e a respetiva percentagem (Tabela 10A), tal como o desvio-padrão e a respetiva percentagem (Tabela 10B).

**Tabela 10** - **A**: Média, por coluna, dos valores apresentados na Tabela 9 e respetiva percentagem; **B**: Desvio-padrão calculado para cada coluna da Tabela 9 e respetiva percentagem.**A**

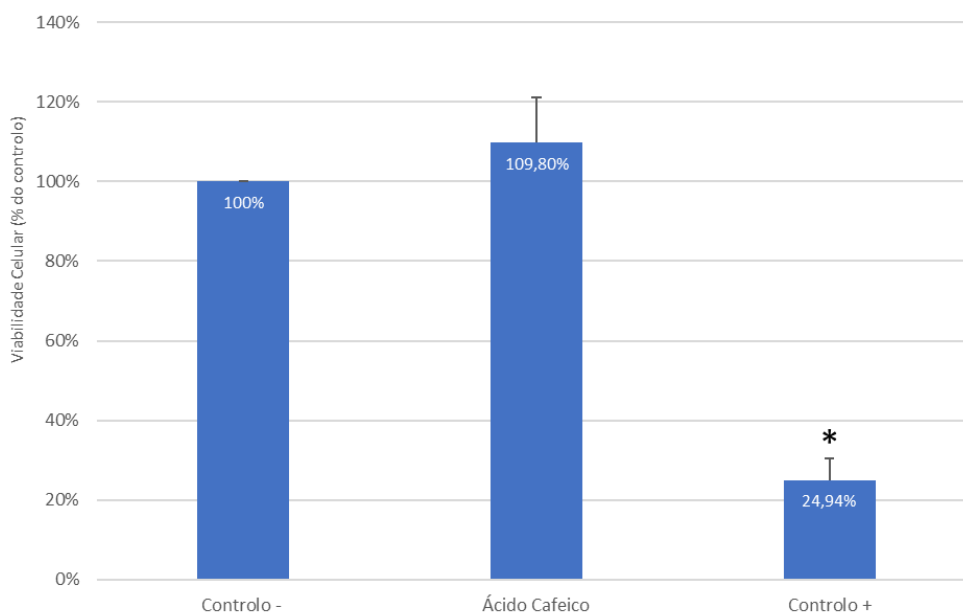
	1	2	3	4	5
A	0,538	0,555	0,558	0,532	0,124
B	99,32%	102,46%	103,01%	98,21%	22,89%

**B**

	1	2	3	4	5
A	0,0429	0,0620	0,0776	0,0945	0,0350
B	7,92%	11,45%	14,33%	17,45%	6,46%

O procedimento descrito foi aplicado, de igual forma, à placa B. Após obtenção dos resultados, realizou-se uma média dos valores das duas placas, conjugando-se as determinações de ambas. Como referido no ponto 4.1.3. – Ensaio Colorimétrico do Cristal Violeta (CV), o controlo negativo terá uma viabilidade celular de 100%.

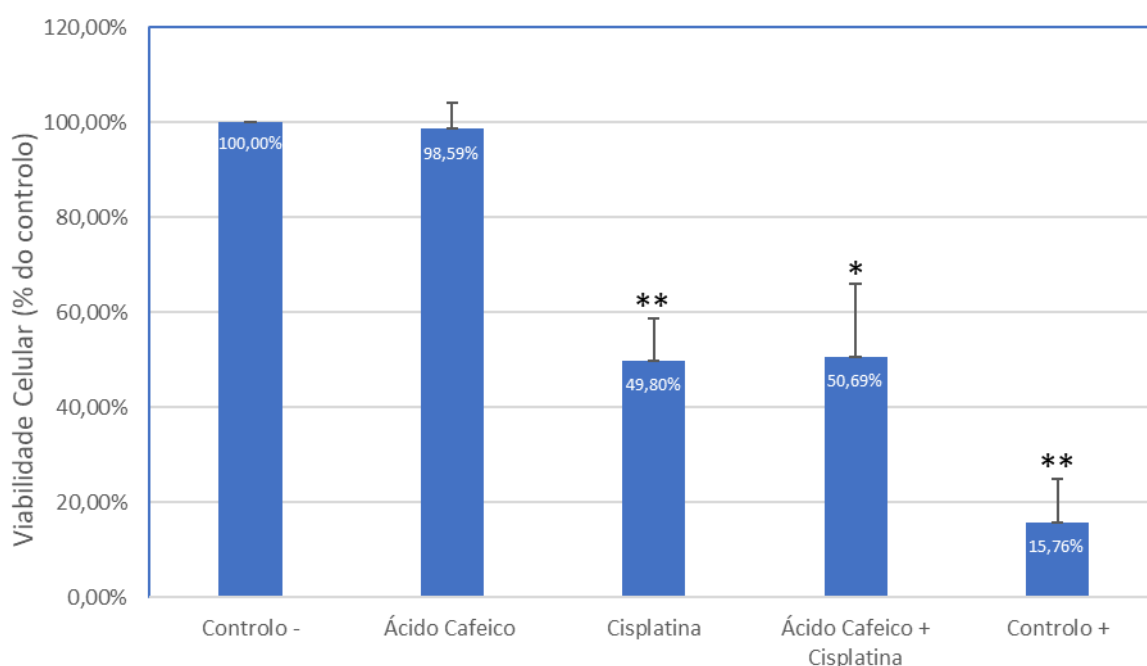
A análise final dos dados das placas A e B (Figura 8) determinou que as células 786-O tratadas com ácido cafeico a uma concentração de 10  $\mu$ M, apresentaram uma viabilidade celular média de 109,80% (sem significado estatístico). O controlo positivo apresentou uma viabilidade celular média de 24,94% ( $p < 0,05$ ).



