

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**MARIANE MINUSSI BAPTISTELLA**

**EFEITOS DE UMA MOLÉCULA HÍBRIDA DE RESVERATROL E CURCUMINA NA  
CARCINOGENESE COLORRETAL**

**Alfenas/MG  
2021**

MARIANE MINUSSI BAPTISTELLA

EFEITOS DE UMA MOLÉCULA HÍBRIDA DE RESVERATROL E CURCUMINA NA  
CARCINOGENESE COLORRETAL

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas.  
Área de concentração: Fisiopatologia.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Pollyanna Francielli de Oliveira

Alfenas/MG  
2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central – Campus Sede

Baptistella, Mariane Minussi  
B222e Efeitos de uma molécula híbrida de resveratrol e curcumina na carcinogênese  
colorretal. / Mariane Minussi Baptistella. – Alfenas, MG, 2021.  
89 f.: il. –

Orientadora: Pollyanna Francielli de Oliveira.  
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) – Universidade  
Federal de Alfenas, 2021.  
Bibliografia.

1. Quimioprevenção. 2. Câncer colorretal. 3. Resveratrol. 4. Curcumina.  
5. PQM162. I. Oliveira, Pollyanna Francielli de. II. Título.

CDD- 616.99

Ficha Catalográfica elaborada por Marlom Cesar da Silva  
Bibliotecário-Documentalista CRB6/2735

MARIANE MINUSSI BAPTISTELLA

EFEITOS DE UMA MOLÉCULA HÍBRIDA DE RESVERATROL E CURCUMINA NA  
CARCINOGENESE COLORRETAL

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Fisiopatologia.

Aprovada em: 20 de outubro de 2021

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Pollyanna Francielli de Oliveira  
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG

Prof. Dr. Vinicius Kannen Cardoso  
Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dr. Renato de Oliveira Horvath  
Universidade de São Paulo - USP



Documento assinado eletronicamente por **Pollyanna Francielli de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 20/10/2021, às 16:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renato de Oliveira Horvath, Usuário Externo**, em 20/10/2021, às 16:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vinicius Kannen Cardoso, Usuário Externo**, em 20/10/2021, às 16:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0615500** e o código CRC **6DECE478**.

Para meus avôs Annibal (*in memoriam*) e  
Antônio Caetano...

## AGRADECIMENTOS

À minha família, representada pelos meus pais, avós e pelo meu irmão, agradeço por todo apoio e confiança depositados. Destaco o agradecimento aos meus avós Annibal Baptistella e Antônio Caetano Minussi que, ao passarem pelas intempéries que o câncer ocasiona, me serviram como motivo de força, de inspiração e de persistência. Meu coração sempre há de estar com vocês.

À Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) por ter me permitido construir bases fortes em minha formação acadêmica.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG) por me permitir crescer profissionalmente. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro oferecido.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Pollyanna Francielli de Oliveira, por ter guiado meus passos durante a realização desse trabalho, fazendo com que tudo fluísse da melhor forma, apesar de todos questionamentos, obstáculos e imprevistos que a Ciência oferece.

Ao Laboratório de Genética Humana da Universidade Federal de Alfenas, representado por toda sua equipe de técnicos, coordenador e pesquisadores. Sem esse empenho coletivo, esse trabalho não poderia ter sido concluído.

A todos pacientes que enfrentam bravamente os mais variados tipos de câncer, incluindo o câncer colorretal. Que toda pesquisa nessa área, assim como essa, tenha o mesmo fim de ao menos amenizar o sofrimento intrínseco a essa doença, enquanto a tão almejada cura não é totalmente atingida. Cada hora empenhada em laboratório é para vocês.

A todos pesquisadores, que mesmo em tempos de pandemia, souberam se reinventar e seguir suas pesquisas, mesmo com incertezas, angústia e medo. Que esse tempo emergja uma maior valorização de quem vive de Ciência e a constrói dia após dia.

Esta pesquisa intitulada "*Efeitos de uma molécula híbrida de resveratrol e curcumina na carcinogênese colorretal*" foi realizada com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (Código de Financiamento 11817) e pelo Ministério da Ciência,

Tecnologia e Inovações/ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCTIC/CNPq) (Processo nº: 408077/2018-2).

*“We may never understand illnesses such as cancer. In fact, we may never cure it. But an ounce of prevention is worth more than a million pounds of cure.”*

(David Agus, 20--?)

## RESUMO

As abordagens do tratamento oncológico implicam despesas onerosas para o sistema de saúde e a ação inespecífica dos quimioterápicos está relacionada a uma série de efeitos adversos. Considerando tais impasses, e tendo como base, evidências científicas da eficácia do resveratrol e da curcumina em vias moleculares que levam à carcinogênese, o objetivo do atual estudo foi avaliar os possíveis efeitos quimiopreventivos e/ou quimioterapêuticos de uma molécula híbrida de resveratrol e curcumina [(E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-N'-(4-metoxibenzilideno)acrilhidrazida - PQM162] na carcinogênese colorretal. No sistema-teste *in vivo*, ratos Wistar foram tratados com PQM162 nas doses de 0,5; 1,0 e 2,0 mg/kg peso corpóreo (p.c.) em três diferentes abordagens de tratamento durante 6 semanas: simultâneo, pré-tratamento e pós-tratamento. As lesões pré-neoplásicas foram induzidas com 1,2 dimetilhidrazina (DMH, 160 mg/kg p.c.). Foram realizadas a avaliação da frequência de focos de criptas aberrantes (FCA), criptas aberrantes (CA), a avaliação da expressão gênica por RT-PCR (*reverse-transcriptase polymerase chain reaction*) e imunohistoquímica para elucidar o mecanismo de ação. PQM162 reduziu a formação de FCA e CA nos tratamentos simultâneo (dose de 1,0 mg/kg p.c.) e pós-tratamento (doses de 1,0 e 2,0 mg/kg p.c.). O híbrido levou à redução da expressão de *TNF- $\alpha$*  (Fator de Necrose Tumoral) e *COX-2* (Ciclo-oxigenase-2). Além disso, foi encontrada uma expressão aumentada de *NRF2* (fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2). Nenhuma diferença foi encontrada para os genes *KRAS* (*Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), *APC* (*Adenomatous polyposis coli*), *DNMT1* (DNA metiltransferase 1) e *TP53* (*supressor de tumor p53*). A análise imunohistoquímica demonstrou que PQM162 reduziu a expressão dos marcadores *COX-2*, PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) e  $\beta$ -catenina. Por outro lado, PQM162 aumentou a expressão de *NRF2*. *In vitro*, foram realizados os ensaios de migração, ciclo celular e apoptose na linhagem de adenocarcinoma colorretal HCT-8. PQM162 atua sobre os processos de migração celular, parada do ciclo celular em G2/M e promoção de apoptose. Os resultados obtidos sugerem que PQM162 apresenta potencial quimiopreventivo e quimioterapêutico na carcinogênese colorretal, atuando em vias anti-inflamatória, antioxidante e de proliferação celular.

**Palavras-chave:** Quimioprevenção; Câncer colorretal; Resveratrol; Curcumina; PQM162.

## ABSTRACT

The approaches used in cancer treatment imply costly expenses for the health system and the nonspecific action of chemotherapy is related to a series of adverse effects. Considering such impasses, and based on scientific evidence of the efficacy of resveratrol and curcumin in molecular pathways that lead to carcinogenesis, the aim of the current study was to evaluate the possible chemopreventive and/or chemotherapeutic effects of a hybrid resveratrol and curcumin molecule [ (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N'-(4-methoxybenzylidene) acrylhydrazide - PQM162] in colorectal carcinogenesis. In the *in vivo* test system, Wistar rats were treated with PQM162 at doses of 0.5; 1.0 and 2.0 mg/kg body weight (b.w.) in three different treatment approaches for 6 weeks: simultaneous, pre-treatment and post-treatment. Preneoplastic lesions were induced with 1,2-dimethylhydrazine (DMH, 160 mg/kg p.c.). The frequency aberrant crypt foci (ACF), aberrant crypts (AC) were evaluated, as well as the evaluation of gene expression by RT-PCR (reverse-transcriptase polymerase chain reaction) and immunohistochemistry to elucidate the action mechanism. PQM162 reduced the formation of ACF and AC in simultaneous treatments (dose of 1.0 mg/kg p.c) and post-treatment (doses of 1.0 and 2.0 mg/kg p.c). The hybrid led to reduced expression of TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor) and COX-2 (Cyclooxygenase-2). Furthermore, an increased expression of NRF2 (factor 2 related to nuclear erythroid factor 2) was found. No difference was found for KRAS genes (Ki-ras2 Kirsten rat viral sarcoma oncogene homolog), APC (Adenomatous polyposis coli), DNMT1 (DNA methyltransferase 1) and TP53 (p53 tumor suppressor). Immunohistochemical analysis showed that PQM162 reduced the expression of COX-2, PCNA (nuclear cell proliferation antigen) and  $\beta$ -catenin markers. On the other hand, PQM162 increased the expression of NRF2. *In vitro*, migration, cell cycle and apoptosis assays were performed in the HCT-8 colorectal adenocarcinoma lineage. PQM162 acts on cell migration processes, cell cycle arrest in G2/M and promotion of apoptosis. The results obtained suggest that PQM162 has chemopreventive and chemotherapeutic potential in colorectal carcinogenesis, acting in anti-inflammatory, antioxidant and cell proliferation pathways.

**Keywords:** Chemoprevention; Colorectal cancer; Resveratrol; Curcumin; PQM162.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hibridação molecular do resveratrol e curcumina produzindo o (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-N'-(4-metoxibenzilideno) acrilidrazida PQM162.....	24
Figura 2 - Delineamento experimental das diferentes abordagens de tratamento incluídas no sistema-teste <i>in vivo</i> .....	30
Figura 3 - Fotomicrografias da porção distal do cólon de ratos Wistar.....	31
Figura 4 - Focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA) observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com PQM162 previamente à indução com DMH.....	41
Figura 5 - Focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA) observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com PQM162 simultaneamente à indução com DMH.....	43
Figura 6 - Focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA) observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com PQM162 após à indução com DMH.....	45
Figura 7 - Abundância relativa dos transcritos que codificam para APC, KRAS, P53 e DNMT1 em ratos Wistar tratados com PQM162 nos modelos de tratamento simultâneo e pós-tratamento.....	49
Figura 8 - Abundância dos transcritos que codificam para NRF2, COX-2 e TNF- $\alpha$ em ratos Wistar tratados com PQM162 no simultâneo e póstratamento.....	50
Figura 9 - Fotomicrografias do tecido colorretal parafinizado de ratos Wistar tratados com PQM162 no modelo de tratamento simultâneo (S) e pós-tratamento (Pós).....	55

Figura 10 - Análise semi-quantitativa da expressão de PCNA, $\beta$ -catenina, NRF2 e COX-2 no tecido colorretal parafinizado de ratos Wistar tratados com PQM162 no modelo de tratamento simultâneo e pós-tratamento.....	56
Figura 11 - Quantificação do fechamento da ferida em porcentagem (%) na linhagem HCT-8 após 48h de tratamento com PQM162 nas concentrações de 2,0; 4,0 e 6,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .....	62
Figura 12 - Representação esquemática das áreas de cicatrização de feridas da linhagem HCT-8 após o tratamento com PQM162 nas concentrações de 2,0; 4,0 e 6,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ os tempos de 0h e 48h.....	63
Figura 13 - Análise da progressão do ciclo celular após 24h de tratamento com PQM162 nas concentrações de 2,0; 4,0 e 6,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .....	65
Figura 14 - Ensaio de anexina V em culturas tratadas por 24 h com PQM162 nas concentrações de 6,0 e 12,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .....	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Grupos experimentais avaliados no modelo <i>in vivo</i> .....	28
Tabela 2 -	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanho do fragmento amplificado utilizados nas reações de RT-PCR.....	33
Tabela 3 -	Valores médios e desvio-padrão do peso inicial, final, ganho de peso e consumo de água obtidos em ratos Wistar tratados com PQM162 nos diferentes modelos de tratamento.....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A498	Linhagem celular de carcinoma renal humano
ACHN	Linhagem celular de adenocarcinoma renal humano
ACTB	<i>β-actin</i> ( $\beta$ -actina)
AINES	Anti-inflamatórios não-esteroidais
Akt	<i>Protein kinase B</i> (Proteína quinase B)
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i> (Proteína quinase ativada por AMP)
AOM	<i>Azoxymethane</i> (azoximetano)
AP-1	<i>Activator protein</i> (Proteína ativadora 1)
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i> (Polipose adenomatosa do cólon)
AR	<i>Androgen receptor</i> (Receptor de andrógeno)
AV	Anexina V
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> (Linfoma de células B 2)
BRAF	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i> (Oncogene homólogo ao v-Raf de sarcoma viral em murinos)
CA	Criptas aberrantes
CCNB1	<i>G2/mitotic-specific cyclin-B1</i> (G2/ciclina-B1 específica para mitose)
CCR	Câncer colorretal
CDC2	<i>Cell division cycle protein 2 homolog</i> (Homólogo da proteína 2 do ciclo de divisão celular)
CDK	<i>Cyclin-dependent kinases</i> (Cinase dependente de ciclina)
CDKN1A	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i> (Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A)
CK1	<i>Casein kinase I</i> (Caseína cinase 1)
CL1-5	Linhagem celular de câncer de pulmão humano
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono

COX-2	<i>Cyclooxygenase-2</i> (Ciclo-oxigenase-2)
DAB	Diaminobenzidina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Meio Eagle Modificado por Dulbecco)
DMH	<i>1,2-dimethylhydrazine</i> (1,2 Dimetilhidrazina)
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> (Dimetilsulfóxido)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DNMT1	<i>DNA methyltransferase 1</i> (DNA metiltransferase 1)
DR	<i>Death receptor</i> (Receptor de morte)
DU145	Linhagem celular de câncer de próstata humano
DXR	<i>Doxorubicin</i> (Doxorrubicina)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (Fator de crescimento epidérmico)
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (Receptor do fator de crescimento epidérmico)
ELAM-1	<i>Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1</i> (Molécula de adesão leucócito-endotélio-1)
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i> (Potenciador do zeste homólogo 2)
Fas	<i>Fas cell surface death receptor</i> (Receptor de morte de superfície celular Fas)
FCA	Focos de Criptas Aberrantes
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> (Fator de crescimento de fibroblastos)
FS	Fosfatidilserina
g	<i>Grams</i> (Gramas)
GSK-3 $\beta$	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i> (Glicogênio sintase quinase 3 beta)

HaCaT	<i>Cultured Human Keratinocyte cells</i> (Células de queratinócitos humanos)
HCT-8	Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano
HCT116	Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano
HER-2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i> (Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2)
HO-1	<i>Heme oxygenase 1</i> (Heme oxigenase 1)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agência Internacional de Pesquisa em Câncer)
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> (Molécula de adesão intercelular 1)
IL-1	<i>Interleukin 1</i> (Interleucina 1)
IL-6	<i>Interleukin 6</i> (Interleucina 6)
iNOS	<i>Nitric oxide synthases</i> (Óxido nítrico sintase)
i.p	Intraperitoneal
IP	Iodeto de propídeo
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i> (Proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch)
kg	<i>Kilograms</i> (Quilogramas)
KRAS	<i>Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i> (Homólogo do oncogene viral de sarcoma de rato Kirsten Ki-ras2)
LnRNAs	<i>Long non-coding RNAs</i> (RNAs não codificadores longos)
LOX	<i>Lysyl oxidase</i> (Lisil oxidase)
LoVo	Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano metastático
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i> (Lipopolissacarídeo)
MALAT1	<i>Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1</i> (Transcrito 1 de adenocarcinoma pulmonar associado à metástase)
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (Proteína quinase ativada por mitogênio)
mg	<i>Milligram</i> (Miligrama)

miRNA	MicroRNA
mL	<i>Milliliter</i> (Mililitro)
mM	<i>Millimolar</i> (Milimolar)
MMP-7	<i>Matrix metalloproteinase 7</i> (Metaloproteíase de matriz 7)
MMP-9	<i>Matrix metalloproteinase 9</i> (Metaloproteíase de matriz 9)
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i> (Alvo da rapamicina em mamíferos)
NaCl	<i>Sodium chloride</i> (Cloreto de sódio)
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa B</i> (Fator nuclear kappa B)
NQO1	<i>NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1</i> (NAD(P)H quinona desidrogenase 1)
NRF2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i> (Fator nuclear fator 2 relacionado ao eritroide 2)
OV90	Linhagem celular de câncer de ovário
PAF	<i>PCNA-associated factor</i> (Fator de ligação ao PCNA)
Patu8988	Linhagem celular de câncer pancreático humano
Panc-1	Linhagem celular de câncer pancreático humano
PBSA	<i>Phosphate-NaCl buffer</i> (Tampão Fosfato-NaCl)
p.c.	Peso corpóreo
PC3	Linhagem celular de câncer de próstata humano
PCNA celular)	<i>Proliferating-cell nuclear antigen</i> (Antígeno nuclear de proliferação celular)
PI3K	<i>Phosphoinositide-3-kinase</i> (Fosfoinosítideo 3-quinase)
PLK1	<i>Polo Like Kinase 1</i> (Cinase do tipo Polo 1)
PQM162	(E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-N'-(4-metoxibenzilideno) acrilidrazida
PTPN1	<i>Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1</i> (Não receptor tirosina-proteína fosfatase tipo 1)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)

RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
RT	<i>Reverse transcription reaction</i> (Reação de transcrição reversa)
RT-PCR	<i>Reverse-transcriptase polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa)
SC	Subcutâneo
SKOV3	Linhagem celular de câncer de ovário humano
SNB19	Linhagem celular de glioblastoma multiforme humano
SNU-119	Linhagem celular de câncer de ovário humano
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> (Transdutor de sinal e ativador de transcrição)
TBST	<i>1X tris-buffered saline with 0.05% Tween 2</i> (1X solução salina tamponada com tris com 0,05% de Tween 2)
TNF	<i>Tumor necrosis fator</i> (Fator de necrose tumoral)
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis fator alfa</i> (Fator de necrose tumoral alfa)
TP53	<i>Cellular tumor antigen p53</i> (Antígeno tumoral celular p53)
U251	Linhagem celular de glioblastoma multiforme humano
U-266	Linhagem celular de mieloma múltiplo humano
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i> (Molécula de adesão celular vascular-1)
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (Fator de crescimento endotelial vascular)
VO	Via oral
°C	Graus Celsius
5-FU	5-Fluorouracil
$\mu$ L	<i>Microliters</i> (Microlitros)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>18</b>
2.1	CÂNCER COLORRETAL.....	18
2.2	QUIMIOPREVENÇÃO: UMA ESTRATÉGIA PARA O CÂNCER.....	20
2.3	RESVERATROL E CURCUMINA NA CARCINOGENESE COLÔNICA.....	21
2.4	O HÍBRIDO DE RESVERATROL E CURCUMINA.....	23
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	26
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
5.1	OBTENÇÃO DO HÍBRIDO DE RESVERATROL E CURCUMINA.....	27
5.2	SISTEMA TESTE <i>IN VIVO</i> .....	27
5.2.1	<b>Animais.....</b>	<b>27</b>
5.2.2	<b>Agente indutor de lesão colorretal.....</b>	<b>27</b>
5.2.3	<b>Delineamento experimental.....</b>	<b>28</b>
5.2.4	<b>Teste de Focos de Criptas Aberrantes.....</b>	<b>30</b>
5.2.5	<b>Análise de expressão gênica.....</b>	<b>32</b>
5.2.6	<b>Imunohistoquímica.....</b>	<b>34</b>
5.3	SISTEMA-TESTE <i>IN VITRO</i> .....	35
5.3.1	<b>Linhagem celular e condições de cultivo.....</b>	<b>35</b>
5.3.2	<b>Ensaio de migração.....</b>	<b>35</b>
5.3.3	<b>Análise do ciclo celular.....</b>	<b>36</b>
5.3.4	<b>Marcação de células apoptóticas por Anexina V/Iodeto de propídeo.....</b>	<b>36</b>
5.4	<b>Análise estatística.....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
6.1	SISTEMA-TESTE <i>IN VIVO</i> .....	37
6.1.1	<b>Avaliação toxicológica.....</b>	<b>37</b>
6.1.2	<b>Avaliação do potencial carcinogênico.....</b>	<b>40</b>

<b>6.1.3</b>	<b>Avaliação do potencial quimiopreventivo no cólon de ratos</b>	
	<b>Wistar</b> .....	<b>40</b>
6.1.3.1	Pré-tratamento.....	40
6.1.3.2	Tratamento simultâneo.....	43
6.1.3.3	Pós-Tratamento.....	45
<b>6.1.4</b>	<b>Estudo dos alvos de quimioprevenção</b> .....	<b>46</b>
6.1.4.1	Análise da expressão gênica.....	46
6.1.4.2	Imunohistoquímica.....	53
6.2	SISTEMA-TESTE <i>IN VITRO</i> .....	61
<b>6.2.1</b>	<b>Migração</b> .....	<b>61</b>
<b>6.2.2</b>	<b>Análise do ciclo celular</b> .....	<b>64</b>
<b>6.2.3</b>	<b>Análise do ensaio de apoptose por Anexina V/Iodeto de propídeo</b> .....	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>70</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>81</b>
	<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>81</b>
	<b>APÊNDICE B</b> .....	<b>82</b>
	<b>APÊNDICE C</b> .....	<b>83</b>
	<b>APÊNDICE D</b> .....	<b>84</b>
	<b>APÊNDICE E</b> .....	<b>85</b>
	<b>APÊNDICE F</b> .....	<b>86</b>
	<b>APÊNDICE G</b> .....	<b>87</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>88</b>
	<b>ANEXO A</b> .....	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma de cólon e reto, também denominado câncer colorretal (CCR), acomete as porções do intestino grosso e do reto. Segundo estimativas da IARC (*“International Agency for Research on Cancer”*), o câncer colorretal correspondeu a 10% dos diagnósticos em câncer no ano de 2020, enquanto foi o segundo maior responsável dentre as mortes por câncer no mundo em ambos os sexos, correspondendo a 9,4% do total, atrás apenas do câncer de pulmão (SUNG *et al.*, 2021).

Na incidência do câncer colorretal, dados epidemiológicos apontam a importância de numerosos fatores de risco. Dentre eles, a presença de doenças inflamatórias intestinais, histórico familiar de câncer ou pólipos colorretais e síndromes genéticas, além da idade, se destacam. Apesar de indivíduos com 50 anos ou mais possuírem 30 vezes mais chances de serem diagnosticados com essa neoplasia, a incidência entre 20 e 49 anos de idade têm aumentado, fato que tem sido correlacionado por pesquisadores da área a estilos de vida mais sedentários (RAWLA *et al.*, 2019). De fato, mais da metade dos casos e óbitos relativos a este tipo de câncer podem ser atribuídos a hábitos individuais e comportamentos sociais, como fumo, alto consumo de álcool, inatividade física e alimentação não-saudável (SIEGEL *et al.*, 2020).

Nesse contexto de fatores potencialmente modificáveis, a suplementação com micronutrientes e produtos naturais ou semi-sintéticos atrai grande interesse. Estas substâncias podem ser consideradas quimiopreventivos, ou seja, agentes que inibem a tumorigênese, a iniciação ou a progressão tumoral, e que podem ser indicados para indivíduos em estágios iniciais de determinado tipo de neoplasia ou para grupos com risco aumentado, convergindo em vantagens clínicas e econômicas para as abordagens preventivas atuais (MELO *et al.*, 2018).

O potencial quimiopreventivo dos fitoquímicos, particularmente, tem sido estudado com crescente relevância no meio científico. Metabólitos tipicamente identificados em vegetais, os fitoquímicos mostram uma variada gama de efeitos protetores que se estendem também após sua ingestão, como a redução de estresse oxidativo e inflamatório. O resveratrol, por exemplo, encontrado naturalmente em uvas e derivados, possui atividade biológica mediando inúmeras respostas intracelulares, e foi descrito como agente quimiopreventivo por atuar na indução de apoptose,

supressão de crescimento tumoral e inibição da iniciação, promoção e progressão tumoral em diversos tipos de câncer. A curcumina, outro composto fenólico obtido a partir de raízes da *Curcuma longa* e utilizado popularmente como condimento, exibe efeitos anti-inflamatórios já correlacionados à melhora de sintomas e da qualidade de vida de pacientes neoplásicos quando utilizada em conjunto a tratamentos clássicos, com ação sobre os mecanismos de proliferação e angiogênese tumoral e controle do ciclo celular (DAVE *et al.*, 2020).

Considerando a urgência clínica por alternativas às estratégias terapêuticas estabelecidas, que encontram desafios na eficácia e na ocorrência de efeitos adversos, afirma-se a pertinência da prevenção visando a redução da incidência do câncer colorretal. É fato que algumas moléculas de origem natural não são completamente absorvidas e devido este fator, podem ter sua eficácia reduzida. Desta maneira, técnicas que envolvem o planejamento racional de fármacos têm sido amplamente utilizadas por químicos medicinais tanto na academia como na indústria, para gerar moléculas polifuncionais contendo diferentes grupos farmacofóricos. Entre estas estratégias, a hibridização molecular representa uma alternativa atraente para o *design* molecular, permitindo o acesso a novos andaimes moleculares com o intuito de melhorar as funcionalidades das moléculas com promissoras atividades já identificadas. Baseada nesta premissa, torna-se possível e racional, estudos que visam desenvolver e aplicar novas estratégias quimiopreventivas e quimioterapêuticas (BARREIRO *et al.*, 2002).

Resultados de pesquisas com análise de quimioprevenção são relevantes, pois, além do alívio clínico promovido aos pacientes, a quimioprevenção possibilita também redução dos gastos públicos destinados ao tratamento, representando um promissor foco de investimentos em pesquisa e em saúde (BENETOU *et al.*, 2015; PENNY; WALLACE, 2015). Neste sentido, o presente estudo objetivou identificar os efeitos quimiopreventivos e/ou quimioterapêuticos de uma molécula híbrida de resveratrol e curcumina, sintetizado por hidridização molecular, e elucidar seu mecanismo de ação na carcinogênese colorretal induzida em ratos, bem como em modelo de estudo *in vitro*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 CÂNCER COLORRETAL

No que diz respeito ao cenário epidemiológico brasileiro, no ano de 2020, foram diagnosticados 20.540 novos casos de carcinomas colorretais entre os homens e 20.470 entre as mulheres, sendo superado apenas pelos casos de câncer de mama (INCA, 2021).

Dados epidemiológicos sugerem que fatores ambientais relacionados ao estilo de vida possuem um papel crítico na etiologia da doença. Isso pode ser afirmado, visto que a combinação apropriada de dieta e atividade física regular pode evitar o desenvolvimento do câncer colorretal de 66% a 77% (HUXLEY *et al.*, 2009). Cerca de 41% de todos os tumores colorretais são diagnosticados e tratados *in situ*, não havendo o comprometimento linfático. Ademais, para aqueles com câncer metastático, o índice de sobrevivência de 5 anos é de 10%. Todavia, em casos diagnosticados em estágios iniciais (*in situ*), o índice de sobrevivência de 5 anos sobe para 90%. Levando esses dados em consideração, enfatiza-se a relevância não só do diagnóstico precoce, mas, também, da prevenção (HABR-GAMA, 2005; RIDOUANE *et al.*, 2017).

