

**Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita  
Filho”**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**Efeito da associação da taurina e do 5-fluorouracil  
em câncer de cólon induzido por DMH.  
Planejamento e síntese de pró-fármacos derivados**

**Daniela Hartmann Jornada**

ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dra. Chung Man Chin  
COORIENTADOR: Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade

Araraquara  
2018

**Daniela Hartmann Jornada**

**Efeito da associação da taurina e do 5-fluorouracil  
em câncer de cólon induzido por DMH.  
Planejamento e síntese de pró-fármacos derivados**

ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Chung Man Chin  
COORIENTADOR: Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, como parte dos requisitos para a Defesa de Doutorado em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara  
2018

**Ficha Catalográfica**

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**J82e**

Jornada, Daniela Hartmann.

Efeito da associação da taurina e do 5-fluorouracil em câncer de cólon induzido por DMH. Planejamento e síntese de pró-fármacos derivados / Daniela Hartmann Jornada. – Araraquara, 2018.

116 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Chung Man Chin.

Coorientador: Cleverton Roberto de Andrade.

1. 5-fluorouracil. 2. Taurina. 3. Câncer colorretal. 4. 1,2-dimetilhidrazina.  
I. Chung, Man Chin, orient. II. Andrade, Cleverton Roberto de, coorient. III. Título.

*Dedico este trabalho à minha tia Claire (in  
memorian), por todos seus ensinamentos e amor.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pelo amparo e proteção nos momentos mais difíceis e por todo aprendizado pessoal e profissional proporcionados por esse trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, por toda estrutura, pelos profissionais e amigos, que foram peça chave para realização deste trabalho. Em especial à minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Chung Man Chin pela confiança em me conceder a realização de um projeto tão inovador, pelos ensinamentos, conselhos e amizade.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade, pelos ensinamentos, conselhos e solicitude durante a realização do trabalho.

À minha família, que sempre esteve ao meu lado, aceitando e apoiando apesar de todas as dificuldades. Ao meu noivo Tiago de Lima Melo Ferreira, por todo amor, compreensão e paciência, e pela ajuda e contribuição no trabalho. À minha mãe pelos momentos de apoio e pelas palavras de carinho.

À colega e amiga Dra. Paula Carolina de Souza, pelos ensinamentos, pela infinita amizade e pela ajuda no planejamento e execução do ensaio animal.

Aos meus colegas e amigos, Me. Cauê Benito Scarim e Me. Diego Eidy Chiba, pela colaboração no ensaio *in vivo*, por todos os ensinamentos e pela amizade.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Katia Sivieri pelas sugestões e ajuda que incitaram a realização deste trabalho.

Aos funcionários do biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Beatriz Fuller e Celso Borsato pela ajuda na manutenção dos animais, em especial pelo auxílio na higienização do biotério do Departamento de Fármacos.

À médica veterinária Isabela Mancini, pelas orientações e ensinamentos.

À técnica de laboratório Marileide Silva pelo auxílio na manutenção dos animais, sempre que possível.

Aos meus queridos amigos e colegas de laboratório Aline Pavan, Thaís Melo, Gabriel Bernardes e Guilherme Fernandes, pela ajuda, troca de ideias e momentos de descontração.

Ao técnico do laboratório de patologia, José Antônio Zuanon, por todos os ensinamentos e amizade.

À Jennyfer Bramé, pelo auxílio nos cortes das peças, por aceitar contribuir em um trabalho em andamento e com grande volume de trabalho.

## *Agradecimentos*

---

À amiga Ana Paula Almeida, pela ajuda no trabalho e amizade.

Aos membros da banca pela contribuição e engrandecimento do trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À FAPESP, Processo nº 2014-14980-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

E finalmente, aos animais:

*“Foste um instrumento de nosso aprendizado? Foste apenas um objeto de  
experiência?”*

*Foste para nós, vítimas solicitadas pela ciência, para benefício da  
humanidade, porém, apesar do teu olhar mudo e de não teres a permissão da  
palavra, isso não nos impedirá de dizer-te sempre: Muito obrigado”*

*(Autoria desconhecida).*

*“Aos outros eu dou o direito de serem como  
são, a mim dou o dever de ser cada dia  
melhor”*

*(Chico Xavier)*

*“Cada um dá o que tem no coração, e cada um  
recebe com o coração que tem”*

*(Oscar Wilde)*

## RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é um dos 10 tipos de câncer mais incidentes no Brasil. A terapia consiste na remoção cirúrgica e em alguns casos, a quimioterapia adjuvante, composta de 5-fluorouracil e outros fármacos associados. O 5-FU, apesar de amplamente utilizado, provoca uma série de efeitos adversos, relacionados à toxicidade renal, cardíaca, hepática e mucosite. Nesse contexto, a ferramenta do planejamento de pró fármacos é uma alternativa para a redução das propriedades indesejadas dos fármacos. Assim, o objetivo deste trabalho foi comprovar a hipótese da diminuição da toxicidade do 5-FU pela taurina, aminoácido com propriedades anti-inflamatórias e antioxidante, para a obtenção de pró-fármacos derivados. Para isso, ratos Wistar foram submetidos ao modelo de carcinogênese de cólon induzida por 1,2-dimetilhidrazina (DMH), e tratados com a associação (5-FU+TAU) por 8 dias, na 20ª semana pós indução. Os resultados demonstraram que a taurina inibe a formação de criptas aberrantes e atua sinergicamente com 5-FU reduzindo a quantidade das mesmas. Além disso, o grupo tratado com 5-FU isolado apresentou aumento de 28% no número de tumores, enquanto a TAU isolada promoveu 64% menos neoplasias que o controle. Na associação a redução na incidência alcança 86%, sendo nenhuma das neoplasias classificadas como adenocarcinomas (tumor invasivo), enquanto TAU isolada apresenta 50%, e 5-FU 70% de adenocarcinomas entre as neoplasias. Os resultados demonstram que a TAU e o 5-FU apresentam efeito quimioterápico e podem ser utilizados na construção de pró-fármacos. Assim, foram realizadas várias tentativas sintéticas, porém sem a obtenção dos mesmos.

**Palavras-chave:** 5-fluorouracil; taurina; câncer colorretal; 1,2-dimetilhidrazina.



## **ABSTRACT**

Colorectal cancer is one of the ten most incident types of cancer in Brazil. Its treatment consists of surgical intervention and, in some cases, adjuvant chemotherapy, using 5-fluorouracil (5-FU) associated with other drugs. Although extensively used, 5-FU presents several adverse effects, related to renal, cardiac and hepatic toxicity and mucositis. In this context, the search of new drugs is an alternative to reduce some undesired properties of the drug. Thus, the objective of this work was to prove the hypothesis of the reduction of toxicity of 5-FU by taurine, amino acid with anti-inflammatory and antioxidant properties, to obtain derivative prodrugs. For this, Wistar rats were submitted to the colon carcinogenesis model induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) and treated with the combination (5-FU + TAU) for 8 days at the 19th week post induction. The results have demonstrated that taurine inhibits the formation of aberrant crypts foci and acts synergistically with 5-FU. In addition, the group treated with 5-FU alone showed a 28% increase in the number of tumors, whereas the isolated TAU promoted 64% fewer neoplasms than the control. In the association, the reduction in incidence reaches 86%, none of the neoplasms classified as adenocarcinomas (invasive tumor), while isolated TAU presents 50%, and 5-FU 70% of adenocarcinomas between neoplasms. Thus, the association results have demonstrated that the two substances presented a chemotherapeutic effect and can be used to obtention of prodrugs. Thus, several attempts have been tried, but without obtaining them.

**Keywords:** 5-fluorouracil; taurine; colorectal cancer; 1,2-dimethylhydrazine.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – graus Celsius  
µL – microlitros  
5-FdUMP - 5-flúor-2-desoxiuridina-5-monofosfato  
5-FDUrd - 5-flúor-2-desoxiuridina  
5-FdUTP - 5-flúor-desoxiuridina-5-trifosfato  
5-FU – 5-fluorouracil  
5-FUH<sub>2</sub> - 5,6-dihidro-5-fluorouracil  
5-FUrd - 5-fluorouridina  
5-FUTP - 5-fluorouridina-5-trifosfato  
ANOVA - Análise de variância  
AOM - azoximetano  
APC - *Adenomatous polyposis coli*  
C - Comprimento  
CCD - cromatografia em camada delgada  
CCNPH - Câncer Colorretal não-polipóide hereditário  
CCR - Câncer Colorretal  
CEUA - Comissão de Ética em Uso de Animais  
DIC – diisopropilcarbodiimida  
DMF – dimetilformamida  
DMH – 1,2- dimetilhidrazina  
DMSO – dimetilsulfóxido  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
DPD - diidropiridina desidrogenase  
Eq – equivalentes  
FCA – focos de criptas aberrantes  
GALT - Tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal  
HE - hematoxilina/eosina  
HOBt – 1-hidroxibenzotriazol  
HPLC – *High performance liquid chromatography*  
HT-29 – *Human Colorectal Adenocarcinoma*  
IL-1β – interleucina-1 beta  
IL-6 – interleucina-6  
INCA – Instituto Nacional do Câncer – Brasil  
kg – quilograma  
K-RAS - *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*  
L - largura  
MAM - metilazoximetanol  
mg – miligrama  
MHz – mega-hertz  
mL – mililitros  
NIC - Instituto Nacional do Câncer - Estados Unidos  
OMS – Organização Mundial da Saúde (*World and Health Organization*)  
PAF - Polipose Adenomatosa Familiar

PGE-2 – prostaglandina E2

pH – concentração hidrogeniônica do meio

Rf - fator de retenção

RMN de <sup>13</sup>C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN de <sup>1</sup>H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1

TAU – taurina

TEA – trietilamina

THF – tetrahidrofurano

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa

TS – timidilato sintase

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma (Adaptado de INCA (2018)(41))....	21
Figura 2. Fases da carcinogênese de cólon e a sequência adenoma-adenocarcinoma (Adaptado de Pino e Chung, 2010 (47); Tetsuji Takayama et al., 1998(49)).	23
Figura 3. Estadiamento do CCR e quimioterapia adjuvante (Adaptado de Czito et al., 2016 (56)).	26
Figura 4. Estrutura química do 5-fluorouracil.	27
Figura 5. Metabolismo do 5-fluorouracil (Baseado em Lemke, 2013 (5)).	29
Figura 6. Estrutura química da taurina.	32
Figura 7. Possível mecanismo de ação da taurina frente à genotoxicidade de nitro compostos (Adaptado de Bosquesi et al., (2018)(84)).	34
Figura 8. Estrutura química do DMH e AOM.	38
Figura 9. Estrutura química dos pró-fármacos planejados.	40
Figura 10. Desenho experimental dos grupos experimentais e tratamentos realizados (dados da pesquisa).	43
Figura 11. Imagem de cólon com lesões consideradas grosseiras de acordo com a padronização realizada (dados da pesquisa).	46
Figura 12. Imagem macroscópica do cólon distal (1). Imagem microscópica do cólon (objetiva 10x) (2), criptas aberrantes (A), cripta normal (B) (dados da pesquisa).	47
Figura 13. (A) Identificação dos fragmentos do cólon distal; (B) Fragmentos de cólon em ordem alfabética nos cassetes; (C) Lâmina pronta, contendo todos os fragmentos do cólon distal (dados da pesquisa).	49
Figura 14. Imagens de microscopia para diferenciação entre adenoma e adenocarcinoma (Dados da pesquisa).	50

Figura 15. Exemplo de mucosa displásica (objetiva de 5x e 10x, respectivamente) (dados da pesquisa).....	50
Figura 16. Área de infiltrado inflamatório (dados da pesquisa). ....	51
Figura 17. Aspecto da camada muscular atrófica e normal (dados da pesquisa). ....	52
Figura 18. Mitose encontrada na cripta do cólon (dados da pesquisa). ....	52
Figura 19. Planejamento estrutural dos pró-fármacos recíprocos de 5-FU e taurina (dados da pesquisa).....	54
Figura 20. Esquema retrossintético para obtenção dos pró-fármacos recíprocos 5-FU+TAU-1(1) e 5-FU-TAU-2 (7) (dados da pesquisa).....	56
Figura 21. Esquema de obtenção do intermediário (2) a partir dos reagentes (4) e (5) (dados da pesquisa).....	57
Figura 22. Esquema sintético de obtenção do intermediário (2) a partir dos reagentes (4) e (6) (dados da pesquisa). ....	59
Figura 23. Esquema de obtenção do intermediário (8) em dimetilformamida (dados da pesquisa).....	60
Figura 24. Variação de peso entre os grupos nas fases do experimento. Os valores são a média de cada grupo em porcentagem (dados da pesquisa).....	66
Figura 25. Número de lesões visíveis por grupo experimental (dados da pesquisa).	68
Figura 26. Gráfico da distribuição das lesões visíveis de acordo com as porções do cólon nos grupos experimentais (dados da pesquisa). ....	69
Figura 27. Imagem dos tumores de cólon (células LoVo) tratados com taurina, obtidos a partir de modelo xenográfico (Adaptado de Zhang et al. (2014) (37)). ....	70
Figura 28. Imagem macroscópica com o cólon total de um animal de cada grupo experimental, as setas pretas indicam lesões visíveis (dados da pesquisa).....	71

Figura 29. Gráfico do número total de lesões visíveis de acordo com o volume (dados da pesquisa).....	72
Figura 30. Média de focos e criptas aberrantes nos grupos induzidos (dados da pesquisa).....	74
Figura 31. Gráfico do número total de focos e a multiplicidade em cada grupo (dados da pesquisa).....	76
Figura 32. Imagem microscópica dos focos de criptas aberrantes em alguns grupos experimentais (dados da pesquisa).....	77
Figura 33. Imagem microscópica (objetiva de 4x) de fragmentos do cólon distal dos grupos experimentais (dados da pesquisa).....	83
Figura 34. Gráfico de displasia e índice mitótico no cólon distal (dados da pesquisa). .....	84
Figura 35. Gráfico de peso relativo do baço (dados da pesquisa). ....	87
Figura 36. Gráfico da análise histopatológica do baço (Dados da pesquisa). ....	88
Figura 37. Imagens microscópicas do baço de alguns animais dos grupos experimentais, as setas vermelhas indicam espessamento da cápsula do baço (objetiva 4x) (dados da pesquisa). ....	90
Figura 38. Mecanismo de reação (adição-eliminação) proposto para a formação do intermediário (2) em meio básico (Baseado em Carey et al. 2007 <sup>a</sup> ). ....	91
Figura 39. Mecanismo de reação proposto para reação entre a taurina (4) e o brometo de bromoacetila (2) (Baseado em Carey & Sundberg, 2007a).....	95

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Tabela com os grupos experimentais.....	44
Tabela 2. Peso corporal dos animais de acordo com o grupo e a fase do experimento. .....	63
Tabela 3. Tabela com alguns dos parâmetros histológicos analisados para o cólon (distal). .....	79
Tabela 4. Dados das substâncias obtidas de acordo com as metodologias utilizadas. .....	93
Tabela 5. Parâmetros para análise do cólon.....	114
Tabela 6. Parâmetros para análise do baço.....	115
Tabela 7. Proporção de pesos corporais médios de cada grupo em relação ao peso inicial dos animais divididos por fase do experimento.....	116

## SUMÁRIO

Resumo .....	VII
Abstract.....	IX
Lista de Abreviatura e Siglas .....	X
Lista de Figuras.....	XII
Lista de Tabelas.....	XV
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	21
Câncer colorretal (CCR).....	21
Diagnóstico e tratamento do CCR.....	24
Pesquisa de novos fármacos .....	31
Taurina.....	32
Carcinogênese experimental de cólon e 1,2-dimetilhidrazina (DMH).....	37
Hipóteses do trabalho .....	39
3 OBJETIVOS .....	40
Objetivo geral .....	40
3.1.1 <i>Objetivos específicos</i> .....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	41
Reagentes e solventes.....	41
Equipamentos .....	41
Métodos .....	42
4.1.1 <i>Ensaio in vivo - Avaliação do perfil biológico da associação (5-FU e taurina) em modelo de carcinogênese química de cólon</i> .....	42
4.1.2 <i>Análise estatística</i> .....	53



4.1.3	Síntese dos pró-fármacos - Planejamento Estrutural .....	54
4.1.4	Metodologias sintéticas .....	55
4.1.5	Métodos Analíticos .....	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	62
5.1.1	Análise da variação de peso corpóreo dos animais.....	63
5.1.2	Análise macroscópica do cólon .....	67
5.1.3	Análise da formação de focos de criptas aberrantes (ACF) e multiplicidade	73
5.1.4	Análise do baço .....	86
	Síntese e obtenção dos pró-fármacos.....	91
5.1.5	Síntese do intermediário (2) .....	91
	Síntese do intermediário (8) .....	95
6	CONCLUSÕES.....	96
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	97
8	ANEXOS.....	113
	Anexo I – Parecer do Comitê de Ética .....	113
	Anexo II .....	114
	Anexo III .....	115
	Anexo IV – Tabela de peso corporal em porcentagem. ....	116

## 1 INTRODUÇÃO

No ano de 2015 cerca de 8,8 milhões de pessoas vieram à óbito devido a algum tipo de câncer (1). O câncer colorretal (CCR) acomete as regiões anatômicas do cólon e do reto. No Brasil, a estimativa para o ano de 2018 é o surgimento de aproximadamente 36.360 novos casos (2).

A origem mais incidente do CCR é a esporádica, que representa cerca de 80% dos casos (3,4). É caracterizada pelo surgimento de tumores devido à exposição a agentes externos e comportamentais, que promovem mutações somáticas levando à formação de tumores (5–7).

O processo de carcinogênese envolve três etapas: iniciação, promoção e progressão. Durante a fase de iniciação, na presença do agente promotor, ocorrem as alterações nos genes, gerando células chamadas de iniciadas. Nesta fase não é possível verificar alterações clínicas (8,9). Na fase de promoção, após a ação do agente promotor, ocorre a expansão clonal seletiva das células alteradas, formando uma lesão pré-neoplásica (9). Por vezes, pode haver interrupção do processo, uma vez que seja desencadeado o processo de apoptose dessas células, o que está relacionado ao fator fisiológico de defesa de cada organismo. Já na fase de progressão, observa-se a autossuficiência e proliferação celular desordenada, esta fase é irreversível e leva às manifestações clínicas da doença (8,9).

O principal mecanismo molecular envolvido na carcinogênese colorretal é a via adenoma-carcinoma. Ocorre mutação no gene APC, promovendo aumento da *B*-catenina intracelular e, conseqüentemente, da proliferação celular. Em seguida, ocorrem outras mutações em *K-Ras* e genes como p53, que promovem alterações grosseiras nos genes, características do processo de adenocarcinoma (6,10,11).

De modo geral, o tratamento do CCR consiste na remoção cirúrgica da porção afetada do cólon e a quimioterapia, composta de 5-fluorouracil e outros fármacos associados (6,12,13). O 5-FU é um fármaco antimetabólito, análogo da uracila, capaz de promover a incorporação do seu análogo fluoronucleotídeo durante o processo de síntese de DNA e RNA. Isso promove a interrupção da síntese de nucleotídeos e aciona o processo de apoptose (14–19). Apesar da ampla utilização, o 5-FU provoca uma série de efeitos adversos, como toxicidade cardíaca, renal e hepática. Além disso, provoca mucosite, aumentando a fragilidade tecidual e reduzindo a eficácia da absorção intestinal (redução no tamanho das microvilosidades), e aumenta a permeabilidade da membrana das células da mucosa. Isso faz com que esses pacientes apresentem casos de sepse e por vezes, sejam levados à óbito (18,20).

A pesquisa de novos fármacos é um processo complexo, em que, às vezes, apesar de se obter um fármaco ativo, este apresenta uma série de inconvenientes, como problemas farmacocinéticos, farmacotécnicos ou efeitos adversos (21–23). Dessa forma, estratégias de modificação molecular são utilizadas para melhorar o perfil do fármaco, uma delas é a obtenção de pró-fármacos. Essa estratégia envolve a incorporação de um grupo lábil ao fármaco original, que ao ser metabolizado *in vivo*, libera o fármaco ativo para promover sua ação farmacológica. Os pró-fármacos recíprocos são aqueles em que o grupo lábil também possui atividade biológica (21,23–25).

A taurina, um aminoácido considerado semi-essencial, possui ampla atividade anti-inflamatória e antioxidante descrita na literatura (26–28). Recentemente, pesquisadores evidenciaram o efeito protetor da taurina reduzindo os efeitos adversos de fármacos utilizados na terapia de diversos tipos de câncer, como a doxorrubicina e a cisplatina (29–31). Além disso, o aminoácido apresentou atividade biológica frente

à diversos tipos de tumores, como mama, fígado, cólon e tumor ascítico de Ehrlich, tanto como protetor de carcinogênese quanto redutor de proliferação das células tumorais (32–38).

A DMH (1,2- dimetil-hidrazina) é um agente indutor amplamente utilizado em modelos de carcinogênese química de cólon e apresenta especificidade quanto a formação e tumores de cólon em roedores. Chamado de pró-carcinógeno, essa substância é metabolizada *in vivo* e promove a formação de neoplasias no cólon (39).

Nesse contexto, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito da taurina quando associada ao 5-FU no tratamento do câncer de cólon induzido quimicamente, avaliando se ocorre redução de efeitos adversos do 5-FU, bem como verificar se o aminoácido apresenta atividade antitumoral neste modelo animal. Além disso, a partir desta prova de conceito, objetivou-se o planejamento e obtenção de pró-fármaco recíprocos de 5-FU e taurina.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### Câncer colorretal (CCR)

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 8,8 milhões de pessoas morreram de algum tipo de câncer no ano de 2015, o que representou cerca de 13% das causas de mortes no mundo (1).

O câncer colorretal (CCR) acomete as regiões do cólon e reto e está entre os que mais causam mortes, no ano de 2015 foram cerca de 774 milhões de óbitos pela doença no mundo (40). No Brasil, a estimativa em 2018 é de aproximadamente 36.360 novos casos, sendo 17.380 homens e 18.980 mulheres (Figura 1) (2).

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

**Figura 1.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma (Adaptado de INCA (2018)(41)).

Os casos de CCR podem ser de origem hereditária, quando relacionados à suscetibilidade genética; e esporádicos, quando causados devido a mutações somáticas (3,4).

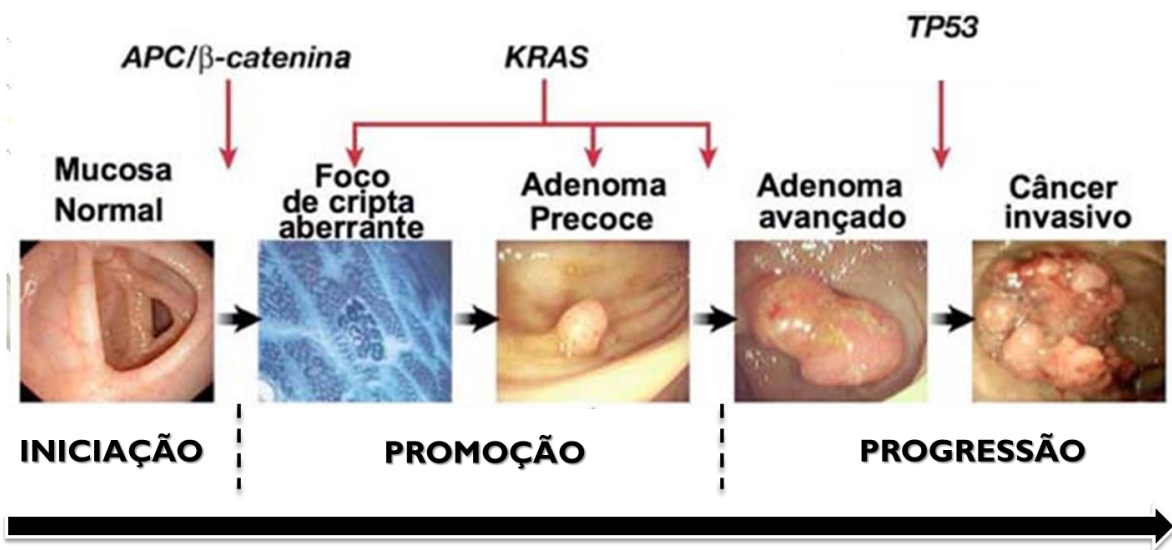
O CCR de origem hereditária representa cerca de 15 a 30% dos casos e as principais síndromes são: polipose adenomatosa familiar (PAF) e a síndrome de Linch (6,42). A PAF caracteriza-se como uma mutação autossômica dominante, em que há mutação no gene APC (*Adenomatous polyposis coli*), que leva a formação de vários

adenomas ao longo do cólon. Geralmente acomete pessoas com menos de 30 anos e a quantidade de adenomas tende a aumentar em número com o passar da idade. Cerca de 100% desses pacientes evoluem para adenocarcinoma, por isso realiza-se a colectomia completa como tratamento (6,42,43). No entanto, mesmo após esse procedimento, podem surgir novos tumores em outros locais do organismo, como estômago, pâncreas, tireoide e sistema nervoso central (6,44).

A Síndrome de Lynch, também conhecida como câncer colorretal não-polipóide hereditário (CCNPH), é causada por mutações em genes responsáveis pelo sistema de reparo durante a replicação de DNA (6,42). Esses genes são chamados *mismatch*, os tipos mais envolvidos são MSH2 e MLH1. Durante o processo de replicação, quando ocorre replicação de sequência de DNA repetidas, os chamados DNA microssatélites, o sistema de reparo ineficiente leva ao acúmulo dessas sequências não-codificantes, gerando a CCNPH (6,42,43). A idade média dos pacientes é entre 41 e 54 anos (43).

Já os casos de CCR esporádicos, envolvem uma série de fatores indutivos, como microrganismos, radiação (solar, nuclear, ionizante, ultravioleta) e fatores comportamentais (tabagismo, etilismo, má alimentação, inatividade física) (5–7).

A carcinogênese do CCR é dividida em três etapas: iniciação, promoção e progressão (figura 2). A etapa de iniciação é caracterizada pela exposição ao agente carcinogênico (iniciador) e alteração do DNA, levando a produção de células iniciadas (8,9,45). Na etapa de promoção, ocorre a expansão clonal seletiva das células alteradas geneticamente. Nesta fase se observa formação de lesão pré-neoplásica, embora a retirada do estímulo possa reverter o processo de carcinogênese nesta fase (8,9,46).



**Figura 2.** Fases da carcinogênese de cólon e a sequência adenoma-adenocarcinoma (Adaptado de Pino e Chung, 2010 (47); Tetsuji Takayama et al., 1998(49)).

Na fase de progressão, o tecido é resistente à fatores pró-apoptóticos e ocorre a proliferação desordenada das células. Esta fase não é reversível e dará origem às manifestações clínicas (8,9).