**Figura 8** - Viabilidade celular das células 786-O tratadas com ácido cafeico a 10  $\mu$ M (48 h), comparadas com o controlo positivo. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico do CV. Os valores representam a média  $\pm$  DP, sendo expressos como percentagem em função das células controlo (\*  $p < 0,05$  quando comparado com o controlo negativo).

As placas C, D e E foram sujeitas ao mesmo procedimento que as placas A e B, sendo igualmente realizada uma média dos valores obtidos nos três ensaios independentes e calculado o respetivo desvio-padrão.

A análise final dos dados dessas placas (Figura 9) determinou que as células 786-O tratadas com ácido cafeico a uma concentração de 20  $\mu\text{M}$ , apresentaram uma viabilidade celular média de 98,59% (sem significado estatístico). As células tratadas com cisplatina 25  $\mu\text{M}$  apresentaram uma viabilidade celular de 49,80% ( $p < 0,01$ ) e as células tratadas com a combinação dos compostos referidos, apresentaram uma viabilidade celular média de 50,69% ( $p < 0,05$  quando comparado com o controlo, mas sem diferença estatística quando comparado com a cisplatina isoladamente). O controlo positivo apresentou uma viabilidade celular média de 15,76% ( $p < 0,01$ ).



**Figura 9** - Viabilidade celular das células 786-O tratadas com ácido cafeico a 20  $\mu\text{M}$ , cisplatina a 25  $\mu\text{M}$  e com ambos os compostos simultaneamente (48 h), comparadas com o controlo positivo. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico do CV. Os valores representam a média  $\pm$  DP, sendo expressos como percentagem em função das células controlo (\*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  quando comparados com o controlo negativo).

### 3.3 – Discussão

O ensaio do CV é um ensaio colorimétrico utilizado para quantificar o número de células aderentes à placa, após aplicação dos compostos em estudo, ligando-se a proteínas e DNA (Feoktistova, Geserick, & Leverkus, 2016). Quando ocorre morte celular, as células destacam-

se da superfície onde estavam previamente aderidas, sendo eliminadas do poço antes da leitura das absorvâncias finais, reduzindo a quantidade de corante presente no mesmo (Feoktistova et al., 2016).

Analisando os resultados dos ensaios do CV, entende-se que à concentração de 10  $\mu\text{M}$ , o ácido cafeico não apresenta atividade citotóxica nas células 786-O e que a 20  $\mu\text{M}$  a mesma não é significativa, com percentagens de viabilidade celular de 109,80% e 98,59%, respetivamente. No que diz respeito à cisplatina, estudada e utilizada em diversos tipos de cancro e com resultados demonstrados (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014), apresenta maior atividade citotóxica quando aplicada sozinha nas células do que quando combinada com o ácido cafeico com percentagens de viabilidade celular de 49,80% e 50,69%, respetivamente.

Em outros estudos presentes na literatura com a utilização de diferentes tipos de ensaios e concentrações, em várias linhas celulares humanas, registaram atividade citotóxica do ácido cafeico. Num ensaio MTT em células humanas MCF-7 do cancro da mama, estas foram tratadas com ácido cafeico por 48 h e 72 h, com concentrações entre 0 e 200  $\mu\text{g/mL}$ . As células tratadas por 48 h provocaram uma redução na viabilidade celular para aproximadamente 75%, a partir de uma concentração de 125  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto que as tratadas por 72 h apresentam essa viabilidade celular em todas as concentrações (Rezaei-Seresht et al., 2019). Noutro estudo, em células humanas MDA-MB-231 de cancro da mama, com concentrações entre 10 e 100  $\mu\text{M}$ , num ensaio de XTT-NR-SRB, as células tratadas com ácido cafeico apresentaram uma viabilidade celular cada vez menor, ao fim de 24 h, com o aumento da concentração de composto: 93.1% a 10  $\mu\text{M}$ , 89.8% a 25  $\mu\text{M}$ , 77.9% a 50  $\mu\text{M}$  e 66.4% a 100  $\mu\text{M}$ . Mais uma vez, registaram-se diferenças em grupos de células tratadas por períodos diferentes, tendo, um conjunto tratado por 48 h, apresentado ligeiramente melhores resultados do que o tratado por 24 h (Kabała-Dzik et al., 2017). Em células humanas 786-O de adenocarcinoma renal, o mesmo modelo usado neste trabalho, outro grupo de investigadores realizaram ensaios de MTT e CV, sendo que para o MTT, com concentrações entre 0 e 250  $\mu\text{M}/48$  h de ácido cafeico, não demonstrou atividade citotóxica (viabilidade celular de 104.1 % na concentração mais elevada). No ensaio do CV, numa gama de concentrações entre 0 e 1000  $\mu\text{M}$ , registou-se uma descida acentuada da viabilidade celular, principalmente entre os 500  $\mu\text{M}$  (66.4 %) e os 1000  $\mu\text{M}$  (17.7 %) (Caparica, Júlio, Baby, de Almeida, & Costa, 2020).