A fisiopatologia dessa neoplasia inicia-se com uma cripta aberrante, que evolui em decorrência de crescimentos localizados ou agregações de células anormais na mucosa intestinal que se projetam no lúmen intestinal, formando os chamados pólipos. Com o decorrer do tempo, as células desses pólipos, as quais apresentam uma alta taxa de proliferação, podem progredir para um adenoma (pólipo pré-canceroso com menos de 1 cm de tamanho) até chegar em um adenoma avançado (com mais de 1 cm de tamanho), finalmente se transformando em um processo neoplásico (JONES *et al.*, 2008). Nesse sentido, dada a importância do crescimento celular como quesito para a progressão do câncer nos locais primário e metastático, destaca-se o papel do marcador molecular PCNA (*“proliferating cell nuclear antigen”*), que atua como braçadeira deslizante e mantém as polimerases ligadas ao molde de DNA durante o processo de replicação do material genético (STOIMENOV; HELLEDAY, 2009; WANG, 2014).

O acúmulo de outras mutações genéticas e epigenéticas nessas células é necessário para favorecer também a capacidade de promover disseminação e

metástase. A título de exemplo, as alterações nos genes *KRAS* (“*Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene*”), *TP53* (“*cellular tumor antigen p53*”), *APC* (“*Adenomatous polyposis coli*”),  $\beta$ -*catenina*, *BRAF* (“*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*”), *COX-2* (“*Cyclooxygenase-2*”), *DNMT1* (“*DNA methyltransferase 1*”), *NRF2* (“*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*”) e *TNF- $\alpha$*  (“*Tumor necrosis fator alpha*”) são apenas algumas das mutações mais frequentemente encontradas em tumores colorretais (ARMAGHANY *et al.*, 2012; HUA; HU, 2017; OKUGAWA; GRADY; GOEL, 2015; SADEGHI *et al.*, 2017; SHANG;). Sobre esse aspecto, estima-se que a progressão completa desde um processo benigno até a neoplasia do cólon pode levar até uma década (JONES *et al.*, 2008; SIMON, 2016).

Uma vez feito o diagnóstico, usualmente por colonoscopia e, posteriormente, por análise histológica do cólon, o tratamento baseia-se em cirurgia e quimioterapia (RATHORE *et al.*, 2013; REJHOVÁ *et al.*, 2018). Nesse sentido, o 5-fluorouracil (5-FU), por sua vez, representa um dos mais comuns constituintes de primeira linha no tratamento do câncer colorretal, sendo amplamente utilizado também em combinação com vários outros quimioterápicos. Classificado como um antimetabólico, após sua metabolização, este fármaco induz, entre outros efeitos, danos ao RNA e ao DNA pela incorporação de seus metabólitos ativos nos ácidos nucleicos, além de promover inibição da enzima timidilato sintase e, portanto, inibição da síntese de DNA (BRACHT *et al.*, 2010).

Cerca de 10 a 15% dos tumores avançados de câncer colorretal tratados com terapia de primeira linha respondem ao tratamento (BRACHT *et al.*, 2010). Além da ação inespecífica dos quimioterápicos, tem-se ainda, uma série de efeitos adversos, como náusea, vômito, diarreia, mucosite da cavidade oral, dores de cabeça, mielossupressão, anemia, cardiotoxicidade, agranulocitose, alopecia, entre outros (REJHOVÁ *et al.*, 2018).

Diante dos impasses supracitados, torna-se válido o incentivo à busca de novas moléculas que tragam entre suas características farmacológicas um potencial quimiopreventivo capaz de agir em diversos níveis, tal qual para o desenvolvimento de novas moléculas quimioterapêuticas com potenciais citotóxicos mais seletivos e eficazes que possam auxiliar na terapêutica clássica atual (REJHOVÁ *et al.*, 2018). Neste sentido, os produtos naturais, em especial os fitoquímicos, são interessantes por serem amplamente estudados. Além disso, muitos já apresentam efeitos e mecanismos comprovados (CHOUDHARI *et al.*, 2020).

## 2.2 QUIMIOPREVENÇÃO: UMA ESTRATÉGIA PARA O CÂNCER

Mais perspicaz que tratar o câncer, é prevenir que ele ocorra ou, pelo menos, que este continue a se desenvolver lançando mão, para isso, do uso de agentes químicos. Conceitualmente, a quimioprevenção é descrita como o uso de agentes farmacológicos (sintéticos ou naturais) a fim de prevenir o desenvolvimento de determinada doença. É de extrema importância que essas moléculas, além da eficácia em doses baixas, apresentem baixa toxicidade e, conseqüente, níveis de efeitos adversos reduzidos. A atuação destas moléculas pode ser dar em três níveis: primário, secundário e terciário (PENNY; WALLACE, 2015).

A quimioprevenção primária destina-se aos indivíduos saudáveis ou, ainda, aos que possuem fatores de riscos para o desenvolvimento de lesões precursoras. A quimioprevenção secundária, por sua vez, é voltada para aqueles que já possuem, no caso do câncer, lesões pré-malignas; e visa, assim, evitar a progressão do câncer por meio da regressão das lesões. Por fim, a quimioprevenção terciária é dirigida para aqueles que já foram diagnosticados e estão em fase inicial do tratamento. De forma sucinta, pode-se dizer que a quimioprevenção atua suprimindo, interrompendo ou invertendo vias moleculares específicas que levam à carcinogênese (PENNY; WALLACE, 2015).

A efetividade de diversas moléculas no que tange, principalmente, à prevenção do câncer tem atraído bastante a atenção da comunidade científica (BENETOU *et al.*, 2015). De fato, uma dieta bem equilibrada pode atuar como uma fonte rica de diversos macronutrientes, micronutrientes e fitoquímicos com potentes propriedades quimiopreventivas. Entre eles, destacam-se os polifenóis (*e.g.* curcumina, resveratrol, quercetina), os ácidos graxos poli-insaturados (*e.g.* ômega 3), os carotenoides (*e.g.*  $\beta$ -caroteno, licopeno ou luteína), as vitaminas (*e.g.* D, E, C e ácido fólico), os minerais (*e.g.* selênio, zinco, cálcio), bem como fibra alimentar (LANGNER; RZESK, 2012).

O potencial quimiopreventivo dos polifenóis são explicados pela capacidade de o grupo agir em diversas vias ou sistemas de sinalização intracelular envolvidos na iniciação ou promoção do câncer, podendo, assim, interromper ou reverter o desenvolvimento tumoral. Muito tem se estudado sobre a capacidade desses compostos em desencadear a morte de células cancerosas por meio da modulação de componentes essenciais nas vias de transdução de sinal celular ligadas à apoptose (ALY; MAHMOUD, 2013).

Estimativas sugerem que existem mais de 8.000 polifenóis diferentes, sendo enquadrados em até dez classes gerais diferentes com base em sua estrutura química. Dentre estes grupos, merecem destaque, aqui, o resveratrol e a curcumina (ALY; MAHMOUD, 2013; ZHAO *et al.*, 2017).

### 2.3 RESVERATROL E CURCUMINA NA CARCINOGENESE COLÔNICA

O resveratrol é encontrado, majoritariamente, em uvas e no vinho tinto, todavia também está presente na composição de outros alimentos, como nozes e determinadas frutas silvestres (KURŠVIETIENĖ *et al.*, 2016).

A estrutura química do resveratrol possui dois anéis de fenol ligados um ao outro por uma ponte de etileno, podendo ser identificada em duas formas isoméricas: cis- e trans-resveratrol. A forma trans, por sua vez, é a principal responsável pela indução de respostas tais como parada do ciclo celular, inibição da proliferação e indução de apoptose das células tumorais (SALEHI *et al.*, 2018). A nível molecular, estudos evidenciaram que o resveratrol atua como ativador da proteína sirtuína-1, elemento-chave em vias de sinalização diretamente envolvidas com resistência ao estresse, sobrevivência e senescência celular, inflamação, funções endoteliais e ritmos circadianos (BERMAN *et al.*, 2017).

Diferentes estudos *in vivo* têm aprofundado o conhecimento sobre os potenciais do resveratrol no tratamento do CCR. Um importante estudo, conduzido por Schneider e colaboradores (2001), demonstrou que a administração oral do resveratrol em camundongos reduziu em 70% a formação de tumores no cólon comparado ao grupo controle. Além disso, a análise do perfil de expressão gênica, nesse mesmo estudo, demonstrou que o resveratrol regulou negativamente diversos genes envolvidos com proliferação e progressão do ciclo celular (ciclina D1 e D2) e, em contrapartida, regulou positivamente, diversos genes relacionados com ativação da resposta imune (SCHNEIDER *et al.*, 2001).

Já a curcumina é encontrada no rizoma da cúrcuma (*Curcuma longa*), o qual, geralmente, passa por um processo de desidratação e moagem, dando origem a um pó de coloração dourada, sendo este bem popular mundialmente especialmente na culinária (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

A curcumina atua em diferentes alvos moleculares regulando diversas vias de sinalização, modulando a expressão de diversos genes e, até mesmo, promovendo

citotoxicidade mediada por contato. Com base em sua capacidade de afetar múltiplos alvos, a curcumina tem o potencial preventivo e terapêutico em várias doenças, tendo já demonstrado bastante êxito como coadjuvante do tratamento de síndromes metabólicas, artrite, feridas, distúrbios hepáticos e biliares e até mesmo ansiedade. Estudos demonstram a regulação da expressão de citocinas inflamatórias, por exemplo TNF (*Tumor necrosis fator*) e IL-1 (*Interleukin 1*); fatores de crescimento, por exemplo VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), EGF (*Epidermal growth factor*) e FGF (*Fibroblast growth fator*); receptores de fatores de crescimento, como EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), HER-2 (*Human epidermal growth factor receptor 2*) e AR (*Androgen receptor*); enzimas, por exemplo COX- 2, LOX (*Lysyl oxidase*), MMP9 (*Matrix metallopeptidase 9*), MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), mTOR (*Mammalian target of rapamycin*) e Akt (*Protein kinase B*); moléculas de adesão, como ELAM-1 (*Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1*), ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) e VCAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*); proteínas relacionadas à apoptose, por exemplo, Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) caspases, DR (*Death receptor*) e Fas (*Fas cell surface death receptor*); e proteínas do ciclo celular (por exemplo, ciclina D1). Além disso, a curcumina também já demonstrou a capacidade de modular a atividade de vários fatores de transcrição, por exemplo NF- $\kappa$ B (*Factor nuclear kappa B*), AP-1 (*Activator protein*), STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) e suas respectivas vias de sinalização (PATEL *et al.*, 2010; SHISHODIA, 2013). Estudos demonstram que essa ampla modulação se dá, sobretudo, pela capacidade da molécula de reagir com resíduos de cisteína das proteínas, o que é mediada pela fração heptadieno-diona conjugada da curcumina. Essa porção da estrutura química leva à modificação covalente de proteínas-chave envolvidas na sinalização celular, e, subsequentemente, à modulação de várias respostas biológicas (YANG *et al.*, 2017).

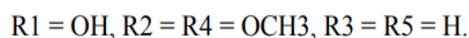
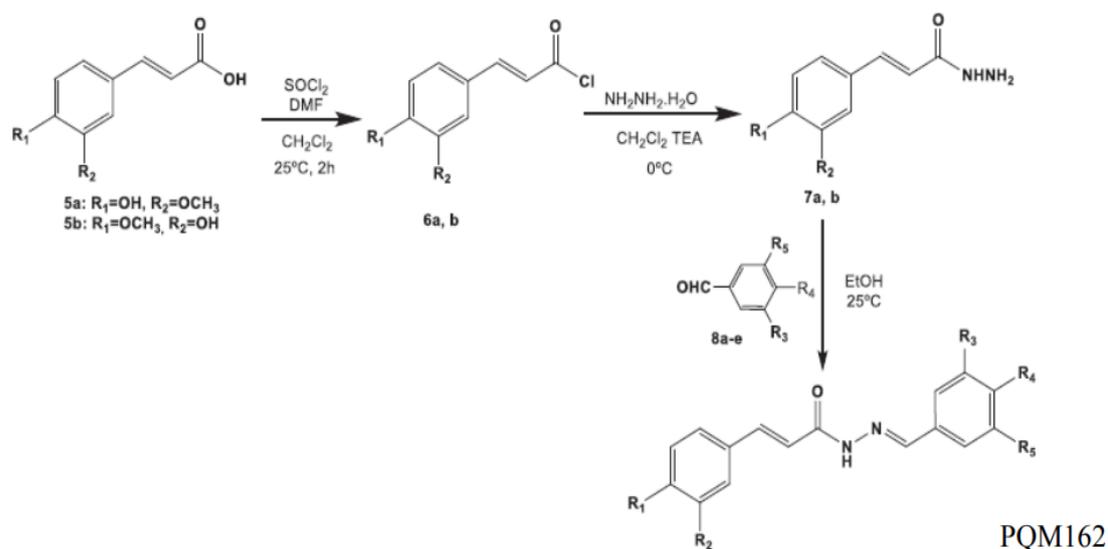
Em um ensaio clínico de fase II, dirigido por Carroll e colaboradores (2011), obteve-se uma redução significativa de 40% do número de Focos de Criptas Aberrantes (FCA) após ter sido administradas 4 gramas diárias de curcumina por um período de 30 dias em pacientes que passaram por uma triagem prévia por colonoscopia. Além disso, de maneira geral, os pacientes apresentaram uma boa tolerância à curcumina, sem sinais de toxicidade hepática sendo que a maioria dos efeitos adversos relatados foram distúrbios a nível gastrointestinal (diarreia e refluxo gastroesofágico) (CARROLL *et al.*, 2011).

O emprego da curcumina na prática clínica se torna instigante pelo fato de que estudos realizados em animais e seres humanos, envolvendo até 12g/dia, relataram ausência de toxicidade atrelada ao uso. Não obstante, a baixa biodisponibilidade é uma adversidade presente. Isso ocorre porque a estrutura química da mesma faz com que ela apresente baixa solubilidade em água e, dessa forma, faz com que seja pouco absorvida. Além disso, a presença de sítios muito reativos ao metabolismo faz com que a curcumina sofra metabolismo hepático de primeira passagem (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015). O mesmo se aplica ao resveratrol. Apesar da alta absorção oral em humanos (cerca de 75%), a problemática no emprego desse flavonóide se encontra em sua baixa biodisponibilidade, que chega a ser inferior a 1% devido ao extenso metabolismo intestinal e hepático (DE SÁ COUTINHO *et al.*, 2018).

#### 2.4 O HÍBRIDO DE RESVERATROL E CURCUMINA

Tendo em vista os vieses de solubilidade e de biodisponibilidade relatados, a modificação da estrutura química do resveratrol e da curcumina representa um caminho promissor para o emprego dessas moléculas como futuros agentes quimiopreventivos e quimioterapêuticos (RAJAMANICKAM *et al.*, 2017; YANAGI; UCHIDA; HAMADA, 2019). Nesse sentido, Freitas e colaboradores (2018) tiraram proveito da técnica de hibridação molecular a fim de ligar a subunidade 3-metoxi-4-hidroxicinamilo da curcumina ao sistema O-substituído-fenil-conjugado do resveratrol. Para isso, e para aperfeiçoar o revés da solubilidade e da absorção, dispuseram de um grupo funcional espaçador N-acil-hidrazona, o qual promove uma maior polaridade e capacidade de doação e aceitação de locais de ligações de hidrogênio, favorecendo, dessa forma, propriedades farmacocinéticas como absorção, distribuição, metabolismo e excreção (CHEN, 2015; DE FREITAS SILVA *et al.*, 2018; NEVES *et al.*, 2012). Como resultado, o híbrido (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-N'-(4-metoxibenzilideno) acrilidrazida (PQM162; Figura 1) foi sintetizado.

Figura 1 - Hibridação molecular do resveratrol e curcumina produzindo o (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-N'-(4-metoxibenzilideno) acrilidrazida – PQM162.



Fonte: Adaptado de Freitas Silva *et al.* (2018).

O perfil de citotoxicidade de PQM162 foi avaliado em linhagens celulares de tumores humanos, e a seletividade foi verificada em linhagem normal de fibroblastos de pele (CCD-1059Sk). Os resultados demonstraram atividade antiproliferativa em todas as linhagens transformadas testadas e um índice de seletividade significativo de 3,9. Interessantemente, esse índice se mostrou, inclusive, maior que o índice de seus precursores isolados (curcumina: 1,93 e resveratrol: 1,45). No que se refere à análise do ciclo celular, foi observada uma redução da população celular em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> e S, e aumento concomitante da população G<sub>2</sub>/M associado à capacidade do híbrido de intervir na dinâmica do alinhamento cromossômico e de perturbar a mitose e sua progressão (DE FREITAS *et al.*, 2018).

Além disso, em células de câncer de mama MCF-7, os níveis dos transcritos, que codificam para o supressor de tumor *CDKN1A* (“*cyclin dependent kinase inhibitor 1A*”), foram maiores nas amostras tratadas com o híbrido em comparação com as amostras tratadas concomitantemente com resveratrol e curcumina na mesma concentração. Esses achados, quando agrupados, demonstram que o híbrido PQM162 apresenta grande potencial como agente antitumoral por atuar em vários alvos, tal como, por ter como base uma estrutura química inovadora (DE FREITAS SILVA *et al.*, 2018).

### 3 JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços significativos nas últimas duas décadas no que diz respeito à terapia do câncer, a maioria das drogas utilizadas ainda se constituem de compostos citotóxicos pouco específicos. Nesse sentido, efeitos colaterais ainda são um grande problema, assim como as baixas taxas de sobrevivência em diversos tipos tumorais. Mesmo com essa eficácia limitada, tais abordagens terapêuticas acarretam em aproximadamente 14 bilhões de dólares para os custos anuais de assistência médica somente nos EUA, uma despesa que tende a aumentar com o incremento da incidência (PENNY; WALLACE, 2015; SIMON *et al.*, 2016).

Assim, uma das maiores adversidades enfrentadas pela pesquisa e pela atual terapia oncológica tem sido identificar moléculas contendo grupos farmacofóricos que tragam maior efetividade, acompanhadas de toxicidade e níveis de efeitos adversos reduzidos (FLOREA; BÜSSELBERG, 2011). Sob essas pretensões, e fundamentado em evidências científicas sobre a efetividade de diversos fitoquímicos, torna-se válido o incentivo à utilização dos princípios ativos de diversas frutas e vegetais como substâncias químicas propriamente isoladas e purificadas.

Nesse sentido, o presente estudo optou por escolher a molécula PQM162, fornecendo novas perspectivas no emprego do embasamento encontrado para a investigação de alvos que apresentem o potencial de levar à promoção de abordagens quimiopreventivas e terapêuticas mais eficientes no que diz respeito ao câncer colorretal e, futuramente, até mesmo outros tipos tumorais. Além da escolha pautada na necessidade de novas moléculas, o atual estudo se justifica também nos resultados preliminares promissores em relação ao efeito de PQM162 obtidos sobre outras linhagens celulares (DE FREITAS SILVA *et al.*, 2018). Ademais, achados promissores da literatura acerca de seus precursores isolados norteiam para a necessidade de outros trabalhos que identifiquem o efeito biológico do híbrido sobre a carcinogênese colônica. Isso pode ser afirmado uma vez que tal molécula foi racionalizada para manter os grupos farmacofóricos envolvidos na atividade biológica, apresentando, assim, melhor solubilidade e, conseqüentemente, maior biodisponibilidade (BERMAN *et al.*, 2017; CARROLL *et al.*, 2011; DE FREITAS SILVA *et al.*, 2018; PATEL *et al.*, 2010; SALEHI *et al.*, 2018; SCHNEIDER *et al.*, 2001; SHISHODIA, 2013).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os possíveis efeitos quimiopreventivos e/ou quimioterapêuticos de uma molécula híbrida de resveratrol e curcumina, (E) -3- (4-hidroxi-3-metoxifenil)-N'-(4-metoxibenzilideno) acril-hidrazida (PQM162) na carcinogênese colorretal.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o possível efeito carcinogênico do tratamento com PQM162 em ratos Wistar;
- b) Avaliar o potencial efeito quimiopreventivo de PQM162 sobre lesões pré-neoplásicas do colón de ratos Wistar envolvendo três diferentes estratégias quimiopreventivas: pré, pós e tratamento simultâneo;
- c) Monitorar a toxicidade dos tratamentos *in vivo*;
- d) Estudar os mecanismos moleculares envolvidos no efeito quimiopreventivo sobre a iniciação da carcinogênese colorretal;
- e) Analisar os efeitos do tratamento com PQM162 sobre os processos de migração, ciclo celular e apoptose na linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano (HCT-8).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 OBTENÇÃO DO HÍBRIDO DE RESVERATROL E CURCUMINA

A molécula híbrida PQM162 foi gentilmente sintetizada e cedida pelo Prof<sup>o</sup> Dr. Claudio Viegas Júnior do grupo de pesquisa em Planejamento, Síntese, Bioprospecção e Caracterização de Substâncias Bioativas da Universidade Federal de Alfenas. A síntese e a caracterização da estrutura química foram realizadas de acordo com a metodologia previamente publicada por de Freitas Silva *et al.* (2018).

### 5.2 SISTEMA-TESTE *IN VIVO*

#### 5.2.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (espécie *Rattus norvegicus*), com 6 semanas e peso corpóreo (p.c.) inicial aproximado de 100 a 120 gramas, oriundos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Alfenas. Os animais foram alocados em duplas em caixas de propileno com acesso *ad libitum* à ração e água e, também, sob condições controladas de temperatura ( $23 \pm 2^\circ \text{C}$ ), umidade ( $50 \pm 10\%$ ) por 12 horas de ciclo claro-escuro. A condução experimental foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas (Protocolo 03/2019, ANEXO A). Os experimentos foram realizados em triplicata e cada grupo de tratamento, ao final, foi composto de seis animais. Durante todo o período experimental, para avaliação da toxicidade dos tratamentos, o peso corpóreo e o consumo de água foram monitorados.

#### 5.2.2 Agente indutor de lesão colorretal

Para a realização dos ensaios *in vivo* foi utilizado o 1,2 Dimetilhidrazina [DMH, 160 mg/kg peso corpóreo (p.c.), *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*] (AGNER *et al.*, 2005). O DMH foi dissolvido em ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA, 1mM) momento antes do seu uso como indutor de lesões pré-neoplásicas do cólon. O DMH é considerado um carcinógeno que requer metabolização, gerando íons capazes de metilar o DNA, RNA e proteínas, além de gerar radicais livres (KAWANISHI; YAMAMOTO, 1991).

### 5.2.3 Delineamento experimental

As diferentes doses de PQM162 utilizadas neste estudo foram estabelecidas com base em dados previamente levantados da literatura sobre o efeito quimiopreventivo da curcumina e do resveratrol individualmente, e em ensaios anteriormente realizados em nosso laboratório e não incluídos nesta proposta (*“Avaliação da genotoxicidade em células do sangue periférico de camundongos Swiss”*, APÊNDICE A). Os resultados prévios mostraram que camundongos Swiss tratados com PQM162 nas diferentes doses (8, 16, 32 e 64 mg/kg p.c.), de maneira aguda e combinada à doxorrubicina (DXR), apresentaram efeito quimiopreventivo significativo em sangue periférico. Neste sentido, após um experimento piloto com as doses de 8, 4 e 2 mg/kg p.c., foram escolhidas, para este estudo, as doses de 2, 1 e 0,5 mg/kg p.c. para avaliação do efeito quimiopreventivo. Para avaliação do potencial carcinogênico, apenas a maior dose (2,0 mg/kg p.c.) foi utilizada. Um resumo acerca dos grupos experimentais pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1- Grupos experimentais avaliados no modelo *in vivo*.

Grupos	Tratamentos
1	Controle negativo (água destilada, v.o. + EDTA 1 mM, s.c.)
2	DMSO (DMSO 0,03g/kg p.c., v.o.; EDTA 1 mM, s.c. )
3	PQM162 III (2,0 mg/kg p.c., v.o.; EDTA 1 mM, s.c.)
4	DMH (água destilada, v.o. + DMH 40 mg/Kg p.c., s.c.)
5	DMSO + DMH (0,03g/kg p.c., v.o. + DMH 40 mg/Kg p.c., s.c.)
6	PQM162 I + DMH (0,5 mg/kg p.c., v.o. + DMH 40 mg/Kg p.c., s.c.)
7	PQM162 II + DMH (1,0 mg/kg p.c., v.o. + DMH 40 mg/Kg p.c., s.c.)
8	PQM162 III + DMH (2,0 mg/kg p.c., v.o. + DMH 40 mg/Kg p.c., s.c.)

Fonte: Do autor (2021).

Legenda: v.o. (via oral/*gavage*); EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético); s.c. (subcutâneo); DMSO (Dimetilsulfóxido); PQM162 [(E) -3- (4-hidroxi-3-metoxifenil)-N'-(4-metoxibenzilideno) acril-hidrazida]; DMH (1,2 Dimetilhidrazina); p.c. (peso corpóreo).

No instante do uso, as diferentes doses do híbrido PQM162 foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO; 0,03g/kg p.c.) e água destilada, e administradas via *gavage* (v.o.) no volume de 1mL/animal. O carcinógeno DMH foi utilizado como indutor de carcinogênese colorretal (controle positivo) e foi diluído na dose de 40 mg/kg p.c. em solução de EDTA (1mM), no instante que antecede o seu uso. A administração nos animais foi realizada sempre no segundo e quinto dia de cada semana, no volume de 0,3 mL/animal por via subcutânea (s.c.). Ao todo, quatro doses de 40 mg/kg p.c. s.c. foram administradas, resultando em uma dose final de 160 mg/kg p.c. s.c., conforme o recomendado por Agner *et al.* (2005). Os animais do grupo controle solvente receberam 1mL de DMSO (0,03g/kg p.c.) via *gavage* e 0,3 mL de EDTA 1mM s.c., a fim de se simular o estresse experimental (Tabela 1).

Para os grupos de tratamento acima descritos, foram adotadas diferentes abordagens de tratamento: pré, pós e tratamento simultâneo a fim de se estudar o mecanismo de ação quimiopreventivo (Figura 2). De maneira geral, o período experimental total consistiu de seis semanas. Em todos os modelos de tratamento, PQM162 foi administrada por 5 dias consecutivos, uma vez ao dia, no período da manhã.

No modelo de pré-tratamento, os animais receberam as diferentes doses de PQM162, anteriormente descritas, da 1<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup> semana de tratamento. O DMH, por sua vez, foi administrado na 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semana, no segundo e no quinto dia de tratamento de cada semana. Por fim, a 5<sup>a</sup> e a 6<sup>a</sup> semanas foram resguardadas ao período necessário para possibilitar a indução das lesões pré-neoplásicas pelo DMH, conforme as orientações de Rodrigues *et al.* (2002). Nesse intervalo de tempo, foi administrada apenas água v.o.

No tratamento simultâneo, foi administrada água na 1<sup>a</sup> e na 2<sup>a</sup> semana. Nesse modelo de tratamento, o DMH começou a ser administrado apenas na 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semana, no segundo e quinto dia de tratamento concomitante à administração das diferentes doses de PQM162. Na 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semana, os animais continuaram recebendo os tratamentos com as diferentes doses de PQM162.

Por fim, no pós-tratamento, a 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> semanas também foram destinadas apenas à administração de água. Na 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semanas o DMH foi administrado, no segundo e quinto dia de cada uma delas. Finalmente, na 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semanas, os animais receberam as diferentes doses de PQM162. Na 7<sup>a</sup> semana, no primeiro dia da semana, foi realizada a eutanásia dos animais para a coleta das amostras (Figura 2).

Figura 2 - Delineamento experimental das diferentes abordagens de tratamento incluídas no sistema-teste *in vivo*.

Semanas	Pré-tratamento	Iniciação Simultânea	Pós-tratamento
Semana 1			
Semana 2			
Semana 3			
Semana 4			
Semana 5			
Semana 6			
Eutanásia			

<b>Legenda:</b>	 PQM162; v.o.	 DMH 40 mg/kg p.c.; s.c.	 Água.	 Eutanásia.
-----------------	--	---	--	--

Fonte: Do autor (2021).