Atualmente, para o câncer colorretal as principais vias moleculares de formação tumoral são: a instabilidade cromossômica e instabilidade nos microssatélites. Esta última está relacionada ao sistema de reparo *mismatch*, característico da síndrome de Lynch, e representa somente 15% dos casos de CCR (50).

A primeira, a via da instabilidade cromossômica é a mais comum, responsável por cerca de 80% dos casos de CRC esporádico, também conhecida como via APC/β-catenina ou via clássica, sendo caracterizada pela sequência adenoma-adenocarcinoma (6,51). O processo envolve mutação na via canônica Wnt, que é relacionada à proliferação celular. Inicialmente ocorre mutação no gene que codifica a proteína APC (*Adenomatous polyposis coli*), que é responsável pela clivagem e degradação da β-catenina no citoplasma da célula. Isso promove o acúmulo de β-

catenina e sua translocação para o núcleo, levando a transcrição de genes relacionados a proliferação celular e promovendo a formação de um adenoma precoce (figura 2)(6,47). Tardiamente também se verifica ativação do proto-oncogene K-RAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), envolvido no crescimento tecidual e inibição do processo de apoptose. Depois, observa-se a formação de processos neoplásicos malignos (adenocarcinomas), e surgem mutações em outros genes anti-apoptóticos como SMAD-2, SMAD-4 e p53, gerando mutações adicionais e alterações cromossômicas grosseiras (6,47,52,53).

### **Diagnóstico e tratamento do CCR**

O diagnóstico da doença compreende no exame físico em que os pacientes relatam dor abdominal, perda de sangue nas fezes e exames bioquímicos detalhados em que se pode verificar anemia. A confirmação do diagnóstico é feita através da colonoscopia e do exame histopatológico (7,13).

O maior obstáculo na quimioterapia do câncer são os efeitos decorrentes da falta de seletividade dos fármacos, o que faz com que esses apresentem uma série de efeitos tóxicos, principalmente para células de ciclo de vida rápido, como as do sistema digestório (15). De maneira geral, os quimioterápicos aumentam o estresse oxidativo e induzem o processo inflamatório, causando danos e modificação na estrutura de macromoléculas, que por sua vez ocasionam a desregulação de diversos processos fisiológicos (54,55).



Órgãos como pulmões, coração e rins frequentemente sofrem de efeitos adversos considerados irreversíveis. Outra dificuldade é a ineficiência terapêutica, em que os tumores são resistentes ao quimioterápico, isso ocorre principalmente em estágios avançados da doença, e em casos de tumores metastáticos (15,18).

A susceptibilidade individual é outro fator agravante no tratamento, que torna necessário o cuidado com o ajuste posológico e esquema de administração. A presença de comorbidades também dificulta o processo curativo/paliativo (15).

A tratamento do CCR é dependente do estadiamento do paciente, de acordo com os achados histopatológicos e a extensão da lesão. Para isso, utiliza-se o critério TNM (*Tumor, Lymph nodes and Metastasis*) para avaliação do estágio do paciente e escolha da terapia apropriada. A figura 3 mostra o critério TNM, em que se observa que o tratamento quimioterápico é utilizado impreterivelmente no estágio III, em que o tumor do cólon pode estar em T1 a 3, mas há comprometimento de um dos linfonodos próximos (N1). Nos estágios anteriores a quimioterapia pode ou não ser utilizada, avaliando-se cada caso especificamente (56).

<b>TX</b>	Primary tumor cannot be assessed
<b>T0</b>	No evidence of primary tumor
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ: intramucosal carcinoma (involvement of lamina propria with no extension through muscularis mucosae)
<b>T1</b>	Tumor invades the submucosa (through the muscularis mucosa but not into the muscularis propria)
<b>T2</b>	Tumor invades the muscularis propria
<b>T3</b>	Tumor invades through the muscularis propria into the pericolorectal tissues
<b>T4</b>	Tumor invades the visceral peritoneum or invades or adheres to adjacent organ or structure
T4a	Tumor invades through the visceral peritoneum (including gross perforation of the bowel through tumor and continuous invasion of tumor through areas of inflammation to the surface of the visceral peritoneum)
T4b	Tumor directly invades or is adheres to adjacent organs or structures
<b>Regional Lymph Nodes (N)</b>	
<b>NX</b>	Regional lymph nodes cannot be assessed
<b>N0</b>	No regional lymph node metastasis
<b>N1</b>	One to three regional lymph nodes are positive (tumor in lymph nodes measuring $\geq 0.2$ mm), or any number of tumor deposits are present and all identifiable lymph nodes are negative
N1a	One regional lymph node is positive
N1b	Two or three regional lymph nodes are positive
N1c	No regional lymph nodes are positive, but there are tumor deposits in the subserosa, mesentery, or nonperitonealized pericolic, or perirectal/mesorectal tissues
<b>N2</b>	Four or more regional lymph nodes are positive
N2a	Four to six regional lymph nodes are positive
N2b	Seven or more regional lymph nodes are positive

**Distant Metastasis (M)**

- M0** No distant metastasis by imaging, etc.; no evidence of tumor in distant sites or organs
- M1** Metastasis to one or more distant sites or organs or peritoneal metastasis is identified
  - M1a Metastasis to one site or organ is identified without peritoneal metastasis
  - M1b Metastasis to two or more sites or organs is identified without peritoneal metastasis
  - M1c Metastasis to the peritoneal surface is identified alone or with other site or organ metastases

PATHOLOGIC STAGE	ADJUVANT TREATMENT
Tis; T1, N0, M0; T2, N0, M0; T3, N0, M0 <sup>1</sup> (MSI-H or dMMR)	Observation
T3, N0, M0 (MSI-L or MSS and no high-risk features)	Observation or Consider capecitabine or 5-FU/leucovorin
T3, N0, M0 at high risk for systemic recurrence or T4, N0, M0	Capecitabine or 5-FU/leucovorin or FOLFOX or CAPEOX or Observation
T1-3, N1 (Low-risk stage III)	Preferred: • CAPEOX (3 mo) or • FOLFOX (3-6 mo) or Other options include: Capecitabine (6 mo) or 5-FU (6 mo)
T4, N1-2; T Any, N2 (High-risk stage III)	Preferred: • CAPEOX (3-6 mo) or • FOLFOX (6 mo) or Other options include: Capecitabine (6 mo) or 5-FU (6 mo)

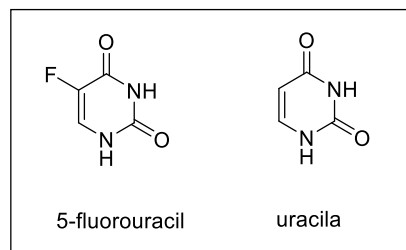
\*FOLFOX: 5-fluorouracil+oxaliplatina; CAPEOX: capecitabina+oxaliplatina;

**Figura 3.** Estadiamento do CCR e quimioterapia adjuvante (Adaptado de Czito et al., 2016 (56)).

O tratamento do CCR inclui a remoção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, sendo incomum a utilização de um método único. De qualquer modo, o objetivo do tratamento é gerar resposta curativa, melhora da qualidade de vida ou mesmo aumento da sobrevida do paciente (7,57). No Brasil, a quimioterapia é dependente do tipo de neoplasia, tem duração de 3 a 12 meses, sendo indicada de acordo com o estágio tumoral e variando os intervalos entre as administrações (7,57).

A quimioterapia disponível tem efeito adjuvante, é utilizada em casos específicos, e o padrão de tratamento é composto de 5-fluorouracil (5-FU) e associações (13).

O 5-fluorouracil é um antineoplásico, análogo da uracila (Figura 4), uma base nitrogenada indispensável na síntese de DNA e RNA. Sintetizado pela primeira vez em meados de 1957 por Charles Heidelberger, é o fármaco padrão para tratamento do câncer de cólon (15).



**Figura 4.** Estrutura química do 5-fluorouracil.

Seu mecanismo de ação envolve a formação de metabólitos fluoronucleotídeos, por isso pertence à classe dos antimetabólitos. *In vivo*, esses fluoronucleotídeos são erroneamente incorporados à síntese do material genético, induzindo o processo de morte celular. Amplamente utilizado na terapia do câncer, sua principal indicação são tumores sólidos, como câncer colorretal, câncer de cabeça e pescoço, mama, próstata, fígado, pâncreas e carcinoma geniturinário (16–18,58).

De modo geral, o mecanismo de ação do 5-FU envolve a incorporação do derivado fluoronucleotídeo à síntese de RNA e DNA no lugar da uracila, o que ocasiona interrupção na síntese de nucleotídeos e aciona o processo de apoptose celular (14–19). Seu metabolismo ocorre através de duas vias competitivas: a anabólica, responsável pela atividade biológica e a catabólica, responsável pelos mecanismos de eliminação do fármaco (15,17). A via anabólica é um processo complexo e envolve a adição de uma ribose e três grupos fosfatos, podendo ocorrer através de três vias alternativas, conforme observa-se na Figura 5. A principal delas, envolve a enzima timidilato sintase (TS), que em condições normais é responsável pela adição de um grupo metila à uracila (seu substrato natural), formando a timina (18). No caso do 5-FU, através desta via ocorre a adição de uma ribose ao 5-FU gerando o 5-flúor-2-desoxiuridina (5-FDUrd), em seguida ocorre uma etapa de fosforilação, formando o intermediário 5-flúor-2-desoxiuridina-5-monofosfato (5-FdUMP), que sofre ataque nucleofílico do átomo de enxofre do resíduo de 195 de cisteína da enzima TS (Figura 5) (14–19).

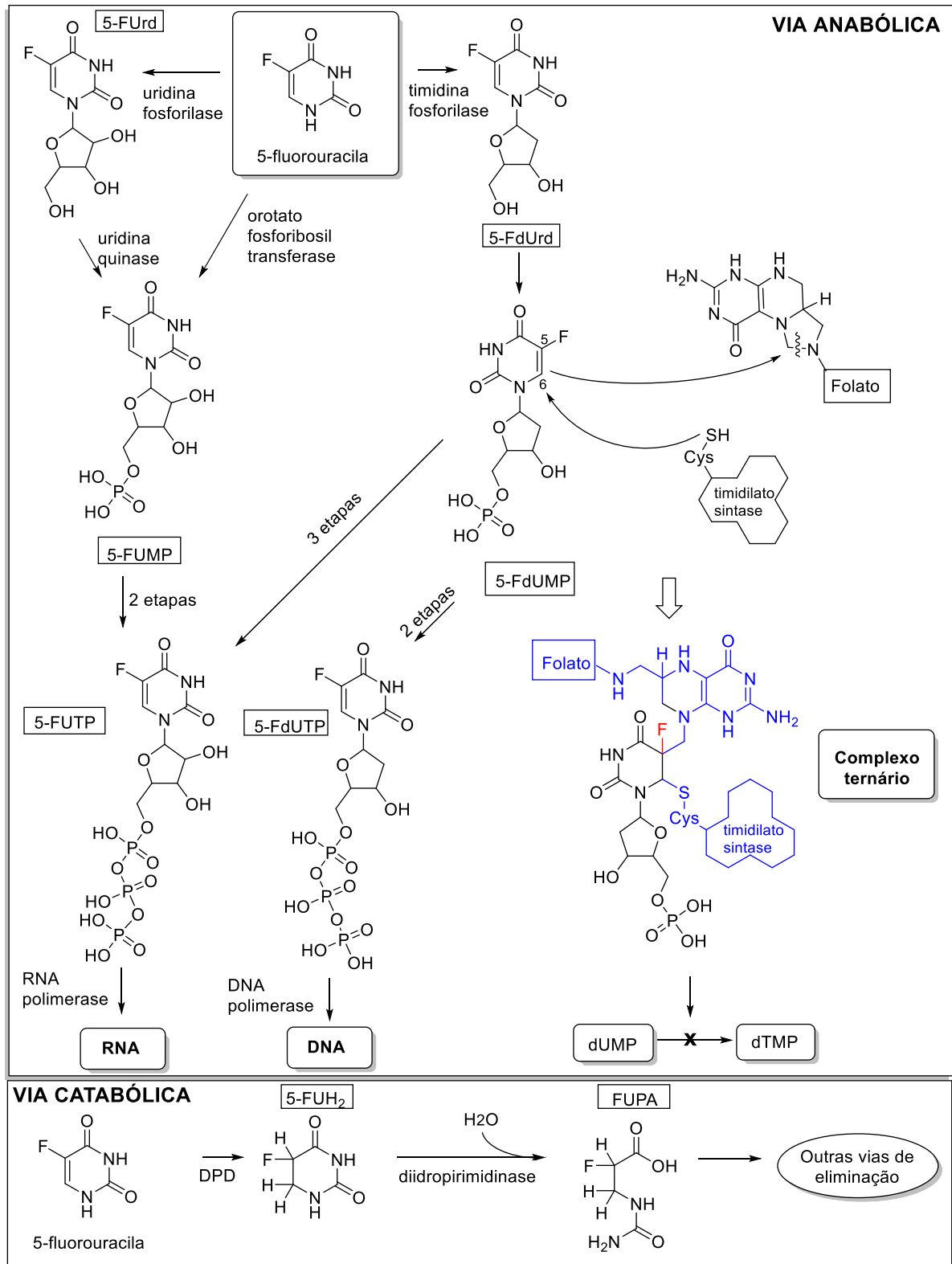


Figura 5. Metabolismo do 5-fluorouracil (Baseado em Lemke, 2013 (5)).

Nesse processo, forma-se um complexo ternário, composto pela enzima, pelo fármaco e pelo ácido fólico reduzido, que atuaria como cofator da reação, captando o hidrogênio da uracila. No entanto, como o flúor está substituindo o hidrogênio e sua ligação com o átomo de carbono é mais estável, o complexo permanece formado, impedindo a formação de timidina trifosforilada, que seria utilizada na síntese do DNA.

Ainda na via anabólica, o 5-FdUMP pode ser trifosforilado e gerar o 5-flúor-desoxiuridina-5-trifosfato (5-FdUTP) que pode ser incorporado ao DNA através da enzima DNA polimerase (14–19).

Quanto aos efeitos causados na formação do RNA, o 5-FU pode ser convertido a 5-fluorouridina (5-FUrd) e ser trifosforilado a 5-fluorouridina-5-trifosfato (5-FUTP) ou pode passar por uma via alternativa em que o 5-FdUMP é convertido a 5-FUTP. Em ambos casos o 5-FUTP será incorporado ao RNA pela enzima RNA polimerase (14–19).

A via catabólica envolve a enzima diidropiridina desidrogenase (DPD) (Figura 5) que promove a redução dos carbonos 5 e 6 do 5-FU formando o 5,6-dihidro-5-fluorouracil (5-FUH<sub>2</sub>). Esse intermediário sofrerá abertura do anel e seguirá por outras vias bioquímicas que levarão à eliminação do fármaco (17,18).

Assim como outros quimioterápicos, o 5-FU provoca diversos efeitos adversos graves, que incluem mucosite/estomatite, complicações cardíacas, renais, hepáticas, mielossupressão, síndrome do pé e mão, visão borrada e areosidade visual, cansaço, queda de cabelo, problemas relacionados à reprodução, e gastrointestinais, como náusea, vômito, diarreia e perda de apetite (18,20). Além disso, as reações adversas causadas pelo fármaco são responsáveis pela interrupção do tratamento visando a troca do antineoplásico, ou mesmo alterações posológicas, o que compromete a eficácia terapêutica e prejudica o paciente (59–61).

A mucosite é um dos efeitos adversos mais comum e caracteriza-se por processo inflamatório da membrana mucosa, que ocorre tanto na cavidade oral quanto intestino delgado. Gera ulcerações, perda da integridade da membrana, redução no tamanho das microvilosidades intestinais e aumento das criptas, esse processo facilita a translocação bacteriana, em que há permeação das bactérias para via sistêmica. O risco de sepse causada pelo processo de mucosite, por vezes, é letal (18,20,62,63).

As dosagens de 5-FU variam de acordo com o tipo de tumor, localização e idade do paciente. Pode ser utilizado por via tópica no tratamento de ceratoses actínicas e carcinomas basocelulares superficiais (18). Além disso, é utilizado por via intravenosa, em vários regimes de administração, variando a dosagem e o tempo de infusão, não excedendo 800 mg por dia (64).

Recomenda-se a hospitalização do paciente na primeira administração, em virtude dos severos efeitos tóxicos decorrentes do ajuste posológico inicial, principalmente nos casos de infusão contínua (18,65,66). Aproximadamente 7-20% do fármaco é excretado em sua forma inalterada através da urina, 6 horas após a administração e o seu tempo de meia vida é de 16 minutos (18).

Difícilmente utilizado em monoterapia, é associado com leucovorin (ácido folínico) e oxaliplatina (sal de platina) ou irinotecan (inibidor da topoisomerase), aumentando a resposta terapêutica (14,15,67,68). A associação do 5-FU com irinotecan é considerada primeira linha para o tratamento do câncer colorretal metastático (15).

### **Pesquisa de novos fármacos**

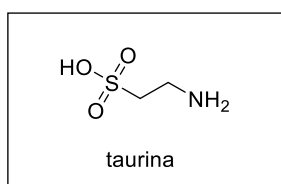
Por vezes, o desenvolvimento de novos fármacos leva a obtenção de uma substância protótipo ativa para determinada doença, mas que apresenta propriedades

indesejadas ou alterações em sua biodisponibilidade, metabolismo e excreção. A obtenção de pró-fármacos é um processo versátil de modificação molecular, com o objetivo de modular a fase farmacocinética, farmacodinâmica ou a toxicidade de um fármaco através da ligação de dois grupos químicos, os quais são ligados por um grupamento lábil (estéres, amidas, azo, carbamatos) (21–23,69).

O pró-fármaco é inativo, e deve sofrer metabolismo *in vivo* para ser ativado química ou enzimaticamente, promovendo a liberação do fármaco ativo (21–23,69). Existem os chamados pró-fármacos recíprocos, que representam uma classe especial de pró-fármacos, em que ambas subunidades liberadas na etapa de ativação metabólica possuem atividade biológica (transportador com atividade biológica) (21,23–25).

### Taurina

A taurina (Figura 6), ácido 2-aminoetanossulfônico, foi inicialmente isolada dos ácidos biliares do boi, é o  $\beta$ -aminoácido semi-essencial mais abundante nos mamíferos. Pode ser obtido por via endógena através do metabolismo hepático da cisteína e metionina ou através da dieta, como a ingestão de alimentos como peixes e frutos do mar (70–72).



**Figura 6.** Estrutura química da taurina.

Sua síntese endógena é regulada pela disponibilidade de cisteína e pela necessidade corporal, além disso, pode ser produzida em menor quantidade em



outros órgãos, como cérebro, pulmões, músculo esquelético, tecido adiposo e glândulas mamárias (72).

Dados obtidos a partir de um estudo com 179 gestantes sugerem que a placenta humana também apresenta a capacidade de sintetizar o aminoácido. Sua deficiência está relacionada a diversos problemas no desenvolvimento do feto, entre eles distúrbios na neurogênese, distúrbios da retina, problemas cardíacos, renais e de crescimento geral do feto (73).

Neonatos são incapazes de sintetizar a taurina nos primeiros meses de vida, sendo susceptíveis a oferta do aminoácido via alimentação, especificamente o leite materno, que possui cerca de 40  $\mu\text{mol}$  a cada 100 mL (72)

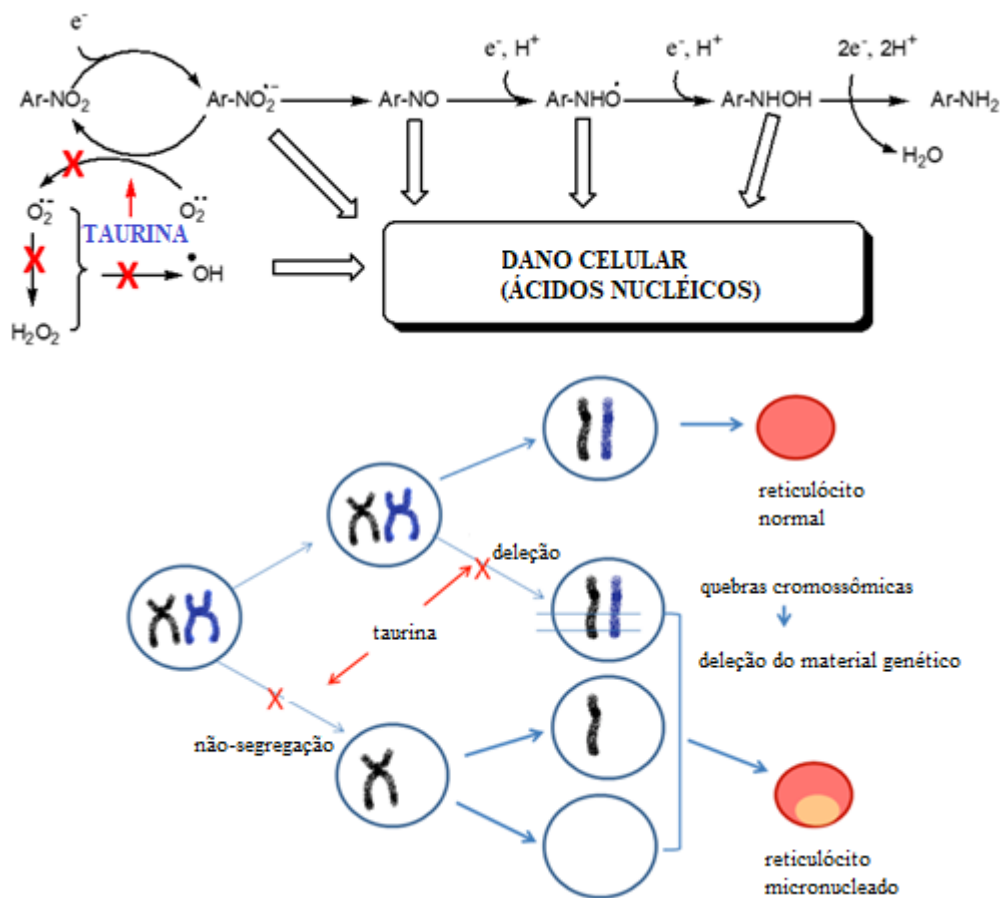
A taurina representa cerca de 0,1% do peso corporal, sendo encontrada principalmente nos músculos, coração e sistema nervoso central (SNC) (74–76). Altamente solúvel em água (fracamente lipossolúvel), em pH fisiológico, a taurina encontra-se na forma ionizada, necessitando de proteínas transmembrana para ser absorvida para dentro da célula (transporte dependente de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  ou  $\text{H}^+$ ) (72).

As principais proteínas são os receptores TauT (*Taurine Transporter*), mas PAT1 (*Proton-coupled amino acid transporter-1*) também são capazes de fazer a captação do aminoácido circulante. Sua excreção ocorre na forma íntegra, uma vez que mamíferos apresentam deficiência enzimática de metabolizar a taurina, por isso é excretada na urina ou nas fezes juntamente com ácidos biliares (72).

Marcinkiewicz (2014) e autores (77,78) descreveram o potencial anti-inflamatório e inibidor do estresse oxidativo deste aminoácido. Além de atuar como regulador osmótico e de cálcio, possui atividade descrita no desenvolvimento da retina, funções cerebrais, reprodução, desintoxicação, estabilização da membrana,

atuação na resposta imunológica, proteção hepática e renal, atua como antidiabético, antimicrobiano além de apresentar potencial antimutagênico (28,72,79–83).

Bosquesi et al., (2018) descreveram o potencial antimutagênico da taurina quando coadministrada com fármacos mutagênicos, como benznidazol, ciclofosfamida, hidroxiuréia, metronidazol e nitrofurazona em ensaio *in vivo* avaliando a presença de reticulócitos micro nucleados. Segundo a pesquisa, a taurina foi capaz de reduzir a atividade genotóxica dos fármacos. O possível mecanismo está relacionado à ação antioxidante da taurina, que reduziria o stress oxidativo gerado pela ação desses nitro compostos, impedindo a formação de radicais livres e, conseqüentemente, bloqueando possíveis danos ao DNA (figura 7) (84).



**Figura 7.** Possível mecanismo de ação da taurina frente à genotoxicidade de nitro compostos

(Adaptado de Bosquesi et al., (2018)(84)).

Haloaminas da taurina (TauBr e TauCl) são descritas na literatura como potentes inibidores de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, além de inibirem a produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandina E2 (PGE2) (85–88). A principal ação anti-inflamatória deste aminoácido está relacionada ao seu poder antioxidante (28).

Nos trabalhos de Vizioli (2009) e Joo et al. (2009) também foram descritos os benefícios de derivados de taurina no tratamento de processos inflamatórios intestinais, como a colite (26,27). Segundo as pesquisas, os derivados taurínicos apresentam atividade anti-inflamatória superior aos padrões anti-inflamatórios utilizados nos trabalhos.

Estudos *in vivo* e *in vitro*, revelaram efeito protetor de apoptose da taurina em linfócitos normais, reduzindo a linfopenia gerada durante a imunoterapia com IL-2, e aumentando sua eficácia no tratamento de melanoma (89,90). Além disso, a taurina apresentou efeito protetor renal em animais com nefrotoxicidade induzida por doxorubicina (31). Efeito semelhante foi observado por Saad & Al-Rikabi (2002), que verificaram que através da suplementação do aminoácido houve redução do acúmulo renal de cisplatina em ratos Wistar (30).

El-houseini et al., (2017) verificaram que a associação de taurina e curcumina levou a proteção da carcinogênese hepática induzida quimicamente em animais. Foi observada redução das alterações malignas nas análises histológicas e o tecido hepático do grupo tratado com a associação apresentava semelhança em relação ao grupo controle não-induzido.

Em tumor ascítico de Ehrlich, a associação taurina + levamisol (*in vivo*) inibiu cerca de 57% do crescimento tumoral e 87% quando associada a ciclofosfamida, promovendo incremento do efeito antitumoral em ambos casos. Além disso, os

autores observaram a redução da proliferação celular e aumento da apoptose das células tumorais, indicando modulação da resposta imune induzida pelo aminoácido (IBRAHIM, 2018).

Ensaio clínico com 40 pacientes adultos, demonstrou efeito quimioprotetor da taurina, promovendo a redução dos efeitos adversos induzidos pela quimioterapia da leucemia linfóide aguda. O aminoácido também promoveu aumento na linhagem de glóbulos brancos e melhoria da função hepática dos pacientes (ISLAMBUCHILAR 2015).

Em estudo de sarcoma ovariano em camundongos, a associação da taurina com a doxorrubicina foi capaz de promover aumento da concentração do fármaco somente em células cancerosas, reduzindo o efluxo do fármaco e aumentando seu índice terapêutico (91).