Com estes estudos, é possível verificar as variações existentes nos resultados da atividade citotóxica, influenciados pela metodologia utilizada, incluindo o tipo de ensaio e a

linha celular, e as concentrações testadas de ácido cafeico. No presente estudo, as concentrações utilizadas são em comparação com os estudos apresentados, demasiado reduzidas para que o composto em estudo apresentasse atividade citotóxica com redução da viabilidade celular, tendo em conta que as concentrações onde se registou esta redução nos estudos apresentados são muito superiores.

A viabilidade celular registada no ensaio com cisplatina (49,80 %) não apresentou uma variação significativa à registada na combinação com ácido cafeico (50,69 %). Noutro estudo realizado, avaliou-se a atividade citotóxica de cisplatina (a 11  $\mu\text{M}$ ) e ácido cafeico (300  $\mu\text{M}$ ), bem como a sua combinação, com recurso a diferentes tipos de linhas celulares: HeLa, CaSki, e Vero (Koraneekit et al., 2018). A sua combinação, em comparação com a aplicação em separado, teve efeitos sinérgicos notáveis nas duas primeiras, não demonstrando o mesmo efeito nas Vero. Nas CaSki, a utilização em separado resultou em 50-60 % de inibição celular e a combinação projetou esse valor para perto de 80%. Nas HeLa, a utilização em separado resultou em perto de 40 % de inibição celular e a combinação em cerca de 75 %. Nas Vero, a utilização em separado resultou em 10-15 % de inibição celular e a combinação em, aproximadamente, 20 % (Koraneekit et al., 2018). Para além deste estudo ter utilizado linhas celulares diferentes da 786-O, também as concentrações diferiram, mas confirmou-se um relativo incremento da atividade citotóxica dos compostos após a sua combinação. Para melhor avaliar a efetividade da combinação de cisplatina com ácido cafeico em células cancerígenas, existe a necessidade de efetuar mais estudos, em variadas linhas celulares e diferentes concentrações, visto que apresenta resultados díspares tendo em conta as condições utilizadas. Tendo em conta que a cisplatina é utilizada no tratamento de diversos cancros, deve-se também estudar a combinação de ácido cafeico no tratamento para diminuir a resistência a este fármaco (Sirota, Gibson, & Kohen, 2017), bem como reduzir possíveis efeitos secundários que advêm da terapêutica com este agente anticancerígeno (Ceylan, Kaymak, Canturk, & Yakan, 2020).

Analisando os resultados obtidos nestes estudos, quanto às concentrações necessárias para se diminuir a viabilidade celular, aliados ao valores conhecidos de farmacocinética, expressos no capítulo 3.2 – Fontes Alimentares e Metabolitos Resultantes, sobre as quantidades de ácido cafeico que são absorvidos dos alimentos, pode-se considerar que essas concentrações só se poderão atingir do ponto de vista farmacológico, não sendo atingíveis pela dieta, devido à rápida metabolização e excreção do ácido cafeico. No entanto, utilizando-se técnicas

avançadas de administração e veiculação que permitam ultrapassar os obstáculos da absorção e distribuição, poderão atingir-se concentrações eficazes nos locais alvo.

## 4 – Conclusão

A procura de novas abordagens à terapêutica anticancerígena é um dos desafios contemporâneos mais urgentes ao nível da saúde das populações, captando capital atenção de quem as investiga. No controlo da doença, desempenham papéis fundamentais, não só o tratamento, mas também a prevenção e sensibilização da mesma. Apenas dessa forma será possível, com diversas áreas da sociedade a operar em conjunto, reduzir a prevalência do cancro enquanto ameaça à saúde pública. Nessa nota de cooperação, deverá sempre constar o auxílio entre países, de forma a que as diferentes condições socioeconómicas e de acesso a políticas e medidas de saúde sejam colmatadas, deixando de ser impeditivas de se atingirem os resultados pretendidos.

Os compostos fenólicos, nomeadamente o ácido cafeico, surgem como uma possível opção terapêutica a explorar, tendo em conta a atividade biológica que têm vindo a revelar em diversos estudos. No presente estudo, nas concentrações utilizadas, não demonstraram atividade citotóxica significativa. No entanto, deve-se continuar a realizar investigação no sentido de entender as concentrações e outras condições experimentais onde estes compostos possam apresentar maior atividade. Por outro lado, apesar dos resultados na linha celular aqui estudada e das condições experimentais usadas, deverão explorar-se os seus potenciais efeitos antitumorais noutras linhas celulares de cancro. Tendo em conta o que se conhece acerca da extensa metabolização sofrida por este tipo de compostos, será oportuno avaliar igualmente a atividade citotóxica não só do ácido cafeico, mas também de metabolitos biologicamente ativos. Para além de ser necessário trabalhar em vias de administração que consigam levar, até aos tecidos-alvo, os compostos nas concentrações necessárias.