Legenda: PQM162 [(E) -3- (4-hidroxi-3-metoxifenil)-N'-(4-metoxibenzilideno) acril-hidrazida]; DMH (1,2 Dimetilhidrazina). v.o (via oral/gavage); p.c. (peso corpóreo); s.c. (subcutâneo);

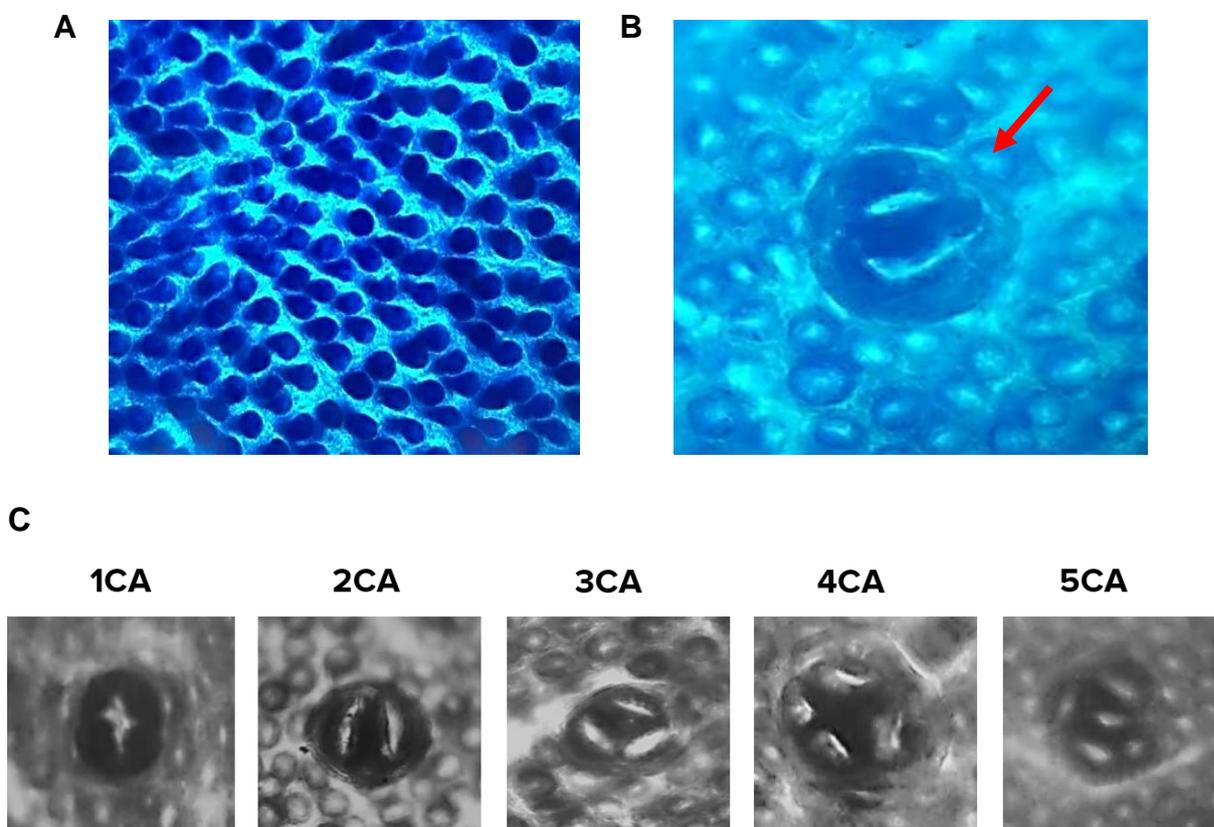
#### 5.2.4 Teste de focos de criptas aberrantes

Após as 6 semanas dos diferentes tratamentos acima descritos, os animais foram eutanasiados com 1 mL de Tiopental sódico 1% (0,84 mg/kg p.c.) por via intraperitoneal (i.p.). Após esse processo, foi realizada a laparotomia seguida da excisão dos cólons. Estes, por sua vez, foram abertos longitudinalmente e, para a remoção da matéria fecal, foram lavados com solução salina de cloreto de sódio (NaCl 0,9%). Logo em seguida, com o auxílio de alfinetes, os cólons foram presos em placas de isopor para posterior fixação em solução de formaldeído (10%) por um período máximo de 24 horas. Em seguida, os cólons foram mantidos em álcool 70% até o momento da análise, que foi realizada após coloração do segmento com solução de azul de metileno (0,02%) por 10 minutos. A visualização dos Focos de Criptas

Aberrantes (FCA), foi realizada através de microscopia óptica comum (aumento total de 100x) após a transferência do cólon para uma lâmina com a parte interna da mucosa voltada para cima. Foram avaliados 50 campos sequenciais na porção distal do intestino grosso, seguindo a metodologia proposta por Bird (1987). A porção distal do intestino grosso é considerada a região colônica onde os tumores apresentam uma maior propensão de evolução dos FCA a carcinoma (PARK; GOODLAD; WRIGHT, 1997).

Foram considerados e contabilizados aqueles FCA caracterizados por uma espessa camada epitelial, que se cora mais intensamente com azul de metileno, abertura luminal alongada, tortuosa e maior em relação às criptas normais circunvizinhas (Figura 3) (BIRD, 1987).

Figura 3 – Fotomicrografias da porção distal do cólon de ratos Wistar.



Fonte: Do autor (2021).

Legenda: (A) padrão histológico normal. (B) Foco de cripta aberrante (FCA) com duas criptas aberrantes (CA). (C): Focos de criptas aberrantes evidenciando de uma a cinco criptas aberrantes. Aumento total 100x.

### 5.2.5 Análise de expressão gênica

Genes envolvidos em diversas vias-alvo que dizem respeito ao processo de tumorigênese colônica foram analisados pela técnica da *Reverse-transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR, reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa) tais como: a metilação do DNA (*DNMT1*), o estresse oxidativo (*NRF2*), a inflamação (*COX-2* e *TNF- $\alpha$* ), além dos supressores tumorais (*TP53* e *APC*). Na Tabela 2 é possível encontrar um resumo das informações sobre os *primers* utilizados e respectivos genes alvo.

A porção distal do tecido colorretal foi armazenada em solução de trizol a  $-80^{\circ}\text{C}$ , e foi submetida ao procedimento de extração de RNA total. A quantificação do RNA total foi avaliada por leitura espectrofotométrica utilizando o NanoDrop® ND1000 (*Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA*). Em seguida, foi realizada a incubação do RNA total com DNase, por 15 min em termociclador a  $37^{\circ}\text{C}$ , a fim de se eliminar possível contaminação com DNA genômico. Feito isso, o RNA total foi, então, submetido à reação de transcrição reversa (RT) utilizando *Randon primers* e *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit®* (*Applied Biosystems, São Paulo, 186 SP, Brasil*), conforme as instruções do fabricante. Ressalta-se que, todos os reagentes foram incubados a  $25^{\circ}\text{C}$  por 10 min,  $37^{\circ}\text{C}$  por 120 min e então,  $85^{\circ}\text{C}$  por 5 min para promover a inativação da enzima.

A expressão dos genes alvo foi investigada utilizando o sistema *Power Sybr®Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems, São Paulo, SP, 191 Brasil*) no *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (*Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brasil*). Todas as reações foram efetuadas obtendo-se um volume final de 25  $\mu\text{l}$  e os genes foram amplificados seguindo as seguintes condições experimentais:  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 min (1 ciclo), desnaturação a  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 segundos, seguido pelo anelamento a  $60^{\circ}\text{C}$  e extensão por 1 min (40 ciclos). A normalização dos valores de expressão dos genes alvo foi feita utilizando a expressão do gene constitutivo *ACTB* (" *$\beta$ -actin*"). O método  $\Delta\Delta\text{Ct}$  com correção da eficiência foi empregado para calcular a expressão relativa de cada gene. E, uma amostra controle foi usada como calibradora (PFAFFL, 2001).

Os valores médios de eficiência para cada gene foram mensurados através do perfil de amplificação de cada amostra, através do auxílio do programa LinRegPCR, conforme as recomendações de Ramakers *et al.* (2003).

Tabela 2 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanho do fragmento amplificado utilizados nas reações de RT-PCR.

Gene	Mecanismo	Oligonucleotídeo iniciador	Tamanho (pb)	Nº de acesso no Genbank
<i>ACTB</i>	Constitutivo ( $\beta$ - <i>ACTINA</i> )	S:AGCCATGTACGTAGCCATCC AS:ACCCTCATAGATGGGCACAG	115	NM_031144. 2
<i>APC</i>	Supressor tumoral, associado à $\beta$ -catenina <sup>1</sup>	S: ACTCCTTACTGCTTCTCACG AS:GTCCTTACTTTCTTTGCCCTTT	114	NM_012499. 1
<i>KRAS</i>	Oncogene envolvido na regulação da divisão celular <sup>2</sup>	S: GGAGGGCTTTCTTTGTGTATTTG AS: GGCACATCTTCAGAGTCCTTTA	105	NM_0391070 23.1
<i>NRF2</i>	Fator de transcrição envolvido na ativação da expressão de genes de resposta antioxidante <sup>3</sup>	S: GTGACTCGGAAATGGAAGAG AS: AGAAGAATGTGTTGGCTGTG	83	NM_031789. 2
<i>DNMT1</i>	Metilação do DNA	S:CAGAGGAGAGAGACCAGGATAA AS: GGCCTTACTCGTTCAGGTTT	100	NM_053354. 3
<i>TP53</i>	Supressor tumoral, regular de ciclo celular, apoptose, senescência e reparo <sup>5</sup>	S: CATGAGCGTTGCTCTGATGGT AS: GATTTCTTC CACCCGGATAA	66	NM_030989
<i>COX-2</i>	Enzima pró-inflamatória <sup>6</sup>	S: TGTATGCTACCATCTGGCTTCGG AS:GTTTGAACAGTCGCTCGTCAT	94	AF233596.1
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	Regula a proliferação celular, induz apoptose e resposta inflamatória <sup>7</sup>	S: ACCACGCTCTTCTGTCTACTG AS: CTTGGTGGTTTGCTACGAC	169	NM_012675. 3

Fonte: Do autor (2021).

Legenda: S: *sense (forward primer)*; AS: *antisense (reverse primer)*; pb: pares de base; *ACTB*:  $\beta$ -actin; *APC*: adenomatous polyposis coli; *KRAS*: Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; *NRF2*: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; *DNMT1*: DNA methyltransferase 1; *TP53*: tumor suppressor p53; *COX-2*: cyclooxygenase-2; *TNF- $\alpha$* : tumor necrosis factor alpha.

<sup>1</sup>FODDE *et al.*, 2002; JANČÍK *et al.*, 2010<sup>2</sup>; <sup>3</sup>KOU *et al.*, 2013; <sup>4</sup>ZHANG; XU, 2017; <sup>5</sup>DUFFY *et al.*, 2014; <sup>6</sup>LIU; QU, 2015; <sup>7</sup>VAN HORSSSEN; TEM HAGEN; EGGERMONT, 2006.

### 5.2.6 Imunohistoquímica

A princípio, o tecido colorretal coletado foi mantido por, no máximo, 24 h em solução de formol tamponado e, posteriormente, foi transferido para álcool 70% até o momento de sua parafinização. Após a inclusão em parafina, foram realizados cortes histológicos de 3-4 µm de espessura. Os cortes foram desparafinizados no dia anterior à realização da técnica em temperatura de 60°C por 1 h associada a três trocas de xilol (15 minutos cada), seguidas de duas trocas em álcool etílico (100 e 70%) com duração, também, de 15 minutos cada. Após a desparafinização, foi realizada a recuperação antigênica mantendo as lâminas em tampão citrato e em uma panela de pressão por 3 min.

A fim de se reduzir a marcação inespecífica, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena por meio da incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio 3% por 15 min. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado também com a incubação por 10 min em solução de leite desnatado a 5%. Esta solução foi preparada em TBST (“1X tris-buffered saline with 0.05% Tween 2”) em pH 7,6.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas com TBST e incubadas *overnight* em câmara úmida na geladeira com os seguintes anticorpos primários:

- PCNA (Abcam, Cambridge, UK, Cat.: ab29; monoclonal): diluição 1:2000
- COX-2 (Abcam, Cambridge, UK, Cat.: ab15191; policlonal): diluição 1:1000
- NRF-2 (Abcam, Cambridge, UK, Cat.: ab137550; policlonal): diluição 1:200
- β-catenina (Abcam, Cambridge, UK, Cat.: ab32572; monoclonal): diluição 1:1000

No dia seguinte, realizou-se a incubação dos cortes com o anticorpo secundário IgG anti-coelho produzido em cabras conjugado com peroxidase (*Dako EnVision™ + Dual Link System-HRP, Aguilent, Santa Clara, CA, USA*) por 1 h. Após esse período de tempo, os cortes foram corados com 3,3'-diaminobenzidina (DAB; 0,5%) por 5 minutos, e contra-corados com hematoxilina (100%) filtrada por 15 segundos.

A determinação semi-quantitativa da expressão proteica foi avaliada utilizando o software *ImageJ Fiji*® (versão 1.2; *WS Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD*), de acordo com os princípios descritos por Crowe e Yue (2019).

### 5.3 SISTEMA-TESTE *IN VITRO*

#### 5.3.1 Linhagem celular e condições de cultivo

A linhagem humana de adenocarcinoma colorretal (HCT-8) utilizada foi gentilmente cedida pela Professora Marisa Ionta do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Alfenas, MG.

As células encontravam-se estocadas em nitrogênio líquido (-195°C), em alíquotas de  $1 \times 10^6$  células/mL em uma solução de congelamento composta de 50% de meio de cultura (DMEM, *Sigma-Aldrich*), 40% de soro bovino fetal (*Nutricell*) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, *SigmaAldrich*).

Para a realização dos experimentos, as células foram cultivadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> utilizando meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 1% de estreptomicina (100 mg/mL), penicilina (60 mg/mL) e 10% de soro bovino fetal (pH 7.2-7.4) e mantidas em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. As culturas foram replicadas a cada 2 ou 3 dias e apenas células na fase exponencial do crescimento e que se encontravam a partir da quarta passagem foram utilizadas neste estudo.

#### 5.3.2 Ensaio de migração

A avaliação da migração foi realizada utilizando as concentrações de 2,0; 4,0 e 6,0 µg/mL. A escolha destas concentrações foi baseada em dados experimentais prévios que avaliaram a proliferação celular (APÊNDICE B, C e D), clonogenicidade (APÊNDICE E) e a instabilidade genômica (APÊNDICE F e G) do tratamento com PQM162 de maneira isolada e combinada ao 5-FU em células HCT-8 e em queratinócitos humanos (HaCat).

A concentração de células empregada para plaqueamento foi de 300 mil células/poço em placas de 24 poços e, ao chegarem a 80% de confluência, foi realizada uma ranhura no centro de cada poço utilizando uma ponteira de 200µL e

uma régua, previamente autoclavadas e esterilizadas. Além disso, as células passaram a ser cultivadas em meio com baixa proporção de soro (1%) e com as respectivas concentrações selecionadas de PQM162. As áreas selecionadas foram fotografadas com magnificação de 40x. Após 48 horas de tratamento, novas imagens foram obtidas e a distância entre as margens das ranhuras foi medida. Os resultados foram expressos como a média das porcentagens de fechamento desta ranhura auxiliado pelo *software ImageJ®* (YAMAGUCHI *et al.*, 2005).

### 5.3.3 Análise do ciclo celular

As células foram semeadas em placa de 6 poços a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço. A avaliação da cinética de progressão do ciclo celular foi realizada utilizando o tratamento com o híbrido PQM162 por 24 horas nas concentrações de 2,0; 4,0 e 6,0  $\mu\text{g/mL}$ . Ao término do tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática (tripsina/EDTA) e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O precipitado de células foi então obtido e as amostras foram fixadas com etanol 75% em PBSA (*“Phosphate-NaCl buffer”*) por 30 min. Em seguida, foram coradas por 1 hora em uma solução contendo PBSA, RNase (3 mg/mL) e Iodeto de Propídio (100  $\mu\text{g/mL}$ ) (*Guava Technologies Merck Millipore*). A análise foi realizada em citômetro de fluxo (*Guava ini EasyCyte, 8HT*) usando o *software GuavaSoft 2.7*.

### 5.3.4 Marcação de células apoptóticas por anexina v/iodeto de propídeo

O ensaio foi realizado utilizando o *Kit Annexin-V FITC/PI (Invitrogen)*, de acordo com instruções do fabricante. As amostras foram tratadas com PQM162 nas concentrações de 6 e 12  $\mu\text{g/mL}$  por 24 horas. Após o tempo de tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática (*Trypsin-EDTA solution/Sigma Aldrich LTDA, Brasil*), centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, lavadas em PBSA gelado e homogeneizadas em solução contendo anexina conjugada a FITC (*“Fluorescein isothiocyanate”*) e Iodeto de Propídio. As amostras foram incubadas por 20 minutos, protegidas da luz em temperatura ambiente e a análise foi feita no citômetro de fluxo (*Guava Mini Easy Cyte, 8HT*) através do *software GuavaSoft 2.7*.

## 5.4 Análise estatística

Para avaliar as diferenças entre os diferentes grupos de tratamento, os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância (*One-way ANOVA*) para experimentos inteiramente aleatorizados, com o cálculo da estatística F e de seu respectivo “*pvalue*”. Nos casos em que  $P < 0,05$ , as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de *Tukey* ou *Dunnett*, com o cálculo da diferença mínima significativa para  $\alpha = 0,05$ , utilizando o programa *Graph Pad Prism®* (Versão 8.0). Para a comparação entre as abordagens de tratamento nos ensaios de RT-PCR e imunohistoquímica, foi utilizado, ainda, o modelo aninhado misto com análise de variância através do método de *Satterthwaite*, por meio do *software* estatístico R.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 SISTEMA-TESTE *IN VIVO*

#### 6.1.1 Avaliação toxicológica

A evolução do peso corpóreo e o consumo de água dos animais foram monitorados durante todo período experimental com o propósito de detectar possíveis sinais de toxicidade provenientes dos tratamentos administrados. Os valores médios e desvio-padrão do peso inicial, final, ganho de peso e consumo de água obtidos em ratos Wistar tratados com PQM162 nos três diferentes modelos de tratamento são mostrados na Tabela 3. No período observado, nenhuma diferença significativa foi constatada no ganho de peso e no consumo de água entre os diferentes grupos experimentais. É digno de destaque que, para todas as abordagens de tratamento, não foram incluídos na análise os animais cujas mortes foram consideradas acidentais (Tabela 3).

De modo símile ao híbrido, a literatura relata ausência de sinais e sintomas de toxicidade ou mortalidade em roedores expostos a altas doses de resveratrol e curcumina. A administração por 28 dias de 20 mg/kg/p.c./d de trans-resveratrol v.o., o que corresponderia a 1000 vezes a quantidade consumida de 1,4 g/d por um indivíduo de 70kg, não mostra acarretar alterações no peso corporal, no consumo de água e alimento e nos parâmetros hematológicos e bioquímicos de ratos machos. O

equivalente se observa com a administração da dose máxima recomendada de 5.000 mg/kg p.c. de curcumina, o que sugere segurança na administração dessas duas moléculas (AGGARWAL; CHACRO; KURUVILLA, 2016; JUAN; VINARDELL; PLANAS, 2002).

Tabela 3 - Valores médios e desvio-padrão do peso inicial, final, ganho de peso e consumo de água obtidos em ratos Wistar tratados com PQM162 nos diferentes modelos de tratamento.

Tratamentos (mg/kg p.c.)	Simultâneo				Pré-tratamento				Pós-tratamento			
	PI (g)	PF(g)	GP (g)	CA (mL/d)	PI (g)	PF(g)	GP (g)	CA (mL/d)	PI (g)	PF(g)	GP (g)	CA (mL/d)
<b>Controle</b>	169±88	290±56	121±33	36±10	169±88	290±56	121±33	36±10	169±88	290±56	121±33	36±10
<b>DMSO</b>	160±15	270±13	110±6	35±6	160±15	270±13	110±6	35±6	160±15	270±13	111±6	35±6
<b>2</b>	146,5±6	288±14	141±9	41±14	147±6	288±14	141±9	41±14	147±6	288±14	141±9	41±14
<b>DMH</b>	173 ±58	260±11	87±51	33±3	173±58	260±11	87±51	33±3	173±58	260±12	87±51	33±3
<b>DMSO + DMH</b>	183±4	272±24	90±36	25±2	203±18	258±30	55±16	41±2	258±20	318±12	61±25	42±5
<b>0,5 + DMH</b>	181±32	274±18	93±29	36±5	229±17	275±24	45±22,	44±0,1	251±15	293±28	40±4	43±22
<b>1,0 + DMH</b>	159±51	270±31	111±28	36±6	220±25	269±21	48±29	47±6	232±31	287±29	36±2	55±7
<b>2,0 + DMH</b>	169±20	281±8	113±9	32±2	206±17	249±41	44±33	49±10	240±38	286±20	44±7	45±31

Fonte: Do autor (2021).

Legenda: PI: peso inicial; PF: peso final; GP: ganho de peso; CA: consumo de água; d: dia; DMSO: Dimetilsulfóxido 0,03g/kg p.c.; DMH: 1,2 Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c.); PQM162: (E) -3- (4-hidroxi-3-metoxifenil)-N'-(4-metoxibenzilideno) acril-hidrazida).

### 6.1.2 Avaliação do potencial carcinogênico

Embora os tecidos proximal e médio tenham sido analisados (dados não mostrados), os dados de avaliação do potencial carcinogênico foram contabilizados utilizando a porção distal do intestino grosso dos animais. Isso porque a região colônica é o local onde os tumores apresentam uma maior propensão de evolução do FCA a carcinoma (PARK; GOODLAD; WRIGHT, 1997). Não foram observadas alterações dignas de nota nos cortes histológicos dos animais dos grupos controle negativo (sem tratamento) e DMSO (0,03g/kg p.c.). Além disso, os animais que receberam PQM162 na dose máxima (2,0 mg/kg p.c., v.o. e EDTA 1 mM s.c.), não apresentaram FCA, revelando ausência de potencial carcinogênico do híbrido nas condições experimentais utilizadas. De maneira análoga, a literatura demonstra ausência de carcinogenicidade proveniente dos tratamentos com a curcumina e o resveratrol em roedores (TANAKA *et al.*, 1994; SENGOTTUVELAN; NALINI, 2006).

É válido ressaltar que a escolha das doses utilizadas no estudo do cólon foi fundamentada na análise de redução de danos no DNA, pelo ensaio de micronúcleo, em células de sangue periférico de camundongos Swiss. A indução de mutagênese foi realizada por doxorrubicina (2 mg/kg p.c.) em células do sangue simultaneamente ao tratamento com as doses de PQM162 (64, 32, 16 e 8 mg / kg p.c.). Foi observada redução dos danos no DNA em todas as doses testadas (APÊNDICE A).

### 6.1.3 Avaliação do potencial quimiopreventivo no cólon de ratos wistar

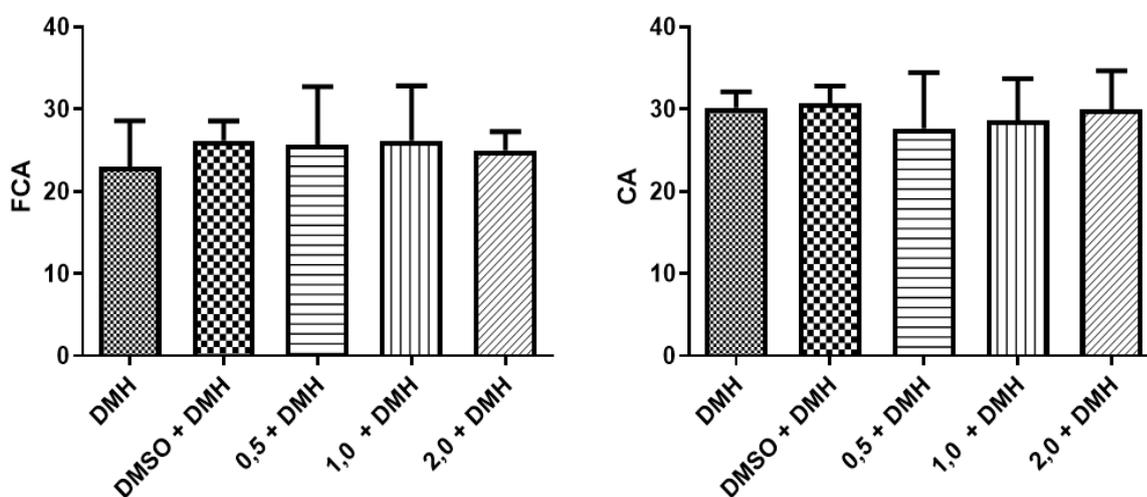
#### 6.1.3.1 Pré-tratamento

A análise referente ao ensaio de FCA foi realizada também na porção distal do intestino, pelo mesmo motivo já supracitado na avaliação do potencial carcinogênico. A Figura 4 apresenta as médias de FCA e CA observadas no cólon distal de ratos Wistar pré-tratados com PQM162. Os resultados demonstraram a presença de criptas aberrantes em todos os tratamentos

que contavam com a administração do DMH, conforme esperado. No entanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada nos grupos tratados com as diferentes doses de PQM162 (0,5, 1,0 e 2,0 mg/kg p.c.) combinadas ao DMH

(40 mg/kg p.c.), demonstrando que o híbrido não possui efeito quimiopreventivo no modelo de pré-tratamento (Figura 4).

Figura 4 - Focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA) observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com PQM162 previamente à indução com DMH.



Fonte: Do autor (2021).

Legenda: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (análise de variância ANOVA e teste de *Tukey*). PQM162: (E) -3- (4-hidroxi-3-metoxifenil)-N'-(4-metoxibenzilideno) acril-hidrazida]; DMSO: Dimetilsulfóxido (0,03g/kg p.c.); DMH: 1,2 Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c). Os valores são média ± desvio padrão.

De maneira geral, existem diferentes estratégias para a prevenção primária no câncer: mudança de estilo de vida, triagens periódicas para detectar lesões iniciais e terapias quimiopreventivas que atuam inibindo ou revertendo o processo de carcinogênese (KRSTIC *et al.*, 2019). Nesse sentido, uma prevenção primária efetiva relaciona-se intimamente com a adoção e com a modificação de hábitos que apresentem certa constância (CHIAVE *et al.*, 2006). De modo a tornar mais compreensível essa ideia, trabalhos envolvendo, por exemplo, a administração do resveratrol e da curcumina, previamente à indução carcinogênica e que apresentam efeitos quimiopreventivos significativos na redução de FCA ou na incidência e no tamanho de tumores colorretais, geralmente envolvem um tempo total de experimentação maior (30 semanas) do que o usado nesse atual estudo. Logo, a quimioprevenção sob o modelo de pré-tratamento, ou seja, que é realizado

previamente à exposição ao agente de risco, espelha-se muito com uma abordagem preventiva primária e, nessa lógica, a cronicidade da prevenção é um fator importante (CUZICK *et al.*, 2020; MCCARTHY *et al.*, 2016; SENGOTTUVELAN; NALINI, 2006; YOUSSEF *et al.*, 2015).