Em estudos realizados por Liu et al., (2018) observaram que concentrações a partir de 80  $\mu$ M de taurina promovem apoptose em cultura de células tumorais de cólon (Caco-2 e SW620), e que a concentração do aminoácido é diretamente proporcional ao índice de apoptose observado. Segundo a pesquisa o efeito indutor apoptótico está relacionado ao gene MST1 (*Mammalian sterile 20-like kinase 1*), um gene ligado a formação do processo tumoral no cólon e no fígado.

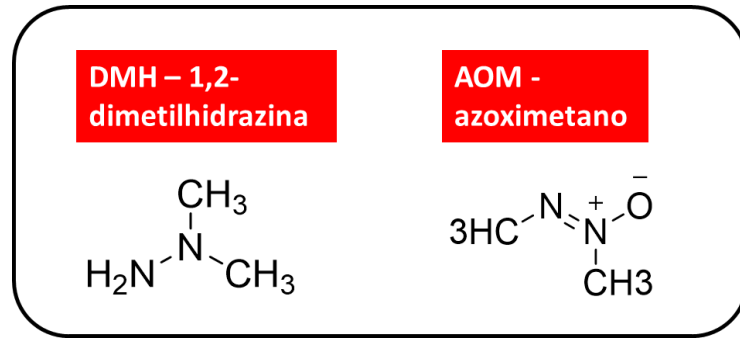
Em modelo animal de carcinogênese mamária induzida por DMBA (7,12-dimetil-benz[a]-antraceno), a taurina (100 mg/kg) apresentou-se eficaz no efeito protetor da carcinogênese, regulando a função das mitocôndrias, estimulando a produção de enzimas antioxidantes, como SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase), GPx (glutaciona peroxidase), GST (glutaciona-s-transferase) e GR (glutaciona redutase), para combater os radicais livres (32). Através do mesmo modelo animal, os autores observaram que o aminoácido possui a capacidade de inibir o

desenvolvimento dos tumores de mama através da indução da apoptose das células tumorais, mediada pelo aumento de p53. A taurina promoveu a superexpressão de Bax, caspase-3 e 9, fatores pró-apoptóticos e inibiu Bcl-2 (anti-apoptótico)(33).

Em cultura de células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-23) observou-se o mesmo efeito, inclusive na linhagem MDA-23, linhagem celular modificada geneticamente e ausente de p53. *In vivo*, observou-se inibição do crescimento tumoral e aumento do fator de transcrição PUMA (*p53-upregulated modulator of apoptosis*), promovendo a ativação de caspase-3 e desencadeando a apoptose das células tumorais (92). O mesmo foi observado em células HepG2, o silenciamento do gene nas células tumorais hepáticas (*in vitro*) gerou redução significativa no efeito apoptótico gerado pelo aminoácido, sugerindo que o gene é um dos principais alvos de ação da taurina (38).

### **Carcinogênese experimental de cólon e 1,2-dimetilhidrazina (DMH)**

A carcinogênese experimental de cólon tem como objetivo simular os eventos biológicos envolvidos no processo de formação do CCR. Muitas substâncias são utilizadas para indução química de cólon, como a 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e o azoximetano (AOM) (figura 8). A DMH age como um pró-carcinógeno, pois necessita de bioativação para exercer sua ação carcinogênica. Sua metabolização ocorre no fígado e os produtos (azoximetano (AOM), metilazoximetanol (MAM) e o íon metildiazônio) são transportados para o cólon junto com os sais biliares, onde que danificam a mucosa colônica através da formação de adutos com o DNA, promovendo a proliferação celular, inibição da apoptose e indução de criptas aberrantes (39).



**Figura 8.** Estrutura química do DMH e AOM.

As criptas aberrantes são consideradas marcadores do processo de iniciação tumoral (93). Naturalmente, as criptas fazem parte do cólon, e são formadas por células produtoras de mucinas, porém, o processo de carcinogênese promove alargamento da cripta, espessamento da parede, proliferação celular, aumento da formação de criptas dentro de um mesmo foco e redução da produção de mucinas. Essas criptas são chamadas de aberrantes e são passíveis de visualização em microscopia através de coloração específica (93,94).

Facilmente distinguíveis das criptas normais, representam pelo menos duas vezes o tamanho das cripta normais circunvizinhas, suas aberturas são ovaladas, apresentam espessamento do epitélio, espaço pericriptal maior e não se encontram no mesmo plano focal das criptas normais (53,93–95).

A DMH é considerada um agente carcinogênico completo, pois atua em duas fases da carcinogênese de cólon, a iniciação e a promoção. Amplamente utilizada em modelos experimentais que utilizam ratos e camundongos, possui especificidade de ação para o cólon e age de forma dependente da dose, tempo de exposição e sexo do animal (39). Geralmente utilizam-se ratos F344, Wistar ou Sprague-Dawely machos com até 6 semanas de vida e estudos que envolvem maior tempo de

exposição ou maiores doses estão envolvidos com alta incidência de tumores e aumento de multiplicidade de criptas aberrantes (39).

### **Hipóteses do trabalho**

- 1) A taurina é capaz de exercer efeito protetor, reduzindo as reações adversas geradas nos outros órgãos no modelo de carcinogênese de cólon induzida por DMH?
- 2) A taurina possui efeito sinérgico quando associada ao 5-FU no modelo de carcinogênese de cólon induzida por DMH?

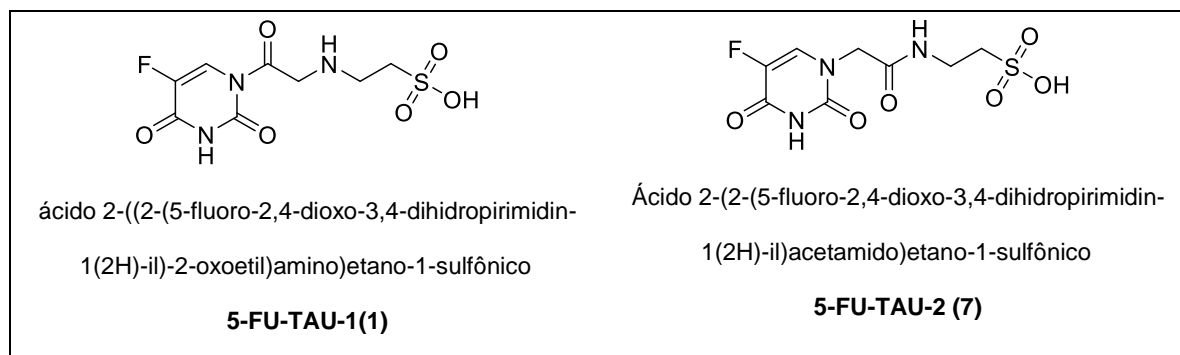
### 3 OBJETIVOS

#### Objetivo geral

Avaliar o efeito biológico da associação de 5-FU e TAU em modelo de carcinogênese química de cólon induzida por 1,2-dimetilhidrazina em ratos Wistar. Planejar, sintetizar e avaliar os pró-fármacos recíprocos de 5-FU e taurina, com o objetivo de reduzir ou inibir a toxicidade do 5-FU sem perda da atividade antitumoral.

#### Objetivos específicos

- Avaliação do efeito biológico da associação em modelo de carcinogênese química de cólon induzida por 1,2-dimetilhidrazina.
- Síntese de dois compostos inéditos (Figura 9):



**Figura 9.** Estrutura química dos pró-fármacos planejados.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### Reagentes e solventes

Brometo de bromoacetila (Sigma®), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (Sigma®), 5-fluorouracil (Sigma®), acetato de etila (Synth®), acetonitrila (Synth®), ácido bromoacético (Sigma®), álcool etílico (Synth®), diisopropilcarbodiimida (DIC) (Sigma®), dimetilformamida (DMF)(Synth®), metanol (Synth®), piridina (Synth®), taurina (Sigma®), terc-butóxido de potássio (Synth®), tetrahidrofurano (Synth®), tolueno (Synth®) e trietilamina (Synth®), formaldeído (Merck®), Xilol (Synth®), água destilada e água mineral, soro fisiológico (0,9% -NaCl), etanol 70%, 80%, 90% e absoluto, Hematoxilina (Sigma®), Eosina (Sigma®), Parafina (Merck).

### Equipamentos

- Agitador magnético IKA® modelo C(-)Mag HS4;
- Aparelho de ponto de fusão capilar modelo SMP3 da Bibby Stuart Scientific®;
- Balança analítica Marte® - modelo AY 220;
- Balança semi-analítica Gehaka® - modelo BG 200;
- Sistema de isolamento cromatográfico acelerado - Biotage®, *Isolera One™-2.3*;
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker® modelo DPX-300 operando a 300 MHz para <sup>1</sup>H e 75 MHz para <sup>13</sup>C;
- Espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu® modelo IR Prestige-21;
- HPLC Shimadzu®, modelo CBM 20A, com bomba preparativa quaternária modelo LC/6 – detector UV (190 nm);
- Rotaevaporador Ika® - modelo RV10;
- Rotaevaporador Buchi® – modelo R-215
- Sonicador Unique® -modelo UltraSonic Cleaner.
- Micrótomo Lupetec® MRP 2004;

## **Métodos**

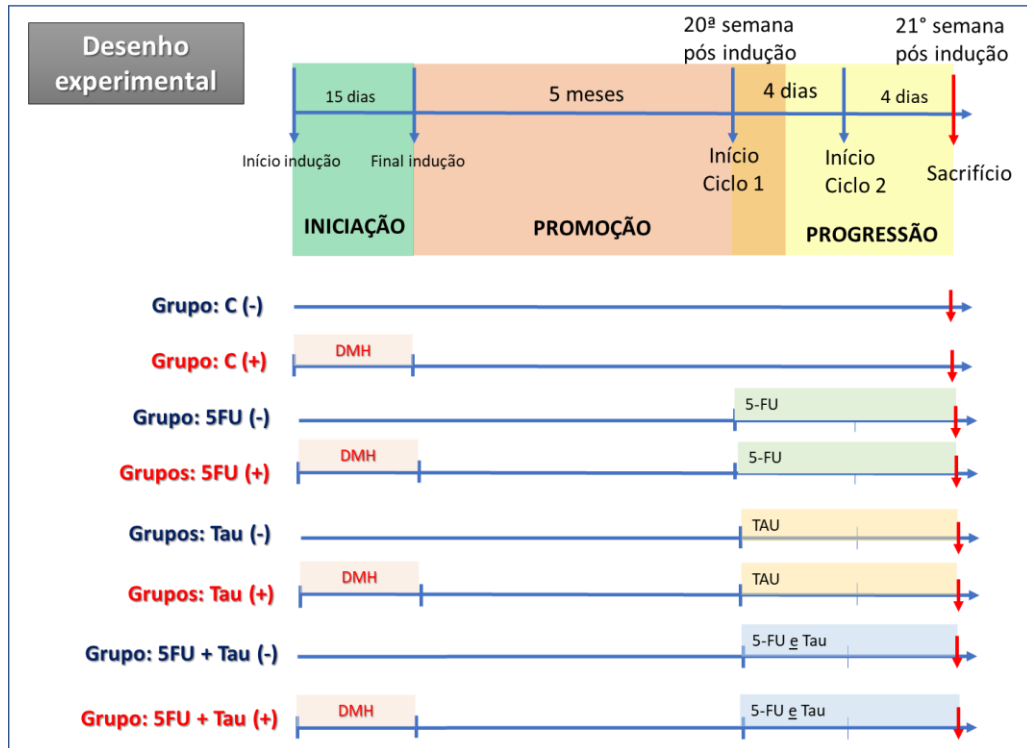
### *4.1.1 Ensaio in vivo - Avaliação do perfil biológico da associação (5-FU e taurina) em modelo de carcinogênese química de cólon*

O ensaio *in vivo* foi realizado no biotério do departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara. O protocolo da Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) foi obtido e consta sob registro 07/2017 (Anexo I) e o experimento foi realizado segundo as a Resolução Normativa CONCEA (Conselho Nacional de Experimentação Animal) nº 27, de 23.10.2015. Este ensaio simples-cego foi realizado baseando-se nas metodologias descritas por Moura et al. (2012), Silva Almeida et al. (2015) e El-Shemi et al. (2016).

#### *4.1.1.1 Grupos e desenho experimental*

Foram utilizados animais com cerca de quatro semanas (ratos Wistar), obtidos do Biotério Central do Campus da UNESP em Botucatu. Os 93 animais foram devidamente acondicionados em caixas específicas no Biotério de Fármacos (UNESP - Araraquara), onde permaneceram por quatro semanas para ambientação, sob ciclo claro-escuro 12/12hs, com 3-4 animais por caixa. A maravalha e a ração recebida pelos animais era autoclavada, para evitar infecções secundárias, a água era filtrada e as trocas eram feitas 3 vezes por semana. Os animais receberam ração e água *ad libitum*.

A figura 10 apresenta o desenho experimental e as fases de indução e tratamento utilizadas neste experimento.



**Figura 10.** Desenho experimental dos grupos experimentais e tratamentos realizados (dados da pesquisa).

Após o período de aclimatação, os animais foram pesados e divididos em grupos conforme a tabela 1. Os animais foram induzidos por via subcutânea 1,2-dimetilhidrazina (DMH) (40mg/kg em salina, pH 6,5) duas vezes por semana por duas semanas, os grupos controles receberam solução salina (veículo), também por via subcutânea (figura 8).

**Tabela 1.** Tabela com os grupos experimentais.

Grupo	Indução	Tratamento*
C(+)- 10 animais	DMH (s.c.)	Veículo
C(-)- 10 animais	Veículo (salina- s.c.)	Veículo
TAU(+)- 11 animais	DMH (s.c.)	Taurina
TAU(-)- 10 animais	Veículo (salina- s.c.)	Taurina
5-FU(+)- 11 animais	DMH (s.c.)	5-Fluorouracil
5-FU(-)- 10 animais	Veículo (salina- s.c.)	5-Fluorouracil
5-FU+TAU(+)- 11 animais	DMH (s.c.)	5-Fluorouracil e taurina
5-FU+TAU(-)- 10 animais	Veículo (salina- s.c.)	5-Fluorouracil e taurina

\*Veículo: salina via intraperitoneal (i.p.) e água via gavage.  
Taurina: 100mg/kg/dia (gavage) em água (37).  
5-FU: Ciclo 1: 4 dias de 12 mg/kg/dia (i.p.) seguido do ciclo 2: 6 mg/kg/dia por 4 dias (i.p.) em solução salina (98,99)

(Dados da pesquisa).

Após o período de indução, os animais foram mantidos por 19 semanas, então, no início da 20ª semana os animais iniciaram os ciclos de tratamento. Os grupos TAU(+), TAU(-) receberam somente taurina por 8 dias, na dose de 100 mg/kg (via gavage – 25 g de TAU a cada 0,1 mL), conforme descrito por Zhang et al (2014). Os grupos 5-FU(+) e 5-FU(-) receberam 5-fluorouracil, em dois ciclos: 4 dias na dose de 12 mg/kg/dia e 4 dias na dose de 6 mg/kg/dia, por via intraperitoneal (25 g de 5-FU a cada 0,1 mL) (98,99). Os grupos da associação 5-FU+TAU(+) e 5-FU+TAU(-) receberam 5-FU e taurina. O 5-FU também foi administrado em 2 ciclos (4 dias de 12 mg/kg/dia seguido de 4 dias de 6 mg/kg/dia – via i. p) e a taurina foi administrada também por 8 dias, na dose 100 mg/kg/dia por via oral (gavage) (tabela 1).

Ao final do 8º dia de tratamento os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>. Este método foi escolhido pois ocorre a perda da consciência do animal, seguida de morte, é um método de baixo custo, e não representa limitação em relação ao peso do animal. Segundo as normas do CONCEA (2015), o método da decapitação, por exemplo, não poderia ser utilizado para ratos com peso superior a 150 gramas. Além disso, o uso de substâncias indutoras de anestesia, poderia

interferir nos resultados experimentais, e por isso, foi descartado o método de exsanguinação (100).

Após o procedimento de eutanásia, os órgãos (cólon, rins, fígado, baço, pulmões e coração) foram coletados, delicadamente lavados com solução salina e pesados em balança analítica. O cólon dos animais foi aberto longitudinalmente e fixado com alfinetes em placas de isopor. Todos os órgãos foram acondicionados em recipientes contendo solução de formalina 10% por 24 horas, seguido de etanol 70%.

#### *4.1.1.2 Processamento e análise do cólon*

O colón dos animais foi medido com régua e dividido em três porções: proximal, medial e distal, considerando-se sua proximidade em relação ao intestino delgado (96,101). Não foi realizada a medida de peso relativo do cólon, pois o material fecal na porção interna do órgão seria pesado de forma conjunta, não sendo para este trabalho uma fração de interesse.

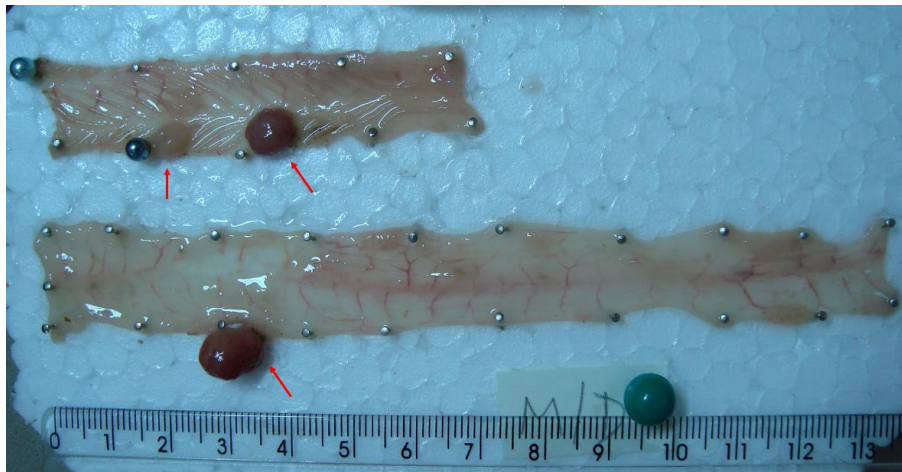
##### *4.1.1.2.1 Análise macroscópica do cólon*

A análise macroscópica, procedimento padrão, foi realizada visando identificar lesões visíveis ao olho nu ou com uso de lupas de baixo aumento (1,5 a 2 x). Esse processo ocorre logo após a retirada do órgão ou logo após o processo de fixação, esse último, usado com maior frequência devido ao risco de degradação dos tecidos durante o tempo de análise sem a devida fixação.

As análises macroscópicas foram realizadas com o cólon completo dos animais e compreenderam na contagem do número de lesões visíveis e cálculo de volume a partir das medidas dos nódulos.

#### 4.1.1.2.1.1 Número de lesões visíveis no cólon

Para padronização da análise do número de lesões, foram visualizadas as fotografias do dia da retirada dos órgãos e então contadas as lesões consideradas grosseiras. Assim, foram contadas as lesões caracterizadas por alteração de cor e/ou elevação de bordas, conforme representado pelas setas na figura 11. Para esta análise não foram consideradas manchas no órgão, nem as áreas de GALT (Tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal) presentes nas porções proximal e distal do cólon.



**Figura 11.** Imagem de cólon com lesões consideradas grosseiras de acordo com a padronização realizada (dados da pesquisa).

#### 4.1.1.2.1.2 Volume das lesões visíveis

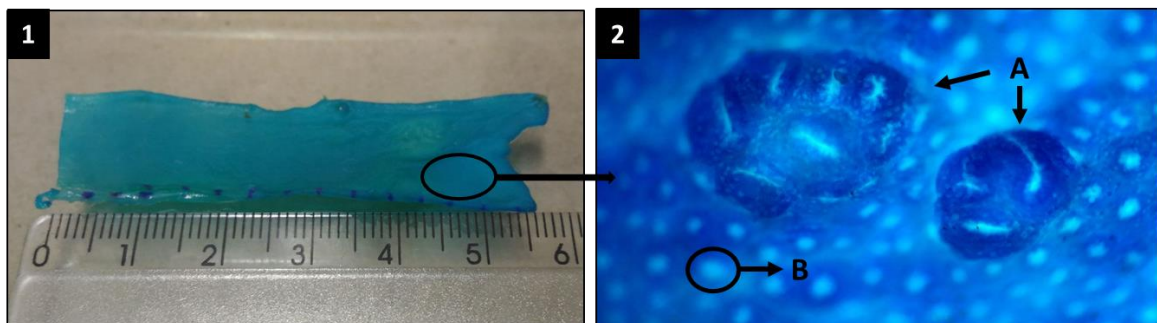
Para esta análise foram feitas as medidas de comprimento (C) e largura das lesões (L) com o auxílio de um paquímetro de 0,01 cm de precisão. O cálculo do volume (V) (em  $\text{cm}^3$ ) foi feito de acordo com a fórmula  $(C \times L^2)/2$ , conforme descrito por Cheng et al., (2014) e as lesões foram classificadas de acordo com os critérios descritos por de Moura et al. (2012), em pequenas ( $V < 0,30 \text{ cm}^3$ ), médias ( $V = 0,30 - 0,60 \text{ cm}^3$ ) e grandes ( $V > 0,60 \text{ cm}^3$ ).

#### 4.1.1.2.2 Análise da formação de focos de criptas aberrantes (FCA)

As criptas são normalmente encontradas no cólon, são estruturas compostas por células caliciformes (*globet cells*) que são responsáveis pela produção e secreção de mucopolissacarídeos no lúmen do cólon (103).

Os focos de criptas (FCA) aberrantes são focos em que há cripta alteradas histologicamente, caracterizadas por alargamento luminal irregular, zona pericriptal e revestimento espessados. Por vezes, ocorre sua multiplicação dentro do foco e com o passar do tempo observa-se aumento da multiplicidade (aumento do número de criptas dentro foco), por isso são consideradas marcadores do início do processo tumoral no cólon. (93).

A figura 12 (1) apresenta a imagem macroscópica da porção distal do cólon, corada com azul de metileno para a contagem de FCA, e a figura 12 (2) mostra em A focos contendo 7 e 3 criptas aberrantes, em B uma cripta normal.



**Figura 12.** Imagem macroscópica do cólon distal (1). Imagem microscópica do cólon (objetiva 10x) (2), criptas aberrantes (A), cripta normal (B) (dados da pesquisa).

Para esta análise foi utilizada a metodologia descrita por Dias et al.(2010). O material foi corado com de azul de metileno a 1% dissolvido em tampão fosfato salino (PBS), por 2 a 5 minutos e foi feita a contagem de focos (FCA) e criptas aberrantes (CA) de acordo com o critério estabelecido por Bird (1995) e Bird & Good

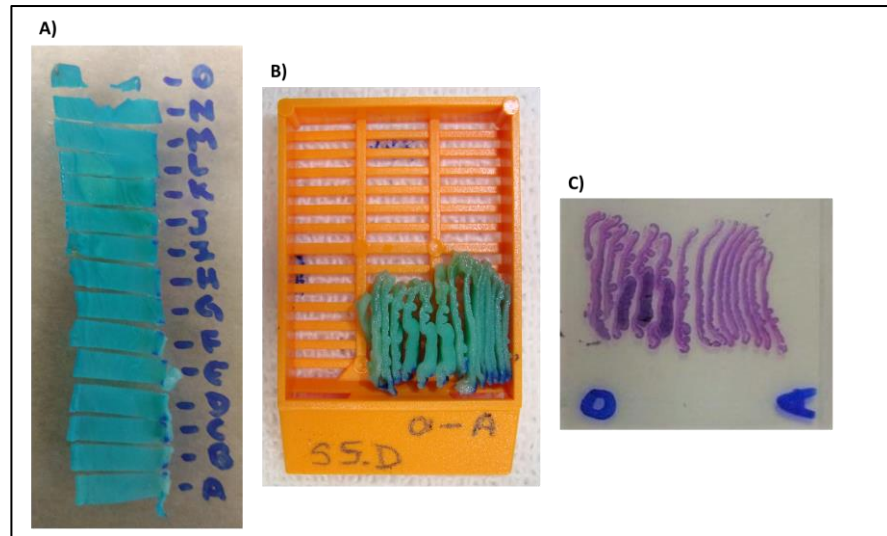
(2000)(93,94). Foram avaliados o número de focos e o número de criptas em cada foco (multiplicidade) por cólon, e a análise foi feita em 25 campos consecutivos em microscópio de luz, na objetiva de 10X, partindo-se da porção final e superior no sentido da direita para esquerda (105,106).

Após essas análises, as amostras foram mantidas em álcool etílico 70% para posterior processamento e inclusão em parafina. O processamento histológico foi realizado no Laboratório de Estomatopatologia e no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia – UNESP – Araraquara, conforme descrito nos itens 4.1.1.2.3 e 4.1.1.3.

#### *4.1.1.2.3 Processamento histológico do cólon*

O cólon foi cortado de 3mm em 3mm e os fragmentos foram alocados em ordem alfabética dentro dos cassetes, de modo que fosse possível identificar a posição em que alterações histológicas se encontravam, conforme observa-se na figura 13. Em seguida os cassetes foram imersos em banhos de 1 hora com álcool 70%, álcool 80%, álcool 90%, 2 banhos de álcool absoluto, álcool/xilol, 2 banhos de xilol 100% e 3 banhos de parafina. Depois do processo de desidratação e diafanização o material foi novamente aberto e reposicionado para inclusão em parafina, mantendo as posições pré-determinadas. O corte no micrótomo foi feito na medida de quatro micrômetros e a coloração utilizada hematoxilina/eosina (HE).





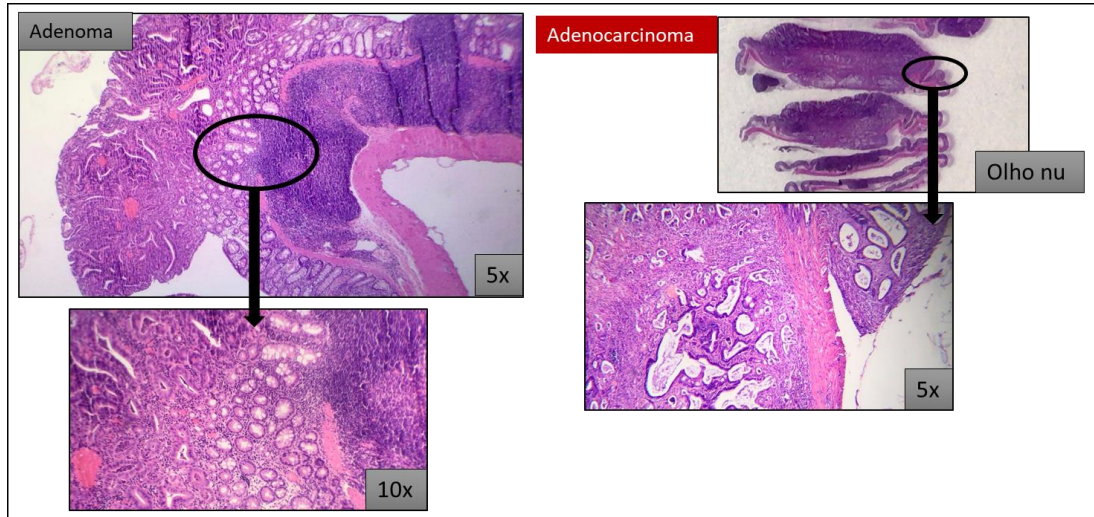
**Figura 13.** (A) Identificação dos fragmentos do cólon distal; (B) Fragmentos de cólon em ordem alfabética nos cassetes; (C) Lâmina pronta, contendo todos os fragmentos do cólon distal (dados da pesquisa).