Em suma, a pesquisa sobre o potencial terapêutico do ácido cafeico e dos seus metabolitos tem ainda um extenso caminho pela frente, mas o futuro parece ser promissor no combate a diversas patologias, incluindo o cancro.

## 5 – Referências Bibliográficas

- Allemani, C., Weir, H. K., Carreira, H., Harewood, R., Spika, D., Wang, X.-S., ... Coleman, M. P. (2015). Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *The Lancet*, 385(9972), 977–1010. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62038-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62038-9)
- Araujo, A. (2009). Cost of cancer care in Portugal. *Acta Medica Portuguesa*.
- Arnold, M., Pandeya, N., Byrnes, G., Renehan, A. G., Stevens, G. A., Ezzati, M., ... Soerjomataram, I. (2015). Global burden of cancer attributable to high body-mass index in 2012: a population-based study. *The Lancet Oncology*, 16(1), 36–46. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71123-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71123-4)
- Assumpção, J. H. M., Takeda, A. A. S., Sforcin, J. M., & Rainho, C. A. (2020). Effects of Propolis and Phenolic Acids on Triple-Negative Breast Cancer Cell Lines: Potential Involvement of Epigenetic Mechanisms. *Molecules*, 25(6), 1289. <https://doi.org/10.3390/molecules25061289>
- Atkins, M. B., & Tannir, N. M. (2018). Current and emerging therapies for first-line treatment of metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Treatment Reviews*, 70(June), 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.07.009>
- Bajaj, J., Diaz, E., & Reya, T. (2020). Stem cells in cancer initiation and progression. *Journal of Cell Biology*, 219(1), 1–12. <https://doi.org/10.1083/jcb.201911053>
- Barata, P. C., & Rini, B. I. (2017). Treatment of renal cell carcinoma: Current status and future directions. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(6), 507–524. <https://doi.org/10.3322/caac.21411>
- Bates, J. P., Derakhshandeh, R., Jones, L., & Webb, T. J. (2018). Mechanisms of immune evasion in breast cancer. *BMC Cancer*, 18(1), 556. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4441-3>
- Bento-Silva, A., Duarte, N., Mecha, E., Belo, M., Vaz Patto, M. C., & Bronze, M. do R. (2020). Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives in Broa, a Traditional Ethnic Maize Bread. *Foods*, 9(10), 1471. <https://doi.org/10.3390/foods9101471>
- Berger, M. F., & Mardis, E. R. (2018). The emerging clinical relevance of genomics in cancer medicine. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(6), 353–365. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0002-6>
- Bian, Y., Wei, J., Zhao, C., & Li, G. (2020). Natural Polyphenols Targeting Senescence: A Novel

- Prevention and Therapy Strategy for Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 684. <https://doi.org/10.3390/ijms21020684>
- Braun, D. A., Bakouny, Z., Hirsch, L., Flippot, R., Van Allen, E. M., Wu, C. J., & Choueiri, T. K. (2021). Beyond conventional immune-checkpoint inhibition — novel immunotherapies for renal cell carcinoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18(4), 199–214. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-00455-z>
- Candido, J., & Hagemann, T. (2013). Cancer-Related Inflammation. *Journal of Clinical Immunology*, 33(S1), 79–84. <https://doi.org/10.1007/s10875-012-9847-0>
- Caparica, R., Júlio, A., Baby, A. R., de Almeida, T. S., & Costa, J. G. (2020). In vitro cytotoxicity assessment of ferulic, caffeic and p-coumaric acids on human renal cancer cells. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 17(1). <https://doi.org/10.19277/bbr.17.1.225>
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8), 1415–1422. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>
- Ceylan, T., Kaymak, E., Canturk, F., & Yakan, B. (2020). Research on the protective effect of caffeic acid phenethyl ester on testicular damage caused by cisplatin. *TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES*, 50(8), 2032–2039. <https://doi.org/10.3906/sag-2002-58>
- ChEBI. (2019). cis-caffeic acid. Retrieved July 16, 2020, from <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=17395>
- Chittiboina, P., & Lonser, R. R. (2015). Von Hippel–Lindau disease. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 132, pp. 139–156). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62702-5.00010-X>
- Cueva, C., Silva, M., Pinillos, I., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2020). Interplay between Dietary Polyphenols and Oral and Gut Microbiota in the Development of Colorectal Cancer. *Nutrients*, 12(3), 625. <https://doi.org/10.3390/nu12030625>
- Cui, Q., Du, R., Liu, M., & Rong, L. (2020). Lignans and Their Derivatives from Plants as Antivirals. *Molecules*, 25(1), 183. <https://doi.org/10.3390/molecules25010183>
- Curtius, K., Wright, N. A., & Graham, T. A. (2018). An evolutionary perspective on field cancerization. *Nature Reviews Cancer*, 18(1), 19–32. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.102>
- Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>