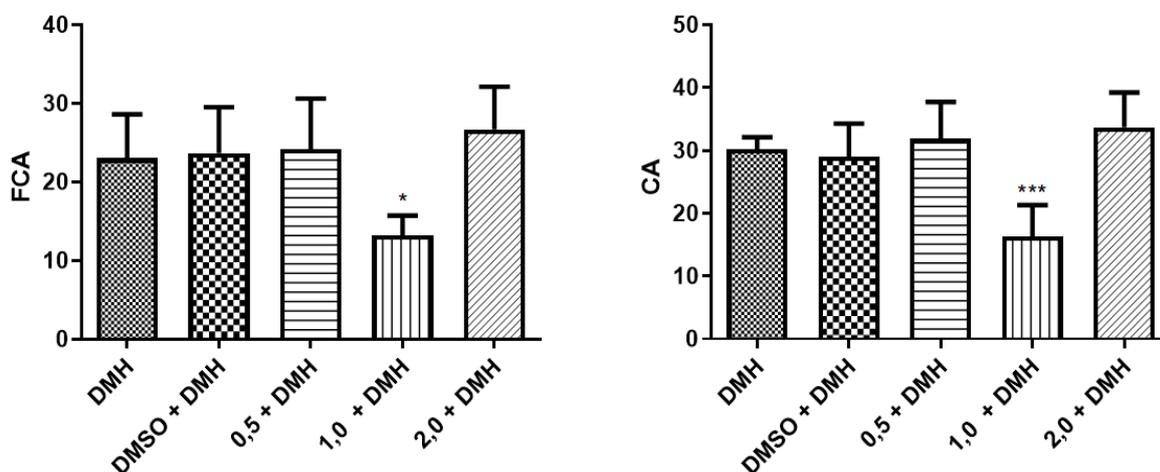
Quando se trata de estudos em humanos, esse seguimento longitudinal, geralmente, é mantido. A título de exemplo, em um ensaio clínico internacional randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, foi realizada a administração de 1 mg/dia de anastrozol (inibidor de aromatase) ou placebo diariamente por 5 anos em 3.864 mulheres pós menopausadas com alto risco de desenvolver câncer de mama, constituindo-se de um longo ensaio de quimioprevenção primária. A quimioprevenção crônica com anastrozol permitiu uma efetiva proteção nesses indivíduos, levando a uma redução de 49% dos casos de câncer de mama entre as mulheres que foram expostas ao agente (CUZICK *et al.*, 2020). Outro exemplo clássico é emprego dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) no tratamento quimiopreventivo, sobretudo, dos tumores colorretais. Outro ensaio randomizado, duplo-cego controlado por placebo demonstrou que o emprego por três anos do AINE Sulindaco associado à difluorometilornitina, em indivíduos que já passaram por um histórico de ressecção de adenomas colorretais, possibilitou uma redução significativa de 95% na recorrência dessas lesões (MEYSKENS *et al.*, 2008).

Assim fundamentado, é possível reconhecer a variável “tempo” como um fator considerável nas respostas biológicas encontradas. Inclusive, o tratamento *in vitro* de células de câncer de cólon humano com curcumina mostra nítidas mudanças dependentes do tempo nos padrões de expressão gênica dessas linhagens, onde algumas classes de genes possuem um perfil de resposta mais precoce que outras e vice-versa. Dessa forma, infere-se, pois, que a escolha do tempo de tratamento e de experimentação influencia consideravelmente nos resultados encontrados, e sua ampliação poderia acarretar em efeitos quimiopreventivos, a nível histológico, nessa estratégia empregada (VAN ERK *et al.*, 2004). Logo, presume-se que a ausência do efeito quimiopreventivo de PQM162 no pré-tratamento esteja relacionada ao tempo de tratamento de 4 semanas, considerado ainda, insuficiente para a detecção do efeito protetor.

### 6.1.3.2 Tratamento simultâneo

A análise histopatológica do cólon dos animais que receberam PQM162 concomitantemente à administração do carcinógeno DMH são apresentados na Figura 5 e revelam uma diminuição estatisticamente significativa no número de FCA e CA na dose de 1,0 mg/kg p.c. quando comparado ao controle positivo DMH (40 mg/kg p.c.). A porcentagem de redução das lesões pré-neoplásicas foi de 42,8% para FCA e 45,8% CA. Não foram encontradas diferenças estatísticas nestes mesmos parâmetros avaliados para os animais que receberam controle solvente (DMSO 0,03g/kg p.c.) e PQM162 (nas doses de 0,5 e 2,0 mg/kg p.c.) associados ao DMH (40 mg/kg p.c.) (Figura 5).

Figura 5 – Focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA) observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com PQM162 simultaneamente à indução com DMH.



Fonte: Do autor (2021).

Legenda: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (análise de variância ANOVA e teste de *Tukey*). PQM162: (E) -3- (4-hidroxi-3-metoxifenil)-N'-(4-metoxibenzilideno) acril-hidrazida]; DMSO: Dimetil sulfóxido (0,03g/kg p.c.); DMH: 1,2 Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c.). Os valores são média ± desvio padrão.

Nossos resultados sugerem que a molécula híbrida PQM162, quando em abordagem de tratamento simultâneo, apresenta uma certa similaridade ao comportamento dito bifásico de dose-resposta — fenômeno descrito na toxicologia como “hormese”. É o caso de moléculas cujos efeitos, decorrentes de baixas doses,

são descritos como estimulatórios ou benéficos, enquanto que altas doses acarretam efeitos inibitórios ou, até mesmo, tóxicos. Estudos recentes demonstram que alguns fitoquímicos fazem parte deste grupo de moléculas e suas atividades quimiopreventivas estão atreladas, principalmente, à ativação de vias de sinalização que resultam no aumento da expressão de genes que codificam proteínas citoprotetoras e enzimas antioxidantes, quando administrados cronicamente e em baixas doses (BAO *et al.*, 2014; CAI *et al.*, 2015). Depreende-se que, neste modelo, a dose de 0,5 mg/kg p.c. pode ser considerada baixa demais para reverter os efeitos deletérios do DMH, enquanto a dose de 1,0 mg/kg p.c., que ainda pode ser considerada uma dose baixa, já é capaz de proteger os animais dos efeitos tóxicos do carcinógeno. Por outro lado, quando se aumenta a dose para 2 mg/kg p.c., esse efeito deixa de ser observado, seguindo um perfil de não linearidade e de comportamento bifásico de dose-resposta. De modo similar, isso também pôde ser observado, por exemplo, com um dos precursores de PQM162, o resveratrol. Quando administrado em camundongos com mutação no gene *APC*, foi observado que a dose menor de resveratrol suprimiu o desenvolvimento dos adenomas intestinais de forma mais potente do que a dose mais alta. Este padrão se mantinha quanto tecidos humanos foram analisados, ou seja, baixas exposições dietéticas ocasionaram um aumento dos efeitos quimiopreventivos. Entre eles, os aumentos da fosforilação de AMPK (*AMP-activated protein kinase*), de autofagia e da expressão da enzima citoprotetora NQO1 (*NAD(P)H quinone dehydrogenase 1*) (CAI *et al.*, 2015). Além disso, quando administrado na dose de 8 mg/kg p.c. por 15 semanas, em um tempo experimental total de 30 semanas e de modo concomitante à indução do DMH, o resveratrol promoveu a redução de aproximadamente 60% dos FCA no tecido colônico de ratos Wistar (SENGOTTUVELAN; NALINI, 2006).

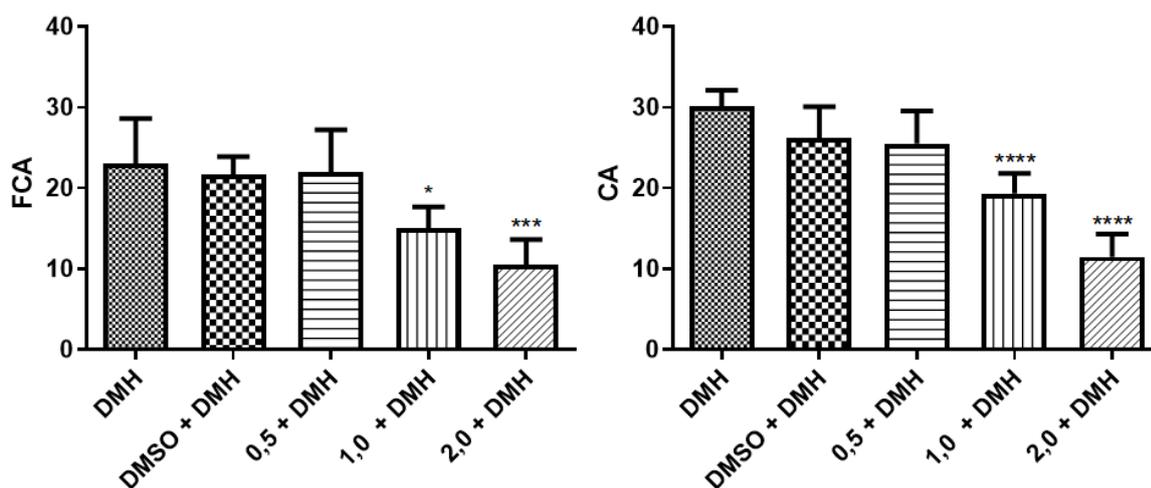
A curcumina, por sua vez, também já exibiu um comportamento bifásico de dose-resposta em diversos modelos biológicos nos estudos de câncer, cardioproteção, neuroproteção e síndromes metabólicas. De modo geral, o principal comportamento descrito se baseia na observação de efeitos potentes em doses mais baixas do que nas maiores doses empregadas e, geralmente, tais efeitos mostram estar relacionados à ativação da via de sinalização das MAPKs ou à indução de atividade antioxidante (MOGHADDAM *et al.*, 2019). No ensaio de FCA, a curcumina a 0,005% já demonstrou uma porcentagem de redução dos FCA em aproximadamente 35%, ao ser administrada simultaneamente com azoximetano

(AOM), em 6 semanas de experimentação (LAI *et al.*, 2011).

### 6.1.3.3 Pós-tratamento

Observou-se que PQM162, no modelo de pós-tratamento, foi capaz de reduzir significativamente o número de CA quando administrado na dose de 1,0 mg/kg p.c., bem como o número de FCA e CA na dose de 2,0 mg/kg p.c. Os dados acerca do modelo de pós-tratamento são apresentados na Figura 6 e permitem constatar uma redução na frequência de CA de 35,9% e 61,87% nas doses de 1,0 e 2,0 mg/kg p.c., respectivamente. Além disso, para a dose de 2,0 mg/kg p.c., uma redução de 54,35% foi observada na frequência de FCA. Não foram encontradas diferenças estatísticas nestes mesmos parâmetros avaliados para os animais que receberam controle solvente (DMSO 0,03g/kg p.c.) e PQM162 (na dose de 0,5mg/kg p.c.) associados ao DMH (40 mg/kg p.c.) (Figura 6).

Figura 6 - Focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA) observadas no cólon distal de ratos Wistar tratados com PQM162 após à indução com DMH.



Fonte: Do autor (2021).

Legenda: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (análise de variância ANOVA e teste de Tukey) PQM162: (E) -3- (4-hidroxi-3-metoxifenil)-N'-(4-metoxibenzilideno) acril-hidrazida]; DMSO: Dimetil sulfóxido (0,03g/kg p.c.); DMH: 1,2 Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c.). Os valores são média  $\pm$  desvio padrão.

Já foram obtidos achados similares ao se administrar o pó de ginseng coreano vermelho, proveniente da planta *Panax quinquefolium* L. (planta rica em fitoquímicos bioativos), após o estabelecimento dos FCA no cólon de ratos 10 F344. O modelo de pós-tratamento demonstrou uma redução significativa no FCA na dose de 0,5 mg/kg p.c. e, mais intensamente, na dose de 2 mg/kg p.c. Além disso, é intrigante a similaridade encontrada, também, no tratamento simultâneo. Quando o pó de ginseng foi administrado durante a fase de iniciação da carcinogênese, isto é, concomitantemente à exposição ao carcinógeno, foi encontrada uma inibição modesta de FCA apenas na menor dose (0,5 mg/kg p.c.) (SZCZUKA *et al.*, 2019; WARGOVICH, 2001).

Sengottuvelan e Nalini (2006) demonstraram, em um modelo experimental total de 30 semanas, que a administração do resveratrol, posteriormente à indução do dano, é mais favorável que a administração da mesma dose (8 mg/kg p.c.) no modelo de pré-tratamento. A diferença se mostra na porcentagem de incidência dos tumores colorretais. O controle positivo apresentou uma média de incidência de tumores de 87%, enquanto os grupos recebendo o resveratrol anteriormente e posteriormente ao DMH apresentaram uma incidência de 56% e 44%, respectivamente. Essa correspondência nos perfis de dose-resposta entre substâncias de origem natural encontrada sugere, pois, uma modulação de efeito dependente da abordagem de tratamento administrada; o que pode vir a influenciar, substancialmente, na forma como essas substâncias poderão ser aplicadas futuramente como agentes quimiopreventivos e/ou quimioterapêuticos do câncer. Esses achados da literatura corroboram com nossos resultados para as diferentes abordagens utilizadas, uma vez que encontramos efeito mais pronunciado no modelo de pós-tratamento.

#### **6.1.4 Estudo dos alvos de quimioprevenção**

##### **6.1.4.1 Análise da expressão gênica**

A fim de investigar os mecanismos que possam estar envolvidos na atividade quimiopreventiva apresentada por PQM162, o presente trabalho selecionou sete genes com relevância nas diferentes etapas da carcinogênese colorretal (*APC*, *KRAS*, *TP53*, *DNMT*, *NRF2*, *COX-2* e *TNF- $\alpha$* ). A abundância relativa do RNAm foi avaliada apenas nas abordagens de pós-tratamento e tratamento simultâneo, em decorrência

dos efeitos quimiopreventivos encontrados nestes modelos. Em concordância com os resultados de redução na frequência de CA e FCA (Figuras 5 e 6), foram selecionadas as doses de 1,0 e 2,0 mg/kg p.c. de PQM162, na estratégia de pós-tratamento, para a avaliação da expressão gênica. Já para o tratamento simultâneo, além da dose de 1,0 mg/kg p.c., responsável pelos efeitos quimiopreventivos até então encontrados, foi incluída também na análise a dose de 0,5 mg/kg p.c. Apesar de não terem sido encontradas alterações a nível histológico, essa escolha foi tomada como base no fenômeno de hormese que algumas moléculas quimiopreventivas apresentam. Nessa lógica, a ideia foi avaliar se já haveria alguma modulação na expressão gênica, mas que ainda não fosse suficiente para refletir em efeitos quimiopreventivos a nível histológico no cólon (BAO *et al.*, 2014; CAI *et al.*, 2015).

Os resultados da análise da expressão gênica são apresentados nas figuras 7 e 8. Para ambos os modelos de tratamentos investigados, a análise de expressão gênica apresentou diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de controle negativo (sem tratamento) e os animais que receberam somente DMH (40 mg/kg p.c.) na avaliação dos genes *APC*, *COX-2*, *NRF2* e *TNF- $\alpha$*  (Figura 8). Para os genes *KRAS*, *DNMT1* e *TP53*, diferenças entre o controle negativo e positivo não foram encontradas (Figura 7).

É bem estabelecido que a carcinogênese do cólon é um processo que envolve múltiplas etapas, principalmente, mutações nos genes *APC*, *KRAS* e *TP53*. Enquanto mutações em *APC* e *KRAS* são eventos iniciais sequenciais na carcinogênese, alterações em *TP53* estão envolvidas em estágios mais tardios. Assim, a aquisição de mutações se dá, primeiramente, no gene *APC*, seguida da mutação ativacional em *KRAS* que, juntas, promovem a progressão tumoral e, então, subsequentemente, ocorre a inativação no gene supressor de tumor *TP53* (ALRAWI *et al.*, 2006; TARIQ; GHIAS, 2016). Tendo esses eventos consecutivos em mente, os resultados de expressão gênica encontrados em ambos os modelos de tratamento, para esses três genes (Figura 7), confirmam que o modelo de indução de danos da carcinogênese colorretal, utilizado neste atual trabalho, promoveu a indução de lesões em estágios iniciais. Diante disso, portanto, à medida que o estágio do tumor avança, o perfil genético se altera (MUNTEANU; MASTALIER, 2014). O que explicaria, também, a ausência de diferença estatística encontrada entre o controle negativo (em tratamento) e positivo (DMH 40 mg/kg p.c.) na análise de expressão do gene *DNMT1*,

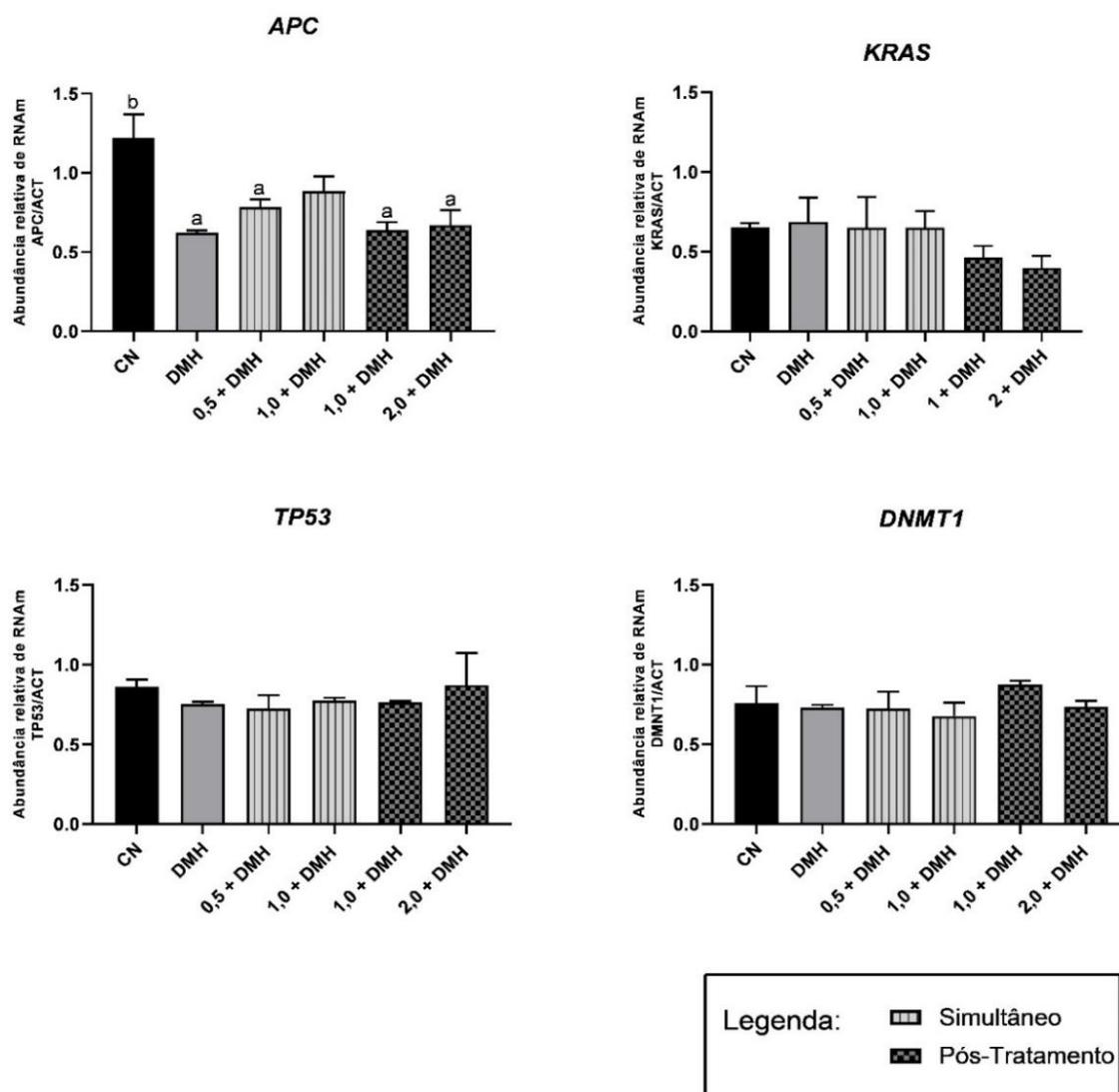
uma vez que a tradução da enzima DNA metiltransferase aumenta progressivamente junto ao estágio tumoral (MIZUNO *et al.*, 2001).

Na abordagem de tratamento simultâneo, os animais que receberam DMH e foram tratados com as doses de 0,5 e 1,0 mg/kg p.c. apresentaram uma redução de 82,24% e 89% na expressão de *TNF- $\alpha$* , respectivamente. Além disso, ambas as doses administradas, acarretaram uma redução de aproximadamente 50% e um aumento de 119% na expressão dos genes *COX-2* e *NRF2*, na devida ordem (Figura 8). Além dessas modulações gênicas observadas, é digna de percepção uma tendência de aumento da expressão dos transcritos que codificam para APC, embora nenhuma diferença estatística tenha sido encontrada. Essa tendência permite demonstrar que vias de sinalização podem estar sendo moduladas mas que, devido ao modelo e às doses utilizados, não puderam ser completamente ativadas (Figura 7).

No que diz respeito ao pós-tratamento, os resultados obtidos foram similares aos efeitos encontrados no tratamento simultâneo. Para a análise de *TNF- $\alpha$* , encontrou-se uma porcentagem média de redução da abundância relativa de RNAm de 93,35% e de 99,46% nos animais que receberam PQM162, posteriormente à indução com DMH (40 mg/kg p.c.) nas doses de 1,0 mg/kg p.c. e 2,0 mg/kg p.c., respectivamente. Ambas as doses acarretaram, também, uma redução de aproximadamente 62% na expressão de *COX-2*, e um significativo efeito antioxidante ao proporcionar um aumento de cerca de 181% e de 226% na expressão de *NRF2* nas doses de 1,0 e 2,0 mg/kg p.c., respectivamente, quando comparados ao tratamento com o controle positivo (DMH 40 mg/kg p.c.). Para o gene *APC*, novamente, nenhuma diferença significativa foi encontrada neste modelo (Figura 8).

Para uma análise comparativa mais apurada entre as estratégias de tratamento (simultâneo *versus* pós-tratamento), utilizou-se a estatística de um modelo aninhado misto com análise de variância através do método de *Satterthwaite*. Através dessa, observou-se uma diferença significativa ( $p < 0,001$ ) no modelo de pós-tratamento em relação ao simultâneo na análise do gene *KRAS*, embora nenhuma diferença estatística tenha sido encontrada nos grupos de tratamento desse modelo (Figura 7). O pós-tratamento também apresentou um efeito mais potente na modulação dos genes *NRF2* ( $p < 0,0001$ ) e *TNF- $\alpha$*  ( $p < 0,05$ ) em relação ao simultâneo.

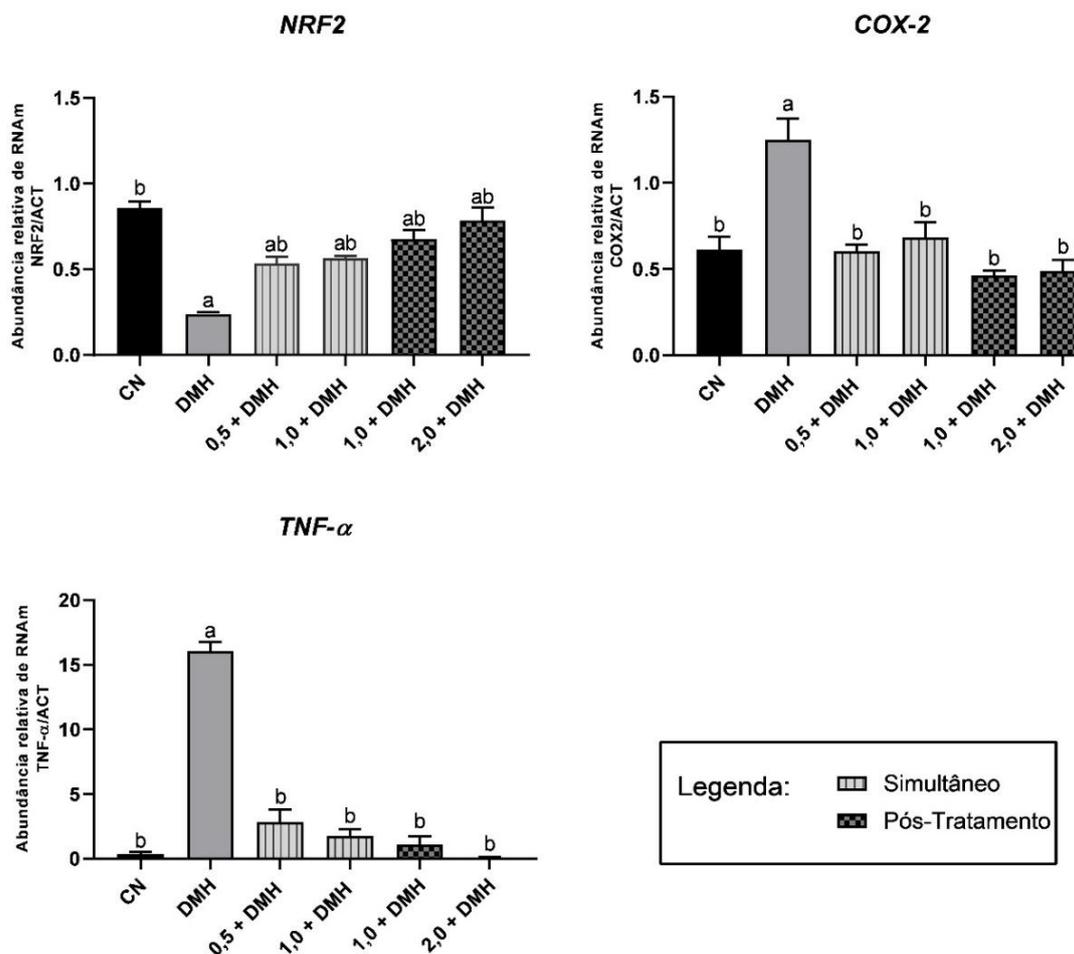
Figura 7 - Abundância relativa dos transcritos que codificam para APC, KRAS, P53 e DNMT1 em ratos Wistar tratados com PQM162 nos modelos de tratamento simultâneo e pós-tratamento.



Fonte: Do autor (2021).

Legenda: Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. A quantificação relativa do RNAm foi determinada pelo método de  $\Delta\Delta Ct$  e normalizada pelo gene constitutivo ACTB. As barras com diferentes letras indicam valores significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ), sendo "a" diferente do controle negativo (CN) e "b" diferente do controle positivo (DMH). Foi encontrada diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os modelos de tratamento apenas na análise do gene *KRAS*. Os dados foram obtidos de pelo menos duas réplicas para grupo experimental. *ACTB*:  $\beta$ -actin; *APC*: adenomatous polyposis coli; *KRAS*: *Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*; *DNMT1*: DNA methyltransferase 1; *TP53*: tumor suppressor p53; CN: controle negativo; DMH: 1,2 Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c); PQM162: (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-N'-(4-metoxibenzilideno) acril-hidrazida].

Figura 8 - Abundância dos transcritos que codificam para NRF2, COX-2 e TNF- $\alpha$  em ratos Wistar tratados com PQM162 nos modelos de tratamento simultâneo e pós-tratamento.



Fonte: Do autor (2021).

Legenda: Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. A quantificação relativa do RNAm foi determinada pelo método de  $\Delta\Delta Ct$  e normalizada pelo gene constitutivo ACTB. As barras com diferentes letras indicam valores significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ), sendo "a" diferente do controle negativo (CN) e "b" diferente do controle positivo (DMH). Os dados foram obtidos de menos duas réplicas para grupo experimental. Foi encontrada diferença estatística entre os modelos de tratamento para as análises de NRF2 ( $p < 0,0001$ ) e TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ). ACTB:  $\beta$ -actin; NRF2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; COX-2: cyclooxygenase-2; TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha; CN: controle negativo; DMH: 1,2 Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c); PQM162: (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-N'-(4-metoxibenzilideno) acril-hidrazida].