#### 4.1.1.2.4 Análise histológica do cólon

A análise histológica do cólon foi realizada através da quantificação de neoplasias (adenomas e adenocarcinomas), displasia, índice mitótico e infiltrado inflamatório. As outras análises foram padronizadas de acordo com a codificação dos achados histopatológicos para análise estatística (Anexo II).

##### 4.1.1.2.4.1 Identificação de adenomas e adenocarcinomas

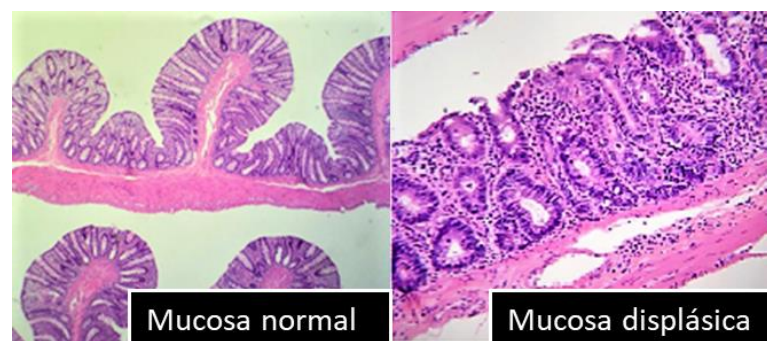
A identificação dos lesões foi feita de acordo com os critérios descritos por Hamilton et al. (2000), que faz a diferenciação através da presença do processo de invasão da camada submucosa, característica do adenocarcinoma, conforme observa-se na figura 14.



**Figura 14.** Imagens de microscopia para diferenciação entre adenoma e adenocarcinoma (Dados da pesquisa).

#### 4.1.1.2.4.2 Identificação de lesões displásicas

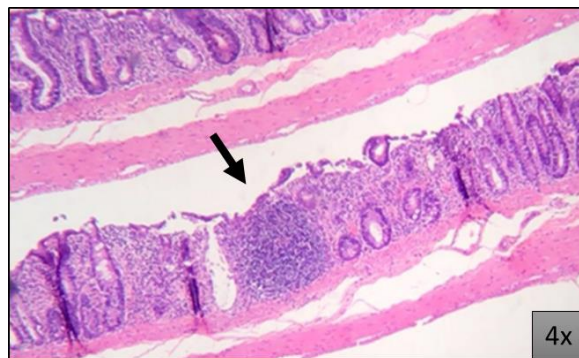
A identificação e quantificação das lesões displásicas foi feita baseando-se em Perse e Cerar (2011), considerando-se lesão displásica a presença de pelo menos três dos seguintes fatores: hipercelularidade, nucléolos aumentados, policromasia, graus variados de estratificação, perda da polaridade, alta relação nuclear/citoplasmática, aglomeração nuclear, presença de muitas mitoses e/ou mitoses atípicas (figura 15).



**Figura 15.** Exemplo de mucosa displásica (objetiva de 5x e 10x, respectivamente) (dados da pesquisa).

#### 4.1.1.2.4.3 Processo inflamatório

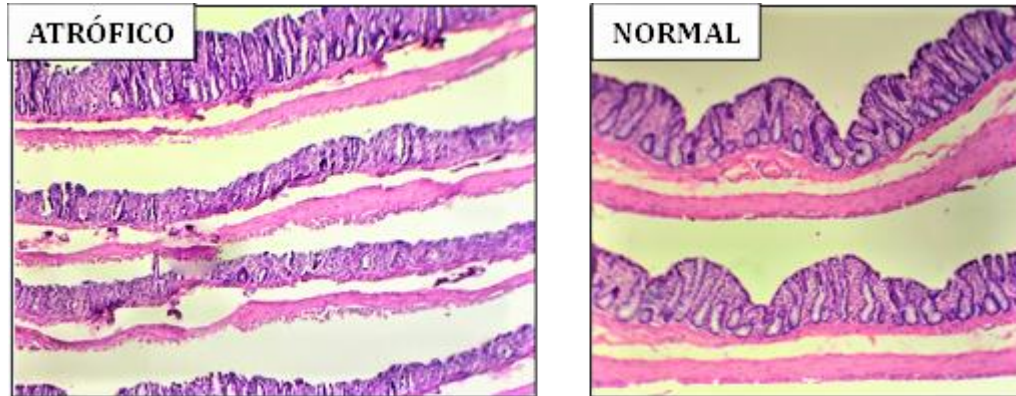
Foram avaliados dois parâmetros quanto ao processo inflamatório: a caracterização do tipo de processo inflamatório do tecido mucoso (agudo, crônico e misto), a intensidade (leve, moderado e intenso), além da quantificação de áreas com infiltrado inflamatório ao longo do cólon, conforme demonstrado pela seta na figura 16. Para esta análise, as áreas de GALT não foram consideradas, uma vez que são consideradas tecido linfoide normal do órgão.



**Figura 16.** Área de infiltrado inflamatório (dados da pesquisa).

#### 4.1.1.2.4.4 Caracterização do epitélio do cólon

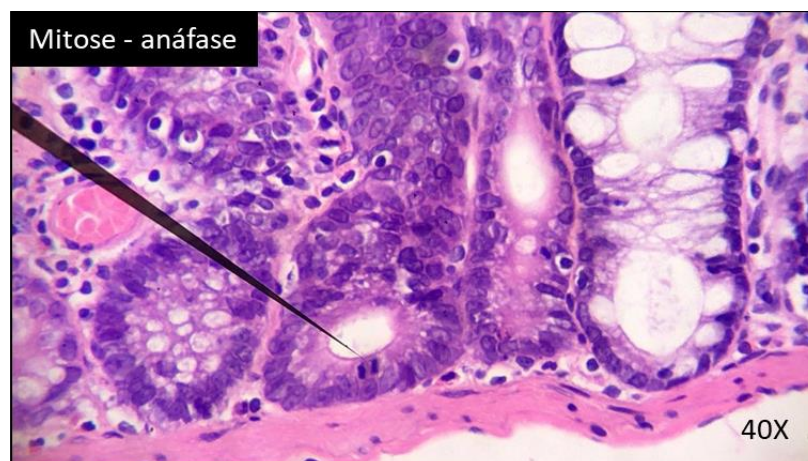
Verificação quanto à espessura da camada mucosa e camada muscular em: atrófica, normal e hipertrófica (figura 17). Além disso, foi avaliada semi-quantitativamente a presença de muco na superfície do epitélio, em leve, moderado e intenso.



**Figura 17.** Aspecto da camada muscular atrófica e normal (dados da pesquisa).

#### 4.1.1.2.4.5 Cálculo do índice mitótico

O índice mitótico é uma medida da proliferação celular tecidual, frequentemente é utilizado para mensurar a velocidade com que ocorre a multiplicação das células (108). O cálculo do índice mitótico foi realizado a partir da contagem do número de mitoses (figura 18) em 10 campos consecutivos, em objetiva de 40X, e calculando-se a média da contagem.



**Figura 18.** Mitose encontrada na cripta do cólon (dados da pesquisa).

#### *4.1.1.3 Processamento e análise histológica dos outros órgãos*

Após a remoção dos órgãos foi feita a lavagem com salina e pesagem, para obtenção da medida de peso relativo do órgão ((peso órgão/peso do animal) x100). Logo em seguida foram colocados em formalina 10% de 2 a 24 horas. Foi retirado um fragmento de cada órgão e colocado em cassetes para desidratação e diafanização, assim como foi feito para o cólon dos animais. Os órgãos foram inclusos em parafina e cortados no tamanho de 5 µM, as lâminas com os cortes permaneceram por 12 horas em estufa de secagem e o material foi corado com HE para confecção de lâmina permanente.

No baço, os parâmetros analisados foram: integridade e espessura da cápsula, relação entre polpa branca e polpa vermelha, aspecto da zona marginal entre as polpas, verificação dos folículos germinativos quanto à organização, identificação quanto à presença de granuloma, congestão dos vasos, presença de seios venosos e pigmento extra capsular. Esses parâmetros foram padronizados de acordo com o Anexo III para análise estatística dos dados histopatológicos do órgão.

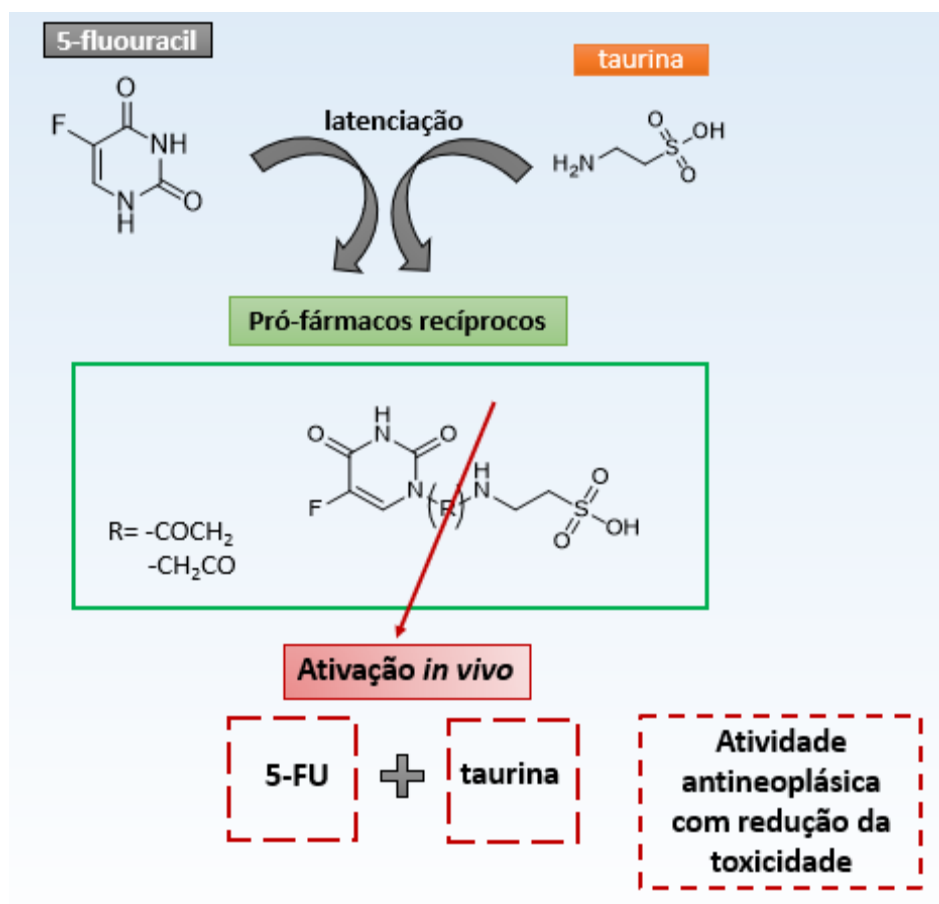
Outros órgãos como fígado, coração, pulmão e rim estão sendo processados.

#### *4.1.2 Análise estatística*

Quando os dados atenderam o pressuposto de normalidade foi utilizada a Análise de variância (ANOVA) e o pós-teste realizado para identificar a diferença entre os grupos foi Bonferroni. Os dados que não atenderam o pressuposto de normalidade (Shapiro-Wilk) foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. O nível de significância utilizado para tomada de decisão foi de 5%.

#### 4.1.3 Síntese dos pró-fármacos - Planejamento Estrutural

Considerando a potente atividade antineoplásica do 5-FU e sua ampla utilização, objetivou-se reduzir os efeitos adversos causados pelo 5-FU ao promover a ligação química entre o fármaco e a taurina. Assim, o planejamento visou a obtenção de dois pró-fármacos recíprocos de 5-FU e taurina, para que, *in vivo*, os pró-fármacos fossem biotransformados e os efeitos de 5-FU e taurina fossem obtidos de forma sinérgica (Figura 19).

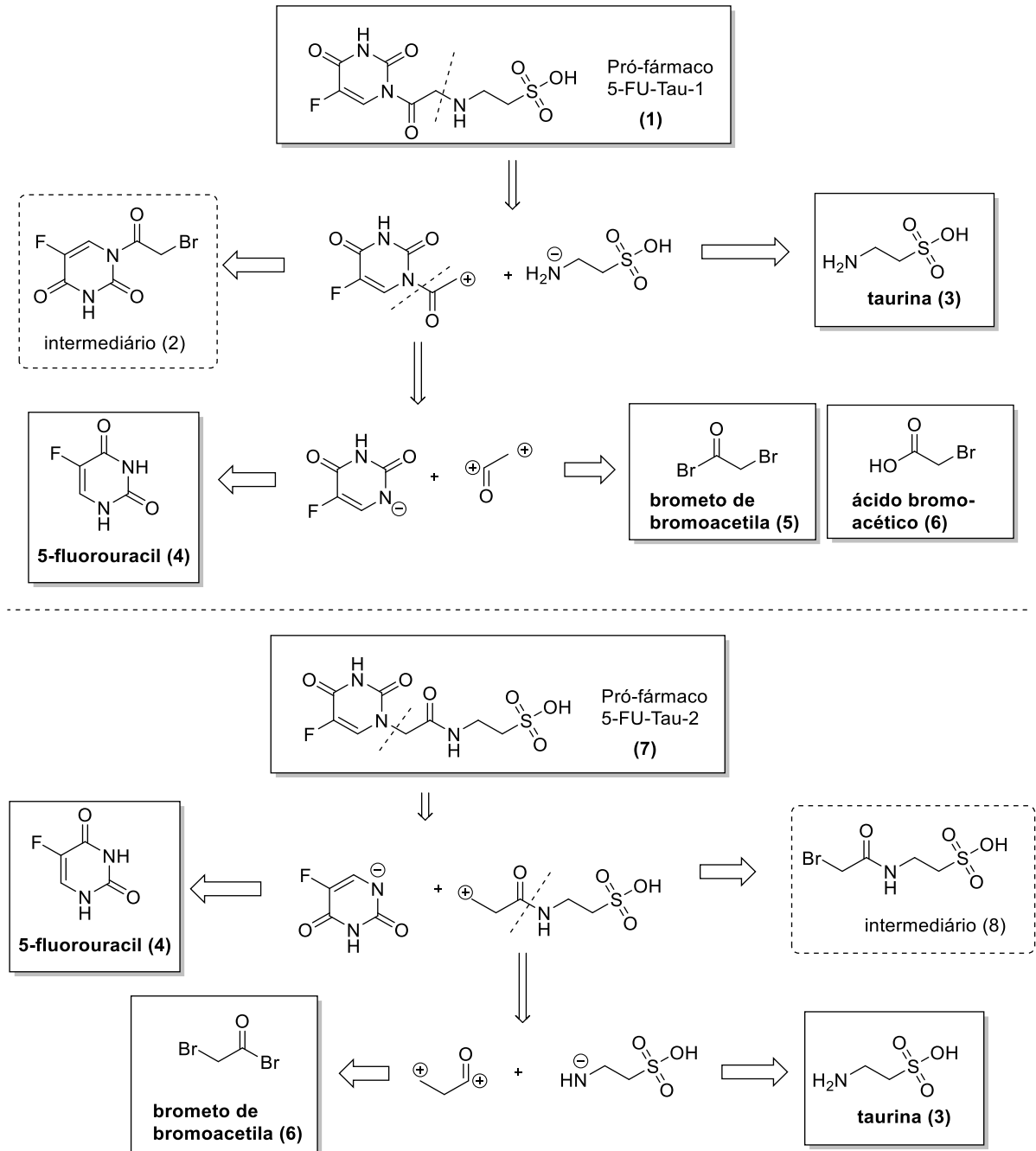


**Figura 19.** Planejamento estrutural dos pró-fármacos recíprocos de 5-FU e taurina (dados da pesquisa).

#### 4.1.4 Metodologias sintéticas

A figura 20 apresenta o mecanismo retrossintético utilizado para obtenção dos pró-fármacos 5-FU-TAU-1 (**1**) e 5-FU-TAU-2 (**7**). Foram utilizados dois espaçadores diferentes, a fim de verificar o que se havia alguma alteração na resposta biológica do receptor.

A seguir, serão apresentadas as três metodologias para obtenção do intermediário do pró-fármaco 5-FU-TAU-1 (**1**) e uma metodologia para obtenção do pró-fármaco 5-FU-TAU-2 (**7**).



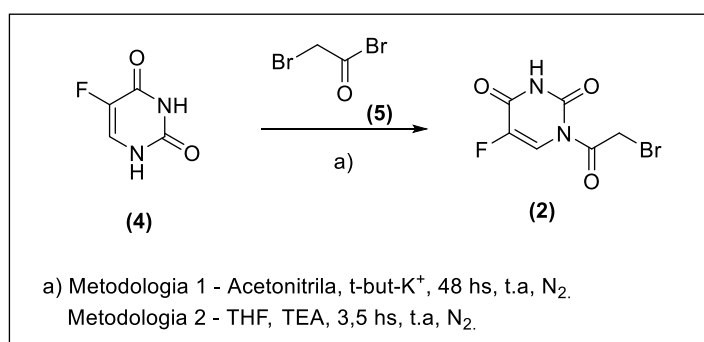
**Figura 20.** Esquema retróssintético para obtenção dos pró-fármacos recíprocos 5-FU+TAU-1(1) e 5-FU-TAU-2 (7) (dados da pesquisa).



#### 4.1.4.1 Síntese do pró-fármaco 5-FU-TAU-1(1) (ácido 2-((2-(5-fluoro-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-2-oxoetil)amino)etano-1-sulfônico)

##### 4.1.4.1.1 Síntese do intermediário 1-(2-bromoacetil)-5-fluoropirimidina-2,4(1H,3H)-diona (2)

A obtenção do intermediário (2) envolve uma reação de adição-eliminação, entre o átomo de nitrogênio 1 do 5-FU (4), que sofreria uma acilação através do brometo de bromoacetila (5). Para isso, foram utilizadas duas metodologias, conforme descrito a seguir. A figura 21 apresenta o esquema geral de reação.



**Figura 21.** Esquema de obtenção do intermediário (2) a partir dos reagentes (4) e (5) (dados da pesquisa).

##### 4.1.4.1.1.1 Síntese do intermediário 1-(2-bromoacetil)-5-fluoropirimidina-2,4(1H,3H)-diona (2) em acetonitrila (metodologia 1)

Esta metodologia baseou-se nos dados descritos por Cho et al. (2012) e o esquema de reação encontra-se na figura 21.

Para isso, em um balão de 25 mL, adicionou-se 100 mg de 5-FU (4) (1 Eq) em acetonitrila anidra e 168,3 mg de terc-butóxido de potássio (1,5 Eq) por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 203 µL de brometo de bromoacetila (5) (3 Eq) gota a gota e em banho de gelo. A reação permaneceu em atmosfera de nitrogênio por 48 horas e foi acompanhada em fase móvel 8/2 acetato de etila/hexano. Após este tempo houve

formação de uma nova substância, que foi isolada em aparelho de cromatografia automatizado (Biotage) em modo isocrático e fase normal (8/2 acetato de etila/hexano, coluna 10g Ultra) e analisada por  $^1\text{H}$  RMN.

#### *4.1.4.1.1.2 Síntese do intermediário 1-(2-bromoacetil)-5-fluoropirimidina-2,4(1H,3H)-diona (2) em tetrahidrofurano (metodologia 2)*

A metodologia foi baseada em Kametani et al. (1980) e está representada na figura 21.

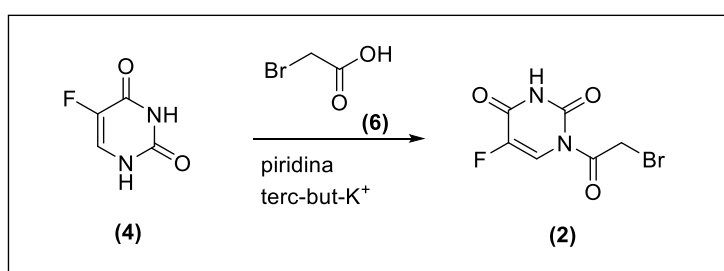
Em balão reacional de 10 mL adicionou-se 100 mg (1 Eq) de 5-FU (**4**) em 7 mL de tetrahidrofurano, sob agitação e à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 537  $\mu\text{L}$  (4 Eq) de trietilamina (TEA), sob agitação e temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, foi feita a adição de 67  $\mu\text{L}$  (1Eq) de brometo de bromoacetila (**5**), em banho de gelo, gota à gota (Figura 22). Em 3,5 horas de reação observou-se a formação de duas manchas não equivalentes a reagentes, em CCD, fase móvel 5/5 acetato de etila/metanol. A reação foi interrompida, o conteúdo foi filtrado à vácuo e lavado com THF, o lavado foi seco à pressão reduzida e a separação foi feita em equipamento de cromatografia automatizado em modo gradiente (Biotage – fase normal - 1% a 10% de MeOH, coluna 10g ultra), com fase móvel acetato de etila/metanol. O suposto produto foi isolado e submetido a análise de  $^1\text{H}$  RMN.

#### *4.1.4.1.2 Síntese do pró-fármaco 5-FU-TAU-1(1) - Síntese do intermediário 1-(2-bromoacetil)-5-fluoropirimidina-2,4(1H,3H)-diona (2) em piridina*

A reação foi feita baseando-se na metodologia de Ouyang et al., (2011) e o esquema reacional está descrito na figura 22.

Para isso, adicionou-se, em balão de 5 mL, 150 mg (1 Eq) de 5-FU (**4**) em 5 mL de piridina e 150 mg de terc(-)butóxido de potássio (4,5 Eq), sob agitação à 35°C.

O conteúdo foi mantido sob agitação à essa temperatura por 30 minutos, em seguida adicionou-se 159,8 mg (1,15 Eq) de ácido bromoacético (**6**). A reação foi mantida sob agitação a 60°C por 5 horas e o acompanhamento por CCD foi feito em fase móvel 7/3 acetato de etila/metanol. Após este tempo, a reação foi interrompida e seu conteúdo foi concentrado à pressão reduzida. Houve formação de precipitado, que foi lavado com éter etílico, e analisado por RMN de hidrogênio.

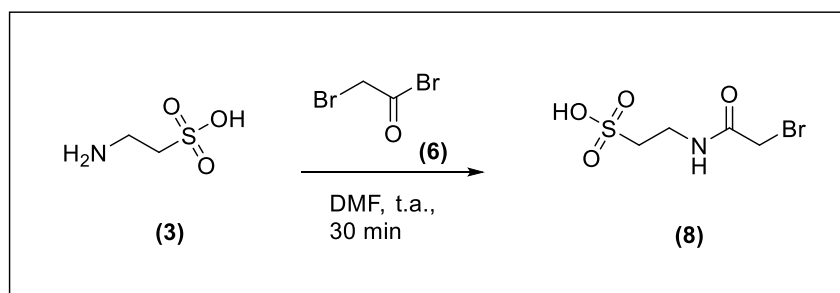


**Figura 22.** Esquema sintético de obtenção do intermediário (**2**) a partir dos reagentes (**4**) e (**6**) (dados da pesquisa).

#### 4.1.4.2 Síntese do pró-fármaco 5-FU-TAU-2 (**7**) (ácido 2-(2-(5-fluoro-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)acetamido)etano-1-sulfônico)

##### 4.1.4.2.1 Metodologia de síntese do intermediário ácido 2-(2-bromoacetamido)etano-1-sulfônico (**8**) em dimetilformamida

Como método alternativo para obtenção do produto, optou-se por reagir a taurina (**3**) com o espaçador (**6**), conforme a Figura 23.



**Figura 23.** Esquema de obtenção do intermediário (8) em dimetilformamida (dados da pesquisa).

Em balão de 10 mL adicionou-se 4 mL de dimetilformamida (DMF) e 300 mg (1Eq) de taurina (3), sob agitação à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida adicionou-se gota a gota 209  $\mu$ L (1Eq) de brometo de bromoacetila (6) e observou-se a formação de coloração alaranjada após 30 minutos de reação. A fase móvel de acompanhamento (CCD) foi 100% metanol. Após acompanhamento do consumo do reagente (6) o conteúdo do meio reacional foi extraído com acetato de etila e a fase aquosa foi evaporada à pressão reduzida, obtendo-se um óleo de cor marrom. Foi feito arraste exaustivo do DMF em à pressão reduzida (5x 10mL com tolueno e 10x 10mL com metanol), posteriormente a fração líquida foi evaporada. O conteúdo foi analisado em HPLC analítico e posteriormente isolado em HPLC preparativo (Coluna *Shimadzu Shim-pack PREP-ODS(H)KIT 250x20mmL.D*, tamanho de partícula 5 $\mu$ m, fase móvel 95/5 água/metanol).

#### 4.1.5 Métodos Analíticos

Durante os procedimentos sintéticos os compostos foram analisados através de cromatografia em camada delgada (CCD), em cromatofolhas de alumínio (AL TLC) de sílica-gel 60 F254 Sigma® e visualização através de lâmpada ultravioleta (254 e 365 nm). Além disso, foram determinados os espectros de ressonância magnética

nuclear de  $^1\text{H}$ , que foram obtidos no Instituto de Química (UNESP-Araraquara), utilizando-se um espectrômetro de 300 MHz Fourier Dual Probe  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  – Bruker®.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma das ferramentas utilizadas para o planejamento de novos fármacos é o processo de latenciação ou desenvolvimento de pró-fármacos. Para tanto, um transportador é ligado quimicamente ao fármaco a ser modificado, através de uma ligação lábil, gerando uma nova unidade química chamada de pró-fármaco, o qual promoverá a atividade biológica após a clivagem no organismo. Caso o transportador tenha atividade, o pró-fármaco será chamado de recíproco ou mútuo. Esta estratégia é utilizada para potencializar os efeitos do fármaco matriz (23,25,112). Assim, para que o planejamento tenha maior chance de sucesso, é imprescindível demonstrar os efeitos dos dois componentes *in vivo*. Desta maneira, ensaios *in vivo* envolvendo a associação do transportador ativo com o fármaco matriz devem ser realizados antes da síntese do pró-fármaco.

Neste contexto, o ensaio *in vivo* foi realizado com a associação entre 5-FU e taurina como uma prova de conceito em relação ao efeito protetor da taurina e sua atividade tumoral.