- Deleuze, A., Saout, J., Dugay, F., Peyronnet, B., Mathieu, R., Verhoest, G., ... Kammerer-Jacquet, S.-F. (2020). Immunotherapy in Renal Cell Carcinoma: The Future Is Now. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2532. <https://doi.org/10.3390/ijms21072532>
- DGS. (2016). *PORTUGAL Doenças Oncológicas em Números - 2015*. 86. Retrieved from <http://www.dgs.pt/estatisticas-de-saude/estatisticas-de-saude/publicacoes/portugal-doencas-oncologicas-em-numeros-2014.aspx>
- Di Sebastiano, K. M., Murthy, G., Campbell, K. L., Desroches, S., & Murphy, R. A. (2019). Nutrition and Cancer Prevention: Why is the Evidence Lost in Translation? *Advances in Nutrition*, 10(3), 410–418. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy089>
- Ding, S., Xu, S., Fang, J., & Jiang, H. (2020). The Protective Effect of Polyphenols for Colorectal Cancer. *Frontiers in Immunology*, 11(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01407>
- Dratwa, M., Wysoczańska, B., Łacina, P., Kubik, T., & Bogunia-Kubik, K. (2020). TERT—Regulation and Roles in Cancer Formation. *Frontiers in Immunology*, 11(November), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.589929>
- El-Seedi, H. R., El-Said, A. M. A., Khalifa, S. A. M., Göransson, U., Bohlin, L., Borg-Karlson, A.-K., & Verpoorte, R. (2012). Biosynthesis, Natural Sources, Dietary Intake, Pharmacokinetic Properties, and Biological Activities of Hydroxycinnamic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(44), 10877–10895. <https://doi.org/10.1021/jf301807g>
- Espíndola, K. M. M., Ferreira, R. G., Narvaez, L. E. M., Silva Rosario, A. C. R., da Silva, A. H. M., Silva, A. G. B., ... Monteiro, M. C. (2019). Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma. *Frontiers in Oncology*, 9(JUN), 3–5. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00541>
- Feletto, E., Grogan, P., Nickson, C., & Canfell, K. (2020). How has COVID-19 impacted cancer screening? Adaptation of services and the future outlook in Australia. *Public Health Research & Practice*, 30(4), 1–5. <https://doi.org/10.17061/phrp3042026>
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4), pdb.prot087379. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
- Fidler, M. M., Bray, F., & Soerjomataram, I. (2018). The global cancer burden and human development: A review. *Scandinavian Journal of Public Health*, 46(1), 27–36. <https://doi.org/10.1177/1403494817715400>
- Forjaz, G., Bastos, J., Castro, C., Mayer, A., Noone, A.-M., Chen, H.-S., & Mariotto, A. B. (2020).

- Regional differences in tobacco smoking and lung cancer in Portugal in 2018: a population-based analysis using nationwide incidence and mortality data. *BMJ Open*, *10*(10), e038937. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-038937>
- Fortunato, A., Boddy, A., Mallo, D., Aktipis, A., Maley, C. C., & Pepper, J. W. (2017). Natural Selection in Cancer Biology: From Molecular Snowflakes to Trait Hallmarks. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *7*(2), a029652. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029652>
- Fraga, C. G., Croft, K. D., Kennedy, D. O., & Tomás-Barberán, F. A. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food & Function*, *10*(2), 514–528. <https://doi.org/10.1039/C8FO01997E>
- Haake, S. M., & Rathmell, W. K. (2017). Renal cancer subtypes: Should we be lumping or splitting for therapeutic decision making? *Cancer*, *123*(2), 200–209. <https://doi.org/10.1002/cncr.30314>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hancock, S. B., & Georgiades, C. S. (2016). Kidney Cancer. *The Cancer Journal*, *22*(6), 387–392. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000225>
- Herceg, Z., Ghantous, A., Wild, C. P., Sklias, A., Casati, L., Duthie, S. J., ... Hernandez-Vargas, H. (2018). Roadmap for investigating epigenome deregulation and environmental origins of cancer. *International Journal of Cancer*, *142*(5), 874–882. <https://doi.org/10.1002/ijc.31014>
- Inamura, K. (2017). Renal Cell Tumors: Understanding Their Molecular Pathological Epidemiology and the 2016 WHO Classification. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(10), 2195. <https://doi.org/10.3390/ijms18102195>
- International Agency for Research on Cancer (World Health Organization). (2020). Kidney: Globocan 2020 - The Global Cancer Observatory. *Globocan 2020*, *419*, 1–2. Retrieved from <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/29-Kidney-fact-sheet.pdf>
- Islami, F., Goding Sauer, A., Miller, K. D., Siegel, R. L., Fedewa, S. A., Jacobs, E. J., ... Jemal, A. (2018). Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(1), 31–54. <https://doi.org/10.3322/caac.21440>
- Jackson, S. E., & Chester, J. D. (2015). Personalised cancer medicine. *International Journal of Cancer*, *137*(2), 262–266. <https://doi.org/10.1002/ijc.28940>
- Jonasch, E., Gao, J., & Rathmell, W. K. (2014). Renal cell carcinoma. *BMJ*, *349*(nov10 11), g4797–g4797. <https://doi.org/10.1136/bmj.g4797>