Assim, de modo geral, os dados de expressão gênica sugerem que PQM162 atua como um agente quimiopreventivo com efeito anti-inflamatório e antioxidante. Isso se sustenta pelas reduções estatisticamente significativas encontradas na expressão dos genes *TNF- $\alpha$*  e *COX-2*, bem como pelo aumento da expressão do gene *NRF2* em animais que receberam PQM162 combinado ao tratamento com o carcinógeno DMH (40 mg/k.g p.c.) (Figura 8).

No desenvolvimento da carcinogênese do cólon, processos relacionados à inflamação se mostram envolvidos tanto em humanos, quanto em outros estudos que utilizam modelos animais e que realizam a indução do CCR com DMH ou, com seu metabólito ativo, AOM. Nesses casos, também é observada uma expressão aumentada nos níveis dos transcritos que codificam para *TNF- $\alpha$* , bem como para iNOS (“*Nitric oxide synthases*”), *COX-2* e outras citocinas inflamatórias (HAMIZA *et al.*, 2012; PERŠE; CERAR, 2010).

De fato, a inflamação crônica tem sido associada ao desenvolvimento tumoral desde o achado de leucócitos em tecidos neoplásicos, há mais de 130 anos. Hoje, sabe-se que a inflamação não só está envolvida com a promoção tumoral, mas, estudos epidemiológicos sugerem que até 25% de todos os cânceres podem ser causados pela sua cronicidade (DE SÁ COUTINHO *et al.*, 2018; SETHI *et al.*, 2008). Nessa perspectiva, o *TNF- $\alpha$*  atua como um dos principais mediadores da inflamação e, portanto, age como um promotor endógeno do tumor. Suas atividades biológicas têm sido associadas a várias etapas da carcinogênese e a vários perfis de malignidade celular, tais como transformação celular, promoção, sobrevivência, proliferação, invasão, angiogênese e metástase, o que o torna um potente alvo terapêutico (LAN; CHEN; WEI, 2021; SETHI *et al.*, 2008). Dessa mesma forma, a superexpressão de *COX-2*, elemento chave para desencadear a resposta inflamatória por meio da síntese de prostanóides, contribui para a modulação de diversos efeitos pró-carcinogênicos. Além de atuar na promoção da carcinogênese, o aumento na expressão dessa enzima está associado ao aumento na taxa de recorrência do câncer, à redução da sobrevivência de pacientes, e à resistência das células cancerosas à quimioterapia e radioterapia (CHEN, 2010; HASHEMI GORADEL *et al.*, 2019).

Um dos eventos que promove o elo entre o processo inflamatório e o câncer é a liberação e o acúmulo de radicais livres por leucócitos no local de dano, o que proporciona o estresse oxidativo e reduz a capacidade antioxidante celular. Essas espécies reativas, por sua vez, são carcinógenos em potencial que causam danos

biomoleculares significativos, contribuindo, ainda, na intensificação da inflamação por ativar vias de sinalização intracelular que aumentam a expressão de genes pró-inflamatórios (CHATTERJEE, 2016; SESTI *et al.*, 2012; WAL *et al.*, 2019).

Tendo em vista o papel desses radicais na fisiopatologia do câncer, o organismo é, então, equipado com mecanismos de regulação da homeostase redox, onde se destaca a mediação pelo regulador transcricional NRF2. Sua ativação representa um importante alvo na prevenção de danos celulares por aliviar também o estresse oxidativo associado à inflamação (HE; ANTONUCCI; KARIN. 2020). Aliás, é importante mencionar aqui que já foi demonstrado, em células HepG2, que a abundância da proteína Keap1, responsável por marcar o NRF2 por ubiquitinação para degradação via proteassoma, é regulada positivamente por estimulação inflamatória mediada por TNF- $\alpha$ . Sendo assim, estudos mostram que a deficiência de NRF2, em roedores, aumenta ainda mais a susceptibilidade à carcinogênese do cólon induzida por estresse oxidativo (REN *et al.*, 2019; YOKOO *et al.*, 2016).

Os efeitos antioxidante e anti-inflamatório de PQM162 encontrados neste trabalho também podem ser correlacionados aos efeitos observados em seus precursores. Ren e colaboradores (2019) demonstraram que a curcumina inibe a expressão da proteína Keap1 e promove a ativação do sistema NRF2 por meio de sua atividade anti-inflamatória, cujos alvos incluem TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, COX-2, IL-1 e IL-6 (EPSTEIN; SANDERSON; MACDONALD, 2010; REN *et al.*, 2019). Analogamente, a modulação de genes envolvidos na homeostase redox é vista também, em estudos com o resveratrol. Em modelo animal utilizando o AOM como indutor de danos da carcinogênese colorretal, o resveratrol preveniu o aparecimento dos tumores através da ativação da via NRF2/HO-1, promovendo, também, um declínio na expressão de iNOS, COX-2 e aldose-redutase, enquanto a expressão da enzima antioxidante glutationa redutase foi aumentada. Estudos complementares a esse evidenciaram o impacto antioxidante e anti-inflamatório do resveratrol em granulócitos, monócitos e macrófagos humanos induzidos com acetato de formol miristato ou lipopolissacarídeo (LPS). O resveratrol implicou em um potente efeito anti-inflamatório através, também, da ativação de NRF2. Como resultados, o dano oxidativo foi inibido e a expressão de NO, iNOS, miR-146a, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , COX-2 e prostaglandina E2 foi suprimida. Interessantemente, além dos efeitos quimiopreventivos, o resveratrol já demonstrou atuar como um agente sensibilizante de células resistentes ao quimioterápico

adriamicina *in vitro*, por meio da ativação de PI3K/Akt/NRF2 (FARKHONDEH *et al.*, 2020).

É válido destacar, ainda, que o indutor de danos utilizado neste trabalho, após uma série de reações de biotransformação e ativação metabólica, é transportado até o cólon onde promove a produção de radicais livres. Esses, somados à atividade mutagênica do DMH, que ocorre através da metilação da guanina no DNA na posição N-7, promovem a formação de FCA e processos inflamatórios intestinais nos animais tratados, desencadeando, assim, o desenvolvimento da carcinogênese do cólon a longo prazo (COSTA-CASAGRANDE, 2018; DE-SOUZA; VENKATACHALAM *et al.*, 2020). Portanto, os resultados obtidos pela análise da expressão gênica sugerem, também, que PQM162 reverte os efeitos deletérios desse carcinógeno.

#### 6.1.4.2 Imunohistoquímica

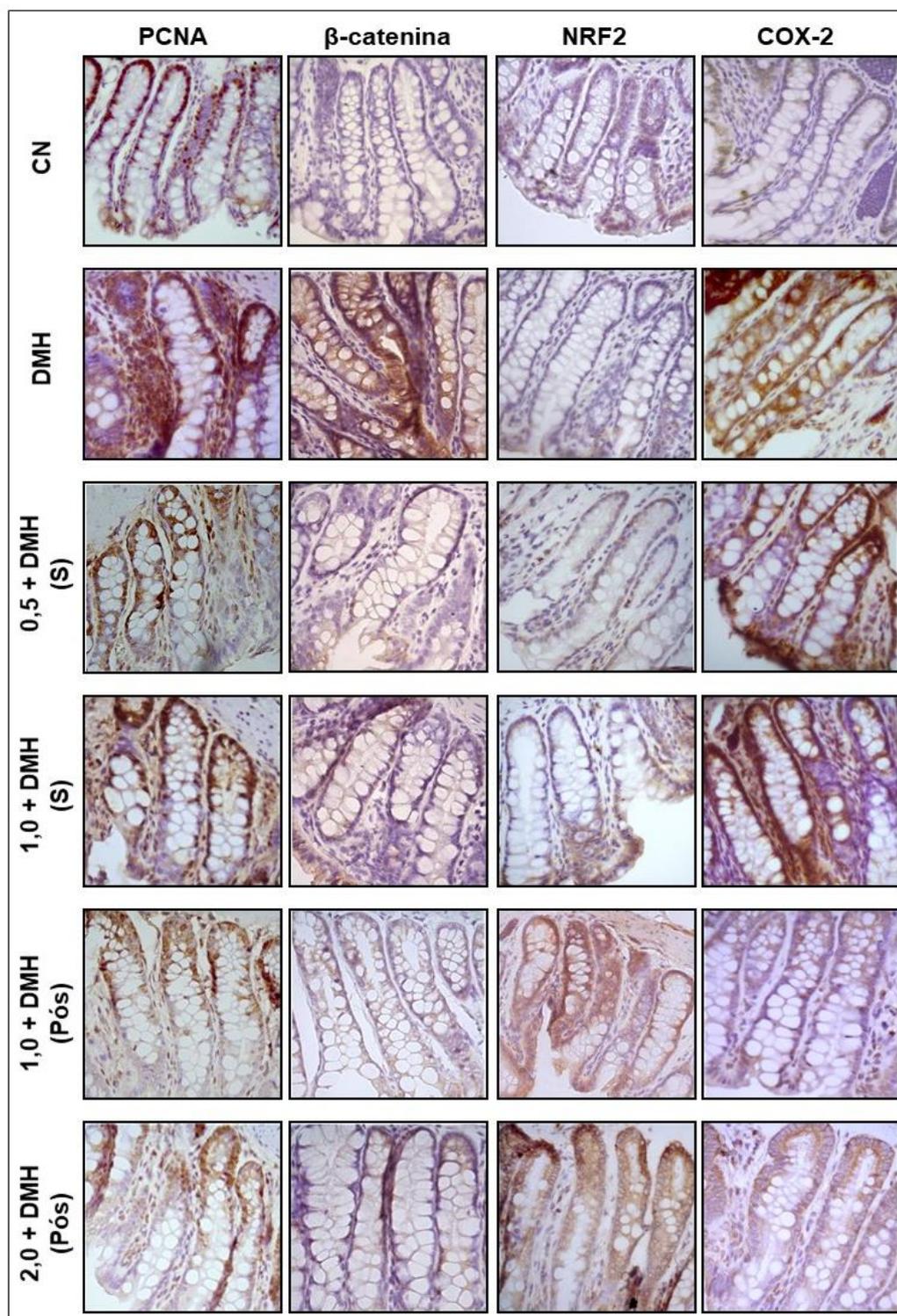
A expressão dos marcadores PCNA,  $\beta$ -catenina, NRF2 e COX-2 foi avaliada através da deconvolução das imagens capturadas, provenientes dos cortes do tecido colorretal parafinizado (Figura 9). A análise semi-quantitativa da expressão proteica confirmou os achados do ensaio de RT-PCR em tempo real para os genes *NRF2* e *COX-2*, sustentando, pois, o mecanismo de ação anti-inflamatória e antioxidante de PQM162 na abordagem de pós-tratamento. Nessa abordagem, a expressão do regulador transcricional apresentou um aumento de aproximadamente 867% em relação ao controle positivo (DMH 40 mg/kg p.c.), em ambas as doses empregadas (1,0 e 2,0 mg/kg p.c.). E a expressão da enzima pró-inflamatória, por sua vez, decaiu em torno de 54% (Figura 10). No tratamento simultâneo, não foram encontradas diferenças significativas para ambos os marcadores, embora observa-se uma tendência de aumento dose-dependente na expressão de NRF2.

É intrigante a influência da abordagem de tratamento nas respostas encontradas, em especial, na expressão de COX-2. A mesma dose administrada (1,0 mg/kg p.c.), quando sob estratégia de tratamento simultâneo, não acarreta em diminuição da expressão dessa enzima. Por outro lado, se administrada após a indução com DMH, efeitos moduladores na expressão proteica são observados. Estudos têm mostrado que um aumento na expressão de COX-2 foi encontrado em pólipos iniciais de camundongos contendo mutações no gene *APC*, o que sugere que o aumento da proporção da expressão de COX-2 pode ser um evento inicial na

carcinogênese colorretal. Dessa forma, o potencial de inibição da expressão de COX-2 por PQM162, no tratamento simultâneo, pode ter sido superado pela produção intrínseca de COX-2 nos processos iniciais da carcinogênese induzida por DMH, uma vez que as exposições ao carcinógeno e ao híbrido foram realizadas concomitantemente (MAEKAWA *et al.*, 1998).

Além disso, uma das principais reações do organismo aos agentes químicos incorporados é a reação inflamatória. Nesse sentido, a enzima COX catalisa a oxidação de uma ampla gama de materiais biológicos, incluindo várias classes de carcinógenos químicos. Em tese, isso justificaria, ainda, a possível potencialização do efeito carcinogênico do DMH, o que excederia ainda mais o potencial efeito inibitório de PQM162, dependendo do momento em que este fosse administrado. Assim, no esquema de pós tratamento, pressupõe-se que o híbrido pode ter sido capaz de reduzir a expressão da COX-2 pelo possível motivo de ter sido administrado na ausência de estímulos carcinogênicos (DMH) diretos e na agudização do processo inflamatório (EMMENDOERFFER *et al.*, 2000; MAEKAWA *et al.*, 1998).

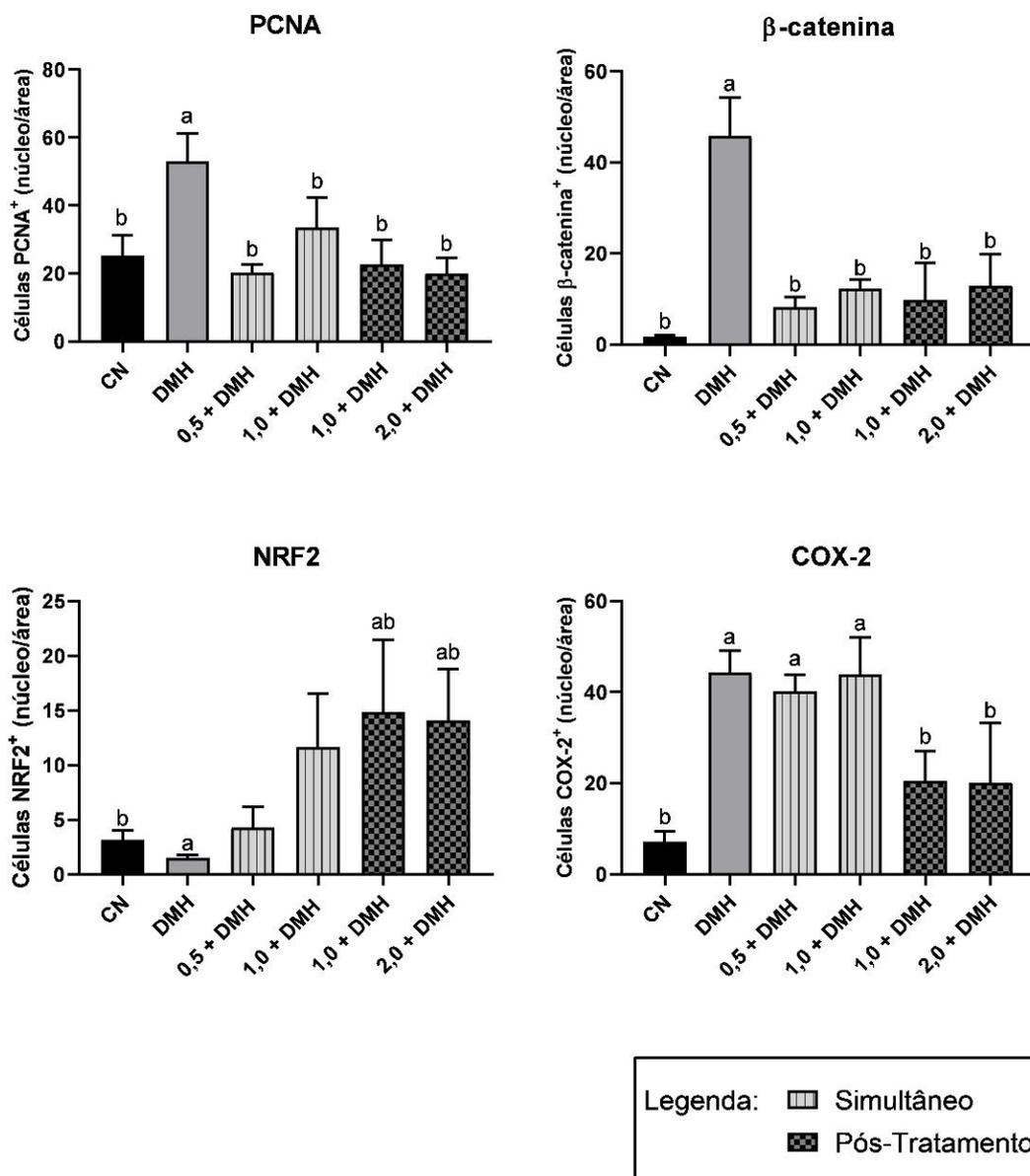
Figura 9 - Fotomicrografias do tecido colorretal parafinizado de ratos Wistar tratados com PQM162 no modelo de tratamento simultâneo (S) e pós-tratamento (Pós).



Fonte: Do autor (2021).

Legenda: Aumento total 400x. A positividade da reação imunohistoquímica é evidenciada pela marcação por diaminobenzidina (de coloração marrom). PCNA: *Proliferating-cell nuclear antigen*; NRF2: *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*; COX-2: *cyclooxygenase-2*; CN: controle negativo; DMH: 1,2 Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c); PQM162: (E) -3- (4-hidroxi-3-metoxifenil)-N'-(4-metoxibenzilideno) acril-hidrazida)].

Figura 10 - Análise semi-quantitativa da expressão de PCNA,  $\beta$ -catenina, NRF2 e COX-2 no tecido colorretal parafinizado de ratos Wistar tratados com PQM162 no modelo de tratamento simultâneo e pós-tratamento.



Fonte: Do autor (2021).

Legenda: Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. As barras com diferentes letras indicam valores significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ), sendo "a" diferente do controle negativo (CN) e "b" diferente do controle positivo (DMH). Os dados foram obtidos de pelo menos duas réplicas para grupo experimental. Foi encontrada diferença estatística entre os modelos de tratamento para as análises de PCNA ( $p < 0,0001$ ),  $\beta$ -catenina ( $p < 0,0001$ ), NRF2 ( $p < 0,05$ ) e COX-2 ( $p < 0,0001$ ). PCNA: Proliferating-cell nuclear antigen; NRF2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; COX-2: cyclooxygenase-2; CN: controle negativo; DMH: 1,2 Dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c); PQM162: (E) -3- (4-hidroxi-3-metoxifenil)-N'-(4-metoxibenzilideno) acril-hidrazida].

Outra observação digna de nota é a discrepância encontrada entre a abundância relativa de RNAm de COX-2 e sua expressão proteica. Enquanto PQM162 demonstrou reduzir a expressão do marcador em ambos os ensaios no pós-tratamento, no tratamento simultâneo a redução foi observada apenas a nível transcricional.

Está bem documentado que a expressão gênica é regulada por variados mecanismos, os quais contribuem com a garantia de comportamentos celulares bem coordenados (POPE; MEDZHITOV, 2018). Dentre tais mecanismos, destaca-se o papel dos microRNAs (miRNAs) como reguladores importantes da expressão gênica a nível pós-transcricional, afetando a estabilidade de transcritos alvos e/ou inibindo o processo de tradução (MICHLEWSKI; CÁCERES, 2019). Nesse seguimento, assume-se que a expressão de COX-2 também pode ser regulada por miRNAs. Inclusive, estudos apontam para dois miRNAs, miR-101a e miR-199a, os quais estão associados a uma maior expressão de COX-2 (SLATTERY *et al.*, 2017).

Interessantemente, outros estudos têm demonstrado que elementos da dieta e estilo de vida regulam os níveis de miRNAs, onde incluem-se os usos de AINEs e, até mesmo, de curcumina e resveratrol. A curcumina já demonstrou exercer efeitos regulatórios epigenéticos em RNAs não codificantes em vários tipos de câncer, bem como já demonstrou mediar a sensibilização de células de carcinoma de cólon ao 5-FU através da regulação de miR-429, miR-200b, miR 200c, miR 141 e miR 101. Similarmente, o resveratrol também já demonstrou atuar a nível pós-transcricional, ao atenuar a expressão de genes pró-inflamatórios em células humanas e murinas (BOLLMANN *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2019; SLATTERY *et al.*, 2017).

Essas descobertas fornecem uma nova visão molecular sobre a modulação de COX-2 a nível pós-transcricional e fortalecem a observação de que miRNAs estão altamente implicados no controle da expressão gênica (STRILLACCI *et al.*, 2009). Dito isso, e considerando a influência já descrita dos precursores de PQM162 na regulação pós-transcricional, torna-se válido considerar uma possível regulação, também a este nível, por parte da molécula híbrida. Essa regulação hipotética por PQM162 em miRNAs poderia ser dependente da abordagem administrada, de modo que promovesse a desestabilização do RNAm de COX-2 no pós-tratamento, mas não no tratamento simultâneo. Assim, estudos futuros podem ser fomentados com o objetivo de se investigar novos alvos de atuação dessa molécula, uma vez que ela tem

demonstrado possuir grandes potencialidades no tocante a quimioprevenção do câncer colorretal.

A análise semi-quantitativa da expressão de  $\beta$ -catenina apresentou uma redução média de aproximadamente 76,4%, ao se considerar as respostas de PQM162 tanto no tratamento simultâneo, quanto no pós-tratamento, ambos em relação ao controle positivo (DMH 40 mg/kg p.c.). Apesar da resposta semelhante em ambas as estratégias de tratamento, desfrutando-se da sensibilidade estatística do mesmo modelo aninhado misto utilizado na análise da técnica de RT-PCR, foi possível observar uma diferença significativa entre as abordagens de tratamento administradas, de modo que a redução da expressão proteica se mostrou mais potente no pós-tratamento ( $p < 0,001$ ). Foi semelhante o perfil observado para PCNA, cuja redução média de expressão foi de aproximadamente 55% em ambos os modelos de tratamento, muito embora, através da análise estatística mais apurada, também se encontrou uma redução mais intensa no pós-tratamento ( $p < 0,001$ ).

A via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina exerce um papel fundamental na regulação de diversos processos fisiológicos como embriogênese, organogênese e homeostase tecidual. Ainda que desempenhe uma função durante o desenvolvimento, o controle adequado dessa via, sobretudo em células diferenciadas, é primordial para a manutenção de uma atividade celular normal. Para que isso ocorra, na ausência de estímulo Wnt, a  $\beta$ -catenina é preservada a níveis baixos pela sua interação com o complexo de degradação APC/Axina/CK1 (“*Casein kinase I*”) /GSK-3 $\beta$  (“*Glycogen synthase kinase 3 beta*”). Por outro lado, quando a via Wnt é ativada, a  $\beta$ -catenina transloca-se para o núcleo celular e atua como fator de transcrição na expressão de diversos genes-alvo, como os protooncogenes *c-Myc*, *Ciclina D-1* e *PCNA*. Assim, a estabilização dos níveis de  $\beta$ -catenina é crítica na tumorigênese, e o aumento na sua expressão pode ser determinado por mutações no gene e anormalidades no complexo de destruição da  $\beta$ -catenina, mutações em *APC* ou superexpressão de ligantes Wnt. Dito isso, fica claro o motivo pelo qual a ativação anormal da via Wnt/ $\beta$ -catenina é um evento relatado com frequência na predisposição de vários tipos de câncer. Inclusive, o acúmulo nuclear de  $\beta$ -catenina pode ser observado em 80% dos carcinomas colorretais (KESTLER; KÜHL, 2011; SHANG; HUA; HU, 2017; TACIAK *et al.*, 2018).

O *PCNA*, gene-alvo do fator de transcrição  $\beta$ -catenina, traduz um fator essencial na replicação do DNA (KESTLER; KÜHL, 2011). A princípio, foi isolado como uma proteína bastante abundante durante a fase S do ciclo celular, e com níveis

baixíssimos em células quiescentes e senescentes (KELMAN, 1997). Hoje, já é bem documentado seu papel no processo de replicação do material genético. Além de atuar como braçadeira deslizante, ao formar um anel homotrimétrico à volta do DNA para ancorar as DNAs polimerases, a proteína PCNA também já foi identificada como um regulador central do ciclo celular, controlando o processo de transição da fase G1 para a fase M e promovendo a degradação dos inibidores de CDK, como p21 e Xic1 (CHOE; MOLDOVAN, 2017; GONZÁLEZ-MAGAÑA; BLANCO, 2020; ZHOU *et al.*, 2018).

Assim, ambos os marcadores estudados por este trabalho não só estão associados com o baixo prognóstico em pacientes com câncer colorretal, como têm sido grandes obstáculos na radioterapia para o câncer, de maneira geral. Em resposta ao dano no DNA promovido pela radioterapia, a proteína PAF (“*PCNA-associated factor*”) se desassocia do PCNA, ao qual mantém interação, se liga à  $\beta$ -catenina e recruta a proteína EZH2 (“*enhancer of zeste homolog 2*”), formando o complexo transcricional PAF-EZH2- $\beta$ -catenina, hiperativando a via de sinalização Wnt e protegendo as células tumorais dos danos induzidos pela radiação. Assim, um inibidor dos componentes da via Wnt/  $\beta$ -catenina, como o híbrido PQM162, representa um forte candidato na terapêutica do câncer, em especial, na superação da radorresistência (MOJARAD *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2018).

O resveratrol e a curcumina já apresentaram efeitos em ambos marcadores em modelos de estudo de diversos tipos tumorais, o que poderia justificar os efeitos quimiopreventivos encontrados por este trabalho. Em células de carcinoma colorretal humano, o resveratrol induziu efeitos inibitórios nos processos de proliferação, migração e invasão através do aumento dos níveis citoplasmáticos de  $\beta$ -catenina e, conseqüente, redução dos níveis nucleares. Conjuntamente, a expressão dos genes *c-Myc* e *MMP-7* (“*Matrix metalloproteinase 7*”) também foi reduzida. Em células de carcinoma nasofaríngeo humano, a atividade proliferativa foi modulada pela redução da expressão de PCNA e Ki67, e a morte celular foi induzida pela modulação dos níveis das caspases clivadas 3 e 9. Ademais, usando a imunorreatividade de PCNA como marcador de capacidade proliferativa, o tratamento combinado de resveratrol e 5-FU apresentou efeito sinérgico ao sensibilizar células de colangiocarcinoma ao quimioterápico (FRAMPTOM *et al.*, 2010; JI *et al.*, 2013; XIONG *et al.*, 2019). Similarmente, a curcumina já inibiu o crescimento de linhagens de carcinoma de pulmão de células não pequenas e de tumores induzidos em animais com células de

leucemia monocítica humana através da inibição da via Wnt/  $\beta$ -catenina e da expressão de PCNA, respectivamente. Nas células de câncer de pulmão, aliados à atividade antiproliferativa, níveis de espécies reativas de oxigênio intracelulares foram reduzidos e a atividade da superóxido dismutase e da glutamato cisteína ligase foram aumentadas, demonstrando, também, efeito em vias de atividade antioxidante (WANG *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2020). É interessante mencionar ainda, uma vez que já foi especulado o plausível efeito de PQM162 sobre a regulação da expressão de miRNAs, que a curcumina regula positivamente, em células de câncer de próstata, a expressão do miR-34a — um miRNA supressor de tumor —, juntamente com a regulação negativa da expressão de *PCNA*, *Ciclina D-1*,  $\beta$ -catenina, e c-Myc (ZHU *et al.*, 2019).