A indução da carcinogênese química foi realizada com DMH, após o período de indução (1ª semana), houve a perda de 8 animais. Esses dados estão de acordo com os obtidos por Moura (2012), que descreve a perda de 10% dos animais após a indução com DMH. Na 9ª semana após a indução houve a perda de um animal, o mesmo ocorreu na 12ª semana. Ambos foram encontrados enrijecidos, e as análises histológicas revelaram processo de necrose, assim este material biológico não foi objeto desse estudo.

### 5.1.1 Análise da variação de peso corpóreo dos animais

Os animais foram pesados, individualmente, em quatro momentos distintos: antes do processo de indução, antes do início do tratamento (antes do ciclo 1), antes da segunda fase de tratamento (antes do ciclo 2) e no dia da eutanásia. A análise foi realizada considerando-se o peso inicial de cada animal como 100% e calculando-se proporcionalmente os pesos em relação à porcentagem. A Tabela 2 apresenta a variação dos pesos corporais reais de cada grupo, por fase do experimento e a tabela 6 (Anexo IV) apresenta os valores em porcentagem, que foram utilizados na análise estatística.

**Tabela 2.** Peso corporal dos animais de acordo com o grupo e a fase do experimento.

Grupo	Fase do experimento		
	Antes do ciclo 1 (P1)	Antes do ciclo 2 (P2)	Eutanásia (P3)
<b>C(-)</b>	563,84± 20,93 <sup>b,c</sup>	568,50± 21,25 <sup>c,d</sup>	541,05± 20,33 <sup>b</sup>
<b>C(+)</b>	539,07± 19,14 <sup>a,c</sup>	542,32± 19,27 <sup>a,c,d</sup>	513,27± 17,91 <sup>b,c</sup>
<b>TAU(-)</b>	543,94± 14,93 <sup>b</sup>	557,65± 16,01 <sup>c</sup>	521,14± 14,93 <sup>b</sup>
<b>TAU(+)</b>	496,78± 14,55 <sup>a</sup>	504,63± 14,66 <sup>a</sup>	475,59± 14,16 <sup>c</sup>
<b>5-FU(-)</b>	562,08± 18,84 <sup>b,c</sup>	563,83± 19,96 <sup>b,d</sup>	523,60± 17,14 <sup>b</sup>
<b>5-FU(+)</b>	504,28± 21,34 <sup>a,c</sup>	500,02± 21,16 <sup>a,d</sup>	455,00± 17,70 <sup>c</sup>
<b>5-FU+TAU(-)</b>	494,56± 20,49 <sup>a,c</sup>	503,52± 18,86 <sup>a,b,d</sup>	454,77± 17,36 <sup>a,c</sup>
<b>5-FU+TAU(+)</b>	508,83± 20,02 <sup>b,c</sup>	500,97± 18,82 <sup>a,c,d</sup>	453,17± 18,33 <sup>c</sup>

\* a,b,c,d – diferença estatística entre linhas (p<0,05).

Valores são médias ± erro padrão.

Análise estatística: *Two-way* Anova seguido de teste de múltiplas comparações de Bonferonni.

Grupos: C(-) (não-induzido+veículo), C(+) (induzido+veículo), TAU(-) (não-induzido+taurina), TAU(+) (induzido+taurina), 5-FU(-) (não-induzido+5-FU), 5-FU(+) (induzido+ 5-FU), 5-FU+TAU(-) (não-induzido+ 5-FU+ taurina), 5-FU+TAU(+) (induzido+ 5-FU+taurina).

(Dados da pesquisa).

Na análise da variação de peso após o primeiro ciclo de tratamento (P2), observou-se, que não houve diferença estatística entre o controle negativo e os grupos TAU(-), 5-FU(-) e associação (5-FU+TAU(-)). O mesmo foi observado analisando-se o controle positivo e os grupos tratados com taurina, 5-FU e associação.

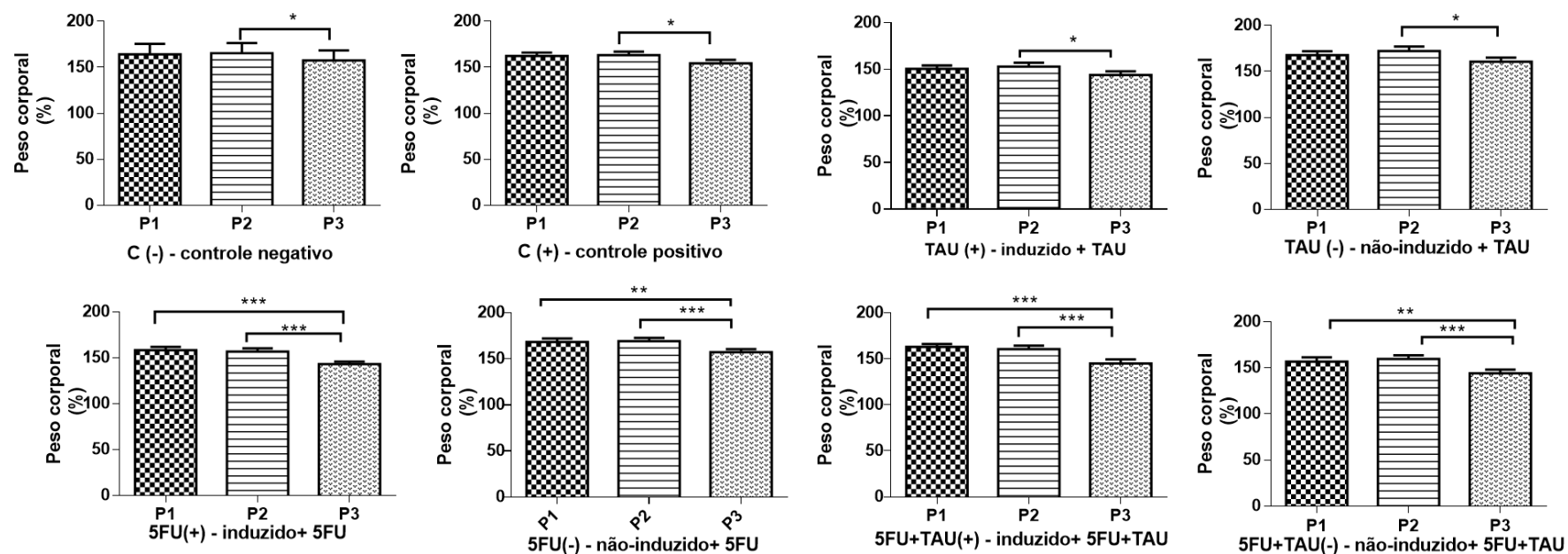
O grupo induzido e tratado com taurina (TAU (+)) foi o único que apresentou redução de peso corporal quando comparado ao seu controle não induzido (TAU (-)), porém, essa diferença já havia sido observada antes do início do ciclo de tratamento, sugerindo relação direta com o processo de indução.

Após o segundo ciclo de tratamento (P3), entre os grupos não induzidos, observou-se redução de peso significativa somente no grupo da associação (5-FU+TAU (-)) quando comparado aos demais (C(-), 5-FU(-) e TAU(-)). Com relação aos grupos induzidos e tratados, não houve diferença quando comparados entre si. Já em relação ao controle de tratamento dos grupos, os grupos que receberam tratamento isolado de 5-FU ou taurina, apresentaram reduções de peso estatisticamente significativas. No caso da taurina (TAU (-) X TAU (+)), essa diferença já havia sido observada na fase anterior ao início do ciclo 1, conforme discutido anteriormente, porém, no caso do 5-FU (5-FU (-) X 5-FU (+)) poderia estar relacionada aos efeitos adversos relacionados à mucosite gerada pelo fármaco.

A figura 24 apresenta os gráficos individuais dos grupos, com as variações de peso corpóreo observadas de acordo com a fase do experimento. É possível observar que todos grupos tiveram perda ponderal entre P2 (peso antes do ciclo 2) e P3 (peso após a eutanásia). Possivelmente devido à uma variável intercorrente, que se aplicou a todos os grupos experimentais. Além disso, observa-se que os animais tratados com 5-FU apresentaram perda ponderal mais expressiva, sendo também verificada entre



P1 e P3 (inclusive nos grupos que não foram induzidos). Isso pode estar relacionado ao efeito adverso causado pelo fármaco no sistema gastrointestinal (18,20).



\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001

Análise estatística Anova One-way para amostras repetidas seguida de teste de múltiplas comparações de Bonferoni.

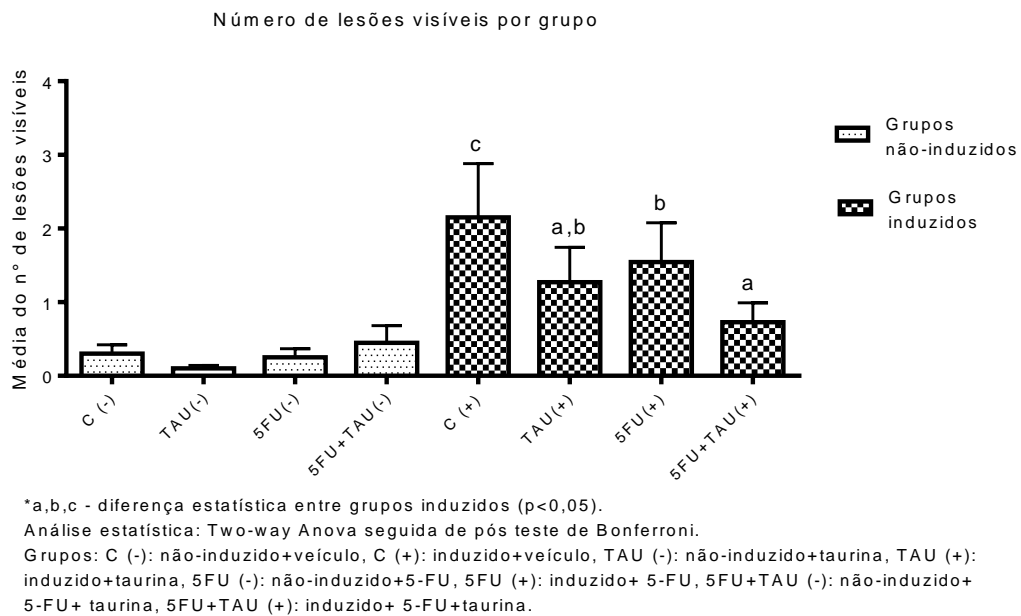
**Figura 24.** Variação de peso entre os grupos nas fases do experimento. Os valores são a média de cada grupo em porcentagem (dados da pesquisa).

### 5.1.2 *Análise macroscópica do cólon*

#### 5.1.2.1 *Análise do número de lesões visíveis*

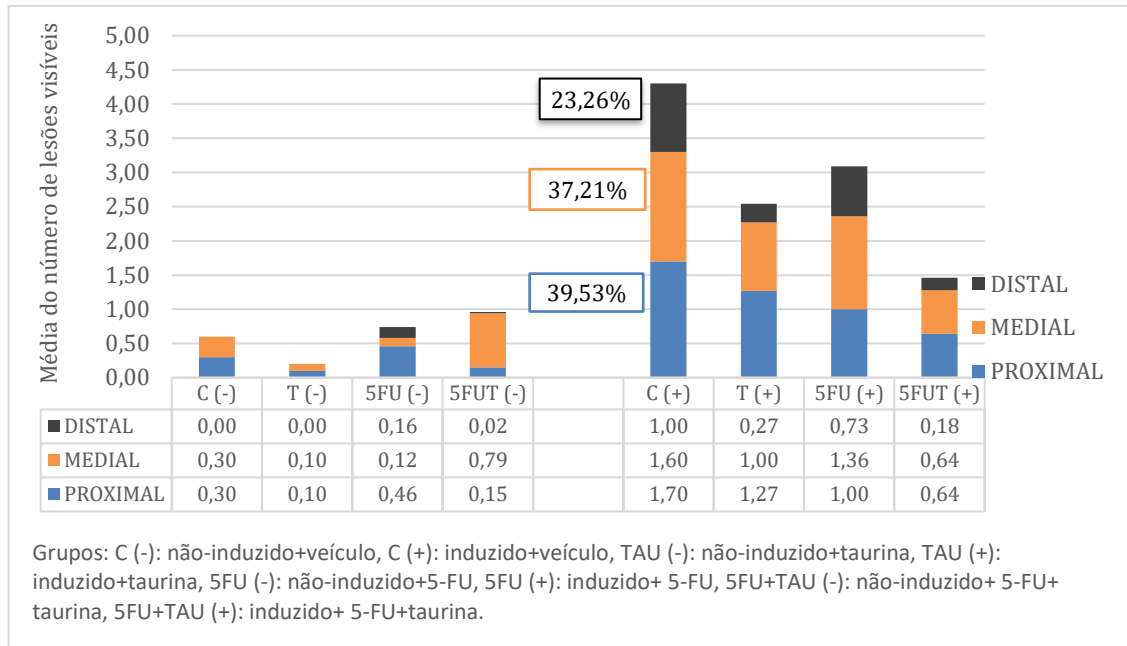
A figura 26 apresenta os dados da contagem de lesões visíveis, em que se verificou que animais não induzidos também apresentaram lesões visíveis. É importante destacar que as lesões visíveis podem incluir processos inflamatórios localizados, tecido linfóide hiperplásico e neoplasias. A confirmação das lesões encontradas somente é possível a partir da análise histológica do cólon completo. Mesmo assim, os grupos não induzidos não apresentaram diferença estatística entre si. Ainda, neste ponto do trabalho, observou-se que o grupo controle negativo (C(-)) apresentou menos lesões que C(+) nas porções proximal, medial e na contagem total de lesões encontradas no cólon  $P < 0,05$ ).

Já entre os grupos induzidos (Figura 25), houve diferença entre os grupos somente na contagem total do número de lesões. Observou-se que TAU(+), 5-FU(+) e 5-FU+TAU(+) apresentaram menos lesões do que o controle do que C(+), com valores significativos de  $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente. Além disso, TAU(+) e 5-FU(+) foram equivalentes entre si, mas comparando-se TAU(+) com a associação (grupo 5-FU+TAU(+)), não houve diferença estatística entre os grupos. Já para 5-FU(+) e 5-FU+TAU(+) observou-se que o grupo da associação promoveu maior redução do número total de lesões visíveis do que o padrão de tratamento ( $p < 0,01$ ), demonstrando que a TAU melhora o perfil da atividade do 5-FU na diminuição das lesões.



**Figura 25.** Número de lesões visíveis por grupo experimental (dados da pesquisa).

A Figura 26 apresenta o gráfico de distribuição das lesões visíveis de acordo com as porções do cólon. Observa-se que no grupo controle de indução (C(+)), a maioria das lesões aparece nas porções proximal e medial do cólon, cerca de 39,53% e 37,21 %, respectivamente. Segundo dados da literatura (39,113), a porção distal e medial apresentam maior incidência de tumores em modelos de carcinogênese química induzida por AOM ou DMH. Entretanto, é importante enfatizar que as lesões visíveis aqui determinadas não se caracterizam, obrigatoriamente, como processos tumorais (adenomas ou adenocarcinomas). Essas lesões podem incluir processos inflamatórios localizados ou mesmo tecido linfóide hiperplásico. Do mesmo modo, não há garantia de que todas as lesões tumorais se expressem clinicamente como lesões macroscópicas. Alguns tumores podem ser diminutos no momento do sacrifício, não atingindo tamanho suficiente para serem identificados na análise ao olho nu.



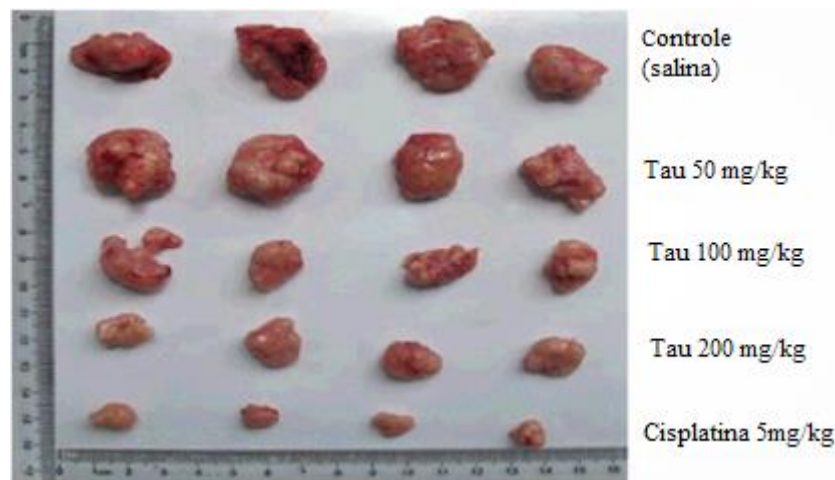
**Figura 26.** Gráfico da distribuição das lesões visíveis de acordo com as porções do cólon nos grupos experimentais (dados da pesquisa).

Com relação aos dados obtidos, observou-se que a taurina isolada foi capaz de reduzir cerca de: 77% das lesões no cólon distal, 37% no medial e 25% no proximal. Enquanto o 5-FU isolado reduziu cerca de 27%, 15% e 42% das lesões visíveis no cólon distal, medial e proximal, respectivamente.

Os dados da associação apontam efeito sinérgico das duas substâncias, uma vez que se observa incremento da redução das lesões visíveis no cólon total. Segundo os dados, há redução de cerca de 82% das lesões no cólon distal, 60% no cólon medial e 62% no cólon proximal.

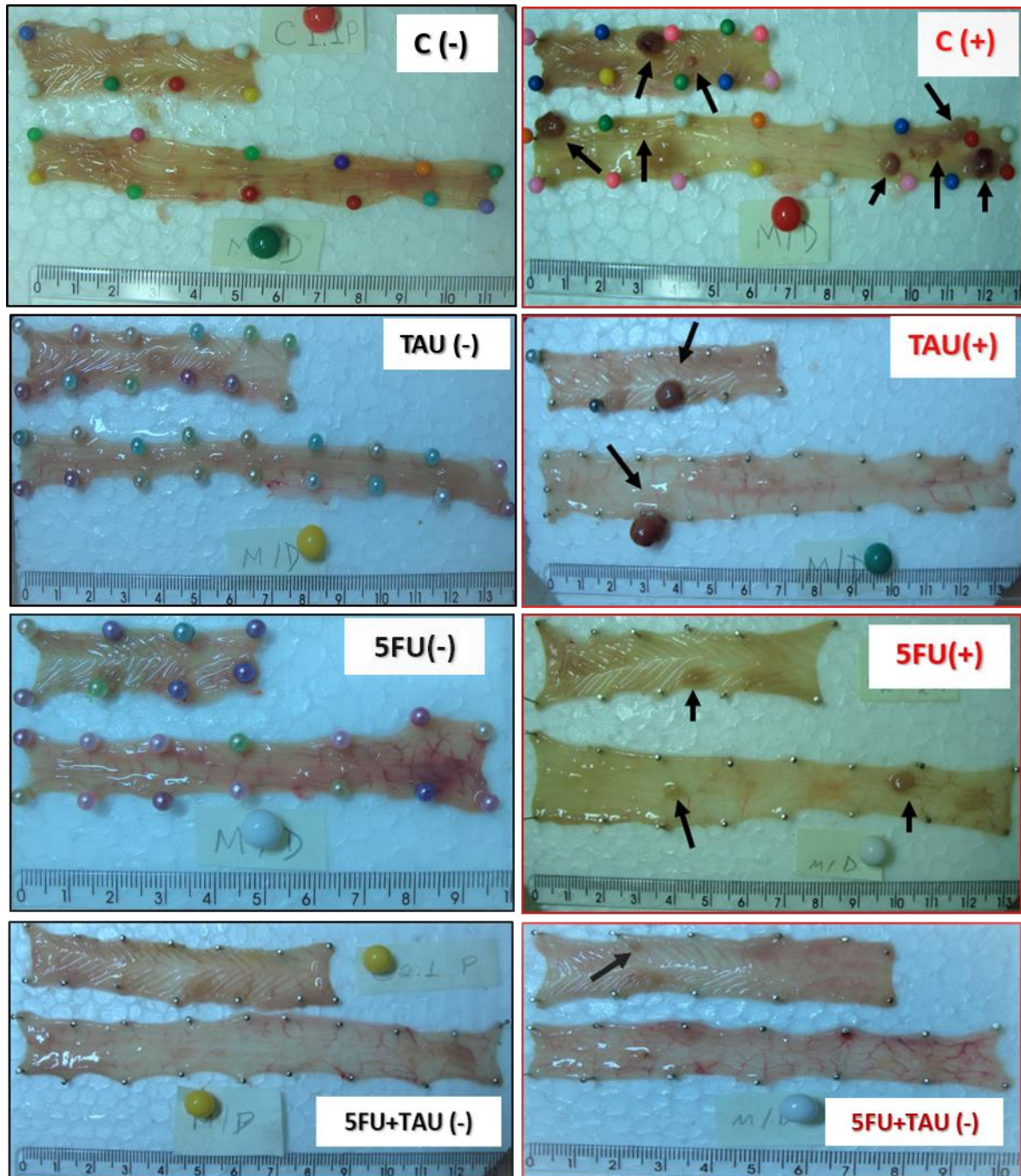
Assim, os dados macroscópicos obtidos corroboram com os resultados obtidos por Zhang et al. (2014), que observaram a atividade da taurina inibindo a proliferação de células tumorais de cólon e induzindo a apoptose dessas células (LoVo e HT-29). Em modelo xenográfico de camundongos, os pesquisadores verificaram que a taurina foi capaz de reduzir o volume dos tumores de cólon de forma dose

dependente, e que a administração de 200 mg/kg de taurina gera cerca de 40 a 50% de redução do volume dos tumores em relação ao grupo não tratado, conforme observa-se na figura 27 (37).



**Figura 27.** Imagem dos tumores de cólon (células LoVo) tratados com taurina, obtidos a partir de modelo xenográfico (Adaptado de Zhang et al. (2014) (37)).

Isso sugere a hipótese de que o mesmo efeito antitumoral possa ser visto no presente trabalho, uma vez que a redução do número de nódulos visíveis foi considerada equivalente entre o grupo da taurina (grupo TAU(+)) e o grupo do 5-fluorouracil isolado (5-FU(+)) e sabe-se que o fármaco (5-FU) não possui atividade anti-inflamatória. De qualquer modo, os resultados indicam que a taurina age de forma sinérgica com o 5-FU, reduzindo o número de lesões visíveis. A figura 28 apresenta as imagens macroscópicas de um animal de cada grupo experimental, as lesões visíveis são destacadas pelas setas pretas.

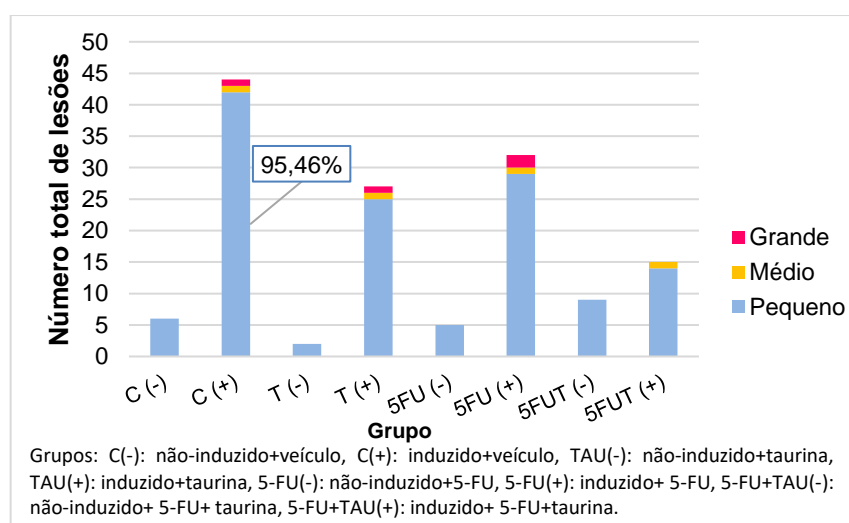


**Figura 28.** Imagem macroscópica com o cólon total de um animal de cada grupo experimental, as setas pretas indicam lesões visíveis (dados da pesquisa).

### 5.1.2.2 Análise do volume das lesões visíveis

Com relação ao volume das lesões visíveis (Figura 29), não houve diferença estatística entre os grupos, tanto induzidos quanto não induzidos. No entanto, observa-se que no grupo induzido e tratado com a associação (5-FU+TAU(+)) não foram encontradas lesões de volume grande ( $>0,60 \text{ cm}^3$ ). Analisando o volume das lesões encontradas, a maioria das lesões foi classificada como pequena. No entanto, o grupo tratado com a associação é o único dos grupos induzidos que não apresentou lesões de volume grande. Isso pode estar relacionado com um provável efeito sinérgico entre 5-FU e taurina, já que a taurina também possui atividade na redução de volume de neoplasias, conforme descrito por Zhang et al. (2014).

Observa-se também que cerca de 95,46% do total das lesões apresentadas no grupo C(+) foi classificada como pequena ( $<0,30 \text{ cm}^3$ ) (Figura 29). Além disso, considerando todas as lesões apresentadas pelos animais, incluindo todos os grupos, 94,3% foram classificadas como pequenas. Observou-se, ainda que o grupo da associação não apresentou lesões de tamanho grande ( $<0,60 \text{ cm}^3$ ).



**Figura 29.** Gráfico do número total de lesões visíveis de acordo com o volume (dados da pesquisa).



### 5.1.3 Análise da formação de focos de criptas aberrantes (ACF) e multiplicidade

As análises da formação de focos de criptas aberrantes e multiplicidade foram realizadas no cólon completo (proximal, medial e distal).

A formação de focos de criptas aberrantes representa o início do processo de formação do câncer de cólon, e o aumento da quantidade de criptas dentro de um mesmo foco está diretamente relacionado à progressão da doença (39). O surgimento dessas alterações celulares indica que há alterações genéticas, assim, não se deve encontrar criptas aberrantes em animais que não foram iniciados. Dessa forma, os resultados apresentados são apenas dos grupos induzidos, uma vez que não foram visualizados focos de criptas aberrantes nos animais dos grupos não induzidos.