- Kabała-Dzik, A., Rzepecka-Stojko, A., Kubina, R., Jastrzębska-Stojko, Ż., Stojko, R., Wojtyczka, R., & Stojko, J. (2017). Migration Rate Inhibition of Breast Cancer Cells Treated by Caffeic Acid and Caffeic Acid Phenethyl Ester: An In Vitro Comparison Study. *Nutrients*, *9*(10), 1144. <https://doi.org/10.3390/nu9101144>
- Karami, S., Daughtery, S. E., Schwartz, K., Davis, F. G., Ruterbusch, J. J., Wacholder, S., ... Colt, J. S. (2016). Analgesic use and risk of renal cell carcinoma: A case-control, cohort and meta-analytic assessment. *International Journal of Cancer*, *139*(3), 584–592. <https://doi.org/10.1002/ijc.30108>
- Karar, J., & Maity, A. (2011). PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *4*(December), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00051>
- Khan, N., & Mukhtar, H. (2018). Tea Polyphenols in Promotion of Human Health. *Nutrients*, *11*(1), 39. <https://doi.org/10.3390/nu11010039>
- Kiokias, S., Proestos, C., & Oreopoulou, V. (2020). Phenolic Acids of Plant Origin—A Review on Their Antioxidant Activity In Vitro (O/W Emulsion Systems) Along with Their in Vivo Health Biochemical Properties. *Foods*, *9*(4), 534. <https://doi.org/10.3390/foods9040534>
- Koraneekit, A., Limpai boon, T., Sangka, A., Boonsiri, P., Daduang, S., & Daduang, J. (2018). Synergistic effects of cisplatin-caffeic acid induces apoptosis in human cervical cancer cells via the mitochondrial pathways. *Oncology Letters*, *15*(5), 7397–7402. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8256>
- Koroleva, O., Torkova, A., Nikolaev, I., Khrameeva, E., Fedorova, T., Tsentalovich, M., & Amarowicz, R. (2014). Evaluation of the Antiradical Properties of Phenolic Acids. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(9), 16351–16380. <https://doi.org/10.3390/ijms150916351>
- Krstic, M. N., Mijac, D. D., Popovic, D. D., Pavlovic Markovic, A., & Milosavljević, T. (2019). General Aspects of Primary Cancer Prevention. *Digestive Diseases*, *37*(5), 406–415. <https://doi.org/10.1159/000497191>
- Lee, Y. T., Tan, Y. J., & Oon, C. E. (2018). Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *European Journal of Pharmacology*, *834*, 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.034>
- Leonard, W., Zhang, P., Ying, D., & Fang, Z. (2021). Hydroxycinnamic acids on gut microbiota and health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *20*(1), 710–737. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12663>
- Lewandowska, A., Rudzki, M., Rudzki, S., Lewandowski, T., & Laskowska, B. (2019).

- Environmental risk factors for cancer – review paper. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 26(1), 1–7. <https://doi.org/10.26444/aaem/94299>
- Lippi, G., Mattiuzzi, C., & Cervellin, G. (2016). Meat consumption and cancer risk: a critical review of published meta-analyses. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 97, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.11.008>
- Liu, Y., Ragaee, S., Marcone, M. F., & Abdel-Aal, E.-S. M. (2020). Composition of Phenolic Acids and Antioxidant Properties of Selected Pulses Cooked with Different Heating Conditions. *Foods*, 9(7), 908. <https://doi.org/10.3390/foods9070908>
- Liviu Preda, A., & Galieta Mincă, D. (2018). Cost-Effectiveness Analysis of Treatment for Metastatic Renal Carcinoma in Romania. *Journal of Medicine and Life*, 11(4), 306–311. <https://doi.org/10.25122/jml-2018-0069>
- Loud, J. T., & Murphy, J. (2017). Cancer Screening and Early Detection in the 21 st Century. *Seminars in Oncology Nursing*, 33(2), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2017.02.002>
- Lu, M., Zhao, B., Liu, M., Wu, L., Li, Y., Zhai, Y., & Shen, X. (2021). Pan-cancer analysis of SETD2 mutation and its association with the efficacy of immunotherapy. *Npj Precision Oncology*, 5(1), 51. <https://doi.org/10.1038/s41698-021-00193-0>
- Luca, S. V., Macovei, I., Bujor, A., Miron, A., Skalicka-Woźniak, K., Aprotosoai, A. C., & Trifan, A. (2020). Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(4), 626–659. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1546669>
- Martinez Chanza, N., Tripathi, A., & Harshman, L. C. (2019). Adjuvant Therapy Options in Renal Cell Carcinoma: Where Do We Stand? *Current Treatment Options in Oncology*, 20(5), 44. <https://doi.org/10.1007/s11864-019-0639-0>
- Martini, S., Conte, A., & Tagliacucchi, D. (2019). Antiproliferative Activity and Cell Metabolism of Hydroxycinnamic Acids in Human Colon Adenocarcinoma Cell Lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(14), 3919–3931. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00522>
- Maruyama, H., Kawakami, F., Lwin, T.-T., Imai, M., & Shamsa, F. (2018). Biochemical Characterization of Ferulic Acid and Caffeic Acid Which Effectively Inhibit Melanin Synthesis via Different Mechanisms in B16 Melanoma Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 41(5), 806–810. <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00892>
- Mema, S. C., Yang, H., Vaska, M., Elnitsky, S., & Jiang, Z. (2016). Integrated Cancer Screening Performance Indicators: A Systematic Review. *PLOS ONE*, 11(8), e0161187. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161187>