Isto posto, os achados deste trabalho apontam para uma molécula com efeitos quimiopreventivos promissores capazes de reduzir o processo inflamatório, o estresse oxidativo e a proliferação celular desencadeados durante a iniciação da carcinogênese colorretal, mediante a modulação dos genes e proteínas envolvidos nos mecanismos supracitados, quando administrada, principalmente, sob a estratégia pós-lesão. A modulação encontrada é justificada pelas atividades de seus precursores e pela proposta de síntese da molécula, que considerou conservar as subunidades estruturais farmacofóricas do resveratrol e da curcumina de modo a almejar que os efeitos biológicos de ambas substâncias pudessem ser expressos conjuntamente. Além disso, espera-se que com a inserção da fração N-acilhidrazona, a qual apresenta propriedades doadoras e aceptoras de ligação de hidrogênio, se tenha obtido um ganho na solubilidade e, conseqüentemente, nas propriedades farmacocinéticas de PQM162. Isso porque a interação molecular com moléculas carreadoras e com macromoléculas nos sítios-alvo se facilitaria, superando, dessa forma, os principais contratempos envolvidos na administração de seus precursores isolados (DE FREITAS SILVA *et al.*, 2018; DE SÁ COUTINHO *et al.*, 2018; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

## 6.2 SISTEMA-TESTE *IN VITRO*

### 6.2.1 Migração

Posto que a aquisição de um fenótipo migratório atua como um dos principais fatores no favorecimento da disseminação metastática, a investigação do potencial migratório de células tumorais é fundamental em pesquisas envolvendo a testagem de novas moléculas com potenciais efeitos quimiopreventivos e/ou quimioterapêuticos (KRAMER *et al.*, 2013). À vista disso, o ensaio de migração por meio da técnica de cicatrização de feridas (“*wound healing assay*”) foi realizado para averiguar o efeito de PQM162 no processo de migração celular da linhagem HCT-8 no tempo de 48h e os resultados estão apresentados na Figura 11. O processo de fechamento da ferida realizado em monocamada celular segue representado de maneira esquemática na figura 12 com fotografias representativas dos poços e das áreas de cicatrização obtidas pelo *software ImageJ®*.

O tratamento com PQM162 por 48 horas, nas concentrações de 2,0; 4,0 e 6,0 µg/mL, foram selecionadas com base em ensaios prévios de proliferação celular e clonogenicidade (APÊNDICE B e E) realizados pela equipe do Laboratório de Genética Humana da Unifal-MG. Em síntese, em células HCT-8, os valores de IC50 encontrados no ensaio de proliferação celular nos tempos de 24h, 48h e 72h foram de  $463,06 \pm 36,98$ ;  $130,60 \pm 11,60$ ; e  $258,30 \pm 40,45$  µg/mL, respectivamente. No ensaio de formação de colônias, a fração de sobrevivência foi estatisticamente significativa nas concentrações acima de 4,062 µg/mL após 48h de tratamento com o híbrido.

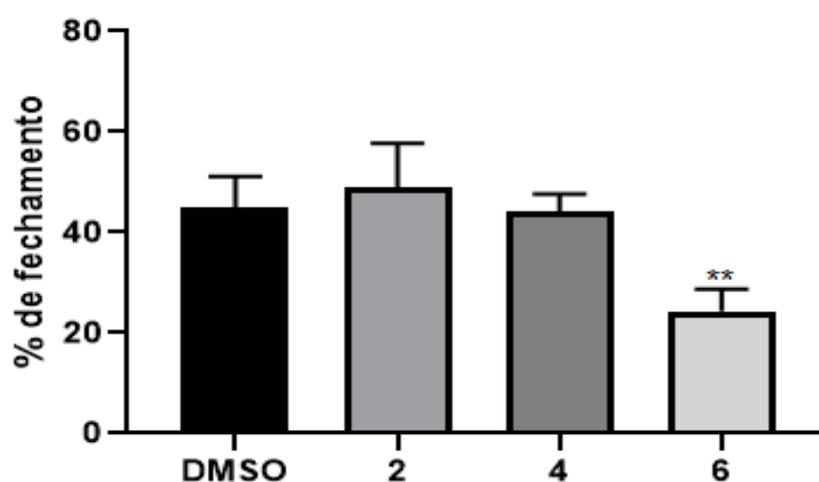
Assim, no ensaio de migração celular, foi encontrada uma redução de aproximadamente 46,7 % na capacidade de migração da linhagem de adenocarcinoma colorretal HCT-8, exposta à concentração de 6,0 µg/mL, quando comparada ao controle (Figuras 11 e 12).

De maneira geral, em outros estudos *in vitro* envolvendo também linhagens celulares de adenocarcinoma colorretal humano, como a HCT116, por exemplo, tanto a curcumina quanto o resveratrol se mostraram capazes em inibir a cicatrização das feridas após 24 horas de tratamento (CALIBASI-KOCAL *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2013; CHUNG *et al.*, 2018).

O efeito exercido no processo de migração celular pelo curcuminoide, em câncer colorretal, pode ser fundamentado na modulação encontrada, em células

HCT116, da atividade da fosfatase PTPN1 (“*Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1*”) com consequente redução da fosforilação da cortactina — proteína envolvida nas interações entre microfilamento e membrana, bem como na transdução de sinais da superfície celular para o citoesqueleto, o que sugere um importante papel dessa molécula na motilidade celular (RADHAKRISHNAN *et al.*, 2014). A curcumina já se mostrou eficaz, ainda, em inibir a migração de outras linhagens de tumores humanos como as células CL1-5 (câncer de pulmão), Patu8988 e Panc-1 (câncer pancreático), U251 e SNB19 (glioblastomas) (CHEN *et al.*, 2008; SU *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2015).

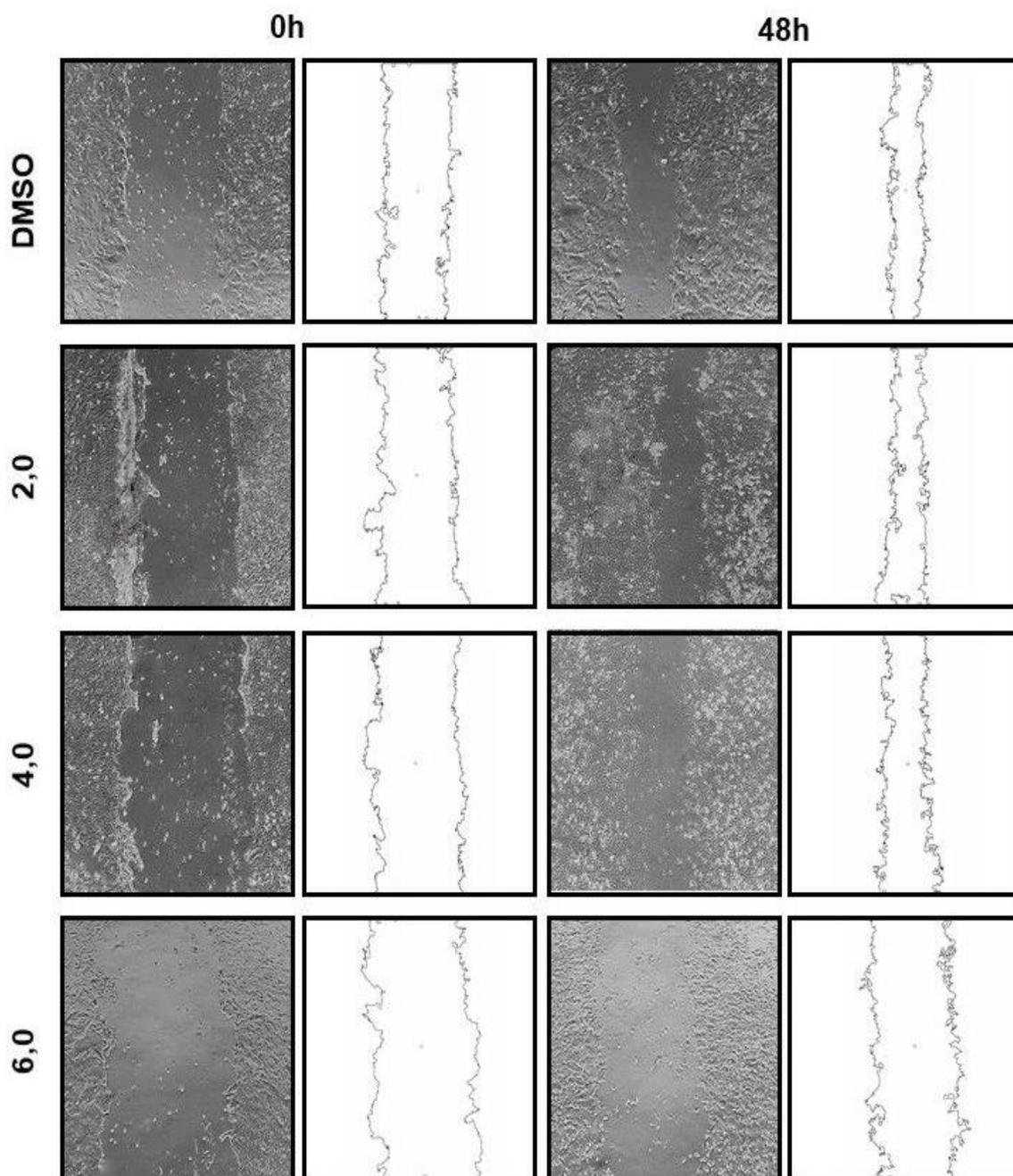
Figura 11 - Quantificação do fechamento da ferida em porcentagem (%) na linhagem HCT-8 após 48h de tratamento com PQM162 nas concentrações de 2,0; 4,0 e 6,0 µg/mL.



Fonte: Do autor (2021).

Legenda: Valores expressos da média de uma triplicata experimental  $\pm$ desvio padrão da média, analisados pela análise de variância *one way* ANOVA pós-teste de *Dunnett*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . PQM162: (E) -3- (4-hidroxi-3-metoxifenil)-N'-(4-metoxibenzilideno) acril-hidrazida]; DMSO: Dimetilsulfóxido 1%.

Figura 12 - Representação esquemática das áreas de cicatrização de feridas da linhagem HCT-8 após o tratamento com PQM162 nas concentrações de 2,0; 4,0 e 6,0 µg/mL os tempos de 0h e 48h.



Fonte: Do autor (2021).

Legenda: PQM162: (E) -3- (4-hidroxi-3-metoxifenil)-N'-(4-metoxibenzilideno) acril-hidrazida];  
DMSO: Dimetilsulfóxido 1%.

O resveratrol, por sua vez, revelou seu potencial em regular negativamente o RNA não codificador longo (lncRNAs, “*long non-coding RNAs*”) MALAT1, resultando na diminuição do conteúdo nuclear de  $\beta$ -catenina e na atenuação da via de sinalização Wnt /  $\beta$ -catenina, o que mostrou, em células de câncer colorretal LoVo, estar atrelado à inibição induzida por esse polifenol na migração e invasão celular (JI *et al.*, 2016). Além disso, encontra-se registrado na literatura científica o efeito inibitório da migração em linhagens de câncer de ovário (SKOV3, SNU-119 e OV90), de câncer de próstata (DU145 e PC3) e de mieloma múltiplo (U-266) (GENG *et al.*, 2018; KHUSBU *et al.*, 2020; WEI *et al.*, 2020). Em outras linhagens como ACHN (adenocarcinoma renal humano) e A498 (carcinoma renal humano), o resveratrol a 100  $\mu$ M chegou a apresentar uma porcentagem de 55% e 71% de inibição do processo migratório de ambas as células, respectivamente (ZHAO *et al.*, 2018).

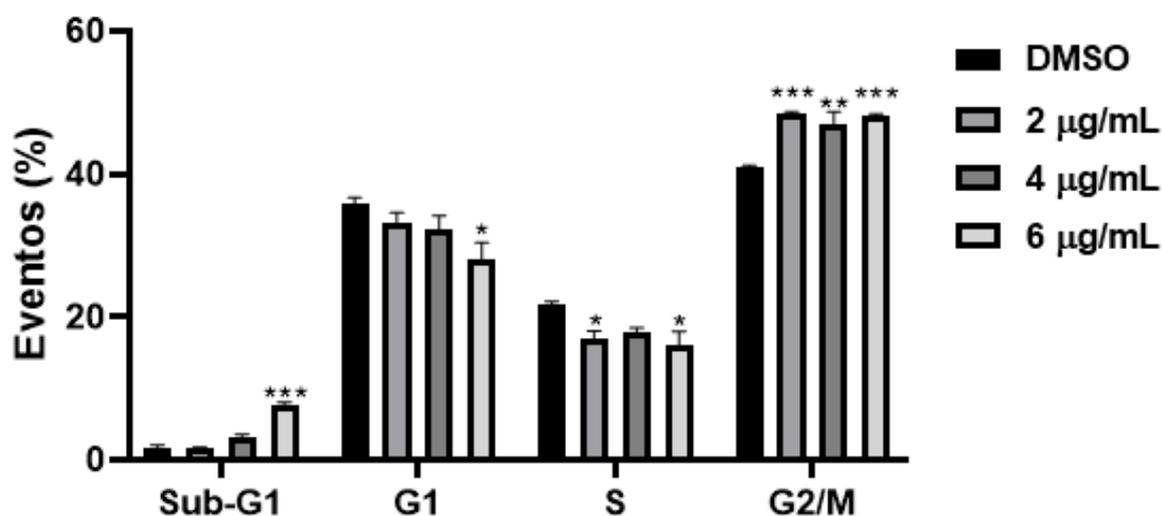
### 6.2.2 Análise do ciclo celular

A cinética de progressão do ciclo celular, sob influência do tratamento com PQM162, foi avaliada no presente estudo e os resultados obtidos por citometria de fluxo encontram-se na figura 13. Observa-se uma progressiva diminuição da população celular nas fases G1 e S e, a partir da concentração de 2  $\mu$ g/mL, concomitantemente, ocorre um aumento na fase G2/M, transição na qual pode-se sugerir que o híbrido induza bloqueio do ciclo celular. Além disso, o aumento da população sub-G1 pela concentração de 6  $\mu$ g/mL é indicativo de citotoxicidade, posto que essa população é constituída por células com fragmentação e conteúdo reduzido de DNA, bem como por mudanças morfológicas, como condensação nuclear. Tais alterações apontam, ainda, para a presença de células apoptóticas, a qual foi avaliada posteriormente pelo ensaio de marcação com anexina V/ iodeto de propídeo (KAJSTURA *et al.*, 2007; PLESCA; MAZUMDER; ALMASAN, 2008).

A literatura científica apresenta uma gama de relatos sobre o potencial dos fitoquímicos em inibir a proliferação de células tumorais mediante a modulação de genes responsáveis pelo controle do ciclo celular, tais como as ciclinas e as cinases dependentes de ciclina (CDKs, “*Cyclin-dependent kinases*”). Nesse sentido, e de maneira análoga ao encontrado na linhagem HCT-8 neste estudo, De Freitas *et al.* (2018) demonstraram, em células de câncer de mama, que PQM162 promoveu um intenso aumento na população G2/M. Tal efeito se mostrou decorrente, pelo menos

em parte, da capacidade do híbrido de modular proteínas cinase nucleares responsáveis por controlar eventos importantes na progressão da mitose (DE FREITAS *et al.*, 2018; VARONI *et al.*, 2016).

Figura 13 - Análise da progressão do ciclo celular após 24h de tratamento com PQM162 nas concentrações de 2,0; 4,0 e 6,0 µg/mL.



Fonte: Do autor (2021).

Legenda: Valores expressos da média de uma duplicata experimental mais ou menos desvio padrão da média, e analisados pela análise de variância *one way* ANOVA pós-teste de *Dunnnett*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . PQM162: (E) -3- (4-hidroxi-3-metoxifenil)-N'-(4-metoxibenzilideno) acril-hidrazida]; DMSO: Dimetilsulfóxido 1%.

A análise de expressão gênica demonstrou um aumento muito mais intenso, nos níveis de RNAm de *CDKN1A*, nas células tratadas com o híbrido em relação às células tratadas isoladamente com cada um de seus precursores na mesma concentração. Tal gene, cujo transcrito codifica a proteína p21, representa um supressor de tumor e regulador central do ciclo celular, que garante a estabilidade genômica. Isso é possível porque a atividade principal de p21 está vinculada à inibição de CDK2 e CDC2, e à consequente interrupção da proliferação em estágios específicos do ciclo celular. Além disso, ao se ligar ao PCNA, p21 interfere na atividade da polimerase dependente de PCNA e, à vista disso, inibe a síntese de DNA (DE FREITAS *et al.*, 2018; KREIS; LOUWEN; YUAN, 2019).

Outras modulações, associadas à progressão do ciclo celular, também foram pontuadas por De Freitas et al (2018) em amostras tratadas com PQM162. Foi observada a redução da abundância de RNAm do gene *CCNB1*, o qual codifica o principal regulador da transição G2/M (ciclina B1). Ademais, reduções na expressão de aurora A, aurora B e PLK1 (“*Polo Like Kinase 1*”) foram encontradas. Esses resultados são instigantes, em virtude, sobretudo, da superexpressão encontrada em pacientes com câncer colorretal e do baixo prognóstico associado a essas três cinases mitóticas investigadas (DE FREITAS *et al.*, 2018; TAKAHASHI *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2014).

No que se refere a seus precursores, o resveratrol encontra-se como um eficiente interferente na progressão do ciclo celular em diferentes tipos câncer, bloqueando, quase sempre, as fases G1/S ou G2/M. Atrelada a essa inibição, geralmente, os estudos evidenciam a modulação dos níveis de expressão das ciclinas A2, B1, D1 e E2. Para mais, os efeitos do resveratrol na parada do ciclo celular e na proliferação celular também parecem ser modulados por seu direcionamento específico para lncRNAs. Em células de carcinoma pulmonar, por exemplo, detectou-se a regulação negativa do lncRNA AK001796, e em câncer colorretal, como já mencionado, do lncRNA MALAT1. Aliás, mudanças na expressão de lncRNAs já foram propostas como alvo molecular de vários outros fitoquímicos, de maneira geral (LI *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2017; VARONI *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2019).

Já em relação à curcumina, Holy (2002) demonstrou que a mesma induz parada G2/M devido a perturbações geradas na estrutura do fuso mitótico de células de câncer de mama, como por exemplo, a montagem de fusos mitóticos monopolares aberrantes (HOLY, 2002). Em células de osteossarcoma humano, a interrupção do ciclo celular em G2/M está associada à redução da formação do complexo CDC2/ciclina B, etapa necessária para que as células entrem em mitose. Em adenocarcinoma de cólon, ainda, a parada do ciclo já mostrou ocorrer por meio da geração de espécies reativas de oxigênio independentemente da via apoptótica mitocondrial (AGARWAL *et al.*, 2018; LEE; LEE, 2009).

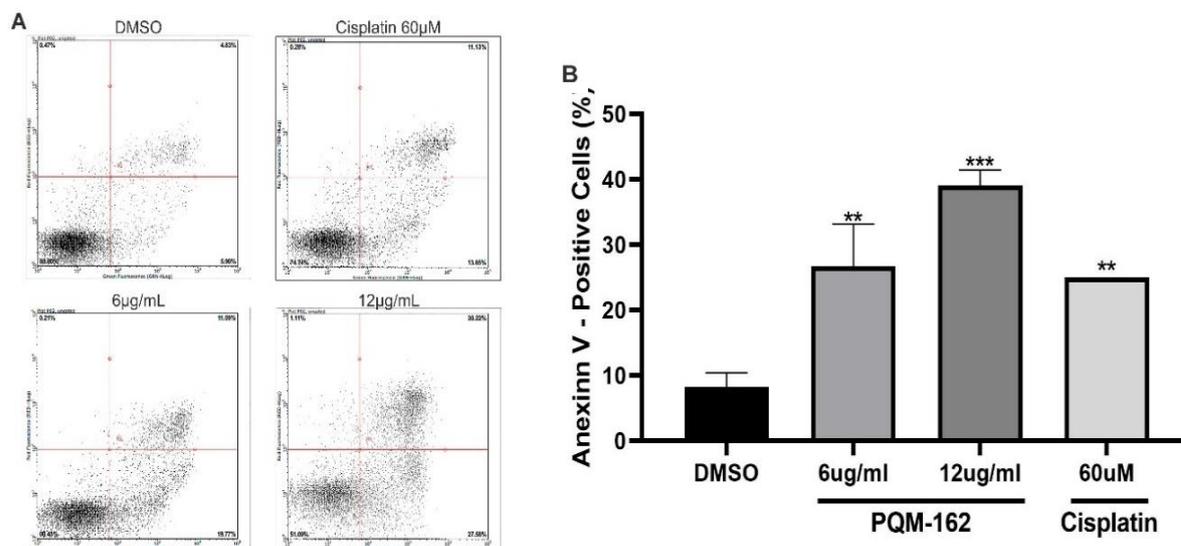
Esses estudos, quando interpostos, sugerem outra vez que a modulação encontrada por PQM162, sobre diferentes processos celulares, pode ser fundamentada nos efeitos biológicos de seus precursores, certificando que as subunidades estruturais farmacofóricas do resveratrol e da curcumina foram mantidas durante o processo de síntese.

### 6.2.3 Análise do ensaio de apoptose por anexina v/iodeto de propídeo

A atividade pró-apoptótica de PQM162 na linhagem HCT-8 foi avaliada em virtude da citotoxicidade encontrada no ensaio de ciclo celular pela concentração de 6 µg/mL. Para isso, utilizou-se o ensaio de Anexina V (AV), o qual se fundamenta na ideia de que células apoptóticas passam por um processo de translocação do fosfolípido fosfatidilserina (FS) do folheto interno para o folheto externo da membrana plasmática. Essa translocação da FS precede a perda da integridade da membrana, evento presente em estágios tardios da morte celular por apoptose ou necrose. O ensaio conta com a marcação por AV, proteína com alta afinidade à FS, e por iodeto de propídeo (IP). Assim, células viáveis e com membranas celulares intactas não são marcadas com IP, sendo AV e IP negativas. Células que se encontram nos estágios iniciais de apoptose, por sua vez, são AV positivas e IP negativas. Populações celulares que estão em apoptose tardia ou já se encontram mortas são marcadas tanto com AV, quanto IP (BIOSCIENCES, 2011).

Logo, tornando claro as peculiaridades desse ensaio, pode-se observar que PQM162 apresenta atividade pró-apoptótica em células de adenocarcinoma colorretal ao promover a positividade de aproximadamente 19,77% e 22,77% das células exclusivamente para AV, nas concentrações de 6 e 12 µg/mL respectivamente, em relação ao controle (5,9%) (Figura 14). Similarmente, células de câncer de mama, tratadas com o híbrido (20 e 40 µM) por 48h, também comprovaram sua capacidade de induzir apoptose. Os dados de ambos os estudos indicam que a promoção de apoptose em células tumorais por PQM162 pode ser uma resposta consecutiva à parada do ciclo celular na transição G2/M (DE FREITAS *et al.*, 2018).

Figura 14 - Ensaio de anexina V em culturas tratadas por 24 h com PQM162 nas concentrações de 6,0 e 12,0 µg/mL.



Fonte: Do autor (2021).

Legenda: (A) *Dot plot* ilustrando as diferentes populações celulares após o ensaio de anexina V. Quadrante inferior esquerdo – células negativas para iodeto de propídio (IP) e anexina V (AV). Inferior direito – células positivas para AV e negativas para IP. Superior direito – células positivas para IP e AV. Superior esquerdo – células positivas para IP e negativas para AV. (B) Frequência de células positivas para anexina V. Valores expressos da média de uma duplicata experimental mais ou menos desvio padrão da média, e analisados pela análise de variância *one way ANOVA* pós-teste de *Dunnett*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . PQM162: (E) -3- (4-hidroxi-3-metoxifenil)-N'-(4-metoxibenzilideno) acril-hidrazida]; DMSO: Dimetilsulfóxido 1%; Controle positivo: cisplatina 60µM.

Além disso, é válido ressaltar que ensaios complementares, realizados pelo nosso grupo de pesquisa, identificaram que PQM162 apresenta um mecanismo genotóxico, em especial, sobre células tumorais. A promoção da instabilidade genética pelo híbrido foi marcada, sobretudo, pela formação de micronúcleos na linhagem HCT-8, e o aumento de biomarcadores se mostrou proporcionalmente dependente da concentração exposta (APÊNDICE F, dados ainda não publicados).

Assim, baseado nos dados encontrados pela nossa equipe e por De Freitas *et al* (2018) sobre a capacidade de PQM162 interromper a progressão do ciclo celular pela interferência na dinâmica de alinhamento dos cromossomos, sugere-se que PQM162 induza a formação de micronúcleos. Isso pode ser explicado devido ao aparecimento de defeitos na formação do fuso mitótico; levando à parada da mitose e, em seguida, induzindo a morte celular por apoptose (DE FREITAS *et al.*, 2018).

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que *in vivo*, o híbrido demonstrou ser capaz de reduzir significativamente a formação de FCA e CA nos modelos de tratamento simultâneo (na dose de 1,0 mg/kg p.c.) e pós-tratamento (nas doses de 1,0 e 2,0 mg/kg p.c.). A avaliação da expressão gênica indica que o efeito quimiopreventivo encontrado sobre as lesões iniciadas no cólon de ratos Wistar está atrelado à modulação da expressão de genes envolvidos em vias inflamatórias (*COX-2* e *TNF- $\alpha$* ) e de regulação da homeostase redox (*NRF2*). A reatividade da reação de imunohistoquímica confirmou as atividades anti-inflamatória (*COX-2*) e antioxidante (*NRF2*) de PQM162 encontradas no modelo de pós-tratamento. Além disso, demonstrou-se que a molécula tem como alvo a via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, inibindo, através da redução dos níveis proteicos de PCNA e  $\beta$ -catenina, a proliferação celular. *In vitro*, o híbrido manifestou inibir o processo de migração celular da linhagem de adenocarcinoma colorretal HCT-8 na concentração de 6  $\mu$ g/mL; induzir parada do ciclo celular na transição G2/M nas concentrações de 2, 4 e 6  $\mu$ g/mL; e promover a morte das células tumorais por apoptose nas concentrações de 6 e 12  $\mu$ g/mL. De maneira geral, os resultados encontrados sugerem PQM162 apresenta potencial quimiopreventivo e quimioterapêutico com claro mecanismo de ação. Esses achados trazem novas perspectivas na investigação de alvos que apresentem o potencial de levar à promoção de abordagens quimiopreventivas e terapêuticas mais eficientes no que diz respeito ao câncer colorretal e, futuramente, até mesmo outros tipos tumorais.

## REFERÊNCIAS

AGNER, A. R. *et al.* DNA damage and aberrant crypt foci as putative biomarkers to evaluate the chemopreventive effect of annatto (*Bixa orellana* L.) in rat colon carcinogenesis. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Botucatu, v. 582, n. 1-2, p. 146-154, 2005.

AGARWAL, A. *et al.* Curcumin induces apoptosis and cell cycle arrest via the activation of reactive oxygen species-independent mitochondrial apoptotic pathway in Smad4 and p53 mutated colon adenocarcinoma HT29 cells. **Nutrition Research**, India, v. 51, p. 67-81, 2018.

AGGARWAL, M. L.; CHACKO, K. M.; KURUVILLA, B. T. Systematic and comprehensive investigation of the toxicity of curcuminoid-essential oil complex: A bioavailable turmeric formulation. **Molecular Medicine Reports**, India, v. 13, n. 1, p. 592-604, 2016.

ALY, M. S.; MAHMOUD, A. A. E. Cancer Chemoprevention by Dietary Polyphenols. In: DURATURO, F. *et al.* **Carcinogenesis. Janeza Trdine: InTech**, Egito, Cap.12, p. 239-262, 2013.

ALRAWI, S. J. *et al.* Aberrant crypt foci. **Anticancer research**, Estados Unidos, v. 26, n. 1A, p. 107-119, 2006.

ARMAGHANY, T. *et al.* Genetic alterations in colorectal cancer. **Gastrointestinal cancer research: GCR**, Estados Unidos, v. 5, n. 1, p. 19, 2012.