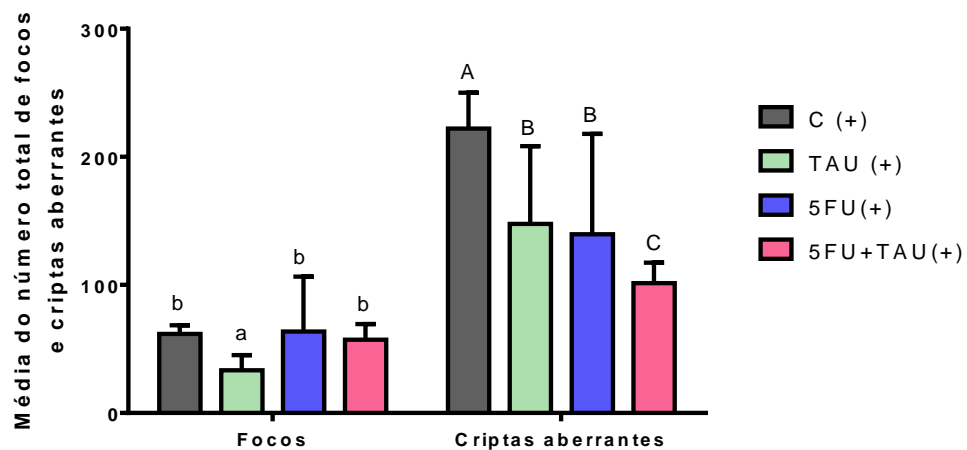
A figura 30 apresenta o gráfico com a média do número de focos e criptas aberrantes observados nos grupos induzidos. Em relação ao número de focos, o grupo que recebeu a taurina apresentou redução significativa em relação ao grupo não tratado, 5-FU isolado e associação ( $p < 0,05$ ). Considerando-se o número de criptas aberrantes, o grupo da associação apresentou redução significativa em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Além disso, o grupo que recebeu taurina isoladamente apresentou redução no número de criptas aberrantes em relação ao não tratado ( $p < 0,05$ ) e equivalente ao fármaco antitumoral.

O DMH é um pró-carcinógeno, que *in vivo* é metabolizado em MAM (metilazoximetanol), que promove a metilação do DNA das células, principalmente as que estão em constante proliferação celular, como as células que formam as criptas colônicas (39). Além disso, a taurina apresentou efeito protetor de carcinogênese química em modelo de indução de câncer de mama, segundo os autores, a taurina age como potente antioxidante, promovendo a regulação da mitocôndria e protegendo

dos radicais livres formados pelo carcinógeno (32). Resultado semelhantes também foram descritos por Wargovich et al. (2000), que demonstrou que a suplementação de taurina simultaneamente ao processo de indução por azoximetano (AOM), foi capaz de reduzir a formação de focos de criptas aberrantes em ratos F344. O azoximetano é o metabólito ativo do DMH, que *in vivo* gera também a formação de MAM.

O efeito da taurina como protetor também foi descrito por Bosquesi, et al. (2018) segundo os autores a taurina reduz o efeito genotóxico *in vivo* quando associada à substâncias que formam radicais livres, especificamente nitrocompostos. Assim como proposto pelos autores, o efeito antioxidante pode ser responsável por sua atividade biológica. Neste caso, o efeito da taurina frente ao MAM gerado pelo metabolismo do DMH, seria a redução de radicais livres e, conseqüentemente da metilação do DNA. Isso explicaria a redução no número de focos de criptas aberrantes.

**Média do número de focos e criptas aberrantes por grupo**



\*a,b - diferença estatística entre os grupos para focos ( $p < 0,05$ ).

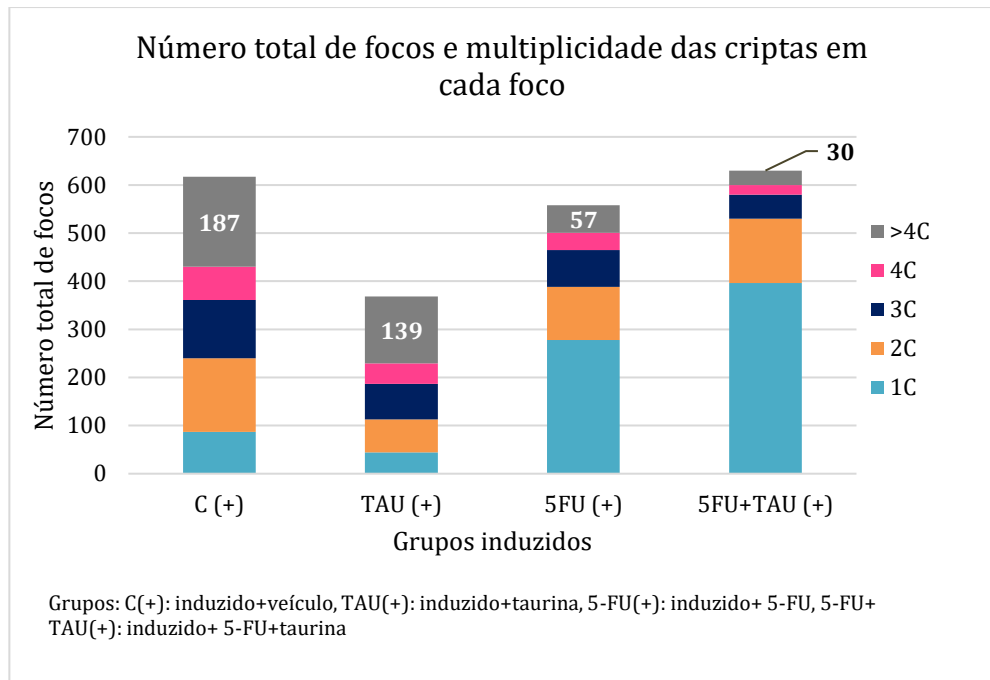
\*A,B,C - diferença estatística entre os grupos para criptas aberrantes ( $p < 0,05$ ).

Análise estatística: Two-way Anova seguida de teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

**Figura 30.** Média de focos e criptas aberrantes nos grupos induzidos (dados da pesquisa).

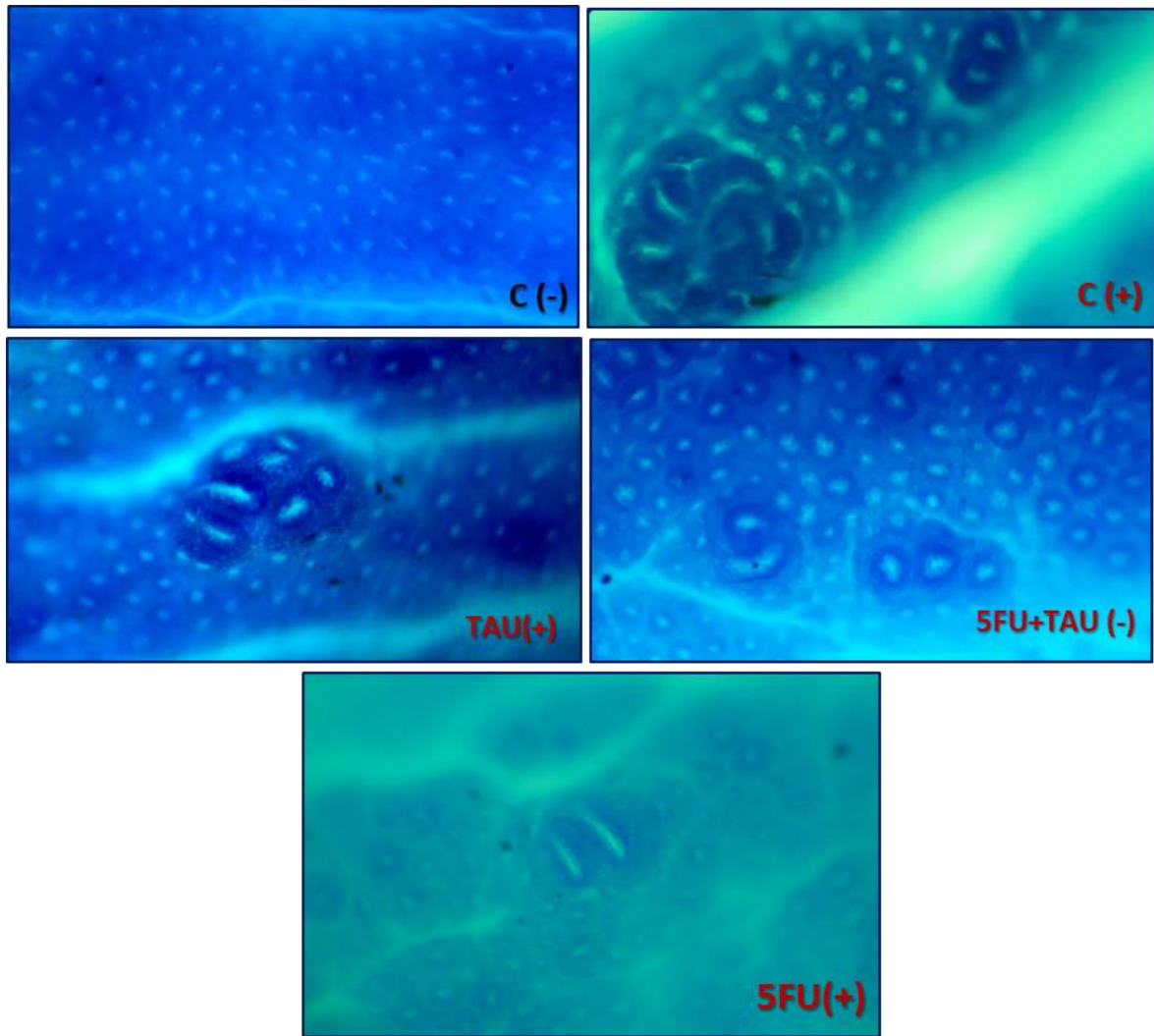
O gráfico da figura 31 apresenta os dados sobre a multiplicidade na média do total de focos. Sabe-se que a quantidade de criptas aberrantes dentro de cada foco está diretamente relacionada a progressão do processo tumoral (39).

Nesse contexto, foi possível observar que os grupos que receberam 5-FU (5-FU(+) e 5-FU+TAU(+)) possuem menor multiplicidade por foco, o que deve estar relacionado ao mecanismo de ação do fármaco, que atua diretamente na fase S do ciclo celular, bloqueando bioquimicamente a síntese de DNA (115). Neste caso, inibindo o aumento da proliferação de criptas dentro do mesmo foco. Além disso, observa-se que a taurina isolada apresenta cerca de 26% menos focos com mais de 4 criptas, o 5-FU isolado apresenta 69,5% menos e a associação 84% menos focos com 4 criptas. O grupo que recebeu a associação reduz o número de focos e a quantidade de criptas por foco, aumentando focos com uma cripta. Isso pode estar envolvido com o mecanismo de apoptose. Estudos de Vanitha et al. (2018) verificaram o efeito da taurina na apoptose de células tumorais, o mecanismo parece estar relacionado ao gene p53. O que pode explicar a redução no número de criptas aberrantes, uma vez que a taurina exerça efeito em p53 e reative a apoptose das criptas aberrantes formadas, reduzindo a multiplicidade dentro dos focos.



**Figura 31.** Gráfico do número total de focos e a multiplicidade em cada grupo (dados da pesquisa).

A figura 32 apresenta dados de microscopia dos grupos induzidos e do controle negativo, observa-se a formação das criptas aberrantes que, geralmente, encontram-se fora do plano microscópico observado. Na figura, o grupo C (-) apresenta somente criptas normais, o C (+) apresenta um foco com cerca de 9 criptas e outro com 2 criptas. TAU(+) apresenta um foco com cerca de 8 criptas, 5FU(+) um foco com 2 criptas e o grupo da associação, apresenta 2 focos, um com 2 e outro com 3 criptas aberrantes.



**Figura 32.** Imagem microscópica dos focos de criptas aberrantes em alguns grupos experimentais (dados da pesquisa).

#### 5.1.3.1 Análises histopatológicas do cólon

A seguir serão apresentados os resultados das análises histológicas das porções distais do cólon dos animais, as demais porções do cólon encontram-se em fase de análise.

A primeira análise histopatológica realizada foi a identificação e contagem de neoplasias (Tabela 3). As neoplasias foram classificadas em adenomas, lesões tumorais sem processo de invasão da camada submucosa e/ou muscular e

*Resultados e discussão*

---

adenocarcinomas, caracterizados pelo processo de invasão. A figura 32 apresenta a imagem microscópica do cólon de um animal por grupo, nos grupos C(+) e 5-FU(+) observa-se rompimento da camada submucosa e invasão do tecido. Nos grupos TAU(+) e 5-FU+TAU(+) observa-se adenomas, em que o tecido submucoso e muscular aparecem íntegros. Os demais grupos apresentam arquitetura tecidual normal, comparativa ao C(-).

**Tabela 3.** Tabela com alguns dos parâmetros histológicos analisados para o cólon (distal).

	C(-)	C(+)	TAU (-)	TAU (+)	5-FU(-)	5-FU(+)	5-FU+TAU(-)	5-FU+TAU(+)
<b>Neoplasia (A+Ac)</b>	0,00	0,50±0,31	0	0,18±0,12	0	0,64±0,20	0	0,09±0,09
<b>Adenoma (A)</b>	0,00	0,10±0,10	0	0,09±0,09	0	0,18±0,12	0	0,09±0,09
<b>Adenocarcinoma (Ac)</b>	0,00	0,40±0,22	0	0,09±0,09	0	0,45±0,20	0	0
<b>Infiltrado inflamatório</b>	0,59±0,09	0,56±0,06	0,65±0,15	0,67±0,09	0,94±0,13	0,67±0,06	0,59±0,09	0,71±0,08
<b>Inflamação Submucosa-intensidade</b>	2,25±0,01	2,20±0,08	2,50±0,11	2,82±0,10	2,50±0,13	2,27±0,12	2,25±0,12	2,36±0,12
<b>Mucosa - Perda de Continuidade</b>	0,40±0,16	0,10±0,10	0,20±0,13	0,18±0,12	0	0,55±0,16	0,40±0,16	0,91±0,09
<b>Aspecto mucosa</b>	1,80±0,25	2,00±0,15	1,80±0,13	2,00±0,19	2,10±0,10	1,36±0,15	1,80±0,25	1,09±0,09
<b>Muscular - Perda de Continuidade</b>	0,00	0	0	0	0	0	0	0,09±0,09
<b>Aspecto do tecido muscular</b>	1,6±0,16	1,90±0,10	1,80±0,13	1,82±0,18	2,10±0,10	1,36±0,15	1,60±0,16	1,18±0,12
<b>Produção de Muco</b>	2,20±0,24	2,05±0,09	1,95±0,14	1,95±0,20	2,30±0,13	1,81±0,19	2,20±0,24	1,41±0,22

\*não houve diferença estatística para estes parâmetros entre os grupos experimentais ( $p>0,05$ ).  
Valores são médias  $\pm$  erro padrão.  
Análise estatística: Two-Way ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

(Dados da pesquisa).

A tabela 3 apresenta parte dos dados histopatológicos do cólon distal, observou-se que os grupos não induzidos não apresentaram neoplasias, o que era esperado, uma vez que estes animais não passaram pelo processo de iniciação (indução da carcinogênese). Além disso, observou-se que a média de tumores apresentados no grupo induzido e tratado com 5-FU é superior à média encontrada para o controle positivo, cerca de 28%. Em relação ao grupo induzido que recebeu a taurina isoladamente, o aminoácido apresentou cerca de 64% menos neoplasias que o controle positivo e aproximadamente 72% menos que o fármaco padrão (grupo 5-FU(+)). Com relação a associação, a incidência de neoplasias foi cerca de 82% menor do que o C(+), 86% menor que a do grupo 5-FU(+) e 50% menor do que o grupo tratado com taurina isoladamente (TAU(+)).

É importante ressaltar, que os dados de neoplasia no grupo 5-FU(+) não indicam que o fármaco causa neoplasia. A contagem superior ao controle positivo deve-se a um fator incremental ao processo de indução da carcinogênese promovida no modelo animal (46). Na verdade, a DMH é um carcinógeno considerado completo, ou seja, não necessita de outras substâncias para promover a carcinogênese. Todavia, o 5-FU, tendo em vista seu próprio mecanismo de ação, pode ter atuado de forma a incrementar a indução tumoral, justificando essa contagem superior ao C(+). Além disso, observando-se o grupo não induzido que recebeu 5-FU, fica claro que o fármaco não desenvolve neoplasias, afinal nenhum grupo não-induzido apresentou tumor.

Ainda, verifica-se atividade sinérgica da taurina sob este ponto, uma vez que se observa redução da quantidade de neoplasias no grupo que recebeu associação, e esta redução é superior ao valor obtido para taurina isolada.



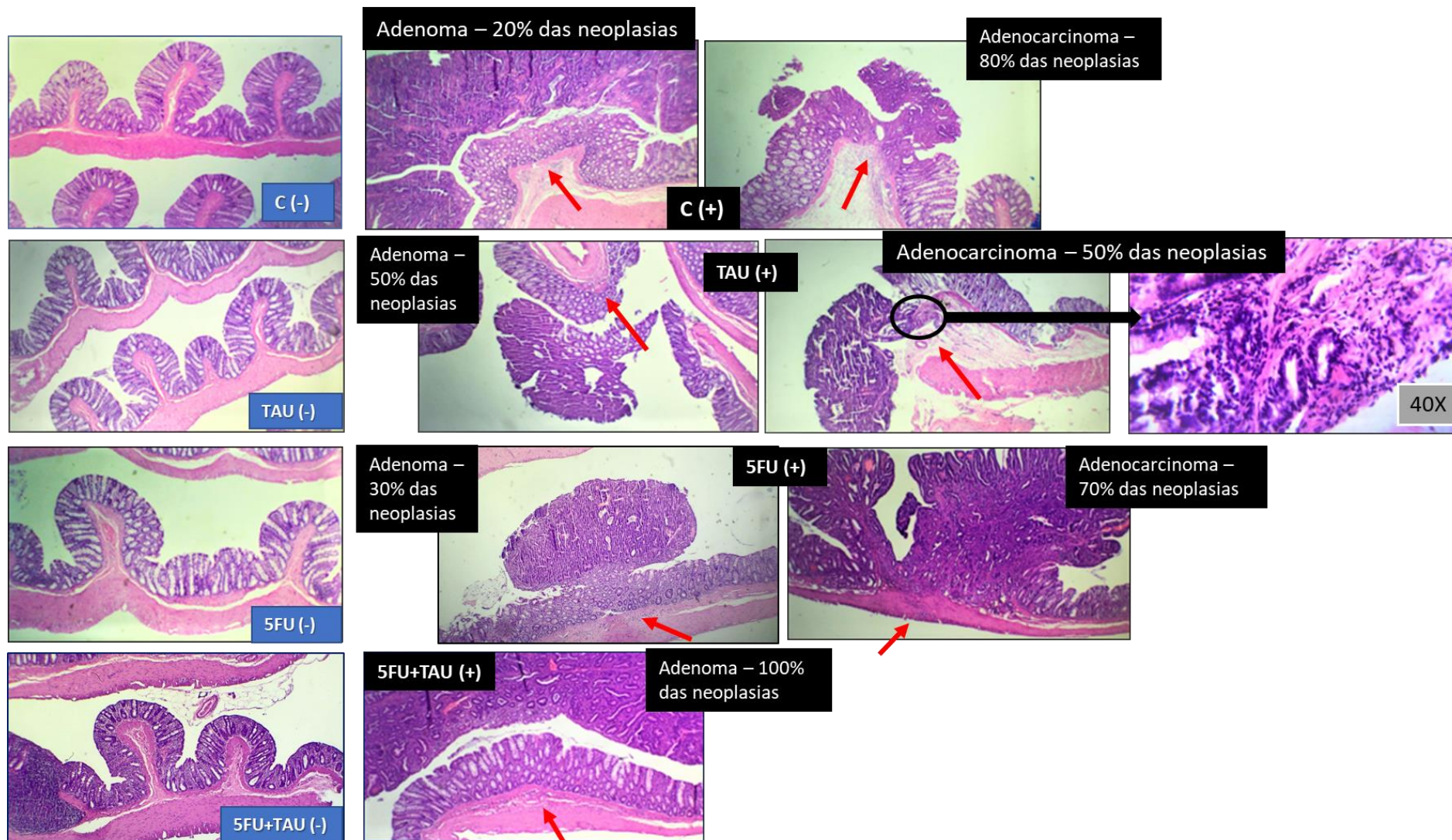
Segmentando os dados de neoplasia, para o grupo C(+) cerca de 80% das neoplasias eram adenocarcinomas, valor semelhante ao obtido no grupo que recebeu 5-FU como tratamento, que apresentou cerca de 70% de adenocarcinomas. O grupo que recebeu taurina (TAU(+)), apresentou aproximadamente 50% de adenocarcinomas. No entanto, o grupo que recebeu 5-FU e TAU é apresentou zero como média de incidência de adenocarcinomas, valor que se equipara aos grupos não induzidos (não apresentaram adenocarcinomas). Isso indica que das lesões neoplásicas que apareceram no grupo tratado com a associação, aproximadamente 100% delas eram adenomas, sendo, portanto, lesões não-invasivas.

Dessa forma, nossos dados estão condizentes com os da literatura, segundo Zhang et al. (2014), a taurina foi capaz de promover a redução de 40-50% de tumores de cólon, em ensaio com modelo xenográfico utilizando duas linhagens celulares (LoVo e HT-29). Além disso, foi capaz de promover a apoptose das células tumorais e inibição da proliferação dessas células. Os mecanismos moleculares envolvem o aumento na expressão do gene PUMA, aumento da expressão do gene Bax (pró-apoptótico) e redução do anti-apoptótico (Bcl-2), gerando a formação de caspase 3 e 9. Porém, os autores observaram que este não deve ser o único mecanismo envolvido, uma vez que a deleção do gene p53 não bloqueia a apoptose induzida pela taurina. Os estudos de Liu et al. (2018) corroboram com esses dados, foi observado que a indução de apoptose gerada pela taurina em cultura de células de CCR (Caco-2 e W620) ocorre via MST1-JNK (mammalian sterile 20-like kinase 1-c-Jun N-terminal kinase) e a deleção do gene MST-1 a taurina ainda promove efeito apoptótico, embora reduzido. Os autores sugerem que a ação apoptótica da taurina esteja relacionada a três vias de sinalização: MST1-JNK, MST1-Hipo, que estaria relacionada a via p53 e PUMA (via apoptose mitocondrial) (36,116).

Outros autores, descreveram o potencial da taurina modulando a atividade de doxorubicina, aumentando a concentração do fármaco dentro das células tumorais de câncer ovariano (M5076), mas não dentro das células normais. Segundo a pesquisa a taurina reduz o efluxo de doxorubicina em cultura de células, *in vivo* o grupo que recebeu a associação (DOX+TAU) apresentou redução de 40% do peso tumoral quando comparado ao grupo tratado com doxorubicina isoladamente (91).

A figura 33 apresenta algumas imagens microscópicas (aumento de 4X) obtidas dos grupos experimentais. Observa-se que os grupos que não foram induzidos (dispostos a primeira coluna) apresentam aspecto histológico normal. Nos grupos induzidos, são apresentados um adenoma e um adenocarcinoma de cada grupo, as setas vermelhas apontam para a camada submucosa, que aparece íntegra nos adenomas e invadida nos adenocarcinomas.

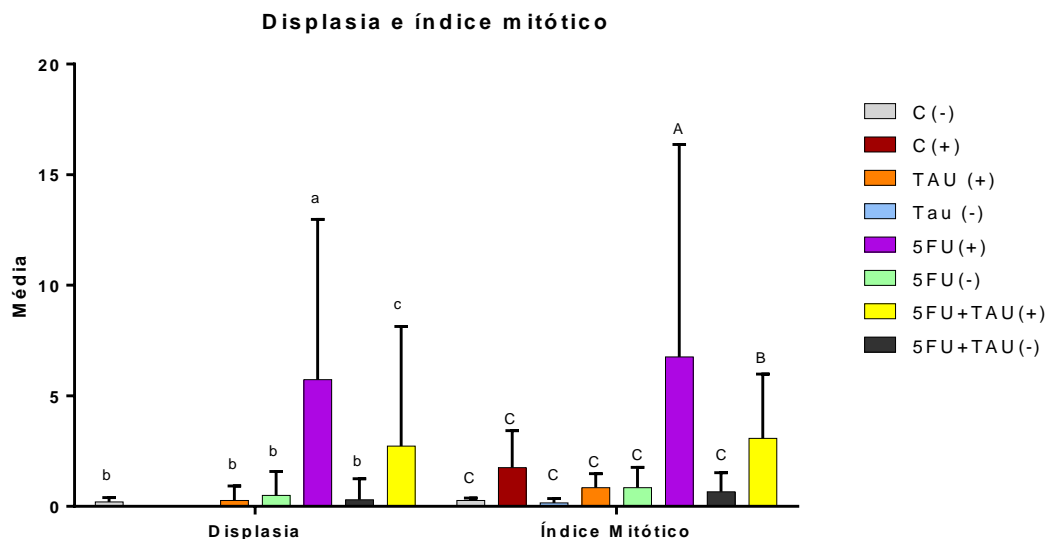
Observa-se ainda, que não houve a presença de adenocarcinomas no grupo induzido e tratado com a associação, por isso a imagem da figura 33 apresenta apenas um adenoma observado.



**Figura 33.** Imagem microscópica (objetiva de 4x) de fragmentos do cólon distal dos grupos experimentais (dados da pesquisa).

Com relação à quantificação dos infiltrados inflamatórios, não houve diferença estatística entre os grupos analisados. Já em relação às características inflamatórias da camada submucosa, 100% dos animais apresentaram inflamação de origem mista, com a presença de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, enquanto a intensidade se manteve entre nível leve e moderado. Isso sugere que os efeitos apresentados pela taurina estejam relacionados à sua atividade antioxidante, e não anti-inflamatória, uma vez que não se observou redução de processo inflamatório local.

A figura 34 apresenta os dados de contagem de displasia e índice mitótico, que apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre alguns grupos.



\*a,b,c - grupos que apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em displasia.

\*A,B,C - grupos que apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em índice mitótico.

Análise estatística: Two-Way ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

**Figura 34.** Gráfico de displasia e índice mitótico no cólon distal (dados da pesquisa).

Observa-se que houve diferença entre o grupo 5-FU(+) e os demais grupos, tanto para displasia, quanto para índice mitótico. A displasia, também chamada de neoplasia intraepitelial, poderia ser entendida através do mecanismo de ação do fármaco, interferindo na síntese de DNA e RNA, o que histologicamente pode gerar

displasia no tecido, embora o objetivo seja eliminar o câncer de cólon. No caso do experimento, a carcinogênese química promove a formação dos tumores de cólon de forma mais inespecífica. Entretanto, é possível que, mesmo no caso do tratamento de animais com o tumor pré-estabelecido, haja formações displásicas devido ao mecanismo de ação do fármaco em outros pontos do cólon.

De qualquer forma, fica clara a contribuição do 5-FU em promover a displasia, uma vez que o grupo da associação apresentou diferença em relação aos demais grupos experimentais. Porém, esse efeito não é observado nos grupos não-induzidos que receberam 5-FU como tratamento, individual ou mesmo combinado. Isso pode estar relacionado ao fato de não terem passado pelo processo de iniciação (indução química), o que seria o fator predisponente para o aparecimento dessas lesões, tornando o 5-FU o fator incremental, conforme discutido anteriormente para neoplasias (46).