- Miranda-Filho, A., Bray, F., Charvat, H., Rajaraman, S., & Soerjomataram, I. (2020). The world cancer patient population (WCPP): An updated standard for international comparisons of population-based survival. *Cancer Epidemiology*, *69*(January), 101802. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2020.101802>
- Napolitano, G., Di Malta, C., Esposito, A., de Araujo, M. E. G., Pece, S., Bertalot, G., ... Ballabio, A. (2020). A substrate-specific mTORC1 pathway underlies Birt–Hogg–Dubé syndrome. *Nature*, *585*(7826), 597–602. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2444-0>
- National Center for Biotechnology Information. (2004). Caffeic Acid. Retrieved July 1, 2020, from PubChem Database website: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/689043>
- Nguyen, D. X., Bos, P. D., & Massagué, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature Reviews Cancer*, *9*(4), 274–284. <https://doi.org/10.1038/nrc2622>
- Oliveira, D. M. de, & Bastos, D. H. M. (2011). Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Química Nova*, *34*(6), 1051–1056. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000600023>
- Peng, Y., & Croce, C. M. (2016). The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *1*(1), 15004. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>
- Phenol-Explorer. (2002). Caffeic Acid. Retrieved July 13, 2020, from <http://phenol-explorer.eu/contents/polyphenol/457>
- Plackett, R., Kaushal, A., Kassianos, A. P., Cross, A., Lewins, D., Sheringham, J., ... von Wagner, C. (2020). Use of Social Media to Promote Cancer Screening and Early Diagnosis: Scoping Review. *Journal of Medical Internet Research*, *22*(11), e21582. <https://doi.org/10.2196/21582>
- Qiao, J., Tian, Y., Cheng, X., Liu, Z., Zhou, J., Gu, L., ... Deng, D. (2021). CDKN2A Deletion Leading to Hematogenous Metastasis of Human Gastric Carcinoma. *Frontiers in Oncology*, *11*(December), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.801219>
- Rezaei-Seresht, H., Cheshomi, H., Falanji, F., Movahedi-Motlagh, F., Hashemian, M., & Mireskandari, E. (2019). Cytotoxic activity of caffeic acid and gallic acid against MCF-7 human breast cancer cells: An in silico and in vitro study. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, *9*(6), 574–586. <https://doi.org/10.22038/AJP.2019.13475>
- Roudsari, N. M., Lashgari, N.-A., Momtaz, S., Abaft, S., Jamali, F., Safaiepour, P., ... Bishayee, A. (2021). Inhibitors of the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Prostate Cancer Chemoprevention and Intervention. *Pharmaceutics*, *13*(8), 1195. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081195>
- Russo, G., Campisi, D., Di Mauro, M., Regis, F., Reale, G., Marranzano, M., ... Morgia, G. (2017). Dietary Consumption of Phenolic Acids and Prostate Cancer: A Case-Control Study in Sicily,

- Southern Italy. *Molecules*, 22(12), 2159. <https://doi.org/10.3390/molecules22122159>
- Saúde, C. N. de. (2017). *Relatório Sobre a Saúde em Portugal - O que se sabe em 2017*. Retrieved from [http://www.cns.min-saude.pt/wp-content/uploads/2017/11/Saude\\_em\\_Portugal\\_3.11.2017\\_final.pdf](http://www.cns.min-saude.pt/wp-content/uploads/2017/11/Saude_em_Portugal_3.11.2017_final.pdf)
- Selvakumar, P., Badgeley, A., Murphy, P., Anwar, H., Sharma, U., Lawrence, K., & Lakshmikuttyamma, A. (2020). Flavonoids and Other Polyphenols Act as Epigenetic Modifiers in Breast Cancer. *Nutrients*, 12(3), 761. <https://doi.org/10.3390/nu12030761>
- Senga, S. S., & Grose, R. P. (2021). Hallmarks of cancer—the new testament. *Open Biology*, 11(1), 200358. <https://doi.org/10.1098/rsob.200358>
- Seyfried, T. N., & Huysentruyt, L. C. (2013). On the Origin of Cancer Metastasis. *Critical Reviews™ in Oncogenesis*, 18(1–2), 43–73. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.v18.i1-2.40>
- Shen, H., Tong, X., Yang, J., Yu, L., Zhou, H., Wang, Y., ... Li, C. (2020). Biotransformation of natural hydroxycinnamic acids by gut microbiota from normal and cerebral ischemia-reperfusion injured rats: a comparative study. *Food & Function*, 11(6), 5389–5395. <https://doi.org/10.1039/D0FO00775G>
- Sidoryk, K., Jaromin, A., Filipczak, N., Cmoch, P., & Cybulski, M. (2018). Synthesis and Antioxidant Activity of Caffeic Acid Derivatives. *Molecules*, 23(9), 2199. <https://doi.org/10.3390/molecules23092199>
- Silva, T., Oliveira, C., & Borges, F. (2014). Caffeic acid derivatives, analogs and applications: a patent review (2009 – 2013). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 24(11), 1257–1270. <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.959492>
- Sirota, R., Gibson, D., & Kohen, R. (2017). The timing of caffeic acid treatment with cisplatin determines sensitization or resistance of ovarian carcinoma cell lines. *Redox Biology*, 11(December 2016), 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.006>
- Soares, A., Monteiro, F. S. M., Maluf, F. C., Bastos, D. A., Jardim, D. L., Sasse, A. D., ... de Cássio Zequi, S. (2020). Advanced renal cell carcinoma (RCC) management: an expert panel recommendation from the Latin American Cooperative Oncology Group (LACOG) and the Latin American Renal Cancer Group (LARCG). *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 146(7), 1829–1845. <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03236-4>
- Sova, M., & Saso, L. (2020). Natural Sources, Pharmacokinetics, Biological Activities and Health Benefits of Hydroxycinnamic Acids and Their Metabolites. *Nutrients*, 12(8), 2190. <https://doi.org/10.3390/nu12082190>