BAO, Y. *et al.* Benefits and risks of the hormetic effects of dietary isothiocyanates on cancer prevention. **PLoS One**, Estados Unidos, v. 9, n. 12, p. e114764, 2014.

BARREIRO, E.J. *et al.* A química medicinal de N-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 129-148, 2002.

BENETOU, V.; LAGIOU, A.; LAGIOU, P. Chemoprevention of cancer: current evidence and future prospects. **F1000Research**, Grécia, v. 4, n. F1000 Faculty Rev, p.916, 2015.

BERMAN, A. *et al.* The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. **NPJ precision oncology**, Estados Unidos, v. 1, n. 1, p. 35, 2017.

BIOSCIENCES, B. D. **Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVersé™ System**. 2011. Disponível em: [https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/marketingdocuments/BD\\_FACSVersé\\_Apoptosis\\_Detection\\_AppNote.pdf](https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/marketingdocuments/BD_FACSVersé_Apoptosis_Detection_AppNote.pdf). Acesso em: 31 ago. 2021.

BIRD, R. P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer letters**, Canada, v. 37, n. 2, p. 147-151, 1987.

BOLLMANN, F. *et al.* Resveratrol post-transcriptionally regulates pro-inflammatory gene expression via regulation of KSRP RNA binding activity. **Nucleic acids research**, Alemanha, v. 42, n. 20, p. 12555-12569, 2014.

BRACHT, K. *et al.* 5-Fluorouracil response in a large panel of colorectal cancer cell lines is associated with mismatch repair deficiency. **British Journal of Cancer**, Reino Unido, v. 103, n. 3, p. 340, 2010.

CAI, H. *et al.* Cancer chemoprevention: Evidence of a nonlinear dose response for the protective effects of resveratrol in humans and mice. **Science Translational Medicine**, Reino Unido, v. 7, n. 298, p. 298ra117-298ra117, 2015.

CALIBASI-KOCAL, G. *et al.* Curcumin effects on cell proliferation, angiogenesis and metastasis in colorectal cancer. **J buon**, Turquia, v. 24, n. 4, p. 1482-1487, 2019.

CARROLL, R. E. *et al.* Phase IIa clinical trial of curcumin for the prevention of colorectal neoplasia. **Cancer prevention research**, Estados Unidos, v. 4, n. 3, p. 354-364, 2011.

CHATTERJEE, S. Oxidative stress, inflammation, and disease. In: Oxidative stress and biomaterials. **Academic Press**, Estados Unidos, p. 35-58, 2016.

CHEN, C. COX-2's new role in inflammation. **Nature chemical biology**, Estados Unidos, v. 6, n. 6, p. 401-402, 2010.

CHEN, C. *et al.* Curcumin suppresses metastasis via Sp-1, FAK inhibition, and E-cadherin upregulation in colorectal cancer. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Taiwan, v. 2013, 2013.

CHEN, H. *et al.* Curcumin inhibits lung cancer cell invasion and metastasis through the tumor suppressor HLJ1. **Cancer research**, Taiwan, v. 68, n. 18, p. 7428-7438, 2008.

CHEN, Q. H. Curcumin-based anti-prostate cancer agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, China, v. 15, n. 2, p. 138-156, 2015.

CHIAVE, S. E. *et al.* Healthy lifestyle factors in the primary prevention of coronary heart disease among men. **Circulation**, Estados Unidos, v. 114, p. 160-167, 2006.

CHOE, K. N.; MOLDOVAN, G. Forging ahead through darkness: PCNA, still the principal conductor at the replication fork. **Molecular cell**, Estados Unidos, v. 65, n. 3, p. 380-392, 2017.

CHOUDHARI, A. S. *et al.* Phytochemicals in cancer treatment: From preclinical studies to clinical practice. **Frontiers in pharmacology**, India, v. 10, p. 1614, 2020.

CHUNG, S. S. *et al.* Combination of resveratrol and 5-fluorouracil enhanced anti-telomerase activity and apoptosis by inhibiting STAT3 and Akt signaling pathways in human colorectal cancer cells. **Oncotarget**, Estados Unidos, v. 9, n. 68, p. 32943, 2018.

CROWE, A. R.; YUE, W. Semi-quantitative determination of protein expression using immunohistochemistry staining and analysis: an integrated protocol. **Bio-protocol**, Estados Unidos, v. 9, n. 24, 2019.

CUZICK, J. *et al.* Use of anastrozole for breast cancer prevention (IBIS-II): long-term results of a randomised controlled trial. **The Lancet**, Reino Unido, v. 395, n. 10218, p. 117-122, 2020.

DAVE, A. *et al.* Phytochemicals and cancer chemoprevention. **Journal of Cancer Metastasis and Treatment**, Estados Unidos, v. 6., 2020.

DE FREITAS SILVA, M. *et al.* Synthetic resveratrol-curcumin hybrid derivative inhibits mitosis progression in estrogen positive MCF-7 breast cancer cells. **Toxicology in Vitro**, Alfenas, v. 50, p. 75-85, 2018.

DE SÁ COUTINHO, D. *et al.* Anti-inflammatory effects of resveratrol: Mechanistic insights. **International journal of molecular sciences**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 6, p. 1812, 2018.

DE-SOUZA, A. S. C.; COSTA-CASAGRANDE, T. A. Animal models for colorectal cancer. ABCD. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, São Paulo, v. 31, n. 2, 2018.

DUFFY, M. J. *et al.* p53 as a target for the treatment of cancer. **Cancer treatment reviews**, Irlanda, v. 40, n. 10, p. 1153-1160, 2014.

EMMENDOERFFER, A. *et al.* Role of inflammation in chemical-induced lung cancer. **Toxicology letters**, Alemanha, v. 112, p. 185-191, 2000.

EPSTEIN, J.; SANDERSON, I. R.; MACDONALD, T. T. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. **British journal of nutrition**, Reino Unido, v. 103, n. 11, p. 1545-1557, 2010.

FARKHONDEH, T. *et al.* The therapeutic effect of resveratrol: Focusing on the Nrf2 signaling pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Iran, v. 127, p. 110234, 2020.

FLOREA, A.; BÜSSELBERG, D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. **Cancers**, Alemanha, v. 3, n. 1, p. 1351-1371, 2011.

FRAMPTON, G. A. *et al.* Resveratrol enhances the sensitivity of cholangiocarcinoma to chemotherapeutic agents. **Laboratory Investigation**, Estados Unidos, v. 90, n. 9, p. 1325-1338, 2010.

FODDE, R. The APC gene in colorectal cancer. **European journal of cancer**, Países Baixos, v. 38, n. 7, p. 867-871, 2002.

GENG, W. *et al.* Resveratrol inhibits proliferation, migration and invasion of multiple myeloma cells via NEAT1-mediated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, China, v. 107, p. 484-494, 2018.

GONZÁLEZ-MAGAÑA, A.; BLANCO, F. J. Human PCNA structure, function and interactions. **Biomolecules**, Espanha, v. 10, n. 4, p. 570, 2020.

HABR-GAMA, A. Colorectal cancer: the importance of prevention. **Arquivos de gastroenterologia**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 2-3, 2005.

HAMIZA, O. O. *et al.* Amelioration of 1, 2 Dimethylhydrazine (DMH) induced colon oxidative stress, inflammation and tumor promotion response by tannic acid in Wistar rats. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, India, v. 13, n. 9, p. 4393-4402, 2012

HASHEMI GORADEL, N. *et al.* Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. **Journal of cellular physiology**, Iran, v. 234, n. 5, p. 5683-5699, 2019.

HE, F.; ANTONUCCI, L.; KARIN, M. NRF2 as a regulator of cell metabolism and inflammation in cancer. **Carcinogenesis**, Estados Unidos, v. 41, n. 4, p. 405-416, 2020.

HOLY, J. M. Curcumin disrupts mitotic spindle structure and induces micronucleation in MCF-7 breast cancer cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Estados Unidos, v. 518, n. 1, p. 71-84, 2002.

HUXLEY, R. R. *et al.* The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. **International Journal of Cancer**, Austrália, v. 125, n. 1, p. 171-180, 2009.

INCA. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estatísticas de câncer 2020**. Coordenação de Prevenção e Vigilância – Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>.

JANČÍK, S. *et al.* Clinical relevance of KRAS in human cancers. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, República Checa, v. 2010, 2010.

JI, Q. *et al.* Resveratrol inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer cells via MALAT1 mediated Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway. **PLoS one**, China, v. 8, n. 11, p. e78700, 2013.

JI, Q. *et al.* Resveratrol inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer cells via MALAT1 mediated Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway [J/OL]. **PLoS One**, China, p. 10-20, 2016.

JONES, S. *et al.* Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Estados Unidos, v. 105, n. 11, p. 4283-4288, 2008.

JUAN, M. E.; VINARDELL, M. P.; PLANAS, J. M. The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. **The Journal of nutrition**, Espanha, v. 132, n. 2, p. 257-260, 2002.

KAJSTURA, M. *et al.* Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete “sub-G1” peaks on DNA content histograms. **Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology**, Estados Unidos, v. 71, n. 3, p. 125-131, 2007.

KAWANISHI, S.; YAMAMOTO, K. Mechanism of site-specific DNA damage induced by methylhydrazines in the presence of copper (II) or manganese (III). **Biochemistry**, Japão, v. 30, n. 12, p. 3069-3075, 1991.

KELMAN, Z. PCNA: structure, functions and interactions. **Oncogene**, Estados Unidos, v. 14, n. 6, p. 629-640, 1997.

KESTLER, H. A.; KÜHL, M. Generating a Wnt switch: it's all about the right dosage. **Journal of Cell Biology**, Alemanha, v. 193, n. 3, p. 431-433, 2011.

KRAMER, N. *et al.* In vitro cell migration and invasion assays. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, Austria, v. 752, n. 1, p. 10-24, 2013.

KREIS, N.; LOUWEN, F.; YUAN, J. The multifaceted p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in cell differentiation, migration and cancer therapy. **Cancers**, Alemanha, v. 11, n. 9, p. 1220, 2019.

KRSTIC, M. N. *et al.* General aspects of primary cancer prevention. **Digestive Diseases**, Sérvia, v. 37, n. 5, p. 406-415, 2019.

KURŠVIETIENĖ, L. *et al.* Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. **Medicina**, Lituânia, v. 52, n. 3, p. 148-155., 2016

KHUSBU, F. Y. *et al.* Resveratrol induces depletion of TRAF6 and suppresses prostate cancer cell proliferation and migration. **The international journal of biochemistry & cell biology**, China, v. 118, p. 105644, 2020.

KOU, X. *et al.* Natural products for cancer prevention associated with Nrf2–ARE pathway. **Food Science and Human Wellness**, China, v. 2, n. 1, p. 22-28, 2013.

LAI, C. *et al.* Tetrahydrocurcumin is more effective than curcumin in preventing azoxymethane-induced colon carcinogenesis. **Molecular nutrition & food research**, Taiwan, v. 55, n. 12, p. 1819-1828, 2011.

LAN, T.; CHEN, Li; WEI, X. Inflammatory Cytokines in Cancer: Comprehensive Understanding and Clinical Progress in Gene Therapy. **Cells**, China, v. 10, n. 1, p. 100, 2021.

LANGNER, E.; RZESKI, W. Dietary derived compounds in cancer chemoprevention. **Contemporary oncology**, Polônia, v. 16, n. 5, p. 394, 2012.

LEE, D. S.; LEE, M. K.; KIM, J. H. Curcumin induces cell cycle arrest and apoptosis in human osteosarcoma (HOS) cells. **Anticancer research**, Coréia, v. 29, n. 12, p. 5039-5044, 2009.

LI, D. *et al.* Resveratrol suppresses colon cancer growth by targeting the AKT/STAT3 signaling pathway. **International journal of molecular medicine**, China, v. 43, n. 1, p. 630-640, 2019.

LIU, B.; QU, L.; YAN, S. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. **Cancer cell international**, China, v. 15, n. 1, p. 1-6, 2015.

LIU, Y. *et al.* The targeting of non-coding RNAs by curcumin: Facts and hopes for cancer therapy. **Oncology reports**, China, v. 42, n. 1, p. 20-34, 2019.

MAEKAWA, M. *et al.* Increased expression of cyclooxygenase-2 to-1 in human colorectal cancers and adenomas, but not in hyperplastic polyps. **Japanese journal of clinical oncology**, Japão, v. 28, n. 7, p. 421-426, 1998.

MCCARTHY, A. *et al.* Prevention of chronic conditions and cancer. In: **Cancer and Chronic Conditions**, Austrália, p. 203-239, 2016.

MELO, F. H. M. *et al.* Cancer chemoprevention: classic and epigenetic mechanisms inhibiting tumorigenesis. What have we learned so far?. **Frontiers in oncology**, São Paulo, v. 8, p. 644, 2018.

MEYSKENS, F. L. *et al.* Difluoromethylornithine plus sulindac for the prevention of sporadic colorectal adenomas: a randomized placebo-controlled, double-blind trial. **Cancer prevention research**, Estados Unidos, v. 1, n. 1, p. 32-38, 2008.

MICHLEWSKI, G.; CÁCERES, J. F. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. **Rna**, Reino Unido, v. 25, n. 1, p. 1-16, 2019.

MIZUNO, S. *et al.* Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, Japão, v. 97, n. 5, p. 1172-1179, 2001.

MOGHADDAM, N. S. A. *et al.* Hormetic effects of curcumin: What is the evidence?. **Journal of cellular physiology**, Iran, v. 234, n. 7, p. 10060-10071, 2019.

MOJARAD, E. N. *et al.* Prognostic significance of nuclear  $\beta$ -catenin expression in patients with colorectal cancer from Iran. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, Iran, v. 17, n. 7, 2015.

MUNTEANU, I.; MASTALIER, B. Genetics of colorectal cancer. **Journal of medicine and life**, Romania, v. 7, n. 4, p. 507, 2014.

NEVES, A. R. *et al.* Resveratrol in medicinal chemistry: a critical review of its pharmacokinetics, drug-delivery, and membrane interactions. **Current medicinal chemistry**, Portugal, v. 19, n. 11, p. 1663-1681, 2012.

OKUGAWA, Y.; GRADY, W. M.; GOEL, A. Epigenetic alterations in colorectal cancer: emerging biomarkers. **Gastroenterology**, Estados Unidos, v. 149, n. 5, p. 1204-1225. e12, 2015.

PATEL, V. B. *et al.* Colorectal cancer: chemopreventive role of curcumin and resveratrol. **Nutrition and cancer**, Estados Unidos, v. 62, n. 7, p. 958-967, 2010.

PARK, H.; GOODLAD, R. A.; WRIGHT, N. A. The incidence of aberrant crypt foci and colonic carcinoma in dimethylhydrazine-treated rats varies in a site-specific manner and depends on tumor histology. **Cancer Research**, Reino Unido, v. 57, n. 20, p. 4507-4510, 1997.

PENNY, L. K.; WALLACE, H. M. The challenges for cancer chemoprevention. **Chemical Society Reviews**, Reino Unido, v. 44, n. 24, p. 8836-8847, 2015.

PERŠE, M.; CERAR, A. Morphological and molecular alterations in 1, 2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Eslovênia, v. 2011, 2010.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Alemanha, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

PLESCA, D.; MAZUMDER, S.; ALMASAN, A. DNA damage response and apoptosis. **Methods in enzymology**, Ohio, v. 446, p. 107-122, 2008.

POPE, S. D.; MEDZHITOV, R. Emerging principles of gene expression programs and their regulation. **Molecular cell**, Estados Unidos, v. 71, n. 3, p. 389-397, 2018.

RADHAKRISHNAN, V. M. *et al.* pTyr 421 cortactin is overexpressed in colon cancer and is dephosphorylated by curcumin: Involvement of non-receptor type 1 protein tyrosine phosphatase (PTPN1). **PLoS One**, Estados Unidos, v. 9, n. 1, p. e85796, 2014.

RAJAMANICKAM, V. *et al.* Novel allylated monocarbonyl analogs of curcumin induce mitotic arrest and apoptosis by reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress and inhibition of STAT3. **Oncotarget**, China, v. 8, n. 60, p. 101112, 2017.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H. L.; MOORMAN, A. F. M. Assumption-465 free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Holanda, v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.

RATHORE, S. *et al.* A recent survey on colon cancer detection techniques. **IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics**, Paquistão, v. 10, n. 3, p. 545-563, 2013.

RAWLA, P.; SUNKARA, T.; BARSOUK, A. Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. **Przegląd gastroenterologiczny**, Estados Unidos, v. 14, n. 2, p. 89, 2019.

REN, L. *et al.* Curcumin upregulates the Nrf2 system by repressing inflammatory signaling-mediated Keap1 expression in insulin-resistant conditions. **Biochemical and biophysical research communications**, China, v. 514, n. 3, p. 691-698, 2019.

REJHOVÁ, A. *et al.* Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. **European Journal of Medicinal Chemistry**, República Checa, v. 144, p. 582-594, 2018.

RIDOUANE, Y. *et al.* Targeted first-line therapies for advanced colorectal cancer: a Bayesian meta-analysis. **Oncotarget**, Estados Unidos, v. 8, n. 39, p. 66458, 2017.

RODRIGUES, M. A. M. *et al.* Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short-and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Botucatu, v. 35, n. 3, p. 351-355, 2002.

SADEGHI, M. R. *et al.* The role of Nrf2-Keap1 axis in colorectal cancer, progression, and chemoresistance. **Tumor Biology**, Iran, v. 39, n. 6, p. 1010428317705510, 2017.

SALEHI, B. *et al.* Resveratrol: A double-edged sword in health benefits. **Biomedicines**, Iran, v. 6, n. 3, p. 91, 2018.

SCHNEIDER, Y. *et al.* Resveratrol inhibits intestinal tumorigenesis and modulates host-defense-related gene expression in an animal model of human familial adenomatous polyposis. **Nutrition and cancer**, França, v. 39, n. 1, p. 102-107, 2001.

SENGOTTUVELAN, M.; NALINI, N. Dietary supplementation of resveratrol suppresses colonic tumour incidence in 1, 2-dimethylhydrazine-treated rats by modulating biotransforming enzymes and aberrant crypt foci development. **British Journal of Nutrition**, Reino Unido, v. 96, n. 1, p. 145-153, 2006.

SENGOTTUVELAN, M.; VISWANATHAN, P.; NALINI, N. Chemopreventive effect of trans-resveratrol-a phytoalexin against colonic aberrant crypt foci and cell proliferation in 1, 2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, India, v. 27, n. 5, p. 1038-1046, 2006.

SETHI, G. *et al.* TNF: a master switch for inflammation to cancer. **Front Biosci**, Estados Unidos, v. 13, n. 2, p. 5094-5107, 2008.

SESTI, F. *et al.* Oxidative stress-mediated biomolecular damage and inflammation in tumorigenesis. **In Vivo**, Grécia, v. 26, n. 3, p. 395-402, 2012.

SINGH, S. K. *et al.* Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis with docetaxel in prostate cancer cells via a p53/p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 pathway. **Oncotarget**, Estados Unidos, v. 8, n. 10, p. 17216, 2017.

SHANG, S.; HUA, F.; HU, Z. The regulation of  $\beta$ -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. **Oncotarget**, China, v. 8, n. 20, p. 33972, 2017.

SHISHODIA, S. Molecular mechanisms of curcumin action: gene expression. **Biofactors**, Estados Unidos, v. 39, n. 1, p. 37-55, 2013.

SIEGEL, R. L. *et al.* Colorectal cancer statistics, 2020. **CA: a cancer journal for clinicians**, Estados Unidos, v. 70, n. 3, p. 145-164, 2020.

SIMON, K. Colorectal cancer development and advances in screening. **Clinical Interventions in Aging**, Estados Unidos, v. 11, p. 967, 2016.

SLATTERY, M. L. *et al.* Diet and lifestyle factors associated with miRNA expression in colorectal tissue. **Pharmacogenomics and personalized medicine**, Estados Unidos, v. 10, p. 1, 2017.

STOIMENOV, I.; HELLEDAY, T. PCNA on the crossroad of cancer. **Biochemical Society Transactions**, Suécia, v. 37, n.3, p. 605–613, 2009.

STRILLACCI, A. *et al.* MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells. **Experimental cell research**, Itália, v. 315, n. 8, p. 1439-1447, 2009.

SU, J. *et al.* Curcumin inhibits cell growth and invasion and induces apoptosis through down-regulation of Skp2 in pancreatic cancer cells. **American journal of cancer research**, China, v. 6, n. 9, p. 1949, 2016.

SUETH-SANTIAGO, V. *et al.* CURCUMIN, THE GOLDEN POWDER FROM TURMERIC: INSIGHTS INTO CHEMICAL AND BIOLOGICAL ACTIVITIES. **QUIMICA NOVA**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p. 538-552, 2015.

SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, Estados Unidos, 2021.

SZCZUKA, D. *et al.* American ginseng (*panax quinquefolium* L.) as a source of bioactive phytochemicals with pro-health properties. **Nutrients**, Polônia, v. 11, n. 5, p. 1041, 2019.

TACIAK, B. *et al.* Wnt signaling pathway in development and cancer. **J Physiol Pharmacol**, Polônia, v. 69, n. 2, p. 185-196, 2018.

TAKAHASHI, T. *et al.* Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers. **Cancer science**, Japão, v. 94, n. 2, p. 148-152, 2003.

TANAKA, T. *et al.* Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and hesperidin: comparison with the protective effect of  $\beta$ -carotene. **Cancer research**, Japão, v. 54, n. 17, p. 4653-4659, 1994.

TARIQ, K.; GHAS, K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. **Cancer biology & medicine**, Paquistão, v. 13, n. 1, p. 120, 2016.

VAN ERK, M. J. *et al.* Time-and dose-dependent effects of curcumin on gene expression in human colon cancer cells. **Journal of carcinogenesis**, Holanda, v. 3, p. 8, 2004.

VAN HORSSSEN, R.; TEN HAGEN, T. LM; EGGERMONT, A. MM. TNF- $\alpha$  in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. **The oncologist**, Holanda, v. 11, n. 4, p. 397-408, 2006.

VARONI, E. M. *et al.* Anticancer molecular mechanisms of resveratrol. **Frontiers in nutrition**, Itália, v. 3, p. 8, 2016.

VENKATACHALAM, K. *et al.* Biochemical and molecular aspects of 1, 2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis: a review. **Toxicology research**, Emirados Árabes Unidos, v. 9, n. 1, p. 2-18, 2020.

WAL, P. *et al.* A detailed insight of the anti-inflammatory effects of curcumin with the assessment of parameters, sources of ros and associated mechanisms. **Open Medicine Journal**, India, v. 6, n. 1, 2019.

WANG, J. Y. *et al.* Curcumin inhibits the growth via Wnt/beta-catenin pathway in non-small-cell lung cancer cells. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, China, v. 22, n. 21, p. 7492-9, 2018.

WANG, L. *et al.* Curcumin suppresses cell growth and invasion and induces apoptosis by down-regulation of Skp2 pathway in glioma cells. **Oncotarget**, China, v. 6, n. 20, p. 18027, 2015.

WANG, M. *et al.* Noncoding RNAs as molecular targets of resveratrol underlying its anticancer effects. **Journal of agricultural and food chemistry**, China, v. 67, n. 17, p. 4709-4719, 2019.

WANG, S. PCNA: a silent housekeeper or a potential therapeutic target?. **Trends in pharmacological sciences**, China, v. 35, n. 4, p. 178-186, 2014.

WARGOVICH, M. J. Colon cancer chemoprevention with ginseng and other botanicals. **Journal of Korean Medical Science**, Estados Unidos, v. 16, n. Suppl, p. S81, 2001.

WEI, B. *et al.* Resveratrol Suppresses Ovarian Cancer Cell Growth and Invasion Through Upregulation of microRNA-34a. China, 2020.

WU, X. *et al.* Inhibition of Aurora B by CCT137690 sensitizes colorectal cells to radiotherapy. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, China, v. 33, n. 1, p. 1-9, 2014.

YAMAGUCHI, H.; WYCKOFF, J.; CONDEELIS, J. Cell migration in tumors. **Current opinion in cell biology**, Estados Unidos, v. 17, n. 5, p. 559-564, 2005.

YANAGI, M.; UCHIDA, N.; HAMADA, H. Versatile synthetic route for resveratrol modification via amine functionalization. **Natural Product Communications**, Japão, v. 14, n. 9, p. 1934578X19876210, 2019.

YANG, H. *et al.* Structure and activity relationship of curcumin: role of methoxy group in anti-inflammatory and anti-colitis effects of curcumin. **The FASEB Journal**, Estados Unidos, v. 31, p. 972.24-972.24, 2017.

YOUSSEF, K. M. *et al.* Chemopreventive effects of curcumin analogs in DMH-Induced colon cancer in albino rats model. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, Egito, v. 1, n. 2, p. 57-72, 2015.

YOKOO, Y. *et al.* Effects of Nrf2 silencing on oxidative stress-associated intestinal carcinogenesis in mice. **Cancer medicine**, Japão, v. 5, n. 6, p. 1228-1238, 2016.

XIONG, H. *et al.* The antitumor effect of resveratrol on nasopharyngeal carcinoma cells. **Front Biosci (Landmark Ed)**, China, v. 24, p. 961-70, 2019.

ZHANG, W.; XU, J. DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis. **Biomarker research**, China, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2017.

ZHAO, Y. *et al.* The beneficial effects of quercetin, curcumin, and resveratrol in obesity. **Oxidative medicine and cellular longevity**, China, v. 2017, p. 1-8, 2017.

ZHAO, Y. *et al.* Resveratrol inhibits proliferation, migration and invasion via Akt and ERK1/2 signaling pathways in renal cell carcinoma cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, China, v. 98, p. 36-44, 2018.

ZHAO, Y. *et al.* The role of canonical Wnt signaling in regulating radioresistance. **Cellular Physiology and Biochemistry**, China, v. 48, n. 2, p. 419-432, 2018.

ZHOU, H. *et al.* The prognostic value of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer: A meta-analysis. **Medicine**, China, v. 97, n. 50, 2018.

ZHU, G. *et al.* Curcumin inhibited the growth and invasion of human monocytic leukaemia SHI-1 cells in vivo by altering MAPK and MMP signalling. **Pharmaceutical biology**, China, v. 58, n. 1, p. 25-34, 2020.

ZHU, M. *et al.* Modulation of miR-34a in curcumin-induced antiproliferation of prostate cancer cells. **Journal of cellular biochemistry**, China, v. 120, n. 9, p. 15616-15624, 2019.