Quanto aos dados de índice mitótico, pode-se observar o mesmo efeito, visto que os grupos que apresentam aumento do índice mitótico são os grupos induzidos e tratados com 5-FU. De qualquer forma, o fator indução parece ser mais preponderante neste caso, já que é possível observar incremento do índice mitótico no grupo C (+). Na verdade, isso condiz com os dados da literatura, uma vez que o índice mitótico representa uma medida de rapidez com a qual as células do tecido estão se dividindo, e em casos de áreas tumorais, a chance de disseminação das mesmas. Assim, após os animais terem passado pela fase de indução com o carcinógeno, o esperado seria justamente o aumento dos índices mitóticos, para que os animais entrem em fase de promoção seguida de progressão. Embora a etapa de iniciação tenha ocorrido 20 semanas antes do tratamento, não é possível prever a fase específica na qual cada animal se encontra, ou mesmo, em que fase específica cada parte do cólon pode se

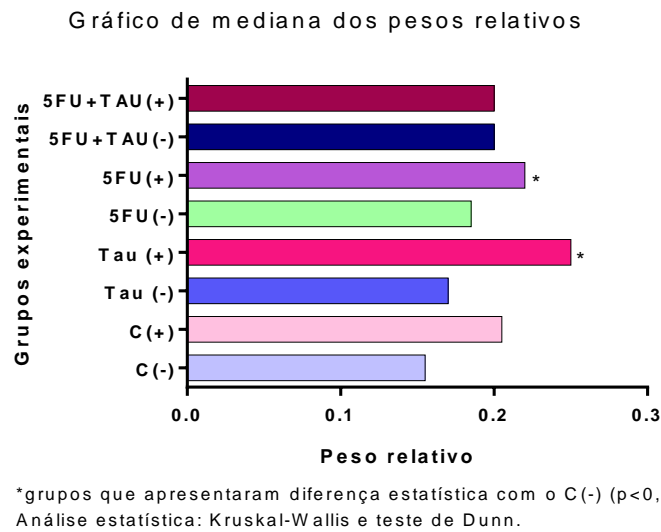
enquadrar, visto que animais com mais de uma lesão neoplásica também foram observados no experimento.

Adicionalmente, o grupo que recebeu a associação apresenta redução tanto do número de displasias, quanto do índice mitótico, deixando claro que o efeito redutor está relacionado a administração de taurina.

#### *5.1.4 Análise do baço*

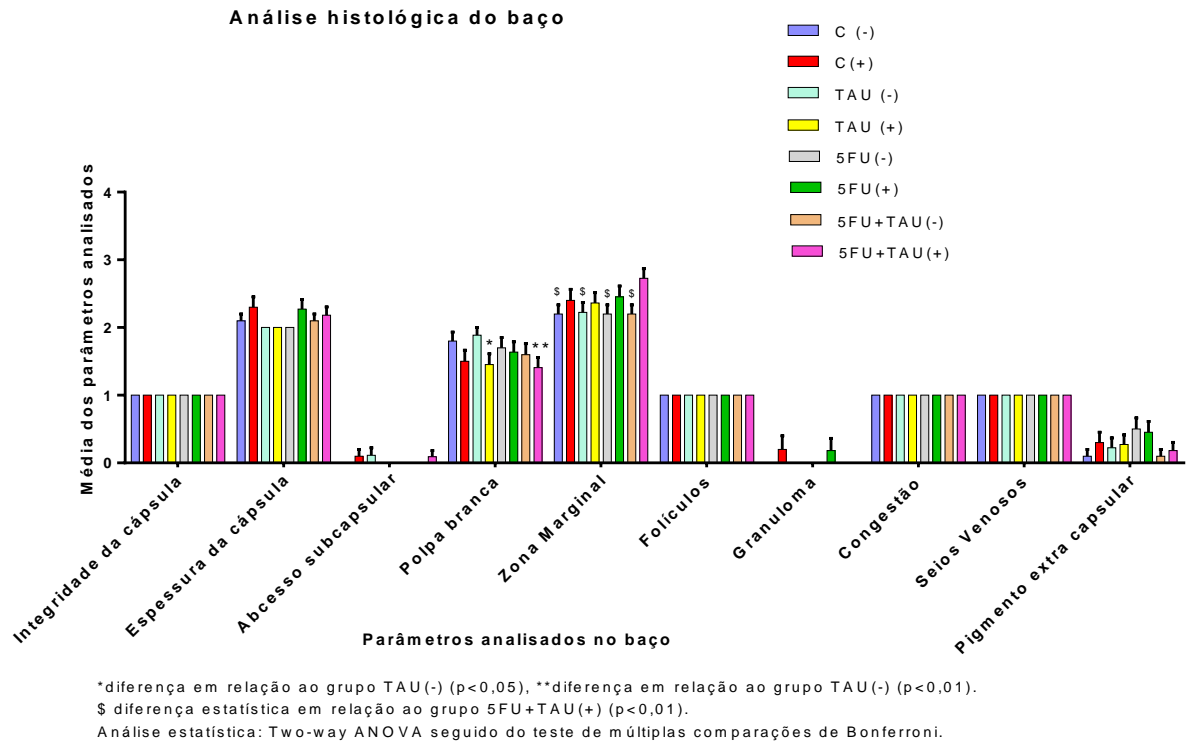
O baço representa o maior tecido linfoide secundário do organismo, responsável pela maior produção de células do sistema imune e pela filtração e armazenamento de sangue. É responsável pela remoção de células circulantes em processo de apoptose, além de estar envolvido na produção de anticorpos, uma vez que a polpa branca, contém os centros germinativos e a zona marginal. Em roedores, a zona marginal é formada exclusivamente por linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos (117).

A figura 35 apresenta os dados de peso relativo do baço dos animais do grupo experimental. Observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os animais induzidos e tratados com 5-FU e TAU isoladamente quando comparados aos animais do controle negativo.



**Figura 35.** Gráfico de peso relativo do baço (dados da pesquisa).

Com relação a análise histopatológica, foram utilizados os critérios descritos no anexo V. De acordo com a figura 36, no gráfico da análise histopatológica do órgão, observou-se que todos os grupos apresentaram a cápsula do baço íntegra, folículos organizados, presença de seios venosos, congestão vascular e pigmento extra capsular.



**Figura 36.** Gráfico da análise histopatológica do baço (Dados da pesquisa).

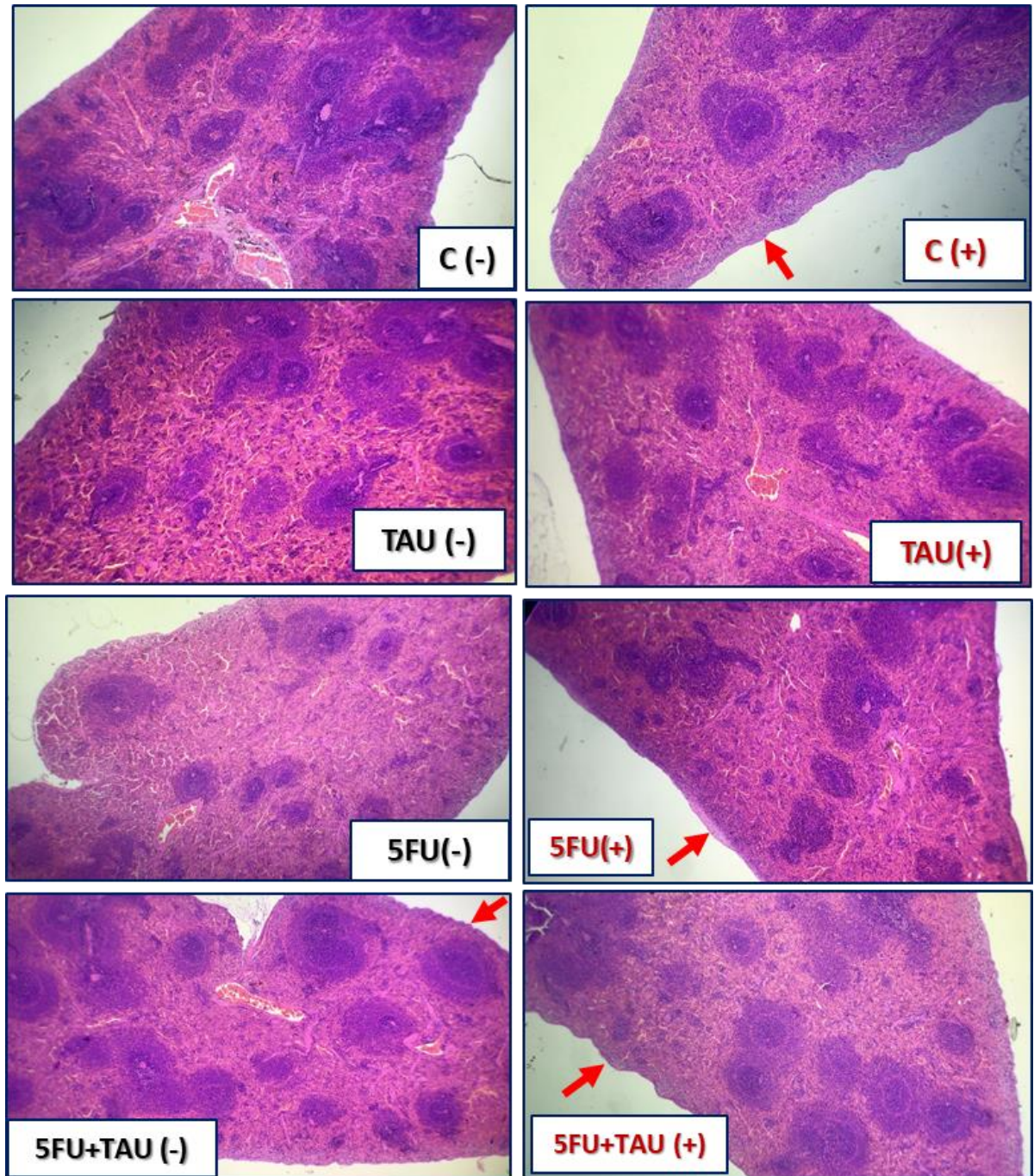
Observou-se diferença na polpa branca entre o grupo TAU (+), que apresentou polpa branca reduzida em relação ao grupo TAU(-) (polpa branca normal). O mesmo ocorreu entre o grupo TAU(-) e 5-FU+TAU(+), em que o grupo da associação também apresentou a polpa reduzida. De modo geral, observou-se que em alguns grupos induzidos houve aumento da zona marginal, como no caso do controle negativo, que apresentou a zona marginal normal, e comparado ao grupo induzido e tratado com a associação (5-FU+TAU(+)) apresentou esta área aumentada. O mesmo ocorreu entre os grupos TAU(-) e 5-FU+TAU(+); 5-FU(-) e 5-FU+TAU(+), e 5-FU+TAU(-) e 5-FU+TAU(+).

A relação entre os parâmetros parece estar mais relacionada ao processo de indução, uma vez que se observando os grupos induzidos e não induzidos em seus respectivos pares, parece haver a tendência de que os grupos induzidos apresentem a polpa branca reduzida e a zona marginal aumentada. Isso poderia ser explicado



pelo processo de carcinogênese, uma vez que haja uma célula alterada geneticamente, existem diversos mecanismos de evasão do sistema imunológico que em última instância, permitirão o estabelecimento da neoplasia. As células NK são as principais células envolvidas na defesa contra tumores, são responsáveis pelo reconhecimento do MHC classe I e marcação para que as células tumorais sejam identificadas pelos linfócitos T (118). A redução da polpa branca, pode representar a exaustão do centro germinativo do baço, uma vez que ocorreria a formação e a migração dessas células para o cólon. Segundo Di Sabatino et al., (2005), em humanos o baço está diretamente relacionado ao tecido linfoide intestinal (GALT). O estudo verificou que pacientes com doença inflamatória do cólon apresentam níveis de células B de memória reduzidos, além de baixa produção de IgM, que é ainda mais baixa em pacientes que passaram por remoção cirúrgica do órgão.

A figura 37 apresenta algumas imagens microscópicas do baço dos animais de cada grupo experimental. Observa-se redução de polpa branca nas imagens dos animais pertencentes aos grupos tratados com 5-FU isoladamente (5-FU(+), 5-FU(-)) e TAU(+). As setas vermelhas indicam espessamento da cápsula do baço. Na imagem, o baço dos animais dos grupos TAU(+) e 5-FU (+) também apresenta redução da zona marginal.

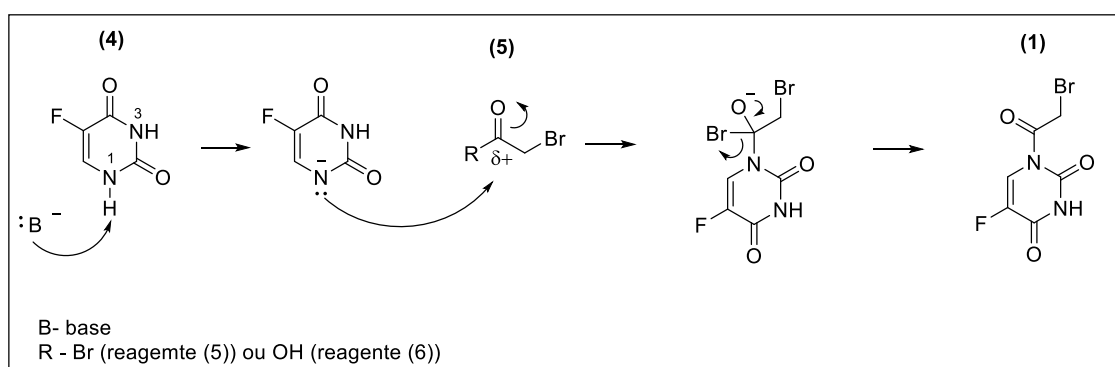


**Figura 37.** Imagens microscópicas do baço de alguns animais dos grupos experimentais, as setas vermelhas indicam espessamento da cápsula do baço (objetiva 4x) (dados da pesquisa).

## Síntese e obtenção dos pró-fármacos

### 5.1.5 Síntese do intermediário (2)

A figura 38 apresenta o mecanismo de reação proposto para as metodologias 4.1.4.1.1.1. e 4.1.4.1.1.2. A reação deveria ocorrer por mecanismo de adição-eliminação, neste caso o átomo de carbono carbonílico encontrar-se-ia altamente positivado, pois os átomos de bromo e oxigênio, retiram sua densidade eletrônica. A base do meio reacional, atuaria de forma a retirar o próton do átomo de nitrogênio 1, que disponibilizaria de modo mais efetivo seu par de elétrons, que atacariam o átomo de carbono eletrofílico do reagente (2). O átomo de nitrogênio seria adicionado ao carbono da carbonila e o par de elétrons da ligação dupla da carbonila (C=O) deslocaria para o átomo de oxigênio. Em seguida o par de elétrons voltaria a estabelecer a ligação C=O e ocorreria a eliminação do bromo com seu par de elétrons (caso a reação tenha ocorrido com o reagente (5)) ou de uma molécula de água (caso tenha sido utilizado o reagente (6)) (120).



**Figura 38.** Mecanismo de reação (adição-eliminação) proposto para a formação do intermediário (2) em meio básico (Baseado em Carey et al. 2007<sup>a</sup>).

Após a metodologia 4.1.4.1.1.1, realizada em acetonitrila, a elucidação estrutural por RMN de hidrogênio do sólido formado revelou que o produto formado

não correspondia ao intermediário **(2)**, e sim ao 5-fluorouracil e outro possível subproduto da degradação do brometo de bromoacetila.

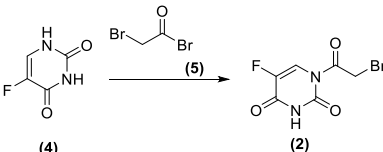
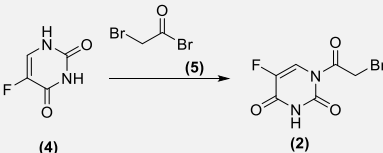
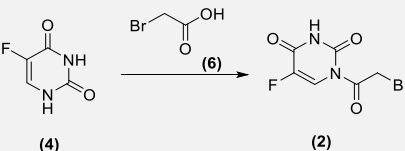
Considerando a dificuldade em solubilizar o 5-FU optou-se pela troca do solvente, da acetonitrila para outro solvente polar, neste caso o THF (tetrahidrofurano). Anteriormente, foi realizada a mesma metodologia descrita para o THF em 1,2-dioxano, porém a viscosidade do solvente dificultou a reação, que ocorreu em baixo rendimento e inviabilizou seu isolamento.

De acordo com dados da literatura (121), o reagente brometo de bromoacetila **(2)** é incompatível com bases fortes e volumosas, como o terc-butóxido ( $pK_a$  17), por isso, também realizou-se a substituição da base. Utilizou-se então, a trietilamina (TEA), que possui  $pK_a$  do seu ácido conjugado 10,7 (120,122) .

Assim, a partir da metodologia 4.1.4.1.1.2 (em THF) o sólido branco isolado foi analisado por RMH de hidrogênio e não apresentou correspondência com o intermediário desejado. Foram observados deslocamentos químicos diferentes dos reagentes de partida, sugerindo a degradação dos reagentes.

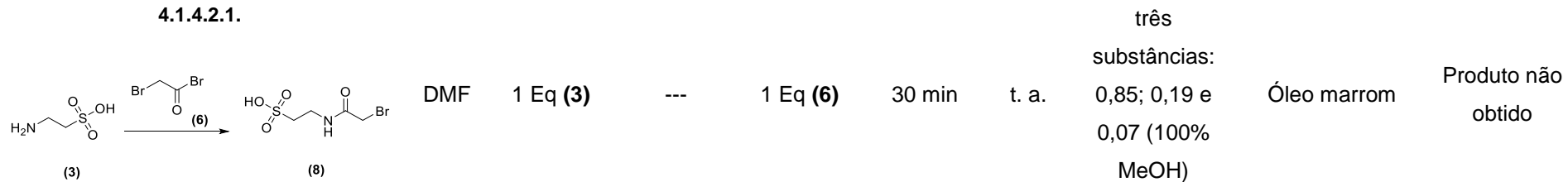
Outra metodologia utilizada foi através da utilização do ácido bromo acético **(6)** como espaçador. O mecanismo reacional segue o mesmo descrito na figura 38, mas neste caso, com a liberação de uma molécula de água. A reação foi feita de acordo com a metodologia 4.1.4.1.2, utilizando-se como solvente a piridina. Durante a síntese, observou-se solubilização parcial do 5-FU **(4)**, mesmo com a adição da base, que formou coloração levemente amarelada. O produto formado apresentou deslocamentos químicos incompatíveis com o intermediário **(2)**. Tais deslocamentos indicaram a presença de vestígios de solvente utilizado na síntese e do reagente (ácido bromoacético). A tabela 4 resume as principais informações das metodologias utilizadas e das substâncias obtidas.

Tabela 4. Dados das substâncias obtidas de acordo com as metodologias utilizadas.

Metodologia	Dados da reação					Dados da substância obtida			
	Solvente	Proporção reagente A	Base utilizada	Proporção reagente B	Tempo reação	T°C	Rf produto	Aspecto da substância obtida	Elucidação estrutural
<b>4.1.4.1.1.1. (Cho et al., 2012)</b>									
	CH <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N	1 Eq (4)	1,5 Eq terc-butK	3 Eq (5)	48 hs (atm N <sub>2</sub> )	t. a.	0,58 (8/2 acetato de etila/hexano)	Sólido amarelado	Produto não obtido
<b>4.1.4.1.1.2. (Kametani et al., 1980)</b>									
	THF	1 Eq (4)	4 Eq TEA	1 Eq (5)	3,5 hs	t. a.	0,45 (5/5 acetato de etila/MeOH)	Pó branco	Produto não obtido
<b>4.1.4.1.2 (Ouyiang et al., 2011)</b>									
	PI	1Eq (4)	4,5 Eq TBK	1,15 Eq (6)	30 min	35°C	0,14 (7/3 acetato de etila/MeOH)	Pó branco	Produto não obtido

*Resultados e discussão*

**4.1.4.2.1.**



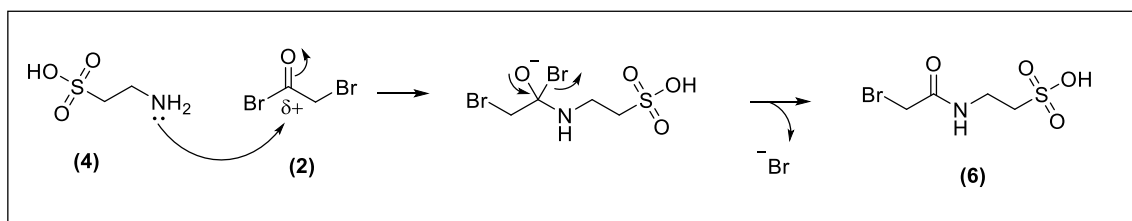
\* t°C – temperatura em graus Celsius; t.a. – temperatura ambiente, atm N<sub>2</sub> – atmosfera de nitrogênio

PI – piridina, TEA – trietilamina, TBK – terc-butóxido de potássio

(Dados da pesquisa).

### Síntese do intermediário (8)

Já para síntese do pró-fármaco 5-FU-TAU-2 (**7**) utilizou-se a síntese a partir da taurina (**3**) e do espaçador ácido bromoacético (**6**). A figura 39 apresenta o possível mecanismo de reação da metodologia 4.1.4.2.1, que também ocorreria através de um mecanismo de adição-eliminação. Neste caso, o par de elétrons do nitrogênio da taurina, promoveriam ataque ao carbono carbonílico do reagente (**6**). Em seguida ocorreria a liberação de uma molécula de água e promovendo a formação do intermediário (**8**) (120).



**Figura 39.** Mecanismo de reação proposto para reação entre a taurina (4) e o brometo de bromoacetila (2) (Baseado em Carey & Sundberg, 2007a).

Através desta metodologia, obteve-se um óleo de coloração amarelada, apresentando-se como a mistura de três substâncias, conforme representado na tabela 4. Após a purificação em HPLC preparativo, foram coletadas as frações 1,2 e 3 em tempos de retenção 2 min, 8 min e 29,5 min, respectivamente (tabela 4). Os deslocamentos químicos obtidos por RMN de hidrogênio revelaram que nenhuma das substâncias correspondia ao intermediário desejado (**8**).

## **6 CONCLUSÕES**

Os dados obtidos no presente modelo animal apresentaram resultados promissores. A taurina isolada foi capaz de reduzir em 73% o número de lesões visíveis no cólon distal dos animais, reduziu também o número de focos de criptas aberrantes, apresentando efeito superior ao 5-FU. Com relação a multiplicidade, reduziu cerca de 26% a incidência de focos com mais de 4 criptas e reduziu o número de criptas aberrantes, sendo equivalente ao 5-FU. Em relação às neoplasias, a TAU também reduz o número de neoplasias, sendo cerca de 50% delas caracterizadas como adenocarcinomas (5-FU – 70% das neoplasias eram adenocarcinomas).

Já o grupo tratado com a associação apresentou efeito sinérgico na redução no número de lesões macroscópicas no cólon dos animais, apresentando redução de 82% das lesões na porção do cólon distal. Além disso, os animais não apresentaram lesões de volume grande e se verificou a redução no número de focos (equivalente ao 5-FU) e redução no número de criptas, sendo superior ao 5-FU e a TAU isolada (efeito sinérgico). Além disso, a associação gerou redução na multiplicidade, cerca de 84% menos focos com mais de 4 criptas. Já para neoplasias, o grupo da associação apresentou 82% menos neoplasias do que o controle positivo, 86% menos do que o grupo tratado com 5-FU isolado e 50% menos do que o grupo da taurina isolada. Além disso, os animais induzidos com DMH e tratados com associação não apresentaram adenocarcinomas (neoplasias invasivas).

A análise de peso dos animais e a análise do baço não apresentaram resultados expressivos em relação aos grupos tratados, não havendo diferença entre eles. Além disso, apesar de várias tentativas sintéticas, os pró-fármacos não foram obtidos.



## **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

As referências bibliográficas foram feitas de acordo com a Norma Vancouver.

1. WHO (World and Health Organization). Cancer [Internet]. 2016 [cited 2016 Mar 4]. Available from: <http://www.who.int/cancer/en/>
2. Câncer I-IN do. Tipos de Câncer - Colorretal [Internet]. 2018 [cited 2018 Feb 17]. Available from:  
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal>
3. Mundade R, Imperiale TF, Prabhu L, Loehrer PJ, Lu T. Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience* [Internet]. 2014;1(6):400. Available from:  
<http://impactjournals.com/oncoscience/index.php?abs=59>
4. Stigliano V, Sanchez-Mete L, Martayan A, Anti M. Early-onset colorectal cancer: A sporadic or inherited disease? *World J Gastroenterol*. 2014;20(35):12420–30.
5. Foye WO, Lemke TL, Williams DA, Roche VF, Zito WS. Foyes's principles of medicinal chemistry. *Pharmacodynamic Agents: Diuretics*. 2008. p. 728–9.
6. Robbins SL, Cottran. *Patologia Bases Patológicas das Doenças*. 8th ed. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC, editors. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. 1592 p.
7. Ministério da Saúde. ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer. 2°. Serviço de Edição e Informação Técnico-Científica/CEDC, editor. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer - INCA; 2012. 1-129 p.
8. Câncer I-IN do. Como é o processo de carcinogênese? [Internet]. Câncer. 2018 [cited 2018 Feb 17]. Available from:  
[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=319](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319)

9. Oliveira PA, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz P. LF, Lopes C. Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc* [Internet]. 2007;79(4):593–616. Available from:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-37652007000400004&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652007000400004&lng=en&tlng=en)
10. Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med* [Internet]. 2016;13(1):120–35. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27144067><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4850121>
11. Arends MJ. Pathways of colorectal carcinogenesis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2013;21(2):97–102.
12. Society AC. Treatment of colon cancer, by stage [Internet]. 2017. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/treating/by-stage-colon.html>
13. Recio-Boiles A CB. Cancer, Colon. *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL). 2017.
14. Longley D, Harkin D, Johnston P. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(5):330–8.
15. Lemke TL, Williams DA, Roche VF, Zito WS, editors. Cancer and Chemotherapy. In: Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins; 2013. p. 1199–265.
16. Koukourakis G V., Kouloulis V, Koukourakis MJ, Zacharias GA, Zabatis H, Kouvaris J. Efficacy of the oral fluorouracil pro-drug capecitabine in cancer treatment: A review. *Molecules*. 2008;13(8):1897–922.
17. Malet-Martino M, Martino R. Oncologist Clinical Studies of Three Oral Prodrugs

- of 5-Fluorouracil. *Oncologist* [Internet]. 2002;7(4):288–323. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12185293>
18. Scaife J, Kerr D. Antimetabolites in cancer therapy. In: Missaidilis, Sotiris (The Open University U, editor. *Anticancer Therapeutics*. 1st ed. India: John Wiley & Sons; 2008. p. 91–109.
  19. Baluz K, do Carmo MGT, Rosas G. O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica : revisão \*. *Rev Bras Cancerol*. 2002;48(4):597–607.
  20. Amstutz U, Froehlich TK, Largiadèr CR. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity. *Pharmacogenomics*. 2011;12(9):1321–36.
  21. Stella VJ, Nti-Addae KW. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(7):677–94.
  22. Rautio J, Kumpulainen H, Heimbach T, Oliyai R, Oh D, Järvinen T, et al. Prodrugs: design and clinical applications. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(3):255–70.
  23. Huttunen K, Raunio H, Rautio J. Prodrugs: design and clinical applications. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2011;63(3):750–71. Available from:  
<http://ajcn.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/ajcn.114.095356>
  24. Das N, Dhanawat M, Dash B, Nagarwal RC, Shrivastava SK. Codrug: An efficient approach for drug optimization. *Eur J Pharm Sci*. 2010;41(5):571–88.
  25. Chung MC. Interações medicamentosas no planejamento de novos fármacos. Universidade estadual paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP; 2012.
  26. Vizioli EO. Ensaio Pré-Clínicos De Híbridos Ftalimídicos E Pró-Fármacos Taurínicos Derivados De Antiinflamatórios Não Ensaio Pré-Clínicos De Híbridos Ftalimídicos E Pró-Fármacos Taurínicos [Internet]. Universidade

- Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2009. Available from:  
<http://www2.fcfar.unesp.br/Home/Pos-graduacao/CienciasFarmaceuticas/EdnirVizioliDO.pdf>
27. Joo K, Lee Y, Choi D, Han J, Hong S, Kim YM, et al. An anti-inflammatory mechanism of taurine conjugated 5-aminosalicylic acid against experimental colitis: Taurine chloramine potentiates inhibitory effect of 5-aminosalicylic acid on IL-1 $\alpha$ -mediated NF $\kappa$ B activation. *Eur J Pharmacol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2009;618(1–3):91–7. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.07.009>
28. Marcinkiewicz J, Kontny E. Taurine and inflammatory diseases. *Amino Acids*. 2014;46(1):7–20.
29. Sadzuka Y, Matsuura M, Sonobe T. The Effect of Taurine, a Novel Biochemical Modulator, on the Antitumor Activity of Doxorubicin. *Biol Pharm Bull*. 2009;32(9):1584–7.
30. Saad SY, Al-Rikabi AC. Protection effects of taurine supplementation against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Chemotherapy*. 2002;48(1):42–8.
31. Kim Y, Sung S, Tang Y, Choi E, Choi Y. Protective effect of taurine on mice with doxorubicin-induced acute kidney injury. *Taur 10 - Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2017;975:1191–201. Available from:  
<http://link.springer.com/10.1007/978-94-024-1079-2>
32. Vanitha MK, Priya KD, Baskaran K, Periyasamy K, Saravanan D, Venkateswari R, et al. Taurine Regulates Mitochondrial Function During 7,12-Dimethyl Benz[a]anthracene Induced Experimental Mammary Carcinogenesis. *J pharmacopuncture* [Internet]. 2015;18(3):68–74. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389003>  
<http://www.pubmedcentral>

- .nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4573810
33. Vanitha MK, Anandakumar P, Sakthisekaran D. Taurine abrogates mammary carcinogenesis through induction of apoptosis in Sprague-Dawley rats. *J Biochem Mol Toxicol* [Internet]. 2018;(June):e22204. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbt.22204>
34. El-Houseini ME, El-Agoza IA, Sakr MM, El-Malky GM. Novel protective role of curcumin and taurine combination against experimental hepatocarcinogenesis. *Exp Ther Med*. 2017;13(1):29–36.
35. Ibrahim HM, Abdel Ghaffar FR, El-Elaimy IA, Gouida MS, Abd El latif HM. Antitumor and immune-modulatory efficacy of dual-treatment based on levamisole and/or taurine in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. *Biomed Pharmacother*. 2018;106(June):43–9.
36. Liu Z, Xia Y, Zhang X, Liu L, Tu S, Zhu W, et al. Roles of the MST1-JNK signaling pathway in apoptosis of colorectal cancer cells induced by Taurine. *Libyan J Med* [Internet]. 2018;13(1):1500346. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19932820.2018.1500346>
37. Zhang X, Tu S, Wang Y, Xu B, Wan F. Mechanism of taurine-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Acta Biochem Biophys Sin*. 2014;46(4):261–72.
38. Tu S, Zhang X, Luo D, Liu Z, Yang X, Wan H, et al. Effect of taurine on the proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Exp Ther Med*. 2015;10(1):193–200.
39. Perše M, Cerar A. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011.

40. WHO (World and Health Organization). Cancer [Internet]. Media centre. 2017 [cited 2018 Jan 18]. Available from:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
41. INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de Câncer no Brasil [Internet]. 2018 [cited 2018 Feb 16]. Available from:  
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-taxas-brasil.asp>
42. Fearon ER. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis* [Internet]. 2011;6(1):479–507. Available from:  
<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-011110-130235>
43. Spoto CPE, Gullo I, Carneiro F, Montgomery EA, Brosens LAA. Hereditary gastrointestinal carcinomas and their precursors: An algorithm for genetic testing. *Semin Diagn Pathol* [Internet]. Elsevier; 2018;(xxxx):0–1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.semdp.2018.01.004>
44. Morin PJ, Weeraratna AT. The APC tumor suppressor pathway. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2003;222(9):21–40. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12710678>
45. Saúde M da. O Câncer e os seus fatores de risco. 2°. Rio de Janeiro-RJ; 2013.
46. Malarkey DE, Hoenerhoff M, Maronpot RR. Carcinogenesis: Mechanisms and Manifestations. 2013. 107-146 p.
47. Pino MS, Chung DC. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;138(6):2059–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065>
48. Tetsuji Takayama S, Katsuki, Yasuo Takahashi M, Ohi, Shuichi Nojiri, Sumio Sakamaki, Junji Kato K, Kogawa, Hirotsugu Miyake YN. Abe Rrant Cryp T F Oci of T He C Olon As Precurs Ors of a D Enoma a Nd C a Ncer Aberrant

- Crypt Foci of the Colon As Precursors of Adenoma and Cancer. *N Engl J Med*. 1998;339(18):1277–84.
49. Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Kukitsu T, Takanashi K, Ishiwatari H, et al. Aberrant crypt foci: detection, gene abnormalities, and clinical usefulness. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005;3(7 Suppl 1):S42–5.
50. Carini F, Margherita M, Rappa F, Jurjus A, Geagea AG, Kattar S Al, et al. Colorectal Carcinogenesis: Role of Oxidative Stress and Antioxidants. *Anticancer Res [Internet]*. 2017;37(9):4759–66. Available from: <http://ar.iijournals.org/content/37/9/4759.abstract>
51. Alwers E, Jia M, Kloor M, Bläker H, Brenner H, Hoffmeister M. Associations Between Molecular Classifications of Colorectal Cancer and Patient Survival: a Systematic Review. *Clin Gastroenterol Hepatol [Internet]*. The American Gastroenterological Association; 2018; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542356517315367>
52. Voorham QJM, Carvalho B, Spiertz AJ, Claes B, Mongera S, van Grieken NCT, et al. Comprehensive mutation analysis in colorectal flat adenomas. *PLoS One*. 2012;7(7):1–8.
53. Zamorano-Ponce E, Lagos Muñoz P, Rivera Caamaño P, Fernández Romero J. Un Modelo Experimental Inducible En Ratón Para Conducir Estudios En Quimioprevención Y Anticarcinogénesis. *Theoria*. 2008;17(1):71–86.
54. Chang CT, Ho TY, Lin H, Liang JA, Huang HC, Li CC, et al. 5-fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor-kB activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. *PLoS One*. 2012;7(3):1–8.
55. Yoshino F, Yoshida A, Nakajima A, Wada-Takahashi S, Takahashi S, Lee MC II. Alteration of the redox state with reactive oxygen species for 5-fluorouracil-

- induced oral mucositis in hamsters. *PLoS One*. 2013;8(12):10–5.
56. Czito BG, Hsu D, Palta M, Willett CG. Colon Cancer. *Clin Radiat Oncol* [Internet]. 2016;977–991.e2. Available from:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323240987000502>
57. Ministério da Saúde/Secretaria de Ateção à Saúde. Oncologia. 21°. Ministério da Saúde/Secretaria de Ateção à Saúde, editor. Brasília - DF - Brasil; 2015. 1-135 p.
58. Nies AT, Magdy T, Schwab M, Zanger UM. Role of ABC Transporters in Fluoropyrimidine-Based Chemotherapy Response. *Adv Cancer Res*. 2015;125:217–43.
59. Bowen JM, Gibson RJ, Cummins AG, Keefe DMK. Intestinal mucositis: The role of the Bcl-2 family, p53 and caspases in chemotherapy-induced damage. *Support Care Cancer*. 2006;14(7):713–31.
60. Stringer AM, Gibson RJ, Logan RM, Bowen JM, Yeoh ASJ, Hamilton J, et al. Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-Fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. *Exp Biol Med* (Maywood) [Internet]. 2009;234(4):430–41. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19176868>
61. Van Vliet MJ, Harmsen HJM, de Bont ESJM, Tissing WJE. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. *PLoS Pathog*. 2010;6(5):1–7.
62. Ferreira TM, Leonel AJ, Melo MA, Santos RRG, Cara DC, Cardoso VN, et al. Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-fluorouracil administration. *Lipids*. 2012;47(7):669–78.
63. Soares PMG, Mota JM, Souza EP, Justino PFC, Franco AX, Cunha FQ, et



- al. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. Cytokine [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;61(1):46–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2012.10.003>
64. Medscape. Fluorouracil - Adrucil [Internet]. 2016 [cited 2016 May 10]. Available from: <http://reference.medscape.com/drug/adrucil-fluorouracil-342092#0>
65. Hoff PM, Cassidy J, Schmoll HJ. The evolution of fluoropyrimidine therapy: from intravenous to oral. *Oncologist*. 2001;6 Suppl 4(suppl 4):3–11.
66. Lamont EB, Schilsky RL. The Oral Fluoropyrimidines in Cancer Chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 1999;5(September):2289–96.
67. de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2000;18(16):2938–47.
68. Douillard J, Cunningham D, Roth A, Navarro M, James R, Karasek P, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* [Internet]. 2000;355(9209):1041–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673600020341>
69. Jornada D, dos Santos Fernandes G, Chiba D, de Melo T, dos Santos J, Chung M. The Prodrug Approach: A Successful Tool for Improving Drug Solubility. *Molecules* [Internet]. 2015;21(1):42. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/1/42>
70. Huxtable RJ. Actions of Taurine. *Physiol Rev*. 1992;72(1):101–42.
71. Larsen R, Eilertsen KE, Mæhre H, Jensen IJ, Elvevoll EO. Taurine Content in Marine Foods: Beneficial Health Effects. *Bioact Compd from Mar Foods Plant*

- Anim Sources. 2013;249–68.
72. Lambert IH, Kristensen DM, Holm JB, Mortensen OH. Physiological role of taurine--from organism to organelle. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015;213(1):191–212.
73. Holm MB, Kristiansen O, Holme AM, Bastani NE, Horne H, Blomhoff R, et al. Placental release of taurine to both the maternal and fetal circulations in human term pregnancies. *Amino Acids* [Internet]. Springer Vienna; 2018;50(9):1205–14. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00726-018-2576-9>
74. Macaione S, Ruggeri P, Luca F De, Tucci G. Free Amino Acids in Developing Rat Retina. *J Neurochem*. 1974;22(6):887–91.
75. Warskulat U, Flögel U, Jacoby C, Hartwig HG, Thewissen M, Merx MW, et al. Taurine transporter knockout depletes muscle taurine levels and results in severe skeletal muscle impairment but leaves cardiac function uncompromised. *FASEB J*. 2004;18(3):577–9.
76. Oja, S.S.; Saransaari P. Pharmacology of taurine. *Proc West Pharmacol Soc*. 2007;50:8–15.
77. Kim SH, Markovitz B, Trovato R, Murphy BR, Austin H, Willardsen AJ, et al. Discovery of a new HIV-1 inhibitor scaffold and synthesis of potential prodrugs of indazoles. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2013;23(10):2888–92.
78. Nam JP, Park JK, Son DH, Kim TH, Park SJ, Park SC, et al. Evaluation of polyethylene glycol-conjugated novel polymeric anti-tumor drug for cancer therapy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;120:168–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.04.013>
79. Dođru-Abbasođlu S, Kanbađlı O, Balkan J, Cevikbađ U, Aykaç-Toker G, Uysal M. The protective effect of taurine against thioacetamide hepatotoxicity of rats.

- Hum Exp Toxicol. 2001;20(1):23–7.
80. Tabassum H, Parvez S, Rehman H, Dev Banerjee B, Siemen D, Raisuddin S. Nephrotoxicity and its prevention by taurine in tamoxifen induced oxidative stress in mice. Hum Exp Toxicol. 2007;26(6):509–18.
81. Ait-Tihyaty M, Zakaria R, Larroque-Lombard A-L, Bertrand J-CJ. ZRX1, the first EGFR inhibitor-capecitabine based combi-molecule, requires carboxylesterase-mediated hydrolysis for optimal activity. Invest New Drugs. 2013;31(6):1409–23.
82. Kim T, Kim AK. Taurine Enhances Anticancer Activity of Cisplatin in Human Cervical Cancer Cells. In: Taurine 8. Springer New York; 2013. p. 189–98.
83. Chen W, Guo J, Zhang Y, Zhang J. The beneficial effects of taurine in preventing metabolic syndrome. Food Funct [Internet]. 2016;7(4):1849–63. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5FO01295C>
84. Bosquesi PL, Scarim CB, de Oliveira JRS, Vizioli E de O, Santos JL dos, Chung M-C. Protective Effect of Taurine in the Induction of Genotoxicity by Mutagenic Drugs. J Pharm Pharmacol [Internet]. 2018;6(1):1–9. Available from: <http://www.davidpublisher.org/index.php/Home/Article/index?id=34141.html>
85. Marcinkiewicz J, Grabowska A, Bereta J, Stelmaszynska T. Taurine chloramine, a product of activated neutrophils, inhibits in vitro the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators. J Leukoc Biol [Internet]. 1995;58(6):667–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7499964>
86. Park E, Schuller-Levis G, Jia JH, Quinn MR. Preactivation exposure of RAW 264.7 cells to taurine chloramine attenuates subsequent production of nitric oxide and expression of iNOS mRNA. J Leukoc Biol. 1997;61(2):161–6.

87. Barua M, Liu Y, Quinn MR. Taurine chloramine inhibits inducible nitric oxide synthase and TNF- $\alpha$  gene expression in activated alveolar macrophages: decreased NF- $\kappa$ B activation and I $\kappa$ B kinase activity. *J Immunol.* 2001;167:2275–81.
88. Chorazy-Massalska M, Kontny E, Kornatka A, Rell-Bakalarska M, Marcinkiewicz J, Maśliński W. The effect of taurine chloramine on pro-inflammatory cytokine production by peripheral blood mononuclear cells isolated from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2004;22(6):692–8.
89. Maher SG, Condrón CEM, Bouchier-Hayes DJ, Toomey DM. Taurine attenuates CD3/interleukin-2-induced T cell apoptosis in an in vitro model of activation-induced cell death (AICD). *Clin Exp Immunol.* 2005;139(2):279–86.
90. Finnegan N, Toomey D, Condrón C, Redmond HP, Da Costa M, Bouchier-Hayes DJ. Potentiation of the therapeutic index of interleukin-2 immunotherapy by combination with taurine in a syngeneic murine tumour model. *Ir J Med Sci.* 2002;171(2):85–8.
91. Sadzuka Y, Matsuura M, Sonobe T. The effect of taurine, a novel biochemical modulator, on the antitumor activity of doxorubicin. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(9):1584–7.
92. Zhang X, Lu H, Wang Y, Liu C, Zhu W, Zheng S, et al. Taurine induces the apoptosis of breast cancer cells by regulating apoptosis-related proteins of mitochondria. *Int J Mol Med.* 2015;35(1):218–26.
93. Bird RP, Good CK. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicol Lett.* 2000;112–113:395–402.
94. Bird RP. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon

- cancer. *Cancer Lett* [Internet]. 1995;93(1):55–71. Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030438359503788X>
95. Cheng L, Lai M De. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2003;9(12):2642–9.
96. da Silva Almeida AP, Avi CM, Barbisan LF, de Moura NA, Caetano BFR, Romualdo GR, et al. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 reduce the early phases of colon carcinogenesis in male Wistar rats. *Food Res Int* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;74:48–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.034>
97. de Moura NA, Caetano BFR, Sivieri K, Urbano LH, Cabello C, Rodrigues MAM, et al. Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Aug;50(8):2902–10. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.05.006>
98. El-Shemi AG, Refaat B, Kensara OA, Mohamed AM, Idris S, Ahmad J. Paricalcitol enhances the chemopreventive efficacy of 5-fluorouracil on an intermediate- Term model of azoxymethane-induced colorectal tumors in rats. *Cancer Prev Res*. 2016;9(6):491–502.
99. Kensara OA, El-Shemi AG, Mohamed AM, Refaat B, Idris S, Ahmad J. Thymoquinone subdues tumor growth and potentiates the chemopreventive effect of 5-fluorouracil on the early stages of colorectal carcinogenesis in rats. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:2239–53.
100. Ministério da Ciência T e ICN de C de EA-C. Anexo I. In: *Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA*. Brasília - DF - Brasil; 2015. p. 1–54.
101. de Moura NA, Caetano BFR, Sivieri K, Urbano LH, Cabello C, Rodrigues MAM,

- et al. Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;50(8):2902–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.05.006>
102. Cheng TC, Lai CS, Chung MC, Kalyanam N, Majeed M, Ho CT, et al. Potent anti-cancer effect of 39-hydroxypterostilbene in human colon xenograft tumors. *PLoS One*. 2014;9(11).
103. Nakatsuji S, Szabo KA, Elmore SA. Small and Large Intestine. *Gastrointest Surg* [Internet]. Elsevier Inc.; :239–310. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/0-387-21578-6\\_8](http://link.springer.com/10.1007/0-387-21578-6_8)
104. Dias MC, Vieiralves NFL, Gomes MIF V, Salvadori DMF, Rodrigues MAM, Barbisan LF. Effects of lycopene, synbiotic and their association on early biomarkers of rat colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;48(3):772–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.12.003>
105. Bazo AP. Estudo do potencial antimutagênico e anticancerígeno da própolis em ratos Wistar. Universidade Estadual Paulista - UNESP; 2000.
106. Silva PRP. Avaliação Do Potencial Genotóxico E Cancerígeno Do Lodo De Estação De Tratamento De Esgoto (Lete) Em Sistemas Experimentais in Vivo. 2009;
107. Hamilton S, Vogelstein B, Kudo S, Riboli E, Nakamura S, Hainout P. Tumours of the Colon and Rectum. *Pathol Genet Tumours Dig Syst*. 2000;103–129.
108. National Cancer Institute [Internet]. 2018 [cited 2018 Sep 23]. Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/mitotic-rate>
109. Cho JH, Amblard F, Coats SJ, Schinazi RF. Synthesis of Cyclopentanyl Carbocyclic 5- Fluorocytosine (( - ) -5-Fluoro-Carbodine ) Using a Facially

- Selective Hydrogenation Approach. *J Org Chem*. 2012;78(2):2–19.
110. Kametani, T; Kigasawa, K.; Hiiragi, M.; Wakisaka, W.; Haga, S.; Nagamatsu, Y.; Sugi, H.; Fukawa, K.; Irino, O.; Yamamoto, T.; Nishimura, N.; Taguchi, A.; Okada, T.; Nakayama M. Studies on the synthesis of chemotherapeutics. 101. Synthesis and antitumor activity of N-acyl-and N-(alkoxycarbonyl)-5fluorouracil derivatives. *J Med Chem*. 1980;23:1324–9.
111. Ouyang L, He D, Zhang J, He G, Jiang B, Wang Q, et al. Selective bone targeting 5-fluorouracil prodrugs: Synthesis and preliminary biological evaluation. *Bioorganic Med Chem*. 2011;19(12):3750–6.
112. Silva ATDA, Chung MC, Castro LF, Guido RVC, Ferreira EI. Advances in prodrug design. *Mini Rev Med Chem*. 2005;5(10):893–914.
113. da Silva Almeida AP, Avi CM, Barbisan LF, de Moura NA, Caetano BFR, Romualdo GR, et al. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 reduce the early phases of colon carcinogenesis in male Wistar rats. *Food Res Int* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;74:48–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.034>
114. Wargovich MJ, Jimenez a, McKee K, Steele VE, Velasco M, Woods J, et al. Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression. *Carcinogenesis*. 2000;21(6):1149–55.
115. De Almeida VL, Leitão A, Barrett Reina LDC, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MTP. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. *Quim Nova*. 2005;28(1):118–29.
116. Strano S, Fausti F, Di Agostino S, Sudol M, Blandino G. PML Surfs into HIPPO Tumor Suppressor Pathway. *Front Oncol* [Internet]. 2013;3(March):1–10.

Available from:

<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2013.00036/abstract>

117. Tarantino G, Scalera A, Finelli C. Liver-spleen axis: Intersection between immunity, infections and metabolism. *World J Gastroenterol.* 2013;19(23):3534–42.
118. Upadhyay S, Sharma N, Gupta KB, Dhiman M. Role of immune system in tumor progression and carcinogenesis. *J Cell Biochem.* 2018;119(7):5028–42.
119. Di Sabatino A, Rosado MM, Ciccocioppo R, Cazzola P, Morera R, Corazza GR, et al. Depletion of immunoglobulin M memory B cells is associated with splenic hypofunction in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2005;100(8):1788–95.
120. Carey FA, Sundberg RJ. Polar addition and elimination reactions. In: *Advanced Organic Chemistry.* 15°. 2007. p. 492–597.
121. National Center for Biotechnology Information [Internet]. Pubchem compound database - CID 61147. 2018 [cited 2018 Feb 7]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/61147>
122. Carey FA, Sundberg RJ. Nucleophilic Substitution. In: *Advanced Organic Chemistry.* 15°. Springer New York; 2007. p. 389–472.



## 8 ANEXOS

### Anexo I – Parecer do Comitê de Ética

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito quimioprotetor de pró-fármacos de 5-FU e taurina e associação da mistura física na formação de tumores e criptas aberrantes em cólon de ratos adultos", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 07/2017, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Chung Man Chin - 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 ad-referendum pela Coordenadora da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em 12 de maio de 2017.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Dezembro de 2017
Espécie/linhagem/raça	Rato/Wistar
Nº de animais	120
Peso/Idade	200-250g / 3-4 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Unesp Botucatu

Araraquara, 12 de maio de 2017.



Profa Dra Carla Raquel Fontana Mendonca  
Coordenadora da CEUA

## Anexo II

Tabela 5. Parâmetros para análise do cólon.

Parâmetros para análise histológica do cólon		Valor	
Neoplasia	Adenoma Adenocarcinoma	Contagem	
Displasia	Contagem do número de fragmentos com a presença de displasia		
Índice mitótico	Média da contagem em 10 campos		
Inflamação mucosa	Tipo	aguda	1
		mista	2
		crônica	3
	Intensidade	Leve	1
		Moderada	2
		Intensa	3
Aspecto da camada mucosa	atrófico	1	
	normal	2	
	hipertrófico	3	
Perda de continuidade da mucosa	ausente	0	
	presente	1	
Aspecto da camada muscular	atrófico	1	
	normal	2	
	hipertrófico	3	
Perda de continuidade da camada muscular	ausente	0	
	presente	1	
Produção de muco	Leve	1	
	Moderada	2	
	Intensa	3	

(Próprio autor).

## Anexo III

Tabela 6. Parâmetros para análise do baço.

<b>Parâmetros para análise histológica do baço</b>		<b>Valor</b>
Cápsula	íntegra	1
	perda da continuidade	2
Espessura da cápsula	atrófica	1
	normal	2
	espassada	3
Polpa branca	reduzida	1
	normal	2
	aumentada	3
Zona Marginal	reduzida	1
	normal	2
	aumentada	3
Folículos germinativos	organizados	1
	desorganizados	2
Granuloma	ausente	0
	presente	1
Congestão	ausente	0
	presente	1
Seios venosos	ausentes	0
	presentes	1
Pigmento extra capsular	ausente	0
	presente	1

(Próprio autor).

### Anexo IV – Tabela de peso corporal em porcentagem.

**Tabela 7.** Proporção de pesos corporais médios de cada grupo em relação ao peso inicial dos animais divididos por fase do experimento.

Grupos	Peso em cada fase do experimento (%)		
	Antes do Ciclo 1	Antes do Ciclo 2	Pós Eutanásia
C(-)	163,5 <sup>A</sup>	164,9 <sup>A</sup>	156,6 <sup>a,B</sup>
C(+)	161,4 <sup>A</sup>	162,4 <sup>A</sup>	153,4 <sup>B</sup>
TAU(-)	167,6 <sup>A</sup>	171,7 <sup>a,A</sup>	160,3 <sup>a,B</sup>
TAU(+)	151,2 <sup>A</sup>	153,7 <sup>A</sup>	144,9 <sup>B</sup>
5-FU(-)	166,7 <sup>A</sup>	167,3 <sup>C</sup>	155,4 <sup>a,B</sup>
5-FU(+)	158,4 <sup>A</sup>	157,1 <sup>A</sup>	143,1 <sup>B</sup>
5-FU+TAU(-)	156,8 <sup>A</sup>	159,5 <sup>b,A</sup>	144,5 <sup>b,C</sup>
5-FU+TAU(+)	163,5 <sup>A</sup>	161,1 <sup>A</sup>	145,8 <sup>B</sup>

\* a, b, c – diferença estatística entre linhas para grupos não-induzidos ( $p < 0,05$ ).

\* A,B,C – diferença estatística entre colunas ( $p < 0,05$ ).

Valores em porcentagem.

Análise estatística: Two-way Anova (análise inter-grupos) e One-way para amostras pareadas (análise intra-grupo) seguidos de teste de múltiplas comparações de Bonferonni.

Grupos: C(-): não-induzido+veículo, C(+): induzido+veículo, TAU(-): não-induzido+taurina, TAU(+): induzido+taurina, 5-FU(-): não-induzido+5-FU, 5-FU(+): induzido+ 5-FU, 5-FU+TAU(-): não-induzido+ 5-FU+ taurina, 5-FU+TAU(+): induzido+ 5-FU+taurina.

(Dados da pesquisa).