- Tabrez, S., Jabir, N. R., Adhami, V. M., Khan, M. I., Moulay, M., Kamal, M. A., & Mukhtar, H. (2020). Nanoencapsulated dietary polyphenols for cancer prevention and treatment: successes and challenges. *Nanomedicine*, *15*(11), 1147–1162. <https://doi.org/10.2217/nnm-2019-0398>
- Taofiq, O., González-Paramás, A., Barreiro, M., & Ferreira, I. (2017). Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives: Cosmeceutical Significance, Challenges and Future Perspectives, a Review. *Molecules*, *22*(2), 281. <https://doi.org/10.3390/molecules22020281>
- Thomas, J. A., Miller, E. R., & Ward, P. R. (2022). Lifestyle Interventions through Participatory Research: A Mixed-Methods Systematic Review of Alcohol and Other Breast Cancer Behavioural Risk Factors. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(2), 980. <https://doi.org/10.3390/ijerph19020980>
- Toftgård, R. (2021). The origin of cancer. *Journal of Internal Medicine*, *289*(5), 601–603. <https://doi.org/10.1111/joim.13280>
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *65*(2), 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>
- Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2016). Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *25*(1), 16–27. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578>
- Trendowski, M. (2014). The rhetoric of cancer. *Cancer Causes & Control*, *25*(10), 1243–1246. <https://doi.org/10.1007/s10552-014-0428-9>
- Vineis, P., & Wild, C. P. (2014). Global cancer patterns: causes and prevention. *The Lancet*, *383*(9916), 549–557. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62224-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62224-2)
- Visvader, J. E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature*, *469*(7330), 314–322. <https://doi.org/10.1038/nature09781>
- Whiteman, D. C., & Wilson, L. F. (2016). The fractions of cancer attributable to modifiable factors: A global review. *Cancer Epidemiology*, *44*, 203–221. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2016.06.013>
- WHO. (2021). Cancer. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Wild, C. P., Espina, C., Bauld, L., Bonanni, B., Brenner, H., Brown, K., ... Schüz, J. (2019). Cancer Prevention Europe. *Molecular Oncology*, *13*(3), 528–534. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12455>
- Wrangle, J. M., Patterson, A., Johnson, C. B., Neitzke, D. J., Mehrotra, S., Denlinger, C. E., ...

- Rubinstein, M. P. (2018). IL-2 and Beyond in Cancer Immunotherapy. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 38(2), 45–68. <https://doi.org/10.1089/jir.2017.0101>
- Wu, S., Zhu, W., Thompson, P., & Hannun, Y. A. (2018). Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nature Communications*, 9(1), 3490. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05467-z>
- Zhang, J., Guo, L., Liu, X., Li, W., & Ying, J. (2017). MET overexpression, gene amplification and relevant clinicopathological features in gastric adenocarcinoma. *Oncotarget*, 8(6), 10264–10273. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14382>
- Zhang, Y., Fang, L., Zang, Y., Ren, J., & Xu, Z. (2018). CIP2A Promotes Proliferation, Invasion and Chemoresistance to Cisplatin in Renal Cell Carcinoma. *Journal of Cancer*, 9(21), 4029–4038. <https://doi.org/10.7150/jca.25005>
- Zheng, Q., & Hou, W. (2021). Regulation of angiogenesis by microRNAs in cancer. *Molecular Medicine Reports*, 24(2), 583. <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12222>
- Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D.-P., Li, S., Chen, Y.-M., & Li, H.-B. (2016). Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. *Nutrients*, 8(8), 515. <https://doi.org/10.3390/nu8080515>
- Zugazagoitia, J., Guedes, C., Ponce, S., Ferrer, I., Molina-Pinelo, S., & Paz-Ares, L. (2016). Current Challenges in Cancer Treatment. *Clinical Therapeutics*, 38(7), 1551–1566. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.03.026>