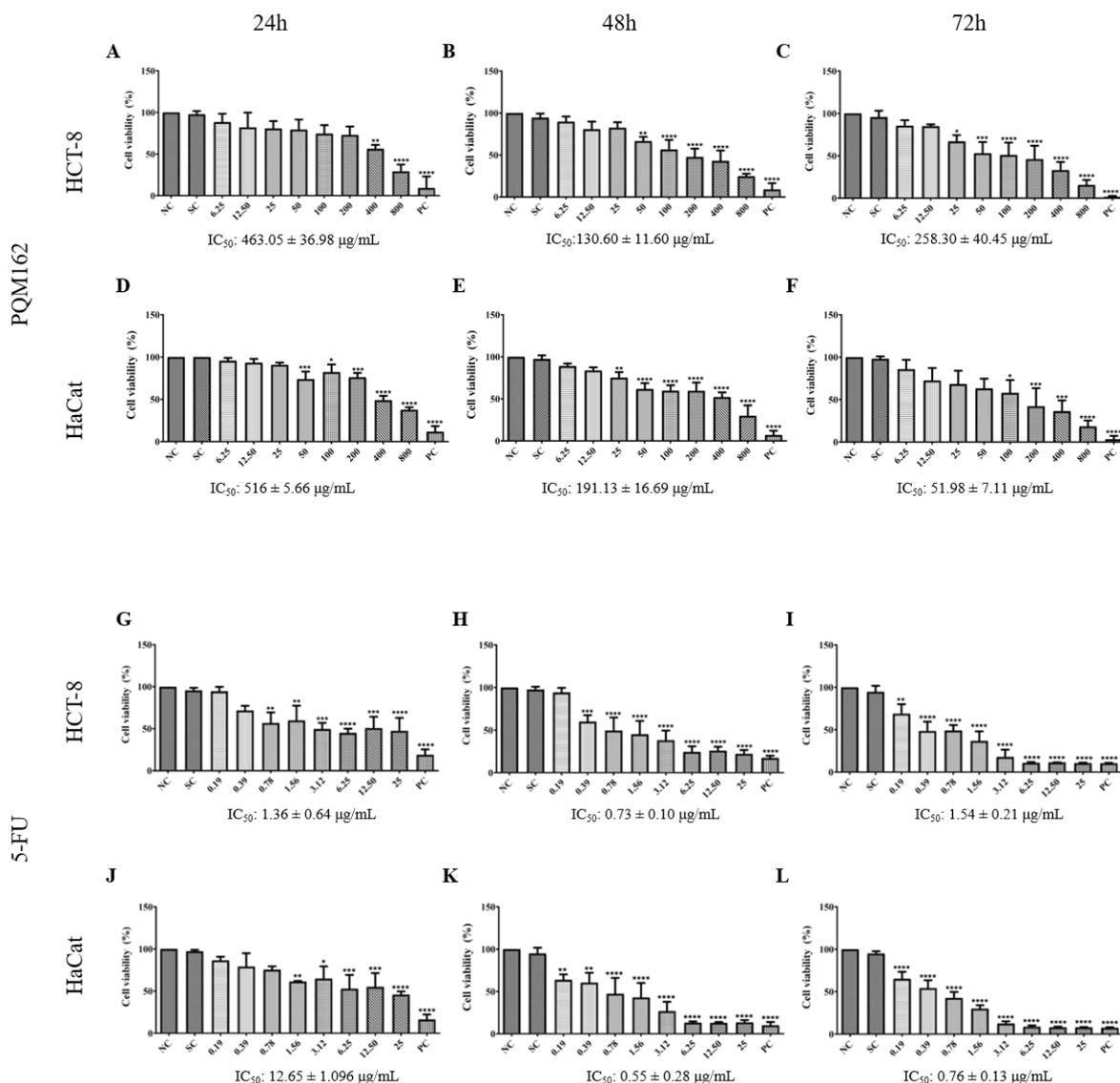
## APÊNDICES

### APÊNDICE A – Frequências médias da razão de PCE/PCE + NCE e PCEMNs observados em sangue periférico de camundongos Swiss após os tratamentos com PQM162 e controles.

Tratamentos (mg/kg p.c.)	PCE/PCE + NCE <sup>a</sup> Média ± DP	PCEMNs <sup>b</sup> Média ± DP	% Redução de danos
Controle	0,062 ± 0,020	11,83 ± 2,23	-
DMSO	0,048 ± 0,013	12,00 ± 2,37	-
64	0,061 ± 0,009	12,67 ± 3,20	-
DXR	0,038 ± 0,004	45,33 ± 3,88 <sup>c</sup>	-
DMSO + DXR	0,057 ± 0,025	41,00 ± 3,58 <sup>c</sup>	-
8 + DXR	0,043 ± 0,012	30,67 ± 2,50 <sup>c,d</sup>	43,76
16 + DXR	0,051 ± 0,022	29,67 ± 4,02 <sup>c,d</sup>	46,75
32 + DXR	0,059 ± 0,028	33,67 ± 5,57 <sup>c,d</sup>	34,81
64 + DXR	0,038 ± 0,008	31,17 ± 4,96 <sup>c,d</sup>	42,27

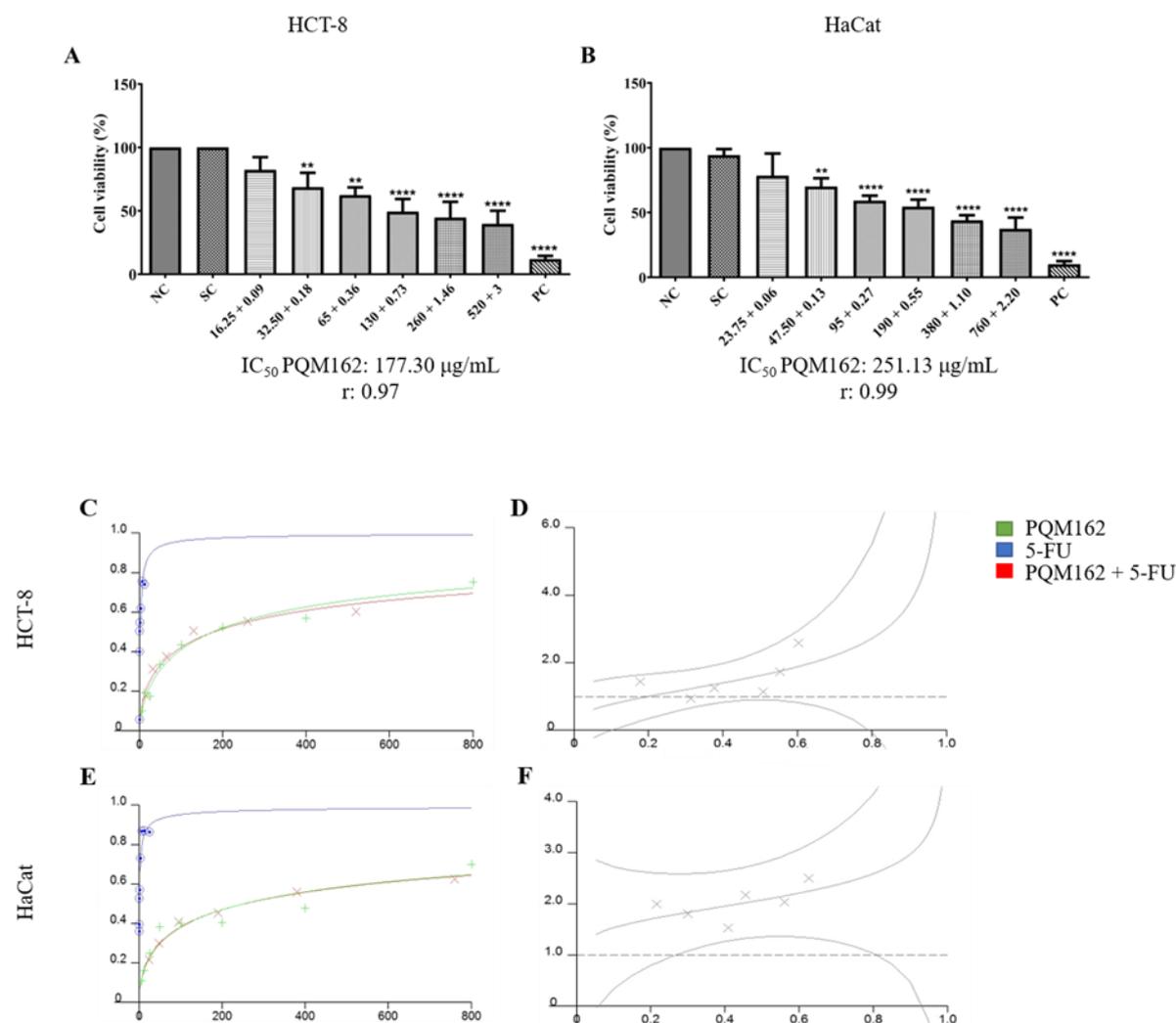
PCEs – eritrócitos policromáticos; NCEs – eritrócitos normocroáticos; PCEMNs - eritrócitos policromáticos micronucleados; PQM162 - (E) – 3 – (4-hidroxi-3-metoxifenil) -N'- (4-metoxilbenzilideno) acrilidrazida; DMSO - dimetilsulfóxido (0,03 g/kg p.c.), DXR - doxorrubicina (15mg/kg p.c.). <sup>a</sup> Foram analisados 2000 eritrócitos por animal, correspondente a um total de 6.000 células por tratamento (PCE/PCE + NCE). <sup>b</sup> Foram analisados 4.000 eritrócitos por animal, correspondente a um total de 24.000 células por tratamento. <sup>c</sup>Significativamente diferente do grupo controle negativo (P < 0,05). <sup>d</sup>Significativamente diferente do grupo DXR (P < 0,05).

**APÊNDICE B – Cell viability determined by MTT assay. HCT-8 and HaCat cell lines were treated with the isolated compounds PQM162 and 5-FU at different concentrations for 24 (A, D, G and J), 48 (B, E, H and K) and 72h (C, F, I and L).**



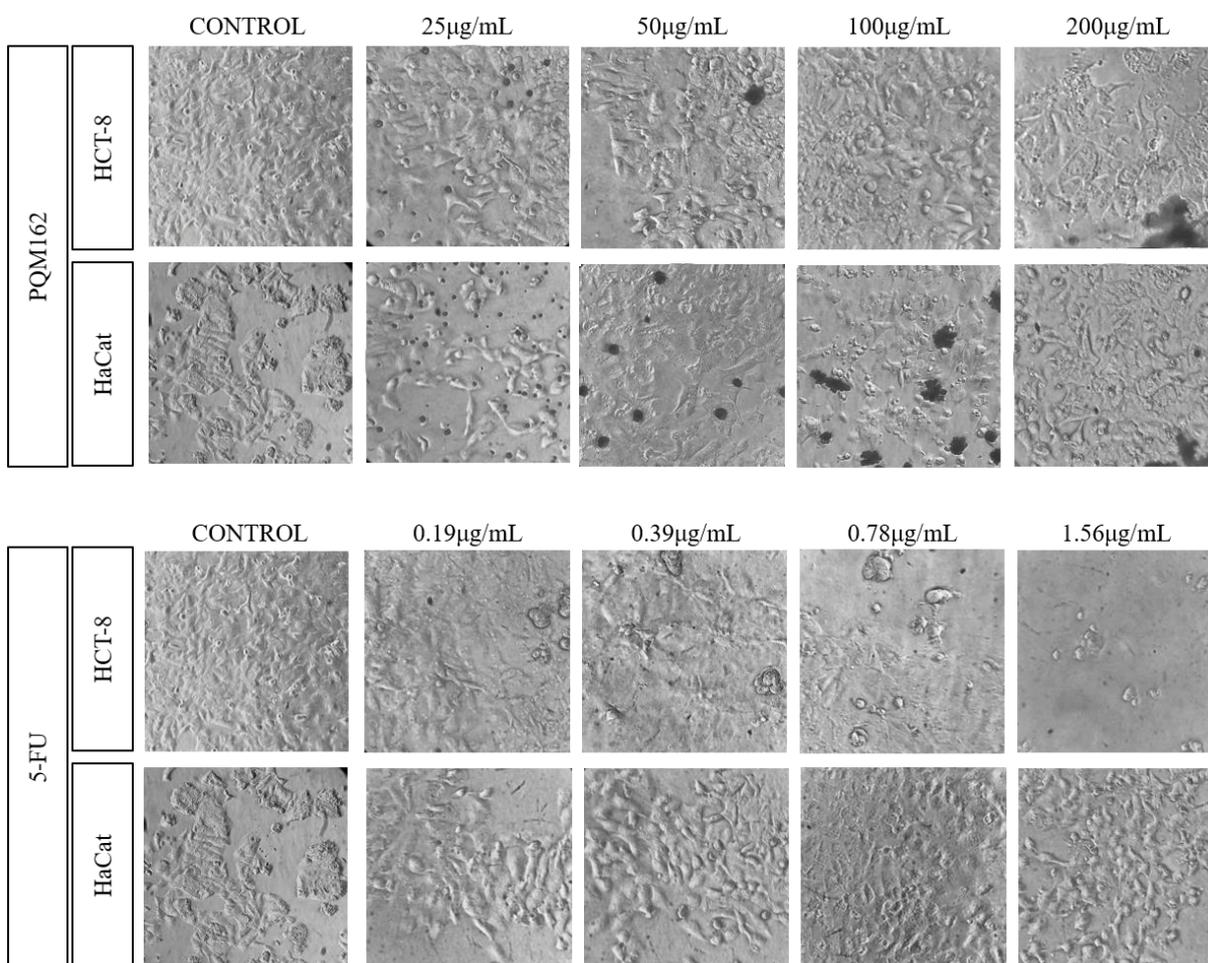
All values are presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of 3 independent experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  according to ANOVA analysis followed by Bonferroni's multiple comparisons test. HCT-8 – colorectal adenocarcinoma cell line, HaCat – normal human keratinocytes cell line, PQM162 - (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N'-(4-methoxybenzylidene) acrylohydrazide, 5-FU – 5-fluorouracil, NC- negative control, SC – solvent control (DMSO – Dimethyl sulfoxide 1%), PC – positive control (DMSO - Dimethyl sulfoxide 25%),  $IC_{50}$  - concentration required to reduce cell proliferation by 50%.

**APÊNDICE C – Cell viability determined by MTT assay (a and b). HCT-8 and HaCat cell lines were treated with the combination of PQM162 and 5-FU at different concentrations for 48h.**



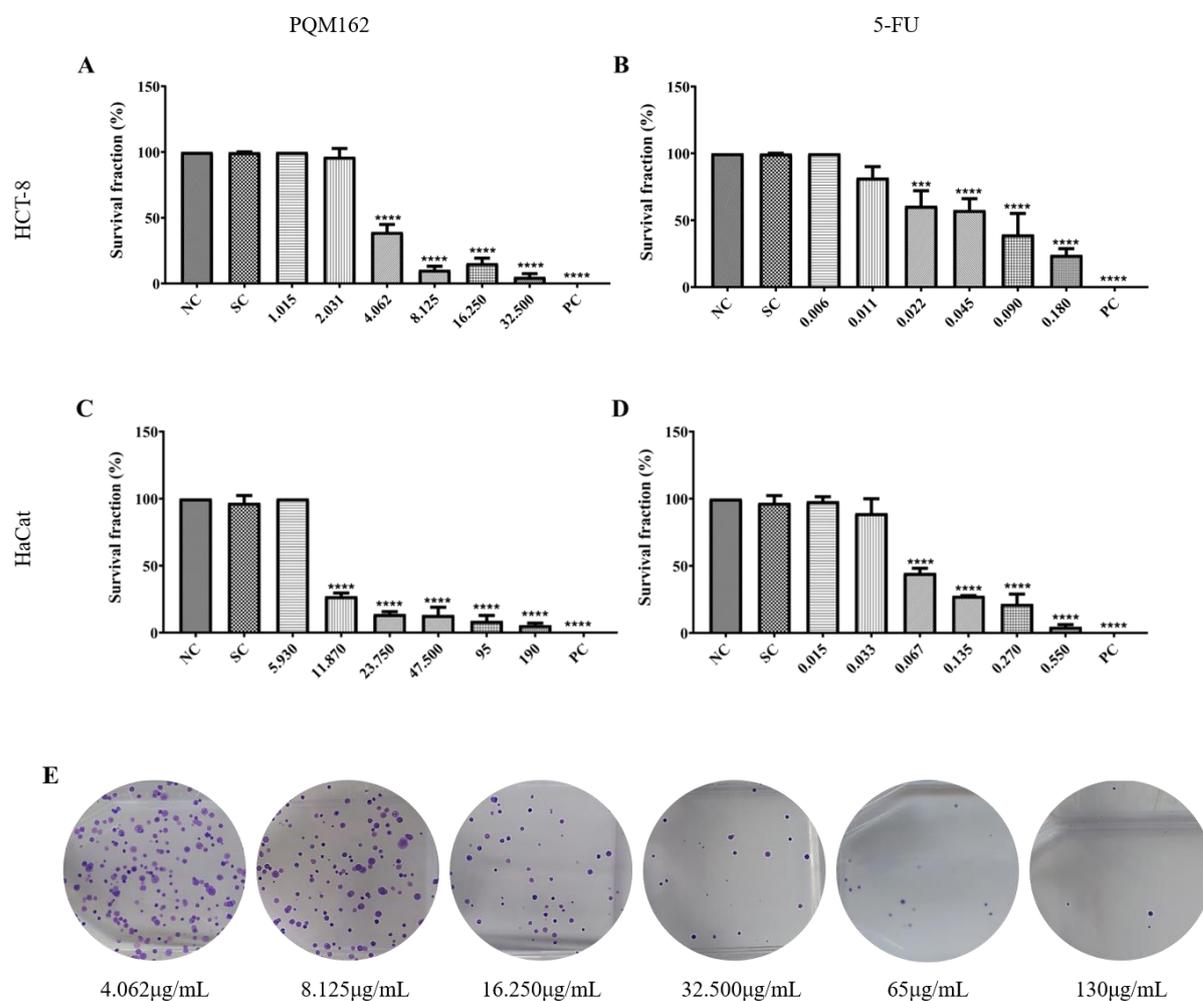
Values are presented as the mean ± standard deviation (SD) of 3 independent experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  according to ANOVA analysis followed by Bonferroni's multiple comparisons test. Anti-proliferative dose-response curve (C and E) and the determination of the Combination Index (CI) (D and F) with the concurrent treatment of both substances. In D and F graphs, the dotted line defines CI value=1; crosses represent experimentally obtained CI values and solid lines correspond to CI values estimated by CalcuSyn® software at effect levels from 0 to 100% of inhibition of cell proliferation. HCT-8 – colorectal adenocarcinoma cell line, HaCat – normal human keratinocytes cell line, PQM162 - (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N'-(4-methoxybenzylidene) acrylohydrazide, 5-FU – 5-fluorouracil, NC- negative control, SC – solvent control (DMSO – Dimethyl sulfoxide 1%), PC – positive control (DMSO - Dimethyl sulfoxide 25%), IC<sub>50</sub> - concentration required to reduce cell proliferation by 50%, r – determination coefficient.

**APÊNDICE D – HCT-8 and HaCat morphology after 48h of exposure to different concentrations of PQM162 and 5-FU.**



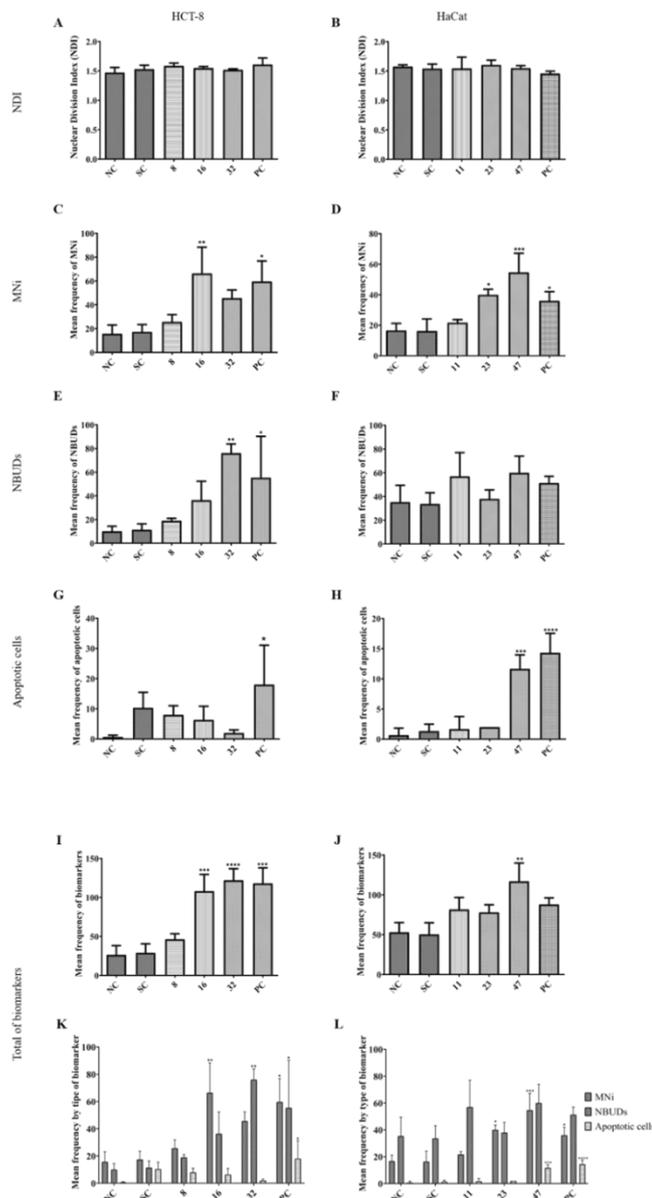
HCT-8 – colorectal adenocarcinoma cell line, HaCat – normal human keratinocytes cell line, PQM162 -(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N'-(4-methoxybenzylidene) acrylohydrazide, 5-FU – 5-fluorouracil, CONTROL- negative control.

**APÊNDICE E – Survival fraction of colonies of HCT-8 and HaCat cell lines after exposure to different concentrations of the isolated treatments with PQM162 (A and C) and 5-FU (B and D). (E) PQM162 on viable colony formation in HCT-8 tumor cell line.**



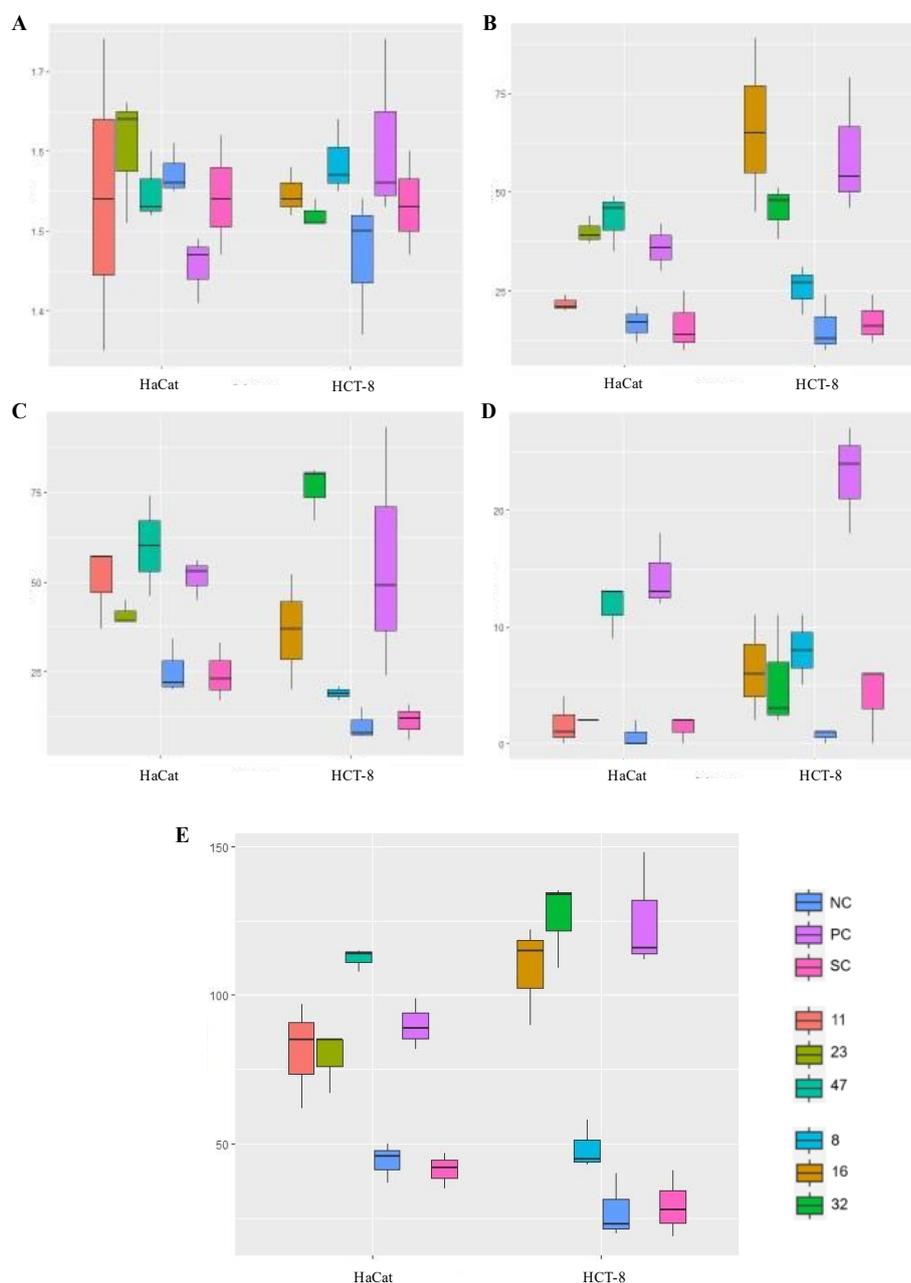
All values are presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of 3 independent experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  according to ANOVA analysis followed by Tukey's multiple comparisons test. HCT-8 – colorectal adenocarcinoma cell line, HaCat – normal human keratinocytes cell line, PQM162 – (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N'-(4-methoxybenzylidene) acrylohydrazide, 5-FU – 5-fluorouracil, NC- negative control, SC – solvent control (DMSO – Dimethyl sulfoxide 1%), PC – positive control (DMSO - Dimethyl sulfoxide 25%).

**APÊNDICE F – Genetic instability events. Nuclear Division Index (A and B). Mean frequency of micronuclei (C and D), nuclear buds (E and fF) and apoptotic cells (g and H). I and j represent the frequency of all biomarkers found, and k and l their mean frequency by type.**



The appearance of nucleoplasmic bridges (NPBs) was not statistically significant in both cell lines and treatments values of damaged cells were based on the count of 1000 binucleated cells after exposure of both cell lines (HCT-8 and HaCat) to the proposed treatments for 48h. All values are presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of 3 independent experiments. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 according to ANOVA analysis followed by Tukey's multiple comparisons test. HCT-8 – colorectal adenocarcinoma cell line, HaCat – normal human keratinocytes cell line, NC- negative control, SC – solvent control (DMSO – Dimethyl sulfoxide 0.5%), PC – positive control (5-FU – 5-fluorouracil – 0.1  $\mu$ g/mL), MNi- micronuclei, NBUDs- nuclear buds.

**APÊNDICE G – Genetic instability events after multiple comparisons. Nuclear Division Index (A), mean frequency of micronuclei (B), nuclear buds (C) and apoptotic cells (D) and (E) the frequency of all biomarkers found.**



The appearance of nucleoplasmic bridges (NPBs) was not statistically significant in both cell lines and treatments. Values of damaged cells were based on the count of 1000 binucleated cells after exposure of both cell lines (HCT-8 and HaCat) to the proposed treatments for 48h. All values are presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of 3 independent experiments, according to nested analysis of variance of fixed effects in Completely Randomized Design (CRD). HCT-8 – colorectal adenocarcinoma cell line, HaCat – normal human keratinocytes cell line, NC- negative control, SC – solvent control (DMSO – Dimethyl sulfoxide 0.5%), PC – positive control (5-FU – 5-fluorouracil – 0.1 $\mu$ g/mL).

## ANEXOS

### ANEXO A – Declaração de aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais em pesquisas – Universidade Federal de Alfenas

	MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO <b>Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG</b> <small>Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000          Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063</small>	
<b>Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL</b>		

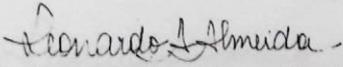
  

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo dos mecanismos quimiopreventivos e quimioterapêuticos de um híbrido resveratrol e curcumina em células tumorais e lesões pré-neoplásicas do cólon", registrada com o nº 03/2019, sob a responsabilidade de Pollyanna Francielli de Oliveira, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	( ) Ensino                      (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 01/03/2019 a 01/10/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico Camundongo Swiss / heterogênico
Nº de animais	216 -Ratos 72 - Camundongos
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 01 de Março de 2019.

  
 Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida  
 Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG