

MScBH

MASTER IN
**BIOCHEMISTRY FOR
HEALTH**

CLÁUDIA SOFIA DELGADO DOS SANTOS
Licenciatura em Bioquímica

**Efeito anticancerígeno dos compostos
fenólicos do azeite virgem extra no
cancro colorretal**

Setembro, 2024

CLÁUDIA SOFIA DELGADO DOS SANTOS

Licenciatura em Bioquímica

Efeito anticancerígeno dos compostos fenólicos do azeite virgem extra no cancro colorretal

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Bioquímica para a Saúde

Orientador: Ana Teresa Serra, PhD, iBET/ITQB-UNL

Coorientador: Elsa Mecha, PhD, iBET/ITQB-UNL

Setembro, 2024

NOVA

UNIVERSIDADE NOVA
DE LISBOA

Efeito anticancerígeno dos compostos fenólicos do azeite virgem extra no cancro colorretal

Copyright© Cláudia Sofia Delgado dos Santos, ITQB/UNL

O Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*A persistência é o caminho do êxito.
(Charles Chaplin)*

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha Orientadora, Doutora Teresa Serra, por me ter proporcionado a oportunidade de ter desenvolvido a minha dissertação no laboratório de bioativos naturais e nutracêuticos, no IBET, num tema que eu admiro muito. Agradeço por toda a orientação, conhecimento partilhado e por toda a ajuda ao longo deste ano de muito trabalho.

Agradeço à minha coorientadora, Doutora Elsa Mecha, pelo constante acompanhamento, pela ajuda e, sobretudo, pela imensa paciência e dedicação ao ensinar, que foram fundamentais ao longo deste percurso.

Gostaria muito de agradecer aos meus colegas/amigos de trabalho que me receberam tão bem, Ana Catarina, Melanie Matos, Fábio Lages, Joana Gonçalves, Juliana Oliveira e Carolina Ventura por toda a ajuda e apoio, pelas palavras de otimismo e por todo o carinho e alegria que me proporcionaram. Foram o meu suporte e fizeram deste ano, um ano bonito. Obrigada por todos os conselhos, por todo o conhecimento que me transmitiram e por tudo o que me ensinaram. Serei sempre eternamente grata por vos ter conhecido e por poder partilhar a ciência e a vida convosco. Em especial, tenho de agradecer à minha colega Ana Catarina que foi incansável comigo, ajudou-me e ensinou-me muito. Um “obrigada” nunca será suficiente para ti. Quero agradecer também à Beatriz Sobreira, Ana Margarida e Leonor Costa pela disponibilidade em ajudar e pela amizade.

Quero agradecer também ao Pedro Brandão por toda a disponibilidade e boa disposição em nos ajudar com o citómetro.

O meu especial obrigado vai para os meus pais e para o meu avô que são o meu suporte diário e sem eles nunca teria conseguido chegar aonde cheguei. Devo-lhes tudo. Obrigada por serem os melhores pais do mundo, por estarem sempre ao meu lado e por nunca me deixarem cair. Espero que um dia consiga ser metade daquilo que vocês são.

Quero agradecer também à minha irmã e ao meu cunhado por me apoiarem e por terem sempre uma palavra amiga e encorajadora. Obrigada pela bebé mais bonita que me deram, a minha Laurinha. É tão pequenina e nem sabe a força que me dá diariamente.

Obrigada a ti, João, que viveste comigo esta fase complicada e nunca me deixaste cair. Eras a minha parte favorita do dia. Obrigada por toda a paciência, ajuda e por todos os conselhos que me deste. Principalmente, obrigada por tornares os meus dias mais felizes e bonitos.

Obrigada, também aos meus amigos, Rita, Beatriz, Cristina, Carolina, Mariana, Vanessa e Diogo por terem vivido comigo esta fase importante da minha vida. Obrigada pelas palavras de apoio que me deram e por me fazerem sentir bem.

Obrigada à minha restante família, padrinhos, tios, primos, e amigos por me darem sempre uma palavra de apoio. Obrigada a todos os que fizeram parte deste percurso direta ou indiretamente.

Às minhas estrelinhas, eu sei que estiveram sempre aqui, obrigada!

Obrigada de coração a todos, são especiais.

Resumo

O Cancro Colorretal (CCR) é uma neoplasia maligna que afeta 1.9 milhões de pessoas anualmente e é a terceira causa de morte em todo o mundo. Estudos epidemiológicos indicam que o consumo da dieta mediterrânica, nomeadamente do azeite virgem extra está relacionado com a redução do risco de desenvolvimento de CCR. Este efeito está relacionado com o conteúdo em compostos fenólicos presentes no azeite virgem, nomeadamente o hidroxitirosol. Até à data os estudos existentes baseiam-se no estudo do hidroxitirosol devido às suas propriedades antioxidantes e anticancerígenas. No entanto, além do hidroxitirosol, existem outros metabolitos fenólicos do azeite cujo potencial efeito anticancerígeno ainda foi pouco explorado, mas que também podem desempenhar um papel importante no tratamento do CCR. Neste trabalho, um extrato de azeite foi submetido a uma simulação da digestão *in vitro* utilizando um modelo dinâmico SHIME®, que simula o trato gastrointestinal (TGI). Foram obtidas amostras de digestão ao longo do TGI (intestino delgado e cólon) e posteriormente foram caracterizadas por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa de alta resolução (UHPLC Q-Orbitrap) de forma a identificar os principais metabolitos. O objetivo desta tese consistiu em explorar o potencial efeito antitumoral de um extrato de azeite, das amostras de digestão, bem como dos principais metabolitos derivados da metabolização dos compostos de azeite ao longo do processo de digestão *in vitro*, utilizando 2 linhas celulares de cancro colorretal, HT29 e LoVo em monocamada (2D) e esferóides celulares (3D). Os ensaios de atividade antiproliferativa do extrato de azeite e das várias amostras de digestão foram realizados na linha celular HT29 em modelos 2D. Paralelamente foram realizados testes de citotoxicidade no modelo 2D na linha celular Caco-2 que mimetiza o epitélio intestinal. Os resultados obtidos indicaram que apesar do extrato ter ação antiproliferativa na linha HT29 ($EC_{50}=0.07 \pm 0.01\text{mg/mL}$), as frações derivadas no processo de digestão não apresentaram bioatividade relevante sugerindo que o processo de digestão contribuiu para a perda de atividade do extrato. Como forma de identificar quais os metabolitos do azeite que podem estar a contribuir para o potencial efeito antiproliferativo, foram selecionados 17 metabolitos para testar em ensaios antiproliferativos no modelo 2D em HT29 e também em células LoVo, uma linha com características mais metastáticas. Os resultados obtidos indicaram que os metabolitos álcool 3-hidroxibenzilo, hidroxitirosol, ácido maslínico, ácido ursólico, luteolina, 4-metilcatecol, apigenina e ácido oleico foram os que apresentaram um maior efeito antiproliferativo em células LoVo tendo sido posteriormente testados num modelo 3D de CCR, em esferóides de LoVo. Neste modelo os metabolitos com maior efeito antiproliferativo foram o hidroxitirosol, ácido maslínico, luteolina e ácido oleico. Por fim, e com o objetivo de analisar se estes metabolitos são capazes de reduzir a quantidade de células cancerígenas estaminais (CECs), foi realizado um ensaio de citometria de fluxo para a identificação da subpopulação ALDH⁺ utilizando o Kit ALDEFLUOR™. Os resultados obtidos indicaram que apenas os metabolitos hidroxitirosol e ácido maslínico mostraram capacidade de reduzir o número de CECs. Estes estudos vêm reforçar as evidências de que o azeite tem na sua composição compostos bioativos com potencial ação anticancerígena, nomeadamente o hidroxitirosol e o ácido maslínico através da redução da proliferação celular e atuação sobre as CECs.

Palavras-chave: Cancro Colorretal; Compostos Fenólicos; Extrato de azeite; Metabolitos.

Abstract

Colorectal Cancer (CRC) is a malignant neoplasm that affects 1.9 million people annually and is the third leading cause of cancer-related worldwide. Epidemiological studies indicate that the consumption of the Mediterranean diet, particularly extra virgin olive oil, is related to a reduction in the risk of developing CRC. This effect is primarily attributed to the presence of phenolic compounds in extra virgin olive oil, mainly hydroxytyrosol. To date, most studies have focused on hydroxytyrosol due to its antioxidant and anticancer properties. However, in addition to hydroxytyrosol, there are other phenolic metabolites in olive oil whose potential anticancer effects have been underexplored but may also play an important role in the CRC treatment.

In this study, an extra virgin olive oil extract was subjected to an *in vitro* digestion simulation using a SHIME® dynamic model, which simulates the gastrointestinal tract (GIT). Digestion samples were obtained throughout the GIT (small intestine and colon) and were subsequently characterized by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (UHPLC Q-Orbitrap) to identify the main metabolites. The aim of this thesis was to explore the potential antitumour effect of an extra virgin olive oil extract, the digestion samples, as well as the major metabolites derived from the metabolization of olive oil compounds throughout the *in vitro* digestion process, using two colorectal cancer cell lines, HT29 and LoVo in both 2D monolayers and 3D spheroid models.

The antiproliferative activity assays of the extra virgin olive oil extract and the various digestion samples were carried on the HT29 cell line in 2D models. In parallel, cytotoxicity tests were conducted in the 2D model on the Caco-2 cell line, which mimics the intestinal epithelium. The results indicated that, although the extra virgin olive oil extract exhibited antiproliferative activity on the HT29 cells ($EC_{50}=0.07 \pm 0.01$ mg/mL), the digestion-derived fractions did not show any relevant bioactivity, suggesting that the digestion process contributed to the loss of the extract's activity. To identify which olive oil metabolites could be contributing to the potential antiproliferative effect, 17 metabolites were selected for testing in antiproliferative assays in the 2D model using HT29 and LoVo cells, a cell line with more metastatic characteristics. The results indicated that 3-hydroxybenzyl alcohol, hydroxytyrosol, maslinic acid, ursolic acid, luteolin, 4-methylcatechol, apigenin, oleic acid showed the strongest antiproliferative effects on LoVo cells and were subsequently tested in a 3D CRC spheroid model using LoVo spheroids. In this model, the metabolites with the most potent antiproliferative effects were hydroxytyrosol, maslinic acid, luteolin and oleic acid.

Finally, to assess whether these metabolites could reduce the population of cancer stem cells (CSCs), a flow cytometry assay was performed to identify the ALDH⁺ population using the ALDEFLUOR™ Kit. The results showed that only hydroxytyrosol and maslinic acid demonstrated the ability to reduce the number of CSCs. These studies reinforce the evidence that olive oil contains bioactive compounds with anticancer potential, particularly hydroxytyrosol and maslinic acid, through the reduction of cell proliferation and their acting on CSCs.

Keywords: Colorectal Cancer; Phenolic Compounds; Extra virgin olive oil; Metabolites.

Índice

1.Introdução	1
1.1.Cancro.....	1
1.2. Cancro Colorretal (CCR).....	2
1.2.1.Diagnóstico	2
1.2.2.Fatores de risco, sinais e sintomas.....	3
1.2.3.Mecanismos patogénicos que originam o CCR e síndromes do CCR	3
1.2.4.Metastização.....	5
1.2.5.Células estaminais e a sua relação com o CCR	6
1.2.6.Biomarcadores de CCR.....	7
1.2.7.Tratamento do CCR	8
1.3.Alimentos e compostos bioativos naturais e o seu impacto no CCR	11
1.3.1.Compostos fenólicos do azeite virgem extra e o CCR.....	13
1.3.2.Impacto da digestão e fermentação microbiota nos compostos presentes no azeite virgem extra.....	15
1.3.3.Métodos de digestão <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	16
1.3.4.Deteção de metabolitos após a digestão de matrizes alimentares	17
1.4.Sistema Digestivo	19
1.4.1.Intestino delgado e cólon.....	19
1.4.2. Processo de digestão dos alimentos ao longo do TGI.....	19
1.5.Linhas e modelos celulares utilizados como ensaios <i>in vitro</i> na análise pré-clínica de compostos com potencial ação anticancerígena	21
1.6.Objetivos	26
2 Metodologia.....	29
2.1. Materiais e Reagentes	29
2.2. Métodos.....	30
2.2.1. Preparação do extrato de azeite virgem extra rico em compostos fenólicos.....	30
2.2.2. Análise do extrato de azeite virgem extra rico em compostos fenólicos.....	30
2.2.2.1. Simulação da digestão <i>in vitro</i> do extrato de azeite pelo método SHIME®.....	30
2.2.2.2. Deteção de metabolitos nas amostras de digestão e no extrato de azeite por UHPLC Q-Orbitrap.....	33
2.2.2.3. Preparação do extrato de azeite, das amostras de digestão do extrato de azeite e dos metabolitos para ensaios celulares.....	36
2.2.3. Ensaio Celulares	36
2.2.3.1. Cultura Celular	36
2.2.3.2. Ensaio antiproliferativo em linhas celulares HT29 e LoVo em modelos 2D	38
2.2.3.3. Ensaio da citotoxicidade em linha celular Caco-2 em modelos 2D	40
2.2.3.4. Silanização e esterilização do <i>spinner</i> (3D).....	41

2.2.3.5. Cultura celular 3D em <i>spinner</i> utilizando a linha celular LoVo.....	42
2.2.3.6. Ensaio antiproliferativo utilizando esferóides LoVo.....	43
2.2.4. Ensaio de ALDEFLUOR™ através da citometria de fluxo	45
3.Resultados e Discussão	47
3.1. Caracterização fitoquímica do extrato de azeite virgem extra rico em compostos fenólicos....	47
3.1.1. Caracterização fitoquímica do extrato de azeite.....	47
3.1.2. Detecção dos metabolitos presentes nas amostras de digestão <i>in vitro</i>	47
3.2. Efeito antiproliferativo do extrato de azeite, amostras de digestão e metabolitos no modelo 2D da linha celular HT29.....	54
3.2.1. Efeito antiproliferativo do extrato de azeite virgem extra rico em compostos fenólicos em células HT29.....	54
3.2.2. Efeito antiproliferativo das amostras de digestão <i>in vitro</i> em células HT29.....	58
3.2.3. Efeito antiproliferativo dos metabolitos no modelo 2D da linha celular HT29	62
3.2.3.1. Fenóis simples	64
3.2.3.2. Flavonóides.....	69
3.2.3.3. Ácidos triterpénicos	72
3.2.3.4. Secoiridóides.....	75
3.2.3.5. Ácido dicarboxílico.....	78
3.2.3.6. Ácidos gordos	79
3.2.3.7. Ácido biliar.....	81
3.2.3.8. Ácidos monohidroxibenzoicos.....	82
3.2.3.9. Ácido hidroxicinâmico.....	84
3.3.Efeito antiproliferativo do extrato de azeite e dos metabolitos em modelos 2D e 3D na linha celular LoVo.....	87
3.3.1. Efeito antiproliferativo do extrato de azeite no modelo 2D na linha celular LoVo	87
3.3.2. Efeito antiproliferativo dos metabolitos no modelo 2D da linha celular LoVo.....	89
3.3.2.1. Fenóis simples	91
3.3.2.2. Flavonóides.....	92
3.3.2.3. Ácidos Triterpénicos	94
3.3.2.4. Secoiridóides.....	95
3.3.2.5. Ácido dicarboxílico.....	96
3.3.2.6. Ácidos gordos	96
3.3.2.7. Ácido biliar.....	97
3.3.2.8. Ácidos monohidroxibenzoicos.....	97
3.3.2.9. Ácido hidroxicinâmico.....	98
3.3.3.Efeito antiproliferativo dos metabolitos no modelo 3D da linha celular LoVo.....	100
3.4.Efeito dos metabolitos em reduzir a subpopulação de células estaminais cancerígenas presentes no modelo 3D da linha celular LoVo.....	106
4.Conclusão	117
5.Trabalho futuro	119

6.Referências	121
7.Anexo(s).....	141

Índice de Figuras

Figura 1.1. Taxa padronizada por idade (mundo) por 100.000 habitantes, incidência e mortalidade, em ambos os gêneros, 2022 [4].....	1
Figura 1.2. Transição epitelial-mesenquimal (EMT) e mesenquimal-epitelial (MET) (Adaptado de [30]).	5
Figura 1.3. Modelo de células estaminais cancerígenas (Adaptado de Biorender).....	7
Figura 1.4. Representação dos diferentes estágios do CCR (Adaptado de [53]).....	9
Figura 1.5. Classificação dos compostos fenólicos (Adaptado de [80,81]).	12
Figura 1.6. Benefícios do azeite virgem extra na saúde humana (Adaptado de Biorender).	15
Figura 1.7. Representação do intestino delgado e do cólon (Adaptado de Biorender).	19
Figura 1.8. Anatomia humana e o percurso de digestão dos alimentos (Adaptado de [147]).....	20
Figura 1.9. Ilustração de modelos 2D e 3D (Adaptado de Biorender).	24
Figura 2.1. Representação do simulador do ecossistema microbiano intestinal humano (SHIME®) (Adaptado de [181]).	31
Figura 2.2. Curva de crescimento das células (Adaptado de Sigma-Aldrich).	37
Figura 2.3. Ilustração do procedimento experimental para a cultura celular em modelos 2D..... A. Observação da confluência das células; B. Descarte do sobrenadante; C. Tripsinização celular; D. Subcultivo das células em meio de cultura; E. inserção das células na incubadora importante para o seu crescimento (Adaptado de Biorender).	37
Figura 2.4. Ilustração da inoculação das microplacas com a suspensão celular HT29 e LoVo (Adaptado de Biorender).....	38
Figura 2.5. Ilustração da incubação das células HT29 e LoVo com diferentes compostos (Adaptado de Biorender).	38
Figura 2.6. Ilustração da avaliação da viabilidade celular em HT29 e LoVo através do reagente <i>PrestoBlue</i> ™ (Adaptado de Biorender).	40
Figura 2.7. Ilustração da inoculação das microplacas com a suspensão celular Caco-2 (Adaptado de Biorender).	40
Figura 2.8. Ilustração da incubação das células Caco-2 com diferentes compostos (Adaptado de Biorender).	41
Figura 2.9. Ilustração da avaliação da viabilidade celular em Caco-2 através do reagente <i>PrestoBlue</i> ™ (Adaptado de Biorender).....	41
Figura 2.10. Ilustração do método de cultura dos esferóides de LoVo (Adaptado de Biorender).	42
Figura 2.11. Ilustração do ensaio antiproliferativo em modelos 3D. F. esferóides em agitação; G. inoculação dos esferóides em microplaca; H. Avaliação da viabilidade celular através do reagente <i>PrestoBlue</i> ™ (Adaptado de Biorender).	44
Figura 2.12. Ilustração do ensaio ALDEFUOR™ através da citometria de fluxo. Os esferóides LoVo foram incubados com hidroxitirosol, luteolina, ácido maslínico e ácido oleico. Após 72h realizou-se o ensaio através do kit ALDEFUOR™. Teste: contém o reagente ALDEFUOR™ (fluorescente); DEAB: inibidor de fluorescência (Adaptado de Biorender).....	46
Figura 3.1. Curva dose-resposta após 72h de incubação do extrato de azeite nas linhas celulares HT29 e Caco-2 em modelos 2D (resultados: média ± SD (n=3)).	54
Figura 3.2. Curva dose-resposta após 72h de incubação das amostras de digestão (intestino delgado – lúmen e dialisado e cólon) nas células HT29 em modelos 2D (n=1).	58
Figura 3.3A. Curva dose-resposta após 72h de incubação dos metabolitos álcool 3-hidroxibenzilo, apigenina, 4-metilcatecol, ácido ursólico, luteolina, hidroxitirosol, ácido maslínico e ácido oleico, em células HT29 e Caco-2 em modelos 2D (resultados: média ± SD (n=3)).	62
Figura 3.3B. Curva dose-resposta após 72h de incubação dos metabolitos ácido desoxicólico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido <i>p</i> -cumárico, tirosol, ácido salicílico, diosmetina, oleocantal, oleaceína e ácido metilmalónico, em células HT29 e Caco-2 em modelos 2D (resultados: média ± SD (n=3)).	63

Figura 3.4. Estruturas químicas do hidroxitirosol, tirosol, álcool 3-hidroxibenzilo e 4-metilcatecol, respetivamente (PubChem).	65
Figura 3.5. Estruturas químicas da luteolina, apigenina e diosmetina, respetivamente (PubChem)...	69
Figura 3.6. Estruturas químicas do ácido maslínico e ácido ursólico, respetivamente (PubChem). ...	73
Figura 3.7. Estruturas químicas da oleocantal e oleaceína, respetivamente (PubChem).	75
Figura 3.8. Estrutura química do ácido metilmalónico (PubChem).	78
Figura 3.9. Estrutura química do ácido oleico (PubChem).	79
Figura 3.10. Estrutura química do ácido desoxicólico (PubChem).	81
Figura 3.11. Estrutura química do ácido 4-hidroxibenzoico e do ácido salicílico, respetivamente (PubChem).	83
Figura 3.12. Estrutura química do ácido <i>p</i> -cumárico (PubChem).	85
Figura 3.13. Curva dose-resposta após 72h de incubação do extrato de azeite em HT29, LoVo e Caco-2 em modelos 2D (resultados: média ± SD (n=3)).	87
Figura 3.14A. Curva dose-resposta após 72h de incubação dos metabolitos álcool 3-hidroxibenzilo, apigenina, 4-metilcatecol, ácido ursólico, luteolina, hidroxitirosol, ácido maslínico e ácido oleico em células LoVo e Caco-2 em modelos 2D (resultados: média ± SD (n=3)).	89
Figura 3.14B. Curva dose-resposta após 72h de incubação dos metabolitos ácido desoxicólico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido <i>p</i> -cumárico, tirosol, ácido salicílico, diosmetina, oleocantal, oleaceína e ácido metilmalónico, em células LoVo e Caco-2 em modelos 2D (resultados: média ± SD (n=3)).	90
Figura 3.15. Curva dose-resposta após 72h de incubação dos metabolitos em LoVo e Caco-2 em modelos 3D (resultados: média ± SD (n=6)).	100
Figura 3.16. Gráfico de barras dos valores de EC ₅₀ dos 8 metabolitos mais promissores na linha celular LoVo em modelos 2D e 3D.	104
Figura 3.17. Percentagem da subpopulação ALDH ⁺ em células LoVo. *** significa que os dois grupos são estatisticamente diferentes a <i>p</i> <0.001.	107
Figura 3.18. Atividade da ALDH1 em células LoVo em modelos 2D e 3D, após 72h de incubação. A subpopulação de células ALDH ⁺ estão identificadas a verde (n=3).	107
Figura 3.19. Efeito do hidroxitirosol, a diferentes concentrações, na subpopulação de ALDH ⁺ . **** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo solvente (água), com <i>p</i> <0,0001.	108
Figura 3.20. Atividade da ALDH1 em esferóides LoVo, após 72h de exposição com hidroxitirosol, a diferentes concentrações, avaliada pelo ensaio ALDEFLUOR™. O efeito dos metabolitos na atividade da ALDH1 foi normalizado relativamente ao CS (n=3).	109
Figura 3.21. Efeito da luteolina, a diferentes concentrações na subpopulação de ALDH ⁺	110
Figura 3.22. Atividade da ALDH1 em esferóides LoVo, após 72h de exposição à luteolina, a diferentes concentrações, avaliada pelo ensaio ALDEFLUOR™. O efeito dos metabolitos foi na atividade da ALDH1 foi normalizada relativamente ao CS (n=2).	111
Figura 3.23. Efeito do ácido maslínico, a diferentes concentrações na subpopulação de ALDH ⁺ . ** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo solvente (DMSO), com <i>p</i> <0,01.	112
Figura 3.24. Atividade da ALDH1 em esferóides LoVo, após 72h de exposição ao ácido maslínico, a diferentes concentrações, avaliada pelo ensaio ALDEFLUOR™. O efeito dos metabolitos foi na atividade da ALDH1 foi normalizada relativamente ao CS (n=2).	113
Figura 3.25. Efeito do ácido oleico, a diferentes concentrações na subpopulação de ALDH ⁺	113
Figura 3.26. Atividade da ALDH1 em esferóides LoVo, após 72h de exposição ao ácido oleico, a diferentes concentrações, avaliada pelo ensaio ALDEFLUOR™. O efeito dos metabolitos foi na atividade da ALDH1 foi normalizada relativamente ao CS (n=1).	114
Figura 7.1. Perfil cromatográfico do extrato de azeite, a 280 nm. Os compostos hidroxitirosol e tirosol foram identificados por comparação com o tempo de retenção e espectro de absorção UV-visível (A e B) dos respetivos padrões analisados nas mesmas condições.	141
.....	143

Figura 7.2. Gráficos de bigodes que representam a variação dos metabolitos identificados por comparação com padrões (ácido maslínico, ácido ursólico, apigenina e hidroxitirosol) ao longo do tempo nas diferentes fases do TGI. 143

Índice de Tabelas

Tabela 1.1. Marcadores de superfície de CECs no CCR.....	8
Tabela 1.2. Estágios de CCR e a sua relação com os tratamentos.	10
Tabela 1.3. Tipos de modelos de digestão <i>in vitro</i> implementados por diversos autores.....	17
Tabela 1.4. Linhas celulares de CCR.....	22
Tabela 1.5. Vantagens e desvantagens dos sistemas de cultura 3D.....	25
Tabela 2.1. Amostras de digestão obtidas ao longo do TGI pelo SHIME®.....	32
Tabela 2.2. Análise das amostras obtidas através do SHIME®.....	35
Tabela 2.3. Concentrações utilizadas no extrato de azeite e nos metabolitos em modelos 2D nas linhas celulares HT29, LoVo e Caco-2.....	39
Tabela 2.4. Concentrações utilizadas nos metabolitos em modelos 3D na linha celular LoVo.....	43
Tabela 2.5. Concentrações utilizadas nos metabolitos no ensaio de citometria de fluxo utilizando o kit ALDEFUOR™.....	45
Tabela 3.1. Caracterização fitoquímica do extrato de azeite.....	47
Tabela 3.2. Classificação dos metabolitos presentes nas amostras de digestão <i>in vitro</i> por ULHPC Q-Orbitrap.....	48
Tabela 3.3. Representação dos valores de EC ₅₀ e de IC ₅₀ do hidroxitiroso, tirosol, álcool 3-hidroxibenzilo e 4-metilcatecol, nas linhas celulares HT29 e Caco-2, respetivamente.....	65
Tabela 3.4. Representação dos valores de EC ₅₀ e de IC ₅₀ dos flavonóides luteolina, apigenina e diosmetina nas linhas celulares HT29 e Caco-2, respetivamente.....	70
Tabela 3.5. Representação dos valores de EC ₅₀ e de IC ₅₀ do ácido maslínico e do ácido ursólico nas linhas celulares HT29 e Caco-2, respetivamente.....	73
Tabela 3.6. Representação dos valores de EC ₅₀ e de IC ₅₀ dos secoiridoides oleocantal e oleaceína nas linhas celulares HT29 e Caco-2, respetivamente.....	76
Tabela 3.7. Representação dos valores de EC ₅₀ e de IC ₅₀ do ácido metilmalónico nas linhas celulares HT29 e Caco-2, respetivamente.....	78
Tabela 3.8. Representação dos valores de EC ₅₀ e de IC ₅₀ do ácido oleico nas linhas celulares HT29 e Caco-2, respetivamente.....	80
Tabela 3.9. Representação dos valores de EC ₅₀ e de IC ₅₀ do ácido desoxicólico nas linhas celulares HT29 e Caco-2, respetivamente.....	81
Tabela 3.10. Representação dos valores de EC ₅₀ e de IC ₅₀ dos ácidos monohidroxibenzóicos 4-hidroxibenzóico e ácido salicílico nas linhas celulares HT29 e Caco-2, respetivamente.....	83
Tabela 3.11. Representação dos valores de EC ₅₀ e de IC ₅₀ do ácido hidroxicinâmico p-cumárico nas linhas celulares HT29 e Caco-2, respetivamente.....	85
Tabela 3.12. Representação dos valores de EC ₅₀ e de IC ₅₀ dos fenóis simples nas linhas celulares LoVo e Caco-2, respetivamente.....	91
Tabela 3.13. Representação dos valores de EC ₅₀ e de IC ₅₀ dos flavonoides apigenina, luteolina e a diosmetina nas linhas celulares LoVo e Caco-2, respetivamente.....	92
Tabela 3.14. Representação dos valores de EC ₅₀ e de IC ₅₀ dos ácidos triterpénicos ácido maslínico e ácido ursólico nas linhas celulares LoVo e Caco-2, respetivamente.....	94
Tabela 3.15. Representação dos valores de EC ₅₀ e de IC ₅₀ dos secoiridoides oleocantal e oleaceína nas linhas celulares LoVo e Caco-2, respetivamente.....	95
Tabela 3.16. Representação dos valores de EC ₅₀ e de IC ₅₀ do ácido metilmalónico nas linhas celulares LoVo e Caco-2, respetivamente.....	96
Tabela 3.17. Representação dos valores de EC ₅₀ e de IC ₅₀ do ácido gordo nas linhas celulares LoVo e Caco-2, respetivamente.....	96
Tabela 3.18. Representação dos valores de EC ₅₀ e de IC ₅₀ do ácido desoxicólico nas linhas celulares LoVo e Caco-2, respetivamente.....	97
Tabela 3.19. Representação dos valores de EC ₅₀ e de IC ₅₀ dos compostos ácido 4-hidroxibenzóico e ácido salicílico nas linhas celulares LoVo e Caco-2, respetivamente.....	98

Tabela 3.20. Representação dos valores de EC ₅₀ e de IC ₅₀ do ácido <i>p</i> -cumárico nas linhas celulares LoVo e Caco-2, respectivamente.....	98
Tabela 3.21. Representação dos valores de IC ₅₀ e EC ₅₀ em diferentes metabolitos nas linhas celulares Caco-2, HT29 e LoVo em 2D e 3D.....	103
Tabela 3.22. Comparação dos valores de EC ₅₀ obtidos nos ensaios de atividade antiproliferativa em modelos 2D e 3D. Realizou-se a análise estatística One-way ANOVA usando o <i>software GraphPad Prism 10</i>	104
Os resultados identificados com letras diferentes (A-F) na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$). Os resultados identificados com letras diferentes (a-b) na mesma linha são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).	104
Tabela 7.1. Análise de HPLC para identificação e quantificação do hidroxitiroso e Tiroso.....	141

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AGCCs: Ácidos gordos de cadeia curta
ALDH: Enzima aldeído desidrogenase
AMPK: proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina
APC: Gene Adenomatous Polyposis Coli
BA: Ácido benzoico
BAAA: BODIPY-aminoacetaldeído
BAA: BODIPY-aminoacetato
BAD: Proteína pró-apoptótica
BAs: Ácidos biliares primários
BAX: Proteína pró-apoptótica
BCL-2: Proteína anti-apoptótica
CCR: Cancro Colorretal
CE: Células estaminais
CECs: Células estaminais cancerígenas
CEE: Células estaminais embrionárias
CEA: Células estaminais adultas ou somáticas
CIN: Instabilidade cromossômica
CIMP: Hipermetilação de ilha CPG
COX-2: ciclooxigenase
CS: Controlo solvente
DEAB: dietilaminobenzaldeído
DHBA: Ácido di-hidroxibenzoico
DM: Dieta mediterrânica
DMBA: Ácido dimetoxibenzoico
DMEM: Meio de cultura Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
DMSO: Dimetilsulfóxido
ECM: Matriz extracelular
EGFR: Recetor do fator de crescimento epidérmico
EMT: Transição epitelial-mesenquimal
ESI: Ionização por Electrospray
FBS: Soro fetal de bovino
F12K: Meio de cultura Ham's F-12K Nutrient Mixture. Kaighn's Mod
GC-MS: Cromatografia gasosa
HBA: Ácido hidroxibenzoico
HCAs: Ácidos hidroxicinâmicos
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência
IBET: Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica
IHC: Imuno-histoquímica
IL- β : interleucina 1-beta
iPS: Células estaminais induzidas
LC-MS: Cromatografia líquida
5-LOX: 5-lipoxigenase
MAP: Polipose associada ao gene *MUTYH*
MAPK: Proteína cinase ativada por mitógeno
MEM NEAA: Aminoácidos não essenciais
MET: Transição mesenquimal-epitelial
MS: Espectrometria de massa
MSI: Instabilidade de microssatélites
MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MUFA: Ácidos gordos monoinsaturados

PAF: Polipose adenomatosa familiar
PBS: Tampão fosfato-salino
PCR: Reação em cadeia da polimerase
P-gp: Glicoproteína P
PS: Penicilina/estreptomicina
qPCR: PCR quantitativo
RMN: Ressonância magnética nuclear
ROS: Espécies reativas de oxigênio
RPMI: Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640)
SHIME: Simulador do Ecosistema Microbiano Intestinal Humano
TGI: Trato Gastrointestinal
UHPLC Q-Orbitrap: cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa de alta resolução, Orbitrap
uPAR: Recetor da superfície celular

1. Introdução

1.1. Cancro

O cancro, ou tumor maligno, é classificado como uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo no século XXI [1]. Este provém da divisão e proliferação celular desordenada e descontrolada, culminando na formação de células cancerígenas [2]. Através da circulação sanguínea e linfática, estas células possuem a capacidade de se espalhar e invadir por outras partes do corpo (metástase), sendo caracterizadas por alterações genómicas, aceleração do ciclo celular, crescimento invasivo, modificações na morfologia da superfície celular e perda de diferenciação. Morfologicamente, as células cancerígenas exibem uma redução do tamanho do citoplasma e alteração do tamanho, forma e estrutura dos núcleos. Estruturalmente, apresentam segmentação do núcleo, alterações na cromatina, aumento dos poros da membrana nuclear e mitoses sucessivas, resultando em defeitos no fuso mitótico provocando formas anormais dos cromossomas. O número e a estrutura das proteínas que atuam como recetores na superfície celular podem também ser alterados [3]. O cancro pode ser classificado em três categorias: carcinomas (advém de tecidos epiteliais), sarcomas (ocorrem nos tecidos conjuntivos e esqueléticos) e leucemias ou linfomas (originados a partir de células do sistema imunitário e de células estaminais da medula óssea), sendo que os carcinomas são responsáveis por 90% dos casos [1]. A agência Internacional de Pesquisa do Cancro (IARC) fornece a avaliação da incidência, mortalidade e prevalência de 36 tipos de cancro em 185 países, estratificados por género e faixa etária [4]. A figura 1.1 ilustra a incidência e mortalidade dos 15 tipos de cancro mais prevalentes, sendo o cancro do pulmão o mais comum em ambos os géneros e o cancro da mama o mais comum em indivíduos do sexo feminino.

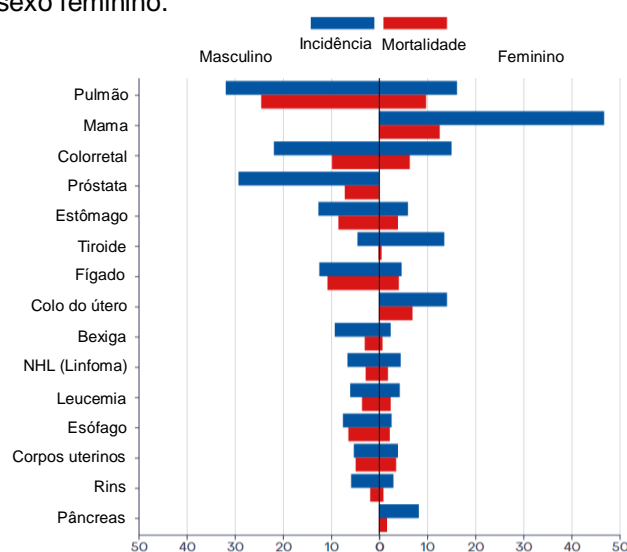


Figura 1.1. Taxa padronizada por idade (mundo) por 100.000 habitantes, incidência e mortalidade, em ambos os géneros, 2022 [4].

1.2. Cancro Colorretal (CCR)

O cancro colorretal (CCR) caracteriza-se pela proliferação desregulada das células epiteliais do cólon e do reto, resultante de mutações que promovem maior expressão de oncogenes, e menor expressão de genes supressores de tumor e genes envolvidos na reparação do DNA [1,5]. Estas alterações genéticas culminam no desenvolvimento de tumores malignos no cólon ou no reto, frequentemente originados por pólipos, que são crescimentos benignos com potencial de transformação maligna ao longo do tempo. O CCR é a segunda neoplasia mais comum em indivíduos do sexo feminino e a terceira em indivíduos do sexo masculino [6], apresentando uma incidência e mortalidade aproximadamente 25% inferiores nas mulheres em comparação aos homens. Essas discrepâncias podem ser atribuídas a fatores genéticos, ambientais e geográficos, sendo mais acentuadas em países mais desenvolvidos devido a hábitos alimentares desfavoráveis, tabagismo, sedentarismo [7] e histórico de doenças crônicas [5]. Projeções indicam que a incidência de CCR poderá atingir 2.5 milhões de novos casos em 2035 [6].

1.2.1. Diagnóstico

A maioria dos casos de CCR tem origem em pólipos que podem evoluir para um estágio pré-maligno denominado adenoma, que posteriormente pode dar origem a adenocarcinomas responsáveis pela maioria dos casos de CCR. Este geralmente é detetado em estágios avançados, sendo assim importante o diagnóstico precoce para prevenir o cancro ou para avaliar a resposta ao tratamento [6]. Para além da avaliação do histórico familiar existem outros métodos de diagnóstico tais como, programas de rastreio, colonoscopia [6,8], testes imunoquímicos fecais [9], testes de sangue oculto nas fezes, exames ao sangue [10], sigmoidoscopia flexível, exames de imagem (colonoscopia por tomografia computadorizada) [7] e ressonância magnética para avaliar a extensão do cancro. O diagnóstico por colonoscopia é o procedimento com maior sensibilidade para a deteção do CCR, pois permite a visualização direta do cólon e do reto para uma precisão maior na deteção de pólipos e da localização do tumor [7,11].

Em pacientes com CCR, é realizada uma avaliação pré-operatória que inclui a avaliação endoscópica, clínica, radiográfica e bioquímica, de forma a fornecer informações sobre o diagnóstico e prognóstico acerca da gravidade do tumor, decidindo qual o tratamento mais adequado. Embora o cancro do cólon e do reto estejam histologicamente relacionados, o tratamento muitas vezes varia tendo em conta o estágio da doença e sua localização específica [12].

1.2.2. Fatores de risco, sinais e sintomas

Diversos fatores de risco aumentam a probabilidade de desenvolver pólipos ou CCR, incluindo a idade avançada, histórico familiar, predisposição genética, padrões alimentares inadequados, falta de atividade física, envelhecimento da população, o tabagismo, a obesidade e os fatores ambientais. A prevalência desses fatores explica as discrepâncias geográficas e socioeconômicas na incidência de CCR [7]. O CCR geralmente é uma doença assintomática nos estágios iniciais, mas alguns pacientes podem apresentar sinais como sangramento retal, alterações dos hábitos intestinais, anemia, dor abdominal persistente, fraqueza e perda de peso [6]. A manifestação desses sintomas depende da localização e do tipo de lesão [10,13,14].

Além disso, alguns pacientes têm sintomas a longo prazo, como fadiga, neuropatia sensorial, incontinência urinária e problemas gastrointestinais decorrentes de terapia. Para indivíduos com risco médio/alto de desenvolver CCR, recomenda-se que a triagem comece por volta dos 45 anos de idade [15], pois a triagem precoce e a detecção de pólipos podem reduzir a incidência e a mortalidade associadas ao CCR.

1.2.3. Mecanismos patogénicos que originam o CCR e síndromes do CCR

Os casos de CCR podem ser classificados com base no padrão de mutação [5] em esporádicos (70%) hereditários (5%) e familiares (25%). Os esporádicos ocorrem devido a mutações adquiridas ao longo da vida, devido a fatores de *stress*, sedentarismo e tabagismo. Os casos de cancro familiares são devido a uma maior incidência desta doença na família, mas sem um padrão de transmissão definido [5,10,13,16].

Entre as síndromes hereditárias mais comuns associadas ao desenvolvimento de CCR estão a polipose adenomatosa familiar (PAF), a síndrome de *Lynch* (cancro colorretal hereditário sem polipose [HNPCC]) [7,10,16] e a polipose associada ao gene *MUTYH* (MAP) [8], com as duas primeiras representando aproximadamente 5% de todos os casos de CCR [11]. A **PAF** é uma condição autossômica dominante caracterizada pela formação de múltiplos pólipos adenomatosos no cólon e no reto, podendo evoluir para CCR se não forem tratados. A formação desses pólipos é atribuída a mutações no gene *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*) [17], que é um gene supressor de tumor que codifica uma proteína essencial na regulação da replicação do DNA e no controlo do crescimento celular [11]. A detecção de pólipos ocorre em cerca de 50% dos pacientes aos 15 anos de idade e em 95% aos 35 anos de idade. Embora muitos pacientes sejam assintomáticos, podem apresentar sinais de sangramento retal e anemia [10,13]. A **síndrome de Lynch** é uma doença autossômica dominante que contribui para aproximadamente 2 a 3% dos casos de CCR. Ao contrário da PAF, a síndrome de *Lynch* não é caracterizada pela presença de pólipos intestinais, mas sim por mutações em genes que codificam proteínas envolvidas na reparação de erros durante a replicação do DNA [11]. Os principais

genes associados são: *MSH2*, *MLH1*, *MLH6*. Estas mutações levam à instabilidade microssatélite (MSI), um fenómeno que resulta na acumulação de mutações no DNA e, conseqüentemente, aumenta o risco de desenvolvimento do cancro [16,18]. A **MAP** é uma doença autossômica recessiva rara, causada por uma mutação germinativa bialélica no gene *MUTYH* (*MutY DNA glycosylase*), que é essencial para a reparação de danos oxidativos no DNA. As variantes mais comuns associadas à MAP são *Y179C* e *G396D* e indivíduos com esta condição geralmente desenvolvem pólipos no cólon entre os 60 e 70 anos de idade [10,13,19]. A natureza recessiva da MAP significa que a condição só se manifesta apenas quando ambos os alelos do gene *MUTYH* estão mutados [20].

Para além destas mutações, a metilação do DNA é outro biomarcador importante no CCR. Existem três alterações moleculares que também desencadeiam o CCR: a instabilidade cromossômica (CIN), instabilidade de microssatélites (MSI) e hipermetilação de ilha CpG (CIMP) [5,21]. Esses mecanismos resultam em mutações no DNA, RNA e proteínas que podem ser detetadas no sangue e nas fezes e utilizadas posteriormente como biomarcadores [5]. A **CIN** é responsável por 80 a 85% dos casos de CCR [5], e envolve a acumulação de mutações causando alterações no número e na estrutura dos cromossomas [5]. Mutações em oncogenes, como proto-oncogenes *KRAS GTPase (KRAS)* e *B-Raf serina/treonina cinase (BRAF)* e em genes supressores de tumor como *APC* e proteína tumoral *p53* contribuem para a tumorigénese [22,23].

Os microssatélites são sequências de DNA presentes no genoma humano e que estão sujeitos a erros durante a replicação do DNA devido à sua estrutura repetida [24]. O sistema de reparação de incompatibilidade de DNA (MMR) repara esses erros durante a replicação e recombinação do DNA, contudo, quando mutado acumula erros genómicos resultando em níveis de **MSI** [25], como observado na síndrome de *Lynch* ou em cancros esporádicos [24]. A deteção de MSI por PCR (reação em cadeia da polimerase) ou imuno-histoquímica (IHC) é importante para usar como diagnóstico para a deteção e classificação de tumores, incluindo no cólon [24,26]. A **CIMP** foi identificada em 17% dos casos de CCR e pode ativar ou silenciar a expressão de genes como a *BRAF*. A hipermetilação dos promotores de oncogenes leva à perda de expressão proteica e silenciamento genético [27].

As mutações somáticas em oncogenes como *RAS*, *SRC* e *MYC* são observadas no CCR, sendo que variantes de mutações *RAS*: *HRAS*, *KRAS*, *NRAS* estão presentes em 50% dos casos de CCR esporádicos. Atualmente, o gene ciclooxygenase (*COX-2*) tem um papel importante no desenvolvimento do cancro, pois inibe a apoptose e inicia a angiogénese. Contudo, diversos estudos estão a ser feitos para encontrar inibidores do *COX-2* com o objetivo de arranjar uma terapia para o cancro, combatendo a resistência a fármacos [28].

1.2.4. Metastização

A metástase é a disseminação de células cancerígenas do tumor primário para um órgão distante, sendo uma das principais causas de morte dos pacientes com CCR. Os locais mais comuns de metástase são o fígado e o peritônio [29]. A metastização é um mecanismo molecular complexo que inclui a migração e invasão de células cancerígenas, que circulam na corrente sanguínea alcançando locais distantes [30]. A colonização metastática não é apenas uma consequência das células cancerígenas, mas surge por interação entre células cancerígenas disseminadas [31].

A EMT é um processo de transição epitelial-mesenquimal que altera a adesão e movimentação das células. As células que sofrem EMT passam a ter características invasivas e resistência à apoptose [32]. As células epiteliais são células que revestem a pele, o trato respiratório e gastrointestinal, são células aderentes e compactas e podem obter características fenotípicas mesenquimais, que migram e invadem novos tecidos. Este fenômeno é importante no desenvolvimento embrionário, mas também está associada à progressão e metástase tumoral. Quando as células epiteliais são expostas a fatores de *stress* oxidativo e radiação podem ocorrer mutações no DNA provocando a EMT. No entanto, as células também podem fazer o processo inverso, passando de mesenquimal para epitelial (MET) através da regulação por fatores de transcrição e sinalização celular (figura 1.2). Inibir a EMT e promover a MET pode ser útil para inibir as metástases e desenvolver novas abordagens terapêuticas [30,33].

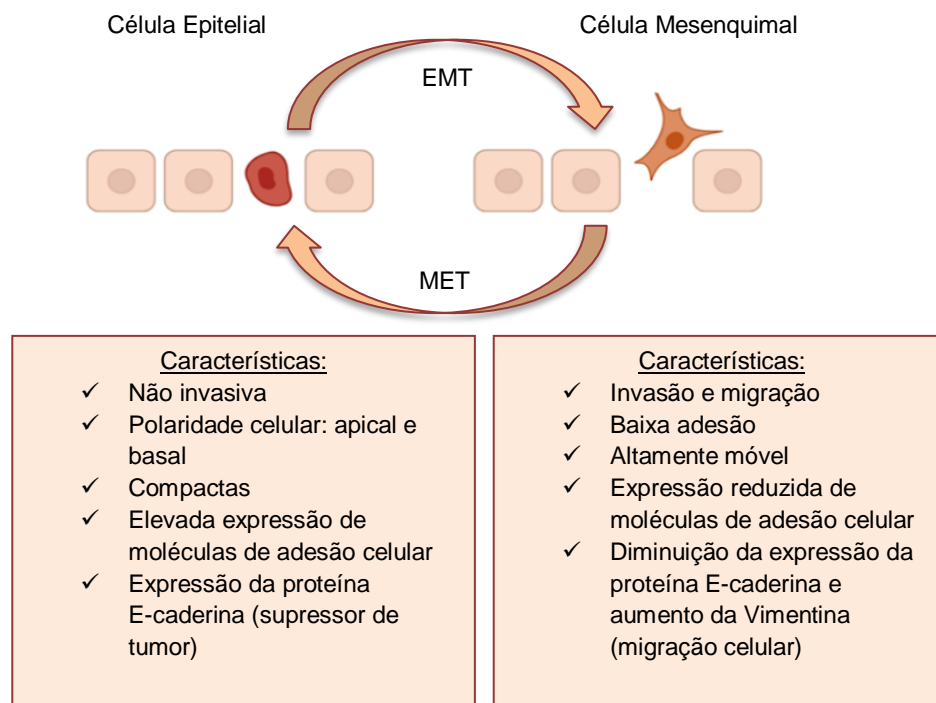


Figura 1.2. Transição epitelial-mesenquimal (EMT) e mesenquimal-epitelial (MET) (Adaptado de [30]).

1.2.5. Células estaminais e a sua relação com o CCR

Existem várias vias que podem desencadear o cancro, tais como inflamação, mutações em genes supressores de tumores, inibição da apoptose, angiogénese, alteração do ciclo celular, desregulação das vias de sinalização e de células estaminais, entre outros [34].

As células estaminais (CE) são células não especializadas do corpo humano, com capacidade de proliferação, autorrenovação e diferenciação em diferentes tipos de células especializadas [35]. Podem ser divididas de acordo com a sua capacidade de diferenciação em células totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes [30]. As CE são essenciais para o desenvolvimento e reparação dos tecidos e podem ser classificadas em diferentes grupos: células estaminais residentes (ou estacionárias), células estaminais circulantes (ou migratórias), células estaminais embrionárias (CEE), células estaminais adultas ou somáticas (CEA), células estaminais induzidas (iPS), e células estaminais cancerígenas (CECs) [36,37]. As **células estaminais residentes** possuem a capacidade de autorrenovação e diferenciação em vários tipos de células especializadas dentro do tecido onde se encontram. Desempenham um papel fundamental na manutenção e regeneração dos tecidos, mas quando ocorrem alterações nos mecanismos de regulação podem contribuir para a heterogeneidade e progressão do tumor [37,38]. Podem ser classificadas como células estaminais hematopoiéticas, neurais e epidérmicas. As **células estaminais circulantes** têm capacidade de migração (dentro do corpo) e invasão pela corrente sanguínea através de sinais químicos e físicos em resposta a lesões, contudo, podem também levar à formação de metástases [39]. Podem ser classificadas em células estaminais mesenquimais e endoteliais [37]. As **CEE** são células derivadas de blastocisto, são pluripotentes e por isso capazes de se diferenciar em três camadas germinativas: endoderme, ectoderme e mesoderme. Esta capacidade importante de se diferenciarem em qualquer célula do organismo permite que estas células sejam muito importantes para investigações científicas [40]. As **células somáticas** são multipotentes e têm como função o crescimento e substituição de células [41], reparação de tecidos e diferenciação em células especializadas específicas do tecido [30]. As **iPS** são células geneticamente reprogramadas através de fatores de transcrição (Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc) para obter um estado pluripotente similar ao das CEE [42].

Atualmente, presume-se que as CE são responsáveis pelo desenvolvimento e reincidência do CCR [43] e podem prevalecer mesmo após a quimioterapia [44]. As **CECs** são células não diferenciadas com características fenotípicas malignas e são derivadas de células estaminais intestinais. Estas células surgem devido a alterações genéticas e epigenéticas [45] que inativam genes supressores de tumores e ativam oncogenes (como o *myc*) [3,46]. Essas células são quimioresistentes e possuem a capacidade de autorrenovação e diferenciação (figura 1.3), tornando os tratamentos convencionais para pacientes com CCR ineficazes, estando assim possivelmente envolvidas no desenvolvimento e metástase do CCR [37]. A sua capacidade de pluripotência permite-lhes gerar células cancerígenas com diferentes fenótipos, contribuindo para o crescimento do tumor primário e o

aparecimento de novos tumores [47]. As CECs podem ser identificadas através de citometria de fluxo com marcação fluorescente.

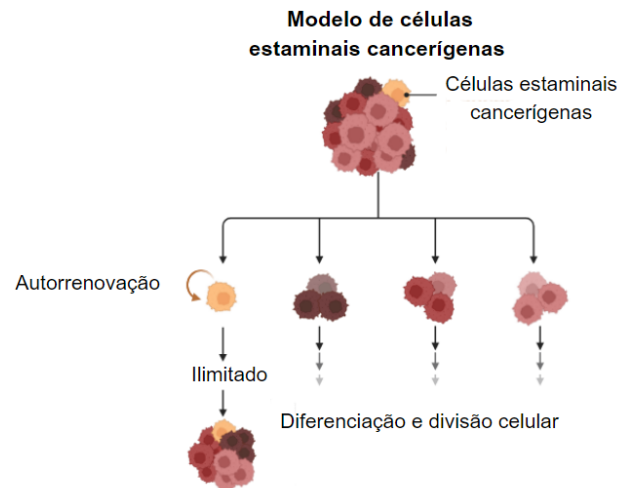


Figura 1.3. Modelo de células estaminais cancerígenas (Adaptado de Biorender).

As características fenotípicas e genéticas fundamentais das CE são a autorrenovação, proliferação programada, diferenciação e vias de sinalização reguladas. Contudo, quando estão disfuncionais levam ao desenvolvimento do cancro [47]. As vias de sinalização Wnt/ β catenina, Hedgehog e Notch são cruciais para a regulação de diversos processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação e migração, importantes para o crescimento do organismo, mas podem levar à proliferação celular descontrolada e resistência ao tratamento do cancro quando desreguladas [47,48]. A erradicação das CECs é um dos principais objetivos do tratamento desta doença, através de imunoterapia e inibidores de histonas desacetilases [46].

1.2.6. Biomarcadores de CCR

De acordo com o instituto nacional de saúde dos Estados Unidos [49], os biomarcadores são moléculas, proteínas e ácidos nucleicos obtidos a partir de tecido da biópsia, sangue, fezes ou urina [50]. Os marcadores moleculares nas fezes são importantes para a detecção de DNA tumoral, sendo que os mais utilizados no CCR são a determinação de MSI e as mutações no *KRAS*, *p53*, e *APC* devido à sua alta sensibilidade e especificidade que depende do tamanho e localização do tumor [49]. Têm como objetivo classificar o tumor, determinar o prognóstico da doença e administrar o tratamento mais adequado. As proteínas específicas da superfície celular são importantes para identificar precocemente vários tipos de células responsáveis pela progressão e reincidência do cancro e são essenciais para a conceção de estratégias eficazes de tratamento [37,51]. Alguns dos biomarcadores das CECs colorretais incluem: CD44, CD133, CD24, EpCAM, ALDH e CD29 (tabela 1.1).

Tabela 1.1. Marcadores de superfície de CECs no CCR.

Biomarcador	Função	Referências
CD44	Glicoproteína presente na superfície celular envolvida na resistência à quimioterapia, adesão e migração celular.	[37,51,52]
CD133	Glicoproteína importante na formação de células estaminais. Está associada à reincidência do CCR.	[37,51,52]
CD24	Proteína associada à adesão celular	[37,52]
EpCAM	Molécula de adesão associada à metástase.	[37,51,52]
ALDH	Enzima associada a uma diferenciação inadequada, metástase e resistência a medicamentos. Está relacionada com o estágio avançado de CCR.	[37,52]
CD29	Molécula de adesão celular importante para regular a diferenciação e a autorrenovação.	[37,52]

1.2.7. Tratamento do CCR

Diversos estudos sobre a expressão gênica têm como objetivo comparar o tecido tumoral com o tecido normal, em diferentes estágios da doença, com o intuito de obter informações acerca do prognóstico e tratamento. Através da localização das metástases, progressão do tumor e a presença de biomarcadores encontra-se o tratamento mais promissor para cada paciente [1,5].

Existem diversos tratamentos para o CCR, tais como cirurgia laparoscópica [6,7] utilizada em 70% dos pacientes, em qualquer idade e que não apresentem doença metastática [3,46]; radioterapia [7]; terapia sistêmica; cirurgia extensa para doença metastática; terapias ablativas locais para metástases; quimioterapia paliativa para pacientes com doença avançada [10] ou alto número de metástases [8,16]; terapia direcionada e imunoterapia [6,7]. Embora estes tratamentos sejam fundamentais para a sobrevivência do paciente, o prognóstico é a melhor forma de prevenir doenças

não metastáticas. Os pacientes com CCR são estratificados em 4 estágios com base na gravidade da doença (figura 1.4).

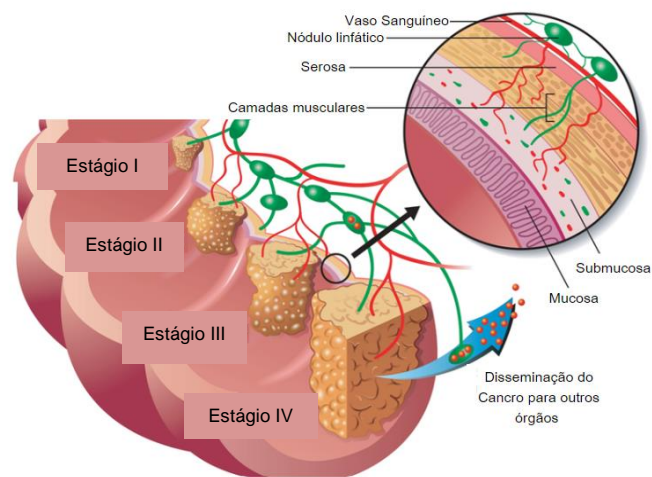


Figura 1.4. Representação dos diferentes estágios do CCR (Adaptado de [53]).

Cada estágio requer terapêuticas específicas para aumentar a eficácia do tratamento. Na tabela 1.2 estão relacionados os vários estágios da doença com o tratamento mais promissor para cada estágio.

Tabela 1.2. Estágios de CCR e a sua relação com os tratamentos.

Estágios do CCR	Definição	Tratamento	Referências
Estágio I	As células cancerígenas estão presentes, mas não se disseminaram. Os pacientes não apresentam metástases.	Cirurgia	[5,54]
Estágio II	Os pacientes têm metástases que possivelmente podem ser removidas.	Quimioterapia para reduzir o número e tamanho das metástases e Cirurgia	[54,55]
Estágio III	O estado da doença é avançado, logo o objetivo é diminuir a agressividade da mesma. O cancro já se espalhou para os gânglios linfáticos	Quimioterapia ou Radioterapia	[5,54]
Estágio IV	Estado muito avançado da doença. O tumor já se espalhou para vários órgãos (metastático)	Imunoterapia, quimioterapia ou radioterapia	[5,54]

1.3. Alimentos e compostos bioativos naturais e o seu impacto no CCR

Os compostos naturais (flavonóides, antocianinas, carotenóides, etc) são substâncias biologicamente ativas presentes em plantas [56] e são fatores importantes para a prevenção e terapia de CCR. Enquanto uma alimentação à base de carnes vermelhas e gorduras contribui para o desenvolvimento do CCR, uma dieta rica em frutas e vegetais é importante para manter um cólon saudável [57], pois os alimentos são fonte de macronutrientes (proteínas e gorduras), micronutrientes (vitaminas e minerais) e de compostos naturais (compostos bioativos) importantes para a saúde [58]. Os compostos fitoquímicos (ex. compostos bioativos) são produzidos através de fontes naturais como plantas e fungos e podem ter várias funções como: antioxidante, anti-inflamatória, de regulação hormonal, indução de apoptose e anticancerígena [59].

Os compostos bioativos podem ser extraídos das plantas, identificados por técnicas analíticas (i.e., cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS)), purificados e testados em ensaios pré-clínicos (cultura de células *in vitro* ou em animais *in vivo*) e em ensaios clínicos com humanos [60]. Apesar destes compostos naturais serem importantes para desenvolver novos quimioterápicos ou para aumentar a eficácia dos medicamentos tradicionais, estes apresentam algumas desvantagens, nomeadamente baixa estabilidade e dificuldade de extração de fontes naturais [61].

A combinação de agentes quimioterápicos sintéticos com compostos naturais é importante para evitar resistência ao tratamento e aumentar a eficácia da quimioterapia [62]. Os medicamentos e terapias são importantes no combate de diferentes doenças, nomeadamente de CCR, contudo, também podem afetar as células saudáveis havendo efeitos colaterais no paciente [63].

Estima-se que os hábitos alimentares contribuam para cerca de 50% dos casos de CCR, pelo que a implementação de uma alimentação saudável pode ser uma forma de prevenir o CCR. A dieta mediterrânica (DM) caracterizada pela ingestão de frutas, vegetais e cereais [64], constitui um fator muito relevante para a proteção contra diversas doenças, nomeadamente doenças cardiovasculares e CCR [65,66]. Os prebióticos são compostos naturais dietéticos que melhoram a função do intestino e do cólon com o objetivo de ter um trato gastrointestinal (TGI) saudável. A modulação dietética da microflora intestinal através de prebióticos e probióticos previne o desenvolvimento de CCR [58].

Para além das propriedades benéficas para a saúde humana, os compostos fitoquímicos são também responsáveis pela cor, sabor e odor, sendo estas características influenciadas pela cultura e condições ambientais [67]. Os compostos fitoquímicos são classificados como primários e secundários. Os primários são vitais para a vida vegetal e incluem carboidratos, aminoácidos e proteínas. Os secundários são compostos produzidos pelas células através das vias metabólicas e têm funções antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, antifúngica, antimicrobiana e anticancerígena [68,69].

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA), mais de 60% dos medicamentos utilizados no tratamento do cancro são de origem natural, no entanto, o uso dos compostos fitoquímicos em

conjunto com quimioterápicos sintéticos pode ter um efeito sinérgico ou aditivo aumentando a toxicidade em células cancerígenas [61]. Os compostos fitoquímicos estão divididos em diferentes classes: alcalóides, terpenóides, carotenóides, fitoesteróis, saponinas, glucosinolatos e glicosídeos [70,71].

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários de origem vegetal [72] e são um dos antioxidantes naturais mais abundantes na dieta [67]. Têm demonstrado bioatividades importantes como atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena e atuam como agentes protetores contra a luz ultravioleta e insetos [73]. Estudos demonstram que os compostos fenólicos têm efeitos antiproliferativos *in vivo* e *in vitro* em diversas células cancerígenas e pouca citotoxicidade em células normais [74]. Contudo, estes compostos também têm desvantagens como baixa absorção pelo TGI, baixa estabilidade e rápida degradação. Assim, foi importante desenvolver técnicas mais avançadas como o encapsulamento, para melhorar a biodisponibilidade e a liberação controlada dos compostos em aplicações alimentares ou farmacêuticas [75]. O encapsulamento por microesferas, nanocápsulas ou lipossomas protege os compostos de condições adversas, facilita a absorção pelo TGI e direciona os compostos para o local desejado para uma maior eficácia [76].

Os compostos fenólicos podem ser divididos em ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos, cumarinas e taninos (figura 1.5) [77]. Apresentam atividade anticancerígena demonstrada em células de leucemia, próstata, e CCR [78], devido à diminuição do crescimento e da viabilidade celular, inibição da proliferação de células e indução de apoptose (morte celular programada) [79].

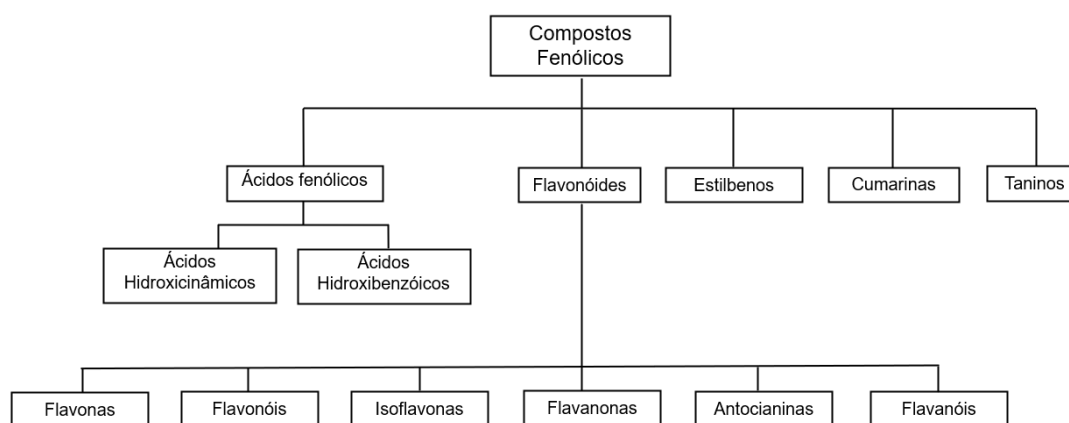


Figura 1.5. Classificação dos compostos fenólicos (Adaptado de [80,81]).

Todos os compostos fenólicos têm na sua estrutura pelo menos um anel de benzeno com um grupo hidroxilo (-OH). As flavonas são as mais abundantes em frutas e vegetais e incluem a apigenina e a luteolina [82,83].

A biodisponibilidade dos compostos fenólicos corresponde à quantidade e eficácia com que estes compostos são digeridos, absorvidos, metabolizados e excretados pelo organismo. (É o processo de absorção dessas moléculas através do intestino para o sistema circulatório após a ingestão de alimentos). Após a ingestão, muitos compostos fenólicos são digeridos e absorvidos no estômago e no intestino delgado, sendo posteriormente metabolizados no fígado. Os que não são absorvidos chegam ao cólon e podem ser fermentados por bactérias intestinais levando à formação de novos metabolitos menores ou ácidos fenólicos. A absorção de gorduras fenólicas derivadas de alimentos está associada à redução de doenças crônicas [84].

Relativamente às espécies reativas de oxigênio (ROS), estas são metabolitos reduzidos do oxigênio e são importantes para regular processos celulares. Contudo, quando desreguladas podem levar a doenças, incluindo o cancro pois promovem o desenvolvimento de *stress* oxidativo o que leva ao aumento da proliferação celular [78,85]. O *stress* oxidativo induz a expressão de genes pró-inflamatórios que recrutam mediadores imunológicos provocando a acumulação de danos moleculares que desregulam a expressão de genes envolvidos no processo de tumorigênese, incluindo a reparação, proliferação, morte celular e angiogênese [86]. Contudo, existem ROS exógenas que favorecem a morte celular das células cancerígenas com altos níveis de *stress* oxidativo, ao invés das células normais que podem manter a homeostase redox [78]. Quando a regulação de ROS é feita corretamente, esta é responsável pelas propriedades anticancerígenas colorretais de compostos bioativos [87]. Contrariamente, quando desregulado promove a progressão do cancro.

1.3.1. Compostos fenólicos do azeite virgem extra e o CCR

O cultivo das oliveiras faz-se em países mediterrânicos como Portugal, Espanha, França, Itália e Grécia, sendo as azeitonas a matéria-prima utilizada para a extração do azeite. A grande produção de azeite virgem extra (*Olea europaea*) apresenta alto teor de compostos bioativos, como os ácidos gordos, secoiridóides, fenóis simples, flavonóides e triterpenos [77,86]. O hidroxitirosol [78], tirosol e a oleuropeína são os compostos fitoquímicos mais abundantes na azeitona verde [86].

O azeite virgem extra é a principal fonte de gordura mais saudável e a mais utilizada na DM e está associado à redução da incidência e prevalência de CCR [88]. As propriedades anticancerígenas do azeite virgem extra têm sido atribuídas ao seu elevado teor de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), esqualeno, tocoferóis, triterpenos e compostos fenólicos [89]. O hidroxitirosol é o composto fenólico mais importante do azeite virgem extra devido ao seu papel antiproliferativo em várias linhas de células tumorais [90]. Apesar de haver estudos que mencionam que o hidroxitirosol induz a apoptose e aumenta a degradação do recetor do fator de crescimento epidérmico nas células de CCR, pouco se sabe acerca dos seus mecanismos moleculares subjacentes, bem como sobre o efeito dos metabolitos colónicos derivados do azeite virgem extra no CCR [91].

A ingestão diária de azeite nas populações mediterrânicas é de 30-50 mL [92] pois é uma gordura monoinsaturada que reduz também os níveis de colesterol total e de lipoproteína de baixa densidade (LDL). Os fenóis são os compostos mais estudados, sendo que a fração insaponificável é constituída por compostos fenólicos e a fração saponificável contém os MUFA (ex. ácido oleico) [77,93]. A composição dos ácidos gordos varia com o estágio de maturação dos frutos e as condições de cultivo das oliveiras, representando cerca de 98% da fração lipídica no azeite [94]. O azeite virgem extra é extraído da azeitona apenas por meios mecânicos ou físicos de modo a não alterar o azeite e a sua composição em compostos bioativos. É obtido a partir de azeitonas não fermentadas que contêm baixa quantidade de ácidos gordos livres e altos níveis de fenóis [77]. Durante o amadurecimento da azeitona, a composição fenólica sofre variações. Nomeadamente, a oleuropeína é consumida e favorece o aumento do tirosol e hidroxitirosol; na fase de maturação existe diminuição da clorofila e da oleuropeína e na maturação final há formação de antocianinas, escurecimento das azeitonas e diminuição dos níveis de oleuropeína. O grau de maturação é importante de forma a prever a época correta da colheita, dando origem a um azeite com maior qualidade e com maior conteúdo fenólico [86]. Através de diversos estudos realizados concluiu-se que a DM, apresenta ação protetora contra diversas doenças cardiovasculares, obesidade e o cancro (figura 1.6). Os compostos do azeite (i.e. compostos fenólicos, triterpenos, entre outros) inibem a proliferação de células cancerígenas, promovem a apoptose e desempenham efeitos favoráveis sobre a microbiota intestinal. Esta degrada algumas substâncias encontradas no azeite, produzindo metabolitos com ação anticancerígena durante a digestão [77]. Técnicas analíticas são importantes para a identificação e quantificação desses metabolitos no azeite virgem extra responsáveis pelos efeitos benéficos [95]. Os efeitos biológicos dos compostos bioativos são dependentes da bioacessibilidade e biodisponibilidade. O primeiro corresponde à quantidade de compostos fenólicos extraídos da matriz do azeite que conseguem atravessar a barreira intestinal e o segundo remete à quantidade de compostos fenólicos que é digerida, absorvida e metabolizada [96].

Os compostos presentes nas plantas podem ser metabolizados ao longo do processo de digestão e fermentação com a microbiota, formando metabolitos mais ou menos ativos. E por isso, nesta área de estudo dos efeitos dos alimentos na saúde torna-se importante conhecer o impacto do processo de digestão na formação de metabolitos potencialmente ativos.

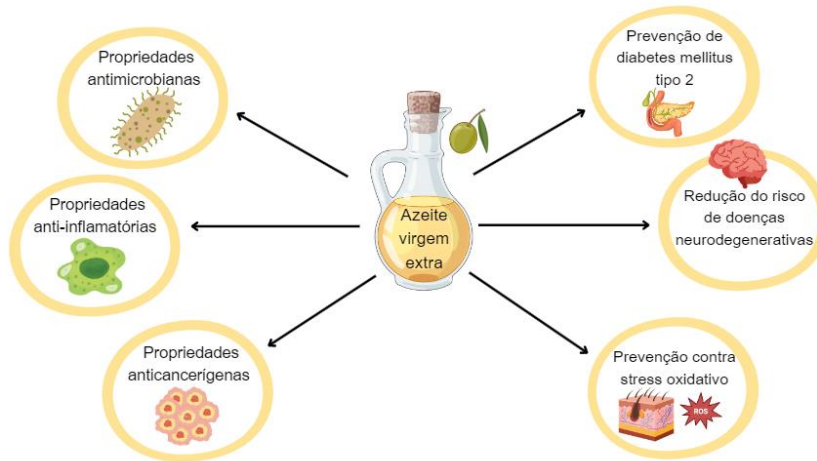


Figura 1.6. Benefícios do azeite virgem extra na saúde humana (Adaptado de Biorender).

1.3.2. Impacto da digestão e fermentação microbiota nos compostos presentes no azeite virgem extra

A microbiota intestinal ou flora intestinal é constituída por diversos microrganismos que habitam o TGI e que são responsáveis pela homeostase do organismo e pela integridade do epitélio. Estes microrganismos, na sua maioria bactérias (*Bifidobacterium* e *Lactobacillus*) [5,10], não são patogénicos, ajudam na absorção química, sintetizam vitaminas [97] e estão envolvidos em processos metabólicos, como a fermentação bacteriana no cólon produzindo ácidos gordos de cadeia curta que servem de fonte de energia para as células intestinais [98,99]. A maior parte da microbiota reside no intestino grosso (cólon), contudo os microrganismos também estão presentes no intestino delgado. Exerce um papel fundamental na manutenção da saúde do hospedeiro, desempenha funções vitais no metabolismo e protege contra agentes patogénicos [99]. A colonização bacteriana no intestino é importante para o desenvolvimento de respostas imunes inatas e adaptativas do hospedeiro, permitindo que o sistema imunológico desenvolva tolerância a antígenos microbianos que levam a respostas alérgicas e inflamatórias [99]. O desequilíbrio da microbiota (disbiose), ou seja, a alteração do número de bactérias não patogénicas ou o aumento do número de bactérias patogénicas (*Escherichia coli* e *Enterobacteriaceae*) está relacionada com o ambiente inflamatório na mucosa intestinal e com a maior concentração de ROS que pode levar a distúrbios gastrointestinais [100], doenças autoimunes, alergias e CCR, devido a estilos de vida como alimentação, uso de antibióticos e genética [101,102]. Este desequilíbrio pode servir como biomarcador para a deteção, prognóstico e tratamento de doenças [10]. A metabolização de compostos fitoquímicos, como flavonóides, pela microbiota pode originar metabolitos bacterianos intestinais que podem ser detetados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) e por LC-MS e exercer efeitos

biológicos como atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena [99,103]. Estes metabolitos podem chegar ao cólon por: fração alimentar não absorvida, metabolitos resultantes da recirculação entero-hepática, ou devido ao transporte basolateral-apical das células intestinais [104,105].

Diversos estudos indicam que a DM tem influência na microbiota sendo que a ingestão de compostos fenólicos contribui para uma microbiota intestinal saudável [77,104]. Foi relatado que o azeite virgem extra tem influência diferente na microbiota intestinal (devido às suas propriedades anticancerígenas e anti-inflamatórias) em comparação com outras gorduras que têm efeitos negativos na saúde, agravando o desenvolvimento de diversas doenças [106]. O azeite virgem extra é uma gordura rica em monoinsaturados e pode ser consumido no estado natural ou refinado. A digestão de gorduras é um processo complexo onde diversas reações promovem a hidrólise de proteínas, lípidos e carboidratos que podem ser absorvidos pela parede intestinal. Os lípidos são macronutrientes também constituídos por triglicéridos e a sua absorção e digestão envolve atividades enzimáticas e alterações físico-químicas [107]. A hidrólise de triglicéridos em moléculas mais pequenas, através de lípases (gástrica e pancreática) origina ácidos gordos e monoglicéridos que são absorvidos pelas células intestinais [108]. A absorção e digestão da fração saponificável é um processo complexo pois a característica hidrofóbica dos lípidos é um fator limitante da sua digestão devido ao carácter hidrofílico das lípases [109].

Uma dieta rica em azeite virgem extra pode aumentar a diversidade da microbiota intestinal promovendo um equilíbrio de microrganismos benéficos, protegendo a mucosa intestinal reduzindo a permeabilidade intestinal que está associada à disbiose [110]. No cancro, a interação entre a inflamação da mucosa, o *stress* oxidativo e a microbiota intestinal podem influenciar a patogénese do CCR.

1.3.3. Métodos de digestão *in vitro* e *in vivo*

Os modelos de digestão *in vivo* e *in vitro* são utilizados para estudos da digestão e fermentação de alimentos ao longo do TGI. Idealmente, a digestão dos alimentos devia ser estudada *in vivo* em humanos ou animais [111], pois fornecem resultados mais reais, precisos e diretos. Contudo, devido a questões éticas e às diferenças existentes entre os sistemas digestivos, foi importante desenvolver modelos *in vitro*. Estes modelos podem ser estáticos, dinâmicos e mecânicos (tabela 1.3) [112] e simulam todo o processo digestivo, com características extremamente controladas de pH, quantidade de enzimas digestivas, ácidos e temperatura [113]. Esses modelos são muitas vezes projetados para operar em condições estáticas e simulam a digestão humana ao longo do TGI [114–116].

Existem algumas vantagens e desvantagens relativamente a estes modelos. Os modelos de estudo *in vitro* permitem avaliar a bioacessibilidade dos nutrientes, são menos dispendiosos e mais rápidos quando comparados aos modelos *in vivo*, e diminuem a exposição a riscos tanto para as pessoas como para os animais [117,118]. No entanto, estes modelos não conseguem replicar a

complexidade da absorção e digestão no TGI. Por outro lado, os modelos *in vivo* permitem o estudo mais complexo do organismo e permitem avaliar a forma como os alimentos se comportam no organismo vivo. Contudo, são estudos mais invasivos, dispendiosos e demorados [117,119]. Assim, tendências futuras estão a direcionar-se para o uso de modelos *in vitro*, para o uso de organoides e para a utilização de tecnologias para melhorar a aplicação dos modelos de investigação.

Tabela 1.3. Tipos de modelos de digestão *in vitro* implementados por diversos autores.

Tipos de Digestão <i>in vitro</i>	Função	Tipos de modelo	Referências
Simulador do ecossistema microbiano intestinal humano (SHIME®)	Simular o TGI. Consiste em cinco reatores que simulam o estômago, intestino delgado e cólon	Multicompartimental e Estático	[113,120,121]
Modelo gastrointestinal TNO's (TIM)	Simular o TGI. Consiste no estudo da absorção de nutrientes no intestino delgado	Multicompartimental e Dinâmico	[113,120,121]
Modelo gástrico dinâmico (DGM)	Simular processos bioquímicos e mecânicos da digestão gástrica humana	Compartimental único e Dinâmico	[113,120]
Simulador gástrico humano (HGS)	Simular a atividade peristáltica	Dinâmico	[113,120]
Simulador de digestão gástrica (GDS)	Simular a digestão gástrica	Dinâmico	[113,120]
Sistema dinâmico estômago-duodeno de rato (DRSD)	Simular o estômago e intestino delgado	Dinâmico	[113]
Sistema dinâmico estômago-intestino humano (DHIS)	Simular o estômago e intestino delgado	Dinâmico	[113]
Modelo artificial do cólon (ARCOL)	Simular o cólon	Sistema de fermentação semicontínuo	[120]
Simulador do TGI (SIMGI)	Simular o TGI	Multicompartimental e estático	[120]
Modelo de estômago e intestino delgado (ESIN)	Simular o TGI	Multicompartimental e dinâmico	[120]

1.3.4. Deteção de metabolitos após a digestão de matrizes alimentares

A metabolómica é a ciência que estuda os compostos químicos de baixo peso molecular presentes em biofluidos, tecidos e amostras biológicas. Os metabolitos são as entidades funcionais finais que dão informação acerca de fenótipos fisiológicos ou patológicos [93]. A análise metabolómica

está dividida em não direcionada (identificação dos metabolitos sem recurso a padrões de referência) e a direcionada (identificação ou quantificação de metabolitos com recurso a padrões de referência) e as técnicas analíticas mais utilizadas para a detecção de metabolitos são a LC e a GC acopladas à espectrometria de massa (MS) e à ressonância magnética nuclear (RMN) [122,123]. A LC é a mais utilizada para metabolitos não voláteis devido à sua sensibilidade e versatilidade, cobrindo uma vasta rede de metaboloma. Requer desproteção com solventes polares dependendo da amostra [93].

Os modelos *in vitro* são utilizados para avaliar a bioacessibilidade de compostos específicos de uma matriz alimentar. Assim a digestão de alimentos ao longo do TGI seguida da análise metabolómica tem como objetivo perceber a biodisponibilidade de compostos que são libertados, absorvidos ou modificados ao longo do processo digestivo e identificá-los [125]. A detecção de vários metabolitos de diferentes classes encontrados ao longo do TGI são importantes para o estudo do potencial efeito anticancerígeno, antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, antiviral, entre outros. O destino dos metabolitos ao longo do TGI pode variar pois pode haver absorção no intestino delgado e metabolização no fígado. Os resíduos que não foram absorvidos podem chegar ao cólon onde ocorre a fermentação microbiana através de bactérias, resultando na libertação de metabolitos que podem influenciar positivamente a saúde do hospedeiro [126]. Os metabolitos formados após a biotransformação de compostos fenólicos têm uma maior disponibilidade para a absorção, e por vezes maior atividade biológica do que os compostos originais. A quantidade de compostos fenólicos libertados durante a fermentação colónica aumenta a solubilidade da matriz alimentar e a sua interação com a microbiota [127].

1.4. Sistema Digestivo

1.4.1. Intestino delgado e cólon

O intestino delgado e o cólon são fundamentais no sistema digestivo. O intestino delgado tem cerca de 3.05 metros de comprimento e 2.5 cm de diâmetro e está dividido em três regiões: duodeno, jejuno e íleo [97]. O duodeno recebe o quimo, o jejuno é responsável pela maior parte da absorção e digestão e o íleo, último segmento do intestino delgado, direciona o alimento para o intestino grosso [138]. O lúmen intestinal é a região interna ao intestino onde ocorre a absorção e digestão dos alimentos e o dialisado intestinal corresponde aos nutrientes que são absorvidos no intestino e passam para corrente sanguínea (figura 1.7). As células da mucosa do intestino delgado são os enterócitos e são compostos por uma borda em escova que é constituída por microvilosidades que revestem a superfície apical [97,139,140].

O intestino grosso tem 7 cm de diâmetro, é a parte final do TGI e tem como função finalizar a absorção de nutrientes e água e transformar os resíduos em fezes. É constituído pelo ceco, cólon, reto e ânus. O cólon é um órgão tubular e está dividido em diferentes partes: ascendente, transverso, descendente e o sigmoide [141] e o reto. O cólon é constituído por 4 camadas: mucosa, submucosa, muscular externo e serosa [138] que são importantes para a absorção, nutrição e movimento do conteúdo no intestino [142]. Uma fração dos polifenóis ingeridos não são absorvidos pelo intestino delgado e chegam ao cólon, onde podem posteriormente servir de substratos para a microbiota colónica residente.

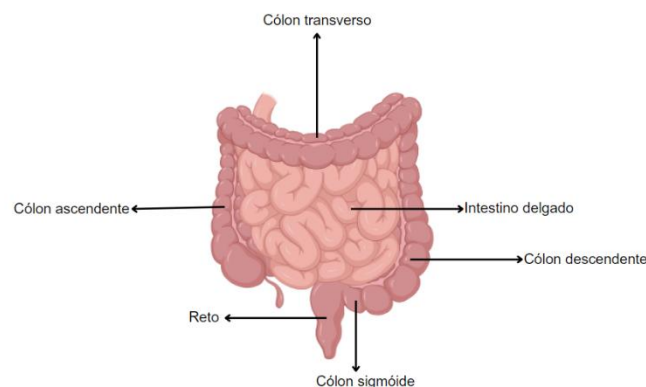


Figura 1.7. Representação do intestino delgado e do cólon (Adaptado de Biorender).

1.4.2. Processo de digestão dos alimentos ao longo do TGI

O sistema digestivo é formado pelo TGI, pâncreas, vesícula biliar e fígado. O TGI é constituído pelo trato superior (cavidade oral, faringe, esófago, estômago e intestino delgado) e inferior (intestino grosso, reto e ânus) [143] e por órgãos acessórios, fígado, pâncreas e vesícula biliar, estendendo-se

anatomicamente da boca ao ânus (figura 1.8) [140,144]. As principais funções do TGI são: ingestão e digestão de alimentos, absorção de nutrientes, secreção de enzimas e água e excreção de resíduos [138,145]. A digestão de alimentos é um processo contínuo e dinâmico de decomposição enzimática e mecânica dos alimentos para sua posterior absorção pela corrente sanguínea. A necessidade de digestão dos alimentos advém da presença de macronutrientes, como gorduras, carboidratos e proteínas que precisam de ser decompostos em moléculas mais acessíveis pelo epitélio intestinal para serem absorvidos. A digestão engloba dois processos fundamentais: a digestão mecânica e a digestão química [97,146]. O processo de digestão inicia-se na cavidade oral, onde as enzimas das glândulas salivares, como a amilase digerem carboidratos e gorduras [146]. Posteriormente, os alimentos mastigados (bolo alimentar), percorrem o esôfago e o esfíncter relaxa permitindo a sua passagem para o estômago [140]. Este tem 4 funções importantes: armazenamento, mistura, fragmentação e esvaziamento [113]. Quando os alimentos chegam ao estômago, as enzimas estomacais, como a pepsina decompõem as proteínas em péptidos e aminoácidos [147] e a acidez do estômago (pH=1.5 a 2.0) destrói os microrganismos ingeridos com alimentos. A cada duas horas, ocorrem contrações estomacais que promovem a movimentação do conteúdo estomacal, formando o quimo, para o intestino delgado (lúmen) [142] onde ocorre a continuação da digestão. No intestino delgado o pH sobe (6-7) devido à segregação de bicarbonato pelo pâncreas e os alimentos são misturados com sucos digestivos (sais biliares e enzimas pancreáticas) e degradados em unidades mais pequenas [146] com a ajuda de outros órgãos como pâncreas, fígado e vesícula biliar para uma fácil absorção e digestão [148]. As paredes intestinais são responsáveis pela absorção de aproximadamente 90% da água e dos nutrientes digeridos para a corrente sanguínea [97,113,142]. Após a absorção dos nutrientes pela corrente sanguínea (dialisado) [143], o bolo alimentar não absorvido e não digerido é conduzido para o intestino grosso, onde ocorre a remoção de água e eletrólitos e a formação das fezes, com a ajuda das bactérias anaeróbias obrigatórias [114]. As fezes resultantes são armazenadas no reto [144,149] e posteriormente expelidas para o exterior através do ânus, com a ajuda da contração dos músculos retais [97,142].

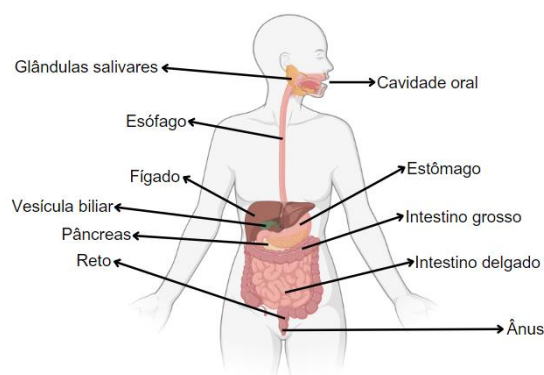


Figura 1.8. Anatomia humana e o percurso de digestão dos alimentos (Adaptado de [147]).

1.5. Linhas e modelos celulares utilizados como ensaios *in vitro* na análise pré-clínica de compostos com potencial ação anticancerígena

As linhas celulares são sistemas de modelos *in vitro* utilizados em diferentes campos de investigação médica, principalmente em doenças como cancro e na descoberta de novos fármacos [150]. São isoladas diretamente de organismos vivos e depositadas em bancos de células [151], como o ATCC (*American Type Culture Collection*) que contém várias linhas celulares cancerígenas importantes para entender a biologia celular, ação de fármacos e mecanismos das doenças [151]. As linhas celulares de CCR são originárias de tumores malignos e são ferramentas amplamente utilizadas para entender o desenvolvimento do cancro, mecanismos oncogénicos, alvos terapêuticos e a eficácia dos medicamentos anticancerígenos (tabela 1.4) [152]. As linhas celulares cancerígenas incluem uma população celular homogénea e quando armazenadas nas condições certas, mantêm a sua genética e as suas características de origem [153–155]. Na tabela 1.4 estão exemplificadas várias linhas celulares de CCR e as suas características.

Tabela 1.4. Linhas celulares de CCR.

Linha celular	Localização	Características	Referências
LoVo	Linha celular isolada de um paciente com CCR, estágio IV	Células epiteliais, aderentes e metastáticas	[153–155]
HT29	Células epiteliais isoladas de adenocarcinoma colorretal	Células epiteliais e aderentes; Mutações no gene <i>APC</i>	[153–155]
HCT116	Linha celular do adenocarcinoma do cólon	Células epiteliais e aderentes; Mutações no gene <i>KRAS</i>	[153–156]
SW480	Células isoladas do intestino grosso de um paciente com CCR Dukes C	Células epiteliais e aderentes; Mutações no <i>KRAS</i> e p53	[153–155,157]
SW620	Células isoladas do intestino grosso de um paciente com CCR Dukes C	Células epiteliais, aderentes e Invasivas; Mutação no <i>KRAS</i>	[153–155]
DLD-1	Linha celular do adenocarcinoma do cólon	Células epiteliais e aderentes; Expressão de marcadores	[153–155,158]
Caco-2	Células epiteliais isoladas de adenocarcinoma colorretal	Células epiteliais e aderentes; simula a barreira intestinal	[153–155]
RKO	Linha celular do adenocarcinoma do cólon pouco diferenciada	Células epiteliais e aderentes; Têm MSI	[153–155]
LS174T	Linha celular do adenocarcinoma do cólon	Células epiteliais e aderentes; Mutações na via de sinalização Wnt	[153–155]

Destas 9 linhas celulares de CCR, as HT29, LoVo e Caco-2 são as mais importantes para o presente estudo. A **linha celular HT29** tem morfologia epitelial e foi isolada em 1964 a partir de um paciente com tumor primário com adenocarcinoma colorretal. Estas células demonstraram um alto consumo de glucose, crescem em multicamada de células indiferenciadas e quando cultivadas em condições de cultura adequadas expressam diferentes vias de diferenciação de enterócitos, sendo uma linha celular pluripotente. Possuem mutações em genes relacionados com o CCR, nomeadamente o gene *APC* e podem ocorrer alteração em proteína, como a E-caderina [159,160]. As células HT29 não são usadas apenas para estudar a biologia do cancro, mas também para a resposta imune intestinal à infeção bacteriana, sobrevivência e adesão de microrganismos [161]. A **linha celular LoVo**, uma linha mais metastática, foi isolada em 1971 de um paciente com adenocarcinoma do cólon, tipo C de Dukes, estágio IV. É caracterizada por mutações no gene *APC* e na proteína tumoral p53. Estas células são importantes para observar o efeito de compostos anticancerígenos e perceber como é que estas células desenvolvem resistência [162]. A **linha celular Caco-2** são células do epitélio intestinal

humano, confluentes e indiferenciadas e são obtidas a partir de um adenocarcinoma do cólon humano. Quando as células Caco-2 se diferenciam, estas apresentam uma determinada semelhança morfológica e funcional com os enterócitos do intestino delgado. Esta diferenciação ocorre espontaneamente quando as células crescem em monocamada numa cultura de longa duração [163,164].

Os modelos celulares *in vitro* em monocamada (2D) e em cultura tridimensional (3D) (figura 1.9) são importantes para estudar a biologia celular, a resposta a fármacos, o comportamento das células e tecidos em diferentes condições, e para reduzir o uso de animais em laboratório [165]. As culturas de células em modelos 2D crescem num frasco de cultura estático com superfícies sólidas e aderentes. As vantagens desta cultura incluem a manutenção simples, reprodutibilidade e baixo custo, no entanto, não representam a estrutura tridimensional dos tecidos vivos, o microambiente tumoral nem a heterogeneidade do tumor devido à falta de interação célula-célula ou célula-matriz *in vivo* [151]. O microambiente tumoral *in vivo* é composto por diferentes tipos de componentes celulares que rodeiam as células tumorais, tais como células imunes, células endoteliais, metabolitos e matriz extracelular (ECM), permitindo o crescimento e metástase tumoral [166]. Para superar as limitações do modelo 2D, desenvolveram-se modelos 3D [165]. Existem 2 tipos de modelos dinâmicos 3D: esferóides e organóides que imitam a complexidade dos tecidos. Os esferóides são agregados de células em suspensão que podem representar uma ampla gama de células como tecidos tumorais, corpos embrionários, hepatócitos e tecidos neurais [167].

Relativamente ao cancro, o esferóide tumoral com tamanho apropriado (> 500 µm de diâmetro) assemelha-se ao microambiente tumoral pois é constituído por várias camadas onde as células têm comportamentos funcionais e metabólicos diferentes [168]. Apresenta uma estrutura organizada, com forma esférica, uma zona com células senescentes e um núcleo interno apoptótico e necrótico devido à falta de nutrientes e transporte de oxigénio (O₂) limitado [166,169]. O interior do esferóide tem um pH baixo (6.5) o que faz com que as células senescentes nessa zona comecem a produzir fatores que aumentam a proliferação das células malignas. Os esferóides formam agregados com características de tumores sólidos, reproduzindo melhor o comportamento tumoral *in vivo* do que em culturas de células 2D, permitindo a observação das interações célula-célula (diferenciação celular e proliferação), a absorção de nutrientes pelas células tumorais e os mecanismos de proliferação e diferenciação [166]. Estes modelos são usados para garantir uma avaliação precisa do potencial efeito anticancerígeno de compostos fitoquímicos e a identificação de potenciais terapêuticas contra o cancro [170–172]. Em comparação com outros métodos de cultura de células 3D, os esferóides apresentam várias vantagens, incluindo uma maior relevância para a biologia tumoral, custos reduzidos, menor complexidade em relação aos modelos animais e reprodutibilidade [173]. Nem todas as linhas celulares têm a capacidade de originar esferóides, é necessário haver otimização do tempo da cultura celular e a densidade celular [166].

Os organóides são estruturas 3D derivadas de CE que mimetizam a estrutura e função dos órgãos humanos, como intestino, fígado e cérebro. São importantes para o estudo de hereditariedade, patologia e organogénese principalmente no cérebro pois têm pouca capacidade regenerativa [167]. Os organóides cancerígenos têm capacidade de autorrenovação e diferenciação, permitindo imitar as características dos tecidos cancerígenos. Podem ser criopreservados, criando um banco de células de diferentes tipos de cancro, sendo assim uma ferramenta útil para estudos pré-clínicos. Recentemente foi descoberto que a tecnologia de edição genética *CRISPR-Cas9* permite introduzir mutações específicas nos organóides derivados de células estaminais intestinais, de forma a criar modelos de CCR que imitam mutações genéticas encontradas em pacientes com CCR, permitindo assim um estudo mais detalhado da doença. Esta edição com organóides pode ser importante para identificar alvos terapêuticos para o tratamento do CCR [166,169].



Figura 1.9. Ilustração de modelos 2D e 3D (Adaptado de Biorender).

Existem técnicas usadas em laboratório para a obtenção e formação de esferóides e organóides, tais como: sistemas de cultura agitados (ex. bioreatores) e estáticos (placas ULA - *Ultra-Low Attachment* e *hanging drop*) [174].

Os **sistemas agitados** (*spinner vessels* e reatores) consistem na agitação contínua de células, criando um ambiente propício para trocas de nutrientes e O_2 . Permitem monitorizar o crescimento celular e são fundamentais para a colheita de amostras [175,176]. Os **bioreatores** permitem a cultura de células num ambiente fechado e controlado e são muito utilizados na área da indústria farmacêutica na produção industrial de biofármacos ou vacinas [177]. As **placas ULA** permitem a formação de esferóides e são importantes para estudar a morfologia celular [178]. O ***hanging drop*** ou ***gota suspensa*** permite que as células se agrupem em gotículas formando o esferóide através da tensão superficial e da força gravitacional [176,179,180]. Na tabela 1.5 estão mencionadas algumas vantagens e desvantagens dos dois tipos de sistemas de cultura.

Tabela 1.5. Vantagens e desvantagens dos sistemas de cultura 3D.

Sistema de cultura	Vantagens	Desvantagens	Referências
Sistema estático	Fácil manuseio e menor risco de contaminação	Limitação no crescimento celular	[180]
Sistema agitado	Maior rendimento e fácil de monitorizar as condições (temperatura, pH)	Difícil manuseio e maior risco de contaminação	[180]

1.6. Objetivos

Apesar de já existirem muitas evidências sobre o potencial efeito anticancerígeno dos compostos bioativos derivados do azeite em CCR, existem poucos estudos sobre o efeito bioativo dos metabolitos derivados do processo de digestão do azeite. Assim, este projeto teve como objetivo estudar o efeito antiproliferativo de metabolitos intestinais derivados do azeite em células de CCR. O projeto foi dividido em 3 partes, nomeadamente:

1. Estudo do impacto da digestão na composição fitoquímica de um extrato derivado de azeite virgem extra rico em compostos fenólicos.

Numa primeira fase, foram utilizados os métodos de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa de alta resolução, Orbitrap (UHPLC Q-Orbitrap) para identificar os compostos e metabolitos presentes no extrato de azeite e nas respetivas frações do intestino delgado e cólon derivadas de um processo de digestão *in vitro*. O método de digestão foi o SHIME® que consiste na simulação da digestão de um extrato de azeite ao longo do TGI. O principal objetivo desta primeira fase foi estudar o impacto da digestão na composição fitoquímica do extrato.

2. Avaliação da atividade antiproliferativa do extrato de azeite antes e após o processo de digestão assim como as amostras de digestão e os principais metabolitos, em linhas de CCR- HT29 e LoVo.

Nesta fase, o extrato de azeite, as amostras de digestão (intestino delgado lúmen e dialisado e o cólon) e os metabolitos detetados foram testados em modelos 2D na linha celular HT29 para avaliar o seu potencial efeito antiproliferativo. Paralelamente foram realizados testes de citotoxicidade, no extrato de azeite e nos metabolitos, no modelo 2D na linha celular Caco-2 que mimetiza o epitélio intestinal. O extrato de azeite e os metabolitos foram também testados em modelos 2D na linha LoVo, uma linha celular com características mais metastáticas.

3. Avaliação da atividade antiproliferativa e ação sobre as CECs dos metabolitos mais promissores em modelos 3D de CCR

Nesta fase final, os metabolitos com maior efeito antiproliferativo (álcool 3-hidroxibenzilo, hidroxitirosol, ácido maslínico, ácido ursólico, luteolina, 4-metilcatecol, apigenina e ácido oleico) testados em modelos 2D na linha celular LoVo, foram testados em modelos 3D,

esferóides LoVo. Posteriormente, os metabolitos com maior efeito antiproliferativo em modelos 3D (luteolina, hidroxitirosol, ácido maslínico e ácido oleico) foram utilizados para ensaios de citometria de fluxo utilizando o kit ALDEFLUOR™ para detetar o impacto nas subpopulações de ALDH⁺ que estão associadas às CECs.

Este mestrado está inserido no projeto VOOmics- Metodologias ómicas para identificar propriedades anticancerígenas no azeite virgem (PTDC/BAA-AGR/4732/2021) financiado pela FCT/MCES.

2. Metodologia

2.1. Materiais e Reagentes

Neste trabalho, foram utilizados os seguintes equipamentos: leitor de microplacas de fluorescência – fluorímetro (*FLx800, BioTek, software Gen5*, EUA); microbalança (*Sartorius*, Alemanha); incubadora (*NUAIRE US AUTOFLOW*, EUA) a 37°C, 5% CO₂; câmara de fluxo laminar (*NUAIRE Biological Safety Cabinets*, EUA); microscópio ótico invertido (*Leica Microsystems DFC 7000 T*); banho de aquecimento (*Julabo*, 37°C, EUA); autoclave (*Tuttnauer 3870*, EUA); vortex mixer (*Labnet*, EUA); UHPLC *Dionex UltiMate 3000 UHPLC* com *Thermo Q-Exactive Focus Orbitrap* (*Thermo Fisher Scientific*, EUA); contador de células automatizados (*Thermo Fisher Scientific*, EUA); microcentrífuga (*VWR Micro Star 30R*, EUA) utilizada a 200 g, 27°C; centrífuga (*Beckman Coulter*, EUA); sonicador (*ARGO LAB*, Itália); citómetro *Guava® easyCyte HT System* (versão 2.7) (*Merck MiliporeSigma*, EUA); medidor de pH (*Mettler Toledo*, EUA).

Os reagentes utilizados para os ensaios antiproliferativo e de citotoxicidade foram: meios de cultura *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium* (DMEM) usado para a linha celular Caco-2 (HTB-37™, ATCC, EUA) e *Ham's F-12K Nutrient Mixture, Kaighn's Mod* (F12K) utilizado para cultura celular de LoVo (CCL-229™, ATCC, EUA), ambos provenientes da *Corning* (EUA); *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640) utilizado para a cultura celular de HT29 (HTB-38™, ATCC, EUA) e soro fetal de bovino (FBS) ambos provenientes do *Biowest -The Serum Specialist* (França); tampão fosfato-salino (PBS) pH 7.4, tripsina-EDTA (0.25%), aminoácidos não essenciais (MEM NEAA) e penicilina/estreptomicina (P/S), provenientes de *Gibco* (*Thermo Fisher Scientific*, USA); solução *Trypan Blue* 0.4% (*Thermo Fisher, Grand Island*, EUA), reagente *PrestoBlue™* (*Thermo Fisher Scientific*, EUA); dimetilsulfóxido (DMSO) ≥ 99.7% e etanol absoluto ≥ 99.8% (*Fisher Scientific*, EUA); água bi-distilada (ddH₂O); 3 tipos de azeites virgem extra (Sovena, Portugal); amostras de digestão *in vitro* do azeite (intestino delgado: lúmen e dialisado e cólon) obtidas pela *ProDigest Gastrointestinal Expertise* (Bélgica) e padrões de metabolitos: hidroxitirosol (C₈H₁₀O₃), tirosol (C₈H₁₀O₂), ácido ursólico (C₃₀H₄₈O₃), luteolina (C₁₅H₁₀O₆), álcool 3-hidroxibenzilo (C₇H₈O₂), ácido maslínico (C₃₀H₄₈O₄), ácido metilmalónico (C₄H₆O₄), ácido 4-hidroxibenzóico (C₇H₆O₃), 4-metilcatecol (C₇H₈O₂), apigenina (C₁₅H₁₀O₅), ácido oleico (C₁₈H₃₄O₂), oleaceína (C₁₇H₂₀O₆), oleocantal (C₁₇H₂₀O₅), ácido salicílico (C₇H₆O₃), ácido desoxicólico (C₂₄H₄₀O₄), diosmetina (C₁₆H₁₂O₆) e ácido *p*-cumárico (C₉H₈O₃), provenientes de *Sigma-Aldrich* (*Missouri*, EUA) e *Extrasynthese* (*Genay*, França).

Para o ensaio de citometria de fluxo foi utilizado o kit ALDEFLUOR™ (*STEMCELL TECHNOLOGIES*, Canadá) que contém o reagente fluorescente ALDEFLUOR™; reagente dietilaminobenzaldeído (DEAB, 1.5mM) 95% de etanol (EtOH); ácido clorídrico (HCl, 2N); DMSO e tampão ALDEFLUOR™.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação do extrato de azeite virgem extra rico em compostos fenólicos

O extrato de azeite virgem extra rico em compostos fenólicos foi preparado e caracterizado no Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (IBET) e foi obtido a partir de uma mistura de 3 tipos de azeite virgem extra (casa de Santa vitoria, Rosmaninho e Quinta Vale dos Lobos). Foi efetuada uma extração convencional com 50% de EtOH e foi evaporado até à secura. Posteriormente foi caracterizado em termos de composição de compostos fitoquímicos.

O extrato de azeite foi caracterizado através do HPLC Vanquish ThermoScientific® equipado com um detetor de díodos (DAD) e uma coluna Luna 5 µm C18 100A (250 x 4 mm); Phenomenex® a 35°C (HPLC-DAD-ED-FD). A fase móvel incluiu o eluente A: 0.5% de ácido fórmico (HCOOH) em água, e o eluente B: 90% de uma solução de acetonitrilo + 0.5% de HCOOH + 9.5% de água Milli-Q®. O tempo total foi de 60 min, a temperatura do autosampler foi de 12°C, o volume de injeção foi de 10 µL e o intervalo de comprimento de onda de 190-680 nm. Esta caracterização teve como objetivo verificar o perfil cromatográfico obtido através da separação e identificação dos compostos fenólicos presentes na amostra, permitindo compreender a sua composição e concentração com base na análise dos picos gerados na cromatografia.

2.2.2. Análise do extrato de azeite virgem extra rico em compostos fenólicos

2.2.2.1. Simulação da digestão *in vitro* do extrato de azeite pelo método SHIME®

O extrato de azeite (0.4 g – 26 mg de compostos fenólicos) foi submetido a condições que simulam *in vitro* a digestão nas diferentes partes do TGI superior (estômago e intestino delgado - lúmen e dialisado) e inferior (côlon ascendente, transverso e descendente) utilizando o Simulador do Ecosistema Microbiano Intestinal Humano (SHIME®). Este modelo de digestão foi aplicado pelo laboratório ProDigest Gastrointestinal Expertise, na Bélgica. O SHIME® é um sistema dinâmico *in vitro* multicompartimental que reproduz as condições fisiológicas, químicas e microbiológicas do TGI humano, permitindo o estudo da interação entre alimentos, compostos bioativos e a microbiota. Os objetivos desta simulação incluíram: a **obtenção e avaliação das amostras de digestão de um extrato de azeite** contendo compostos fenólicos durante a passagem pelo TGI superior humano, para análise de compostos bioativos; **monitorizar o impacto dos compostos fenólicos do azeite no microbioma** do cólon de um adulto saudável e **detetar a composição da comunidade microbiana** por análise de PCR quantitativo (qPCR). Para reproduzir com precisão o ambiente gastrointestinal *in vivo*, foram mantidas condições rigorosamente controladas tais como o pH, a temperatura, a concentração de enzimas e os tempos de incubação.

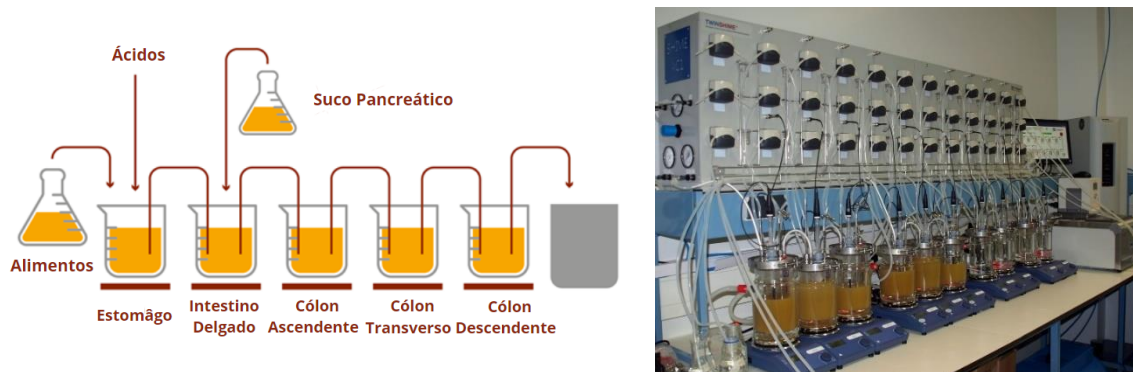


Figura 2.1. Representação do simulador do ecossistema microbiano intestinal humano (SHIME®) (Adaptado de [181]).

O uso da tecnologia SHIME® envolve cinco reatores que simulam as diferentes partes do TGI (figura 2.1). Os dois primeiros seguem o princípio do fill-and-draw (enchimento e extração), reproduzindo diversas fases da absorção e digestão dos alimentos. As bombas peristálticas adicionam quantidades definidas de líquido pancreático e biliar aos compartimentos do estômago e do intestino delgado, respetivamente. Os três restantes reatores em sequência com agitação constante, volume controlado e ajuste de pH, simulam as porções ascendente, transverso e descendente do cólon [115,182] através de incubações com microbiota fecal humana. A análise das amostras nos diversos reatores ao longo do tempo, permitiu a **avaliação da atividade metabólica microbiana** através do controlo de vários parâmetros nomeadamente: **pH** (o grau de acidificação é uma medida da intensidade do metabolismo bacteriano, ou seja, fermentação), **gás** (é uma medida da atividade microbiana, ou seja, da velocidade de fermentação dos substratos), **ácidos gordos de cadeia curta** (avaliação do metabolismo microbiano de carboidratos e proteínas), **lactato** (produzido por bactérias, diminui o pH e atua como agente antimicrobiano), **amónia** (produto de degradação que resulta na produção de compostos tóxicos) e a **determinação da composição da comunidade microbiana** que foi avaliada através de um qPCR para enumerar microrganismos como: *eFirmicutes*, *Bacteroides*, *Akkermansia muciniphila*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* [115]. As duas últimas são bactérias sacarolíticas benéficas e produzem altas concentrações de lactato, importante no ambiente do cólon devido às suas capacidades antimicrobianas [183]. Durante a simulação da digestão, foi efetuada a diálise estática através de uma membrana de celulose com o objetivo de simular a barreira intestinal, que naturalmente permite a passagem de pequenas moléculas para a corrente sanguínea e retém as moléculas maiores. Introduziu-se o conteúdo do intestino delgado na membrana de celulose com o intuito de simular a absorção intestinal, onde moléculas pequenas (< 3.5 kDa) tais como: aminoácidos, monossacarídeos e micronutrientes são absorvidas pela corrente sanguínea. Durante a simulação foram recolhidas diferentes frações/amostras de digestão ao longo do TGI: estômago (0h e 2h); intestino delgado: lúmen (1.5h; 3h e 4.5h); intestino delgado: dialisado (1.5h; 3h e 4.5h) e cólon (0h, 6h, 24h e 48h). Para cada

secção do TGI foi recolhido o produto de teste (com extrato de azeite) e o branco, que serve de controlo (sem extrato de azeite) (tabela 2.1).

Tabela 2.1. Amostras de digestão obtidas ao longo do TGI pelo SHIME®.

Secção TGI	Amostras	
	Branco	Produto de Teste
Estômago 0h	A4	A1/A2/A3
Estômago 2h	A8/A9	A5/A6/A7
Intestino delgado: lúmen 1.5h	A13	A10/A11/A12
Intestino delgado: lúmen 3h	A21	A18/A19/A20
Intestino delgado: lúmen 4.5h	A29/A30	A26/A27/A28
Intestino delgado: dialisado 1.5h	A17	A14/A15/A16
Intestino delgado: dialisado 3h	A25	A22/A23/A24
Intestino delgado: dialisado 4.5h	A34	A31/A32/A33
Cólon 0h	B22/B23/B24	B19/B20/B21
Cólon 6h	B40/B41/B42	B37/B38/B39
Cólon 24h	B58/B59/B60	B55/B56/B57
Cólon 48h	B88/B89/B90	B85/B86/B87

Após simulação da digestão pelo SHIME®, apenas as amostras do intestino delgado e do cólon foram caracterizadas por cromatografia, nomeadamente HPLC-DAD-ED-FD para verificar o perfil cromatográfico e por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa de alta resolução (UHPLC Q-Orbitrap) para a deteção dos metabolitos presentes. A sua bioatividade foi analisada em células de CCR-HT29, LoVo e Caco-2 que mimetiza o epitélio intestinal.

2.2.2.2. Deteção de metabolitos nas amostras de digestão e no extrato de azeite por UHPLC Q-Orbitrap

O UHPLC é uma técnica analítica que visa a separação, identificação e quantificação de componentes em amostras líquidas através de interações com a fase estacionária e a fase móvel. Os componentes eluem a tempos diferentes (tempos de retenção) o que favorece a sua identificação. Em comparação com a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), o UHPLC oferece uma resolução superior, reduz o tempo de análise e melhora a eficiência na separação dos compostos [184,185]. O acoplamento de UHPLC com MS proporciona diversas vantagens, pois após a separação dos componentes por cromatografia, a espectrometria de massa, após a ionização dos compostos, permite a obtenção de espectros de massa dos diferentes compostos o que possibilita a identificação dos compostos com base na razão massa/carga (m/z) [186]. Esta técnica é aplicada no estudo de amostras biológicas, misturas orgânicas e inorgânicas complexas, bem como na identificação de compostos conhecidos e desconhecidos. Um dos avanços mais significativos foi o desenvolvimento do analisador de massa Orbitrap, capaz de caracterizar amostras biológicas com resoluções de até 500.000 a m/z 200 [187] devido a três fatores principais: elétrodos de alta precisão em escala nanométrica, fontes de alta tensão e medições de massa por carga baseadas na frequência de oscilação dos iões. O analisador Orbitrap, constituído por dois elétrodos externos e um elétrodo central, funciona como analisador e detetor, oferecendo alta precisão e exatidão, simplicidade de uso, baixa necessidade de manutenção e é eficaz na deteção de compostos novos, de baixo peso molecular, de reduzida abundância e alta complexidade, sem comprometer a seletividade e a sensibilidade [188,189].

As amostras de digestão do extrato de azeite (intestino delgado e cólon), obtidas ao longo do TGI no sistema SHIME® (tabela 2.2), foram analisadas por UHPLC Q-Orbitrap equipado com ionização por electrospray (ESI), com o objetivo de identificar os metabolitos presentes (i.e., compostos fenólicos, sacarídeos, aminoácidos e ácidos gordos) no modo negativo. Após a injeção no sistema de UHPLC, os compostos do extrato de azeite foram separados numa coluna XBridge BEH C18 (130 Å, 3.5 µm, 2.1 x 150 mm, Waters, MA, USA), utilizando como fase móvel água acidificada com 0.1% de ácido fórmico (eluição A) e acetonitrilo acidificado com 0.1% de ácido fórmico (eluição B). A separação cromatográfica baseou-se na interação dos compostos com a fase estacionária, de acordo com a sua polaridade, num gradiente de eluição com duração de 38.10 minutos e um fluxo de 0.317 mL/min.

Na fonte de ionização por ESI, os compostos com reduzida volatilidade ou termolábeis foram ionizados em modo negativo ([M-H]⁻), através da perda de prótons, e transferidos da fase líquida para a fase gasosa. Posteriormente, no analisador de massa Q-Orbitrap, os iões moleculares foram separados com base na relação massa/carga (*m/z*) e fragmentados utilizando uma energia de colisão normalizada de 20, 40 e 60 eV, permitindo a obtenção de fragmentos específicos de acordo com a massa dos compostos.

Os valores de *m/z*, juntamente com a abundância dos iões e a fragmentação MS/MS, foram utilizados para a identificação dos compostos. A análise de dados foi realizada com o *software Compound Discoverer* (versão 2.1), que facilitou a comparação dos dados obtidos com bibliotecas online, como *mzCloud*, *ChemSpider* e *OliveNet*TM. Para uma identificação confiável, os compostos foram considerados quando: o score de semelhança com o espectro de fragmentação na biblioteca *mzCloud* foi igual ou superior a 80%; o valor de FISh (*Fragment Ion Search Coverage*) na biblioteca *ChemSpider* foi igual ou superior a 10%; a exatidão de massa estava no intervalo de -5 a 5 ppm. Adicionalmente, sempre que possível, a identificação dos compostos foi confirmada através da análise de padrões disponíveis no laboratório, como o hidroxitiroso, apigenina e outros, nas mesmas condições das amostras. Quando tal não foi possível, a identificação baseou-se na massa exata e nos fragmentos característicos dos metabolitos, com recurso às bibliotecas *mzCloud*, *ChemSpider* e *OliveNet*TM.

A tabela 2.2 mostra quais foram as amostras utilizadas para a deteção de metabolitos por métodos analíticos e quais foram utilizadas em ensaios celulares, explicados mais à frente (secção 2.2.3). As amostras correspondentes ao estômago não foram utilizadas nos ensaios de bioatividade pois o foco desta tese é apenas o intestino e cólon.

Tabela 2.2. Análise das amostras obtidas através do SHIME®.

Amostras	Branco	Produto de teste	Amostras analisadas no UHPLC Q-Orbitrap para identificação de metabolitos	Amostras utilizadas em ensaios celulares	Ambos
Intestino delgado: lúmen 1.5h	A13	A10/A11/A12	X	X	X
Intestino delgado: lúmen 3h	A21	A18/A19/A20	-	X	-
Intestino delgado: lúmen 4.5h	A29/A30	A26/A27/A28	-	X	-
Intestino delgado: dialisado 1.5h	A17	A14/A15/A16	-	X	-
Intestino delgado: dialisado 3h	A25	A22/A23/A24	-	X	-
Intestino delgado: dialisado 4.5h	A34	A31/A32/A33	-	X	-
Cólon 0h	B22/B23/B24	B19/B20/B21	-	X	-
Cólon 6h	B40/B41/B42	B37/B38/B39	X	X	X
Cólon 24h	B58/B59/B60	B55/B56/B57	-	X	-
Cólon 48h	B88/B89/B90	B85/B86/B87	X	-	X

Nos ensaios de bioatividade, o extrato de azeite foi testado em 3 linhas celulares, HT29, LoVo e Caco-2 para avaliar o possível efeito antiproliferativo e de citotoxicidade, respetivamente. As amostras de digestão mais relevantes para o presente estudo, intestino delgado (lúmen e dialisado) e cólon foram testadas em células HT29 de modo a verificar o potencial efeito antiproliferativo. A concentração destas amostras era desconhecida e por esta razão foram efetuadas diluições (1:2 - 1:124) com base na concentração de hidroxitirosol presente no extrato de azeite (tabela 7.1 em anexo). Relativamente aos metabolitos isolados, detetados em cada fração ao longo do TGI através do UHPLC Q-Orbitrap, foram testados a diferentes concentrações em linhas de células HT29, LoVo e Caco-2 de modo a observar o possível efeito antiproliferativo e de citotoxicidade, em modelos 2D e 3D.

2.2.2.3. Preparação do extrato de azeite, das amostras de digestão do extrato de azeite e dos metabolitos para ensaios celulares

O extrato de azeite virgem extra foi pesado, dissolvido em EtOH (99%) e filtrado através de um filtro estéril de acetato de celulose para seringa com um tamanho de poro de 0.22 µm. O produto de teste (com extrato de azeite) e o respetivo branco (sem extrato de azeite) de cada amostra recolhida ao longo do processo de simulação da digestão foram também filtradas com um filtro de acetato de celulose. Os metabolitos utilizados foram dissolvidos no solvente mais adequado (DMSO, EtOH ou água estéril), e a solução foi filtrada utilizando filtros de acetato de celulose ou filtros de membrana nylon, dependendo do solvente, e foram armazenados a -20°C. Estes compostos foram testados em diferentes linhas celulares HT29, LoVo e Caco-2 a diferentes concentrações e utilizados para ensaios antiproliferativos e de citotoxicidade em modelos 2D e 3D.

2.2.3. Ensaios Celulares

2.2.3.1. Cultura Celular

As linhas de CCR derivadas de humanos são essenciais para avaliar compostos anticancerígenos, através de modelos de cultura de células 2D e 3D pois fornecem interações célula-célula, célula-matriz e desenvolvem um microambiente cancerígeno [172]. As células foram observadas ao microscópio de modo a verificar a sua aderência e confluência ao frasco de cultura, sendo que a passagem das células só ocorre quando estas atingirem 70 a 80% de confluência. Quando as células são cultivadas em frascos de cultura passam por 4 fases formando a curva de crescimento (figura 2.2). A primeira fase é a fase de latência (**fase Lag**), que corresponde à fase em que as células se estão a ajustar às condições de cultura e não se dividem; a **fase exponencial (fase Exp)** em que as células começam a dividir-se e a atividade metabólica aumenta. É nesta fase que se pode avaliar o crescimento populacional e onde ocorre a passagem celular (subcultura). A **fase estacionária**, quando as células começam a sofrer alterações bioquímicas pois já consumiram todos os recursos disponíveis

e o seu crescimento diminui pois já atingiram aproximadamente 100% de confluência ficando assim mais suscetíveis a stress. Por fim, a **fase de morte**, em que a população de células vivas morre [190].

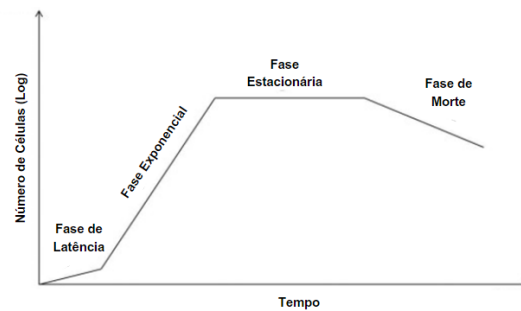


Figura 2.2. Curva de crescimento das células (Adaptado de Sigma-Aldrich).

A passagem celular foi realizada na câmara de fluxo laminar para manter o ambiente estéril e consistiu em observar a confluência das células ao microscópio (figura 2.3.A), descartar o sobrenadante (meio) (figura 2.3.B), lavar o frasco de cultura com tripsina 0.25% EDTA e a subsequente tripsinização (figura 2.3.C). Neste processo, foi adicionada tripsina ao frasco de cultura, colocando-o na incubadora a 37°C para promover a desagregação das células da parede do frasco. Após este processo, a ação da tripsina foi neutralizada com meio de cultura. As células HT29 e LoVo foram cultivadas em meios específicos, Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) com um rácio 1:6 e Ham's F-12K Nutrient Mixture. Kaighn's Mod (F12K 1x) a uma proporção 1:3, respetivamente, ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino (FBS) para favorecer o crescimento celular (figura 2.3.D) e foram colocadas na incubadora (figura 2.3.E). As células Caco-2 foram cultivadas em meio Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM), a um rácio 1:4, suplementado com 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) e 1% de aminoácidos não essenciais (NEAA). Todas as linhas celulares foram cultivadas em monocamada (2D), em frascos de cultura de 75 ou 175 cm², de forma rotineira (cultivadas regularmente) e mantidas numa incubadora a 37°C humidificada com 5% de dióxido de carbono (CO₂). O crescimento celular foi monitorizado diariamente e o meio de cultura foi renovado a cada 3 dias. A deteção de contaminação microbiana foi realizada através da visualização de alterações fisiológicas do meio evidenciadas pelo acelerado metabolismo das bactérias.

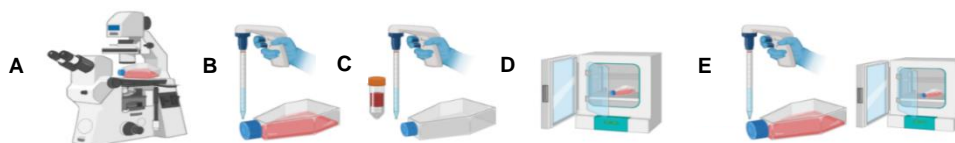


Figura 2.3. Ilustração do procedimento experimental para a cultura celular em modelos 2D.

A. Observação da confluência das células; B. Descarte do sobrenadante; C. Tripsinização celular; D. Subcultivo das células em meio de cultura; E. inserção das células na incubadora importante para o seu crescimento (Adaptado de Biorender).

2.2.3.2. Ensaio antiproliferativo em linhas celulares HT29 e LoVo em modelos 2D

O ensaio antiproliferativo consistiu na avaliação da viabilidade celular das linhas celulares HT29 e LoVo, após a exposição a diferentes compostos/extratos: extrato de azeite, amostras de digestão do intestino delgado (lúmen e dialisado) e do cólon bem como os metabolitos presentes nessas amostras de digestão (hidroxitirosol, tirosol, ácido ursólico, luteolina, álcool 3-hidroxibenzilo, ácido maslínico, ácido metilmalónico, ácido 4-hidroxibenzóico, 4-metilcatecol, apigenina, ácido oleico, oleaceína, oleocantal, ácido salicílico, ácido desoxicólico, diosmetina e ácido *p*-cumárico). Antes da realização deste ensaio, foi necessário visualizar a confluência das células ao microscópio, realizar a passagem celular conforme descrito anteriormente e fazer a contagem celular utilizando o contador de células. A contagem consistiu em retirar uma amostra da suspensão celular do frasco de cultura, colocar 100 µL do corante *Trypan blue* e 100 µL de suspensão numa microplaca de 96 poços e posteriormente colocar 10 µL desta mistura no contador de células. O *Trypan Blue* é um corante que permite observar a diferenciação entre células vivas e mortas pois penetra nas células com a membrana danificada tornando-as coradas. Posteriormente, uma suspensão celular contendo 1×10^5 células/mL, foi preparada e inoculada nos 60 poços internos de uma microplaca de 96 poços (figura 2.4). Os restantes poços foram preenchidos com água estéril, de forma a evitar a evaporação. Após a inoculação, as microplacas foram incubadas a 37°C, numa atmosfera contendo 5% de CO₂, durante 24h.



Figura 2.4. Ilustração da inoculação das microplacas com a suspensão celular HT29 e LoVo (Adaptado de Biorender).

Após as 24h confirmou-se ao microscópio se as células estavam aderentes, e estas foram então incubadas com diferentes concentrações de amostras/compostos diluídas (tabela 2.3) durante 72h a 37°C, 5% CO₂. As células incubadas apenas com meio de cultura suplementado com 0.5% FBS foram consideradas como controlo, e as células incubadas com o solvente correspondente ao composto a ser testado, diluído em meio com 0.5% FBS, foram usadas como controlo solvente (figura 2.5).

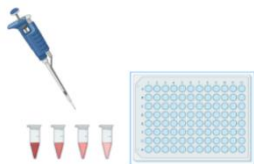


Figura 2.5. Ilustração da incubação das células HT29 e LoVo com diferentes compostos (Adaptado de Biorender).

Na tabela 2.3 estão representadas as concentrações utilizadas do extrato de azeite e dos metabolitos detetados nas frações da digestão, nos ensaios antiproliferativos e de citotoxicidade em modelos 2D, nas linhas celulares de CCR- HT29 e LoVo e na linha celular Caco-2.

Tabela 2.3. Concentrações utilizadas no extrato de azeite e nos metabolitos em modelos 2D nas linhas celulares HT29, LoVo e Caco-2.

Metabolito	Concentrações
Extrato de azeite	0.0059 – 0.188 mg/mL
Ácido metilmalónico	31.3 – 1000 µM
Álcool 3-hidroxibenzilo	31.3 – 1000 µM
Hidroxitirosol	6.12 – 400 µM
Tirosol	31.3 – 1000 µM
Ácido maslínico	3.06 – 100 µM
Ácido ursólico	3.06 – 100 µM
Luteolina	12.5 – 400 µM
Ácido 4-hidroxibenzoico	125 – 1000 µM
4-metilcatecol	31.3 – 1000 µM
Apigenina	12.5 – 1000 µM
Ácido oleico	0.6 – 5 µM
Oleaceína	12.5 – 1000 µM
Oleocantal	12.5 – 1000 µM
Ácido salicílico	125 – 1000 µM
Ácido desoxicólico	31.3 – 500 µM
Diosmetina	12.5 – 1000 µM
Ácido <i>p</i> -cumárico	12.5 – 1000 µM

Para avaliar a viabilidade celular, 72h após a incubação, utilizou-se um reagente fluorimétrico, o *PrestoBlue*TM que é utilizado na câmara de fluxo laminar com a luz desligada de modo a evitar a sua degradação. Este método, rápido e não destrutivo, permite a reutilização das células para ensaios adicionais, bastando limpar os poços. O *PrestoBlue*TM é um reagente baseado na resazurina, um composto que é reduzido a resorufina fluorescente em células metabolicamente ativas. Isso permite a medição da atividade metabólica das células, que está diretamente relacionada à viabilidade celular. Uma maior intensidade de fluorescência indica uma maior viabilidade celular [191].

As células foram submetidas a duas lavagens com PBS e posteriormente o reagente *PrestoBlue*TM, diluído numa proporção de 1:20, foi adicionado a cada poço e a microplaca foi incubada durante 2h (figura 2.6). Posteriormente, a microplaca foi lida num leitor de microplacas de fluorescência

com uma excitação de 560 nm e uma emissão de 590 nm e os resultados foram expressos em termos de percentagem de células vivas em comparação com o controlo. As experiências foram realizadas em triplicado (exceto as amostras de digestão) e todos os resultados foram apresentados como, média \pm desvio padrão. O tratamento estatístico e o valor de EC_{50} (concentração da amostra necessária para reduzir 50% da população celular após 72h de incubação) foram calculados pelo *software GraphPad Prism 10*.



Figura 2.6. Ilustração da avaliação da viabilidade celular em HT29 e LoVo através do reagente *PrestoBlue™* (Adaptado de Biorender).

2.2.3.3. Ensaio da citotoxicidade em linha celular Caco-2 em modelos 2D

Para observar os efeitos da citotoxicidade de um composto, são utilizadas células Caco-2 confluentes como modelo do epitélio intestinal humano. Com este ensaio avaliamos o grau em que um composto pode causar danos às células saudáveis. As células expostas a compostos citotóxicos podem sofrer necrose, apoptose, autofagia ou parar de crescer / dividir ativamente para diminuir a proliferação celular. Na descoberta de medicamentos, os compostos com efeito citotóxico normalmente são eliminados pois podem afetar também as células normais e não só as cancerígenas. Por outro lado, os compostos que atuam apenas em células cancerígenas são promissores para o tratamento do cancro [192]. Antes de realizar este ensaio visualizou-se a confluência das células ao microscópio, realizou-se a tripsinização e fez-se a contagem celular. Posteriormente, preparou-se uma suspensão celular com densidade de 2×10^5 células/mL (figura 2.7) através da diluição das células no respetivo meio de cultura celular (DMEM) suplementado com 10% FBS. Esta suspensão foi posteriormente inoculada nos poços internos de uma microplaca com 96 poços, enquanto os poços restantes contém água destilada estéril.

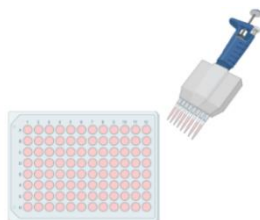


Figura 2.7. Ilustração da inoculação das microplacas com a suspensão celular Caco-2 (Adaptado de Biorender).

Ao contrário do que acontece com as células LoVo e HT29, só 8 dias após a inoculação é que as células de Caco-2 são incubadas com diferentes concentrações de amostras/compostos diluídas (extrato de azeite e metabolitos) (tabela 2.3), em meio de cultura suplementado com 0.5% FBS (figura 2.8).

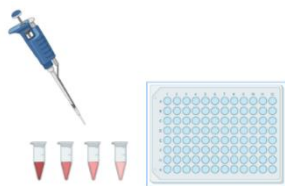


Figura 2.8. Ilustração da incubação das células Caco-2 com diferentes compostos (Adaptado de Biorender).

Após a incubação dos compostos durante 72h, as células foram submetidas a duas lavagens com PBS, e a viabilidade das células foi observada através do reagente *PrestoBlue*[™] e avaliada através de um fluorímetro (figura 2.9), como descrito anteriormente. Foram avaliados os valores por IC₅₀ e a viabilidade celular foi expressa em percentagem de células vivas relativamente ao controlo. As experiências foram realizadas em triplicado e todos os resultados foram apresentados como, média ± desvio padrão. Para calcular o IC₅₀ e para fazer tratamento estatístico utilizou-se o *software GraphPad Prism 10*.



Figura 2.9. Ilustração da avaliação da viabilidade celular em Caco-2 através do reagente *PrestoBlue*[™] (Adaptado de Biorender).

2.2.3.4. Silanização e esterilização do *spinner* (3D)

O processo de silanização é importante para reduzir a hidrofilicidade das superfícies de vidro e obter características hidrofóbicas. Este tratamento é essencial para preparar a superfície do frasco de cultura, garantindo que as células não se aderem. Para isto, foi utilizada uma solução de Hidróxido de Potássio (KOH), como agente de limpeza no frasco para remover o silano existente. De seguida, este foi lavado com água destilada e um volume de fenolftaleína foi adicionado para verificar a eficácia da lavagem. A fenolftaleína atua como indicador ácido-base e em meio básico (pH=8.2-10) muda a sua coloração para rosa, logo, se houver alteração de cor, o processo de lavagem do *spinner* teria de ser repetido. Após garantir a limpeza adequada, uma pequena quantidade de silano foi aplicada ao *spinner* e deixado a atuar durante 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se tolueno, um solvente orgânico utilizado para dissolver o silano em excesso e facilitar a sua aplicação uniforme sobre a

superfície. De seguida, o *spinner* foi deixado a secar ao ar e autoclavado de modo a garantir a esterilização.

2.2.3.5. Cultura celular 3D em *spinner* utilizando a linha celular LoVo

O objetivo da cultura celular em modelos 3D é obter agregados de esferóides de células LoVo com características de tumores sólidos. Em 3D há uma maior reprodução do comportamento tumoral *in vivo* do que em 2D, e são usados para garantir uma avaliação precisa do potencial anticancerígeno de compostos [171,172].

A cultura celular em modelos 3D foi iniciada com a passagem e a contagem celular descritas anteriormente. Após a contagem, foram realizados os cálculos para o inóculo e o volume calculado foi retirado do *spinner* e colocado num tubo de *falcon* de 15 mL. Centrifugou-se a 200 xg, por 10 minutos para remover a tripsina; após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionados 4 mL de meio de cultura F12K suplementado com 10% FBS ao tubo de *falcon*. O *pellet* foi ressuspensionado para destruir os agregados celulares. Em seguida, foram adicionados 56 mL de meio de cultura ao *spinner* sendo posteriormente colocado num agitador magnético, a uma velocidade de 40 rotações por minuto (rpm). Acrescentou-se ao *spinner* os 4 mL do *pellet* ressuspensionado do tubo de *falcon* (com uma densidade de 2.5×10^5 células/mL), totalizando 60 mL de volume (figura 2.10).

Para a linha celular LoVo, o *spinner* foi colocado 4h na incubadora com uma atmosfera humidificada a 37°C, com 5% CO₂ em agitação (40 rpm) para formar agregados. Após as 4h, retirou-se uma alíquota de 500 µL para confirmar a existência de agregados de esferóides (aproximadamente 3 a 10 células juntas) e posteriormente acrescentou-se o restante volume (40 mL) para perfazer até aos 100 mL (volume final) e aumentou-se a rotação para 50 rpm. 23h após o inóculo alterou-se a rotação para os 60 rpm e manteve-se assim durante 8 dias. A partir do 4º dia e até ao 7º dia retirou-se 50 mL de meio do *spinner* e colocou-se 50 mL de meio novo. O *spinner* foi colocado na incubadora durante 8 dias, até ao dia do ensaio antiproliferativo, com as tampas parcialmente abertas para permitir a oxigenação.

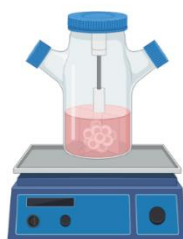


Figura 2.10. Ilustração do método de cultura dos esferóides de LoVo (Adaptado de Biorender).

2.2.3.6. Ensaio antiproliferativo utilizando esferóides LoVo

O objetivo do ensaio foi avaliar o potencial efeito antiproliferativo dos compostos em esferóides LoVo, obtidos no 8º dia de cultura. Os metabolitos selecionados para testar em modelos 3D foram os que obtiveram resultados mais promissores em modelos 2D: álcool 3-hidroxibenzilo, hidroxitirosol, ácido maslínico, ácido ursólico, luteolina, ácido oleico, 4-metilcatecol e apigenina. Foram selecionados com base no seu valor de EC₅₀ (um menor valor de EC₅₀ corresponde a um maior efeito antiproliferativo), classificação e localização na amostra.

Para a realização do ensaio antiproliferativo em modelos 3D, o *spinner* contendo os esferóides foi mantido em agitação para facilitar a colheita dos mesmos (figura 2.11.F). Foi realizada uma diluição 1:1 em meio de cultura F12K com 10% FBS e esta solução foi inoculada numa microplaca de 96 poços utilizando pontas de micropipeta cortadas para evitar a desagregação e destruição dos esferóides. Foi adicionado a cada poço da microplaca, 100 µL da solução e foram incluídos os controlos e o branco (meio de cultura e *Trypan Blue*) (figura 2.11). A microplaca foi analisada ao microscópio, para assegurar a presença de esferóides (figura 2.11.G). Antes do tratamento com os compostos, a viabilidade celular foi avaliada no tempo inicial (t=0h) e após 72h (t=72h) de modo a comparar as possíveis alterações na viabilidade celular ao longo do tempo. Para isso, ao t=0h foram adicionados 10 µL de *PrestoBlue*TM a cada poço e as microplacas foram incubadas 2h (figura 2.11.H). Posteriormente as microplacas foram centrifugadas a 200 ×g durante 5 minutos e observadas ao microscópio de modo a localizar os esferóides e garantir que apenas o sobrenadante é removido. O sobrenadante foi transferido para uma microplaca preta de 96 poços pela mesma ordem e a fluorescência foi medida no fluorímetro. Realizaram-se as diluições apropriadas das concentrações de cada composto (tabela 2.4) e adicionaram-se a cada poço da microplaca transparente. A microplaca foi analisada ao microscópio, para confirmar se nenhum esferóide foi removido inadvertidamente. Foram incubadas as microplacas transparentes a 37°C, 5% CO₂ na incubadora durante 72h.

Tabela 2.4. Concentrações utilizadas nos metabolitos em modelos 3D na linha celular LoVo.

Metabolito	Concentrações (µM)
Álcool 3-Hidroxibenzilo	500 – 40 000
Hidroxitirosol	500 – 4000
Ácido maslínico	12.5 – 100
Ácido ursólico	125 – 1000
Luteolina	50 – 400
4-metilcatecol	125 – 1000
Apigenina	125 – 1000
Ácido Oleico	0.6 – 10

Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 200 \times g durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100 μ L de PBS a cada poço para a lavagem. Centrifugou-se novamente nas mesmas condições e em seguida foi adicionado o reagente *PrestoBlue*[™] diluído num rácio 1:10 e incubou-se durante 2h. As microplacas foram lidas no fluorímetro após este tempo de incubação. O ensaio foi realizado em 6 ensaios independentes e foi efetuado utilizando 6 réplicas de cada concentração de composto; os resultados foram expressos em termos de percentagem de inibição de crescimento em relação ao controlo. Todos os valores de EC₅₀ foram calculados a partir de curvas de dose-resposta utilizando o *software GraphPad Prism 10*. A estatística foi realizada através do *software One-way ANOVA*. O *One-way ANOVA* e o teste *Post-hoc Tukey-HSD* são testes de comparações múltiplas utilizados em conjunto para uma análise mais completa de diferenças entre vários grupos. O *One-way ANOVA* permite comparar as médias de três ou mais grupos, de modo a verificar se existe diferença estatisticamente significativa entre eles. O *Tukey-HSD* identifica quais ou grupos que têm médias significativamente diferentes caso o *ANOVA* indique que existe diferença significativa [193].

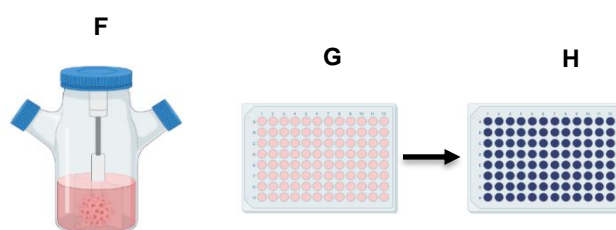


Figura 2.11. Ilustração do ensaio antiproliferativo em modelos 3D.
F. esferóides em agitação; G. inoculação dos esferóides em microplaca; H. Avaliação da viabilidade celular através do reagente *PrestoBlue*[™] (Adaptado de Biorender).

2.2.4. Ensaio de ALDEFLUOR™ através da citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para medir e analisar as características físicas e químicas de partículas num fluido. As células ou as partículas em suspensão são alinhadas e passam por um feixe de laser. Os detetores medem a dispersão da luz e a fluorescência é emitida. Existem diferentes parâmetros a serem medidos, tais como: o **tamanho da célula** que é determinado pela dispersão frontal da luz (FSC), **complexidade da célula** determinada pela dispersão lateral da luz (SSC) e a **fluorescência** que é determinada por fluorocromos ligados a anticorpos ou marcadores específicos [194].

O ensaio de ALDEFLUOR™ é uma técnica específica para identificar, avaliar e isolar células estaminais normais e cancerígenas baseadas na atividade da enzima aldeído desidrogenase (ALDH1). A alta expressão de ALDH1 foi relatada em várias linhas celulares: mamárias, endoteliais e neurais. O kit ALDEFLUOR™ contém um substrato fluorescente não tóxico, o BODIPY-aminoacetaldeído (BAAA), para ALDH1, que se difunde livremente em células intactas e viáveis. Na presença de ALDH1, o substrato BAAA é convertido em BODIPY-aminoacetato (BAA), um produto carregado negativamente que é retido dentro das células. As células com alta atividade de ALDH1 acumulam intracelularmente o BAA o que leva ao aumento da fluorescência, e podem ser analisadas por citometria de fluxo [195,196]. Através deste kit os objetivos foram **identificar a subpopulação de CECs** presentes na linha celular LoVo, através do reagente ALDEFLUOR™, pois as células metabolizam este reagente e tornam-se fluorescentes, sendo detetadas por citometria de fluxo com laser azul. Por outro lado, foi importante perceber se existiu **diminuição da subpopulação de CECs** quando os esferóides das LoVo foram incubados com compostos a diferentes concentrações (tabela 2.5) com efeito antiproliferativo (luteolina, hidroxitirosol, ácido oleico e ácido maslínico).

Tabela 2.5. Concentrações utilizadas nos metabolitos no ensaio de citometria de fluxo utilizando o kit ALDEFLUOR™

Metabolito	Luteolina	Hidroxitirosol	Ácido oleico	Ácido maslínico
Concentrações (µM)	50 e 100	125, 250 e 500	1.5 e 3	12.5 e 25

O ensaio consistiu em colocar 1 mL de esferóides LoVo em cada poço numa microplaca de 12 poços, seguido de uma centrifugação a 200 xg, 10 minutos, a 27°C, após o que se retirou o sobrenadante sem remover os esferóides e colocou-se as diluições dos compostos feitas previamente.

Incubou-se a microplaca durante 72h, e após este período de incubação os esferóides foram recolhidos para *ependorfs*, centrifugados, lavados com PBS e dissociados com tripsina. Por fim, fez-se a contagem celular de cada *ependorf*, os respetivos cálculos de inóculo e colocou-se o inóculo em novos *ependorfs* com uma densidade de 1×10^6 células/mL. Centrifugou-se, retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se no tampão ALDEFUOR™. Após isto, o kit ALDEFUOR™ foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. São necessários 2 *ependorfs* para cada condição: 1 *ependorf* com células e 5 μ L do reagente ALDEFUOR™ (tubo teste) e um controlo negativo apenas com 5 μ L do reagente DEAB (inibidor de fluorescência). Retirou-se 500 μ L do tubo teste e colocou-se no tubo controlo, incubaram-se os *ependorfs* durante 45 minutos a 37°C, 5% CO₂; após incubação, centrifugou-se, ressuspendeu-se o *pellet* em 500 μ L de tampão ALDEFUOR™ e os *ependorfs* foram colocados em gelo até ser feita a análise das amostras. Antes de as amostras serem avaliadas no citómetro *Guava* (figura 2.12), estas foram homogeneizadas e filtradas de modo a evitar aglomerados. A análise de dados foi efetuada através do *software* *GuavaSoft* e foi feita a leitura de 5000 eventos/amostra a uma taxa de fluxo de 100-500 eventos/segundo. A atividade da ALDH1 das condições de tratamento foi normalizada relativamente ao controlo solvente (CS), dividindo o valor da fluorescência medida das amostras pelo valor da fluorescência do CS.

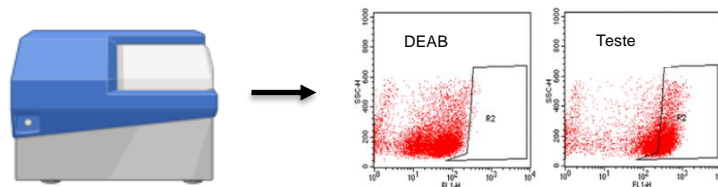


Figura 2.12. Ilustração do ensaio ALDEFUOR™ através da citometria de fluxo.

Os esferóides LoVo foram incubados com hidroxitirosol, luteolina, ácido maslínico e ácido oleico. Após 72h realizou-se o ensaio através do kit ALDEFUOR™. Teste: contém o reagente ALDEFUOR™ (fluorescente); DEAB: inibidor de fluorescência (Adaptado de Biorender).

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização fitoquímica do extrato de azeite virgem extra rico em compostos fenólicos

3.1.1. Caracterização fitoquímica do extrato de azeite

O extrato de azeite foi preparado pelo iBET por extração convencional utilizando três tipos de azeite virgem. O extrato obtido foi analisado por cromatografia, nomeadamente HPLC-DAD-ED-FD para a identificação de compostos. Os resultados para a concentração de fenólicos totais, hidroxitirosol e tirosol estão presentes na tabela 3.1. O perfil cromatográfico correspondente ao extrato de azeite com a identificação dos picos do hidroxitirosol e tirosol está presente na figura 7.1 (em anexo).

Tabela 3.1. Caracterização fitoquímica do extrato de azeite.

Composto fenólico	Concentração (mg/g extrato seco)
Compostos Fenólicos Totais	63.7 mg EAG/g*
Hidroxitirosol	12.81 mg/g
Tirosol	12.25 mg/g

* miligramas de equivalentes de ácido gálico

Este extrato foi utilizado nos ensaios de digestão *in vitro* utilizando o modelo SHIME®. Os ensaios foram realizados em triplicado com 0.4 g de extrato (que corresponde a 60 g de azeite – equivalente a 3 colheres de sopa).

3.1.2. Deteção dos metabolitos presentes nas amostras de digestão *in vitro*

A análise metabolómica das amostras de digestão obtidas no SHIME® por UHPLC Q-Orbitrap possibilitou a deteção de vários metabolitos que foram testados posteriormente em ensaios de bioatividade. Na tabela 3.2 foram compilados os 17 metabolitos classificados em diferentes classes de compostos, e detetados nas diferentes amostras recolhidas ao longo do TGI (intestino delgado lúmen e dialisado e cólon).

Tabela 3.2. Classificação dos metabolitos presentes nas amostras de digestão *in vitro* por ULHPC Q-Orbitrap

Metabolito ID	Fórmula química	Massa exata (ppm)	Massa molecular (experimental)	Correspondência <i>mzCloud</i>	<i>mz Logic</i>	Amostras (Detecção)				Classificação
						Lúmen Intestinal**	Dialisado**	Cólon**	Extrato de azeite	
Ácido Metilmalónico	C ₄ H ₆ O ₄	-1.12	118.03	97.10	-	X	-	X	-	Ácido Dicarboxílico
Álcool 3-Hidroxibenzilo	C ₇ H ₈ O ₂	-0.95	124.05	92.40	-	X	-	-	X	Fenol simples
Hidroxitirosol*	C ₈ H ₁₀ O ₃	-0.81	154.06	-	68.10	X	X	X	X	Fenol simples
Tirosol	C ₈ H ₁₀ O ₂	-0.97	138.07	-	60.18	-	-	-	X	Fenol simples
Ácido Maslínico*	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	-1.14	472.35	98.40	-	X	X	X	X	Ácido triterpénico
Ácido Ursólico*	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	-1.03	456.36	-	89.01	X	X	X	X	Ácido triterpénico
Luteolina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-0.72	286.05	72.00	-	X	-	-	X	Flavonóide
Oleaceína	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	-0.66	320.13	-	33.42	-	-	-	X	Secoiridóides

Oleocantal	C ₁₇ H ₂₀ O ₅	-0.66	304.13	-	26.91	-	-	-	X	Secoiridóides
Ácido Oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	-1.26	282.26	99.90	-	X	-	-	X	Ácidos gordos de cadeia longa
Ácido Desoxicólico	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	-0.81	392.29	-	34.73	-	-	-	X	Ácido biliar
Diosmetina	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	-0.68	300.06	81.70	-	-	-	-	X	Flavonóide
4-Metilcatecol	C ₇ H ₈ O ₂	-0.95	124.05	92.40	-	X	-	-	X	Catecol
Ácido 4-Hidroxi benzoico	C ₇ H ₆ O ₃	-0.95	124.05	92.40	-	X	-	-	X	Ácido Monohidroxibenzoico
Ácido salicílico	C ₇ H ₆ O ₃	-0.91	138.03	94.30	-	-	-	-	X	Ácido Monohidroxibenzoico
Ácido p-cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	-0.73	164.04	99.70	-	-	-	-	X	Ácido hidroxicinâmico
Apigenina*	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	-0.96	270.05	80.30	-	X	X	X	X	Flavonóide

¹ **As amostras de digestão do intestino delgado: lúmen e dialisado foram identificadas às 1.5h, 3h e 4.5h e do cólon às 0h, 6h, 24h e 48h.
*Compostos identificados por comparação com padrões.

Durante a simulação da digestão do extrato de azeite pelo SHIME®, os compostos fenólicos do azeite podem ser modificados por meio dos ácidos do estômago e por outros processos de digestão [197]. Os compostos fenólicos sofrem hidrólise no estômago, passam pelo intestino delgado e apenas alguns chegam ao intestino grosso onde podem ser metabolizados pela microbiota residente [198]. Os compostos que não chegam ao cólon geralmente são absorvidos, metabolizados ou excretados pela urina. A transformação dos compostos fenólicos pela microbiota intestinal pode influenciar o potencial terapêutico dos compostos. Além disso, as fermentações dos compostos fenólicos também podem gerar produtos, como ácidos gordos e fenóis simples que beneficiam o ambiente intestinal [199].

Na tabela 3.2 estão indicados os metabolitos identificados nas diferentes frações (intestino delgado e cólon). Alguns metabolitos foram apenas encontrados no extrato inicial - tirosol, oleaceína, oleocantal, ácido desoxicólico, diosmetina, ácido salicílico e ácido *p*-cumárico, e não foram detectados nas amostras de digestão ao longo do TGI, tendo sido metabolizados e originados novos metabolitos [200]. A título de exemplo, a hidrólise da oleuropeína no TGI origina o hidroxitirosol [201].

Há compostos que foram identificados tanto no extrato não digerido como nas frações provenientes do intestino delgado (lúmen), nomeadamente: ácido 4-hidroxibenzóico, 4-metilcatecol, ácido oleico, luteolina, e álcool 3-hidroxibenzilo. A presença destes compostos no intestino delgado sugere que são estáveis à hidrólise ácida e à ação enzimática no estômago [197]. No intestino delgado, as enzimas podem metabolizar estes compostos, convertendo-os em formas mais simples, deixando de aparecer nas amostras do cólon [200]. O ácido metilmalónico está presente no cólon e no intestino delgado (lúmen) mas não foi detectado no azeite, o que significa que a produção deste composto pode ser favorecida pela interação entre a microbiota e os produtos de digestão do azeite [202].

O hidroxitirosol é um dos principais compostos fenólicos no extrato de azeite com importantes propriedades bioativas, e é por isso de extrema importância para aplicações farmacêuticas e de cosmética. Tem propriedades anti-inflamatórias, anticancerígenas e antioxidantes. O hidroxitirosol é absorvido e excretado dependendo da matriz onde se encontra (aquosa ou oleosa) e a sua absorção (cerca de 66%) ocorre no intestino delgado e no cólon por transporte passivo através do epitélio intestinal [203]. O hidroxitirosol, ácido maslínico, ácido ursólico e apigenina foram identificados por comparação de padrões tanto no extrato de azeite como em todas as frações do TGI (intestino delgado lúmen e dialisado e colon) (figura 7.2 em anexo) podendo produzir efeito no local desejado.

A identificação destes metabolitos nestas amostras pode fornecer informações acerca da bioacessibilidade e da absorção destes compostos, pois a sua presença nas frações do intestino delgado e no cólon já é um bom indicador de que são suficientemente estáveis e biodisponíveis para passar pelo TGI. A presença destes metabolitos no cólon sugere que o composto pode ser resultado do metabolismo e degradação no intestino delgado (glicuronídeos e sulfatos) por bactérias intestinais, resultando em novos metabolitos [204]. A deteção dos compostos hidroxitirosol, ácido maslínico, ácido ursólico e apigenina nas amostras do cólon recolhidas nos vários tempos de fermentação (0h, 6h, 24h e 48h) indica que estes são resistentes ao processo de metabolização pela microbiota intestinal, permanecendo no cólon por longos períodos, pelo menos durante 48h, e contribuindo para exercer efeito local [205]. A sua presença prolongada pode indicar que os compostos poderão ter efeitos locais, modulando a atividade da microbiota ou influenciando processos inflamatórios, antioxidantes e

oxidativos do cólon [206]. A redução do *stress* oxidativo e da inflamação pelos metabolitos pode contribuir para a proteção contra o CCR. Relativamente ao hidroxitirosol, durante a fermentação este pode ser transformado em vários metabolitos como ácidos fenilacéticos hidroxilados, que são mais estáveis que o hidroxitirosol livre. A deteção destes compostos ao longo das várias frações recolhidas, nomeadamente intestino delgado e cólon, sugere que mesmo após a fermentação, os compostos e os seus derivados permanecem ativos para a saúde do cólon. Estudos *in vivo* e *in vitro* indicaram que o hidroxitirosol [207], a apigenina [208], o ácido ursólico [209] foram identificados nas fezes de animais após o consumo de azeite o que significa que passaram pelo cólon, o que vai de acordo com os resultados obtidos.

A capacidade destes metabolitos conseguirem chegar ao cólon e serem identificados em todas as frações do TGI mostra que estes metabolitos são resistentes às variações de pH e ação das enzimas ao longo do percurso gastrointestinal. Esta estabilidade e resistência poderá estar relacionada com algumas características estruturais e indica que estes compostos conseguem exercer os seus efeitos antioxidante, anti-inflamatório e anticancerígeno em diferentes partes do corpo, nomeadamente o intestino e o cólon que estão associados a doenças inflamatórias e degenerativas [210].

O ácido maslínico e o ácido ursólico estão em maior quantidade no lúmen às 1.5h e 3h, dialisado às 3h e cólon às 6h. A apigenina encontra-se maioritariamente no lúmen às 3h, dialisado às 3h e 4.5h e cólon às 0h. O hidroxitirosol está em maior quantidade no lúmen às 1.5h, dialisado às 3h e cólon às 24h e 48h (figura 7.2 em anexo). A diferente distribuição temporal dos compostos ao longo do TGI poderá estar relacionada com diferentes fatores, tais como: absorção e metabolização dos compostos; interação com diferentes partes do TGI; degradação enzimática dos compostos; propriedades químicas (solubilidade); reações de oxidação, desidroxilação e descarboxilação poderão ser importantes para os metabolitos conseguirem alcançar todo o TGI pois a remoção de grupos -OH e -COOH podem torná-los mais estáveis e capazes de ultrapassar barreiras celulares [211].

Os compostos identificados nas várias frações do TGI durante a digestão *in vitro* são relevantes comparativamente com aqueles encontrados apenas no extrato de azeite. Isto porque ao serem detetados nas frações, esses compostos mostram capacidade de resistir à ação das enzimas, o que sugere que podem exercer os seus efeitos anti-inflamatórios, anticancerígenos e antioxidantes nos locais-alvo do organismo. Assim, e apesar do azeite ser composto por uma diversidade de substâncias, a presença desses compostos ao longo do TGI indica uma maior eficácia biológica, estando ativos nos locais onde o cancro pode ocorrer. A solução mais adequada para garantir que um metabolito isolado atinja o seu local-alvo, quando isso não acontece naturalmente, é a utilização de nanocápsulas, permitindo a libertação controlada do metabolito diretamente no tecido ou órgão de interesse [212].

De acordo com os resultados obtidos na caracterização das várias frações, e tendo em consideração os efeitos bioativos já associados a cada composto, foram selecionados os seguintes metabolitos para estudos do efeito antiproliferativo em células de CCR nas fases seguintes desta tese: hidroxitirosol, tirosol, ácido ursólico, luteolina, álcool 3-hidroxibenzilo, ácido maslínico, ácido

metilmalónico, ácido 4-hidroxibenzóico, 4-metilcatecol, apigenina, ácido oleico, oleaceína, oleocantal, ácido salicílico, ácido desoxicólico, diosmetina e ácido *p*-cumárico.

3.2. Efeito antiproliferativo do extrato de azeite, amostras de digestão e metabolitos no modelo 2D da linha celular HT29

3.2.1. Efeito antiproliferativo do extrato de azeite virgem extra rico em compostos fenólicos em células HT29

Como mencionado anteriormente, o extrato de azeite é constituído por compostos fenólicos e é uma gordura monoinsaturada com propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e anticancerígenas. Neste estudo, o extrato de azeite, as amostras de digestão (intestino delgado e cólon) e os metabolitos detetados foram utilizados de modo a verificar o seu potencial efeito antiproliferativo na linha celular de CCR- HT29, modelo mais usado em estudos de atividade anticancerígena, após 72h de incubação. Paralelamente foram realizados testes de citotoxicidade no modelo 2D na linha celular Caco-2, que apesar de ser uma linha de CCR, quando confluenta apresenta características de enterócitos mimetizando o epitélio intestinal. O foco deste estudo é de avaliar se os compostos têm um efeito antiproliferativo em células cancerígenas (HT29), diminuindo a sua viabilidade celular pelo menos em 50% e não causarem citotoxicidade em células saudáveis (Caco-2).

Os conceitos de EC_{50} e IC_{50} são fundamentais para a farmacologia e bioquímica para quantificar a eficácia dos compostos anticancerígenos em células tumorais. O valor de EC_{50} (concentração efetiva 50%) é a concentração de um composto que dá metade da resposta máxima, e neste estudo representa a concentração de amostra necessária para diminuir em 50% a viabilidade celular. O valor de IC_{50} (concentração inibitória 50%) é a concentração de um inibidor onde a resposta é reduzida pela metade, permitindo assim, neste caso, perceber o quão citotóxicos os compostos são para as células saudáveis [213].

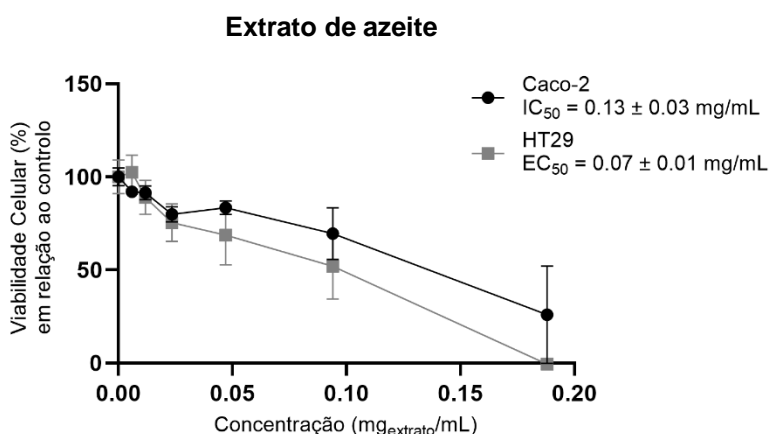


Figura 3.1. Curva dose-resposta após 72h de incubação do extrato de azeite nas linhas celulares HT29 e Caco-2 em modelos 2D (resultados: média \pm SD (n=3)).

A figura 3.1 representa a curva dose-resposta após 72h de incubação do extrato de azeite em células HT29 e Caco-2 de modo a verificar o seu potencial efeito antiproliferativo e de citotoxicidade, respetivamente. Existe uma redução de 50% da viabilidade celular em ambas as linhas celulares à medida que a concentração de extrato de azeite aumenta, sendo que as células HT29 obtiveram um valor de EC_{50} de $(0.07 \pm 0.01 \text{ mg/mL})$ e as Caco-2 um valor de IC_{50} de $(0.13 \pm 0.03 \text{ mg/mL})$. O extrato apresentou efeito antiproliferativo em HT29 sendo esse efeito dependente da dose. Contudo, as concentrações testadas também induziram citotoxicidade no modelo Caco-2 que representa o epitélio intestinal. No entanto é de destacar que o valor de EC_{50} é inferior ao valor de IC_{50} sugerindo que este extrato pode ter um efeito promissor na terapia de CCR.

A variação na resposta ao tratamento com extrato de azeite pode ser resultado das diferenças biológicas e moleculares de ambas as linhas celulares, tais como: expressão de genes, perfil de mutações e diferenciação. Os compostos fenólicos presentes no extrato de azeite podem ter efeitos consoante a linha celular. Em células como as Caco-2, que se diferenciam em células do epitélio intestinal, passando a ser considerada uma linha saudável, os compostos fenólicos podem ativar vias de sinalização para promover a sobrevivência e a reparação celular; contrariamente, em células cancerígenas podem promover a apoptose e inibir a proliferação celular [214].

Hipóteses para a diminuição da viabilidade celular em células cancerígenas HT29 através dos compostos do extrato de azeite:

O extrato de azeite é caracterizado por uma elevada concentração (6.4%) de compostos fenólicos potencialmente benéficos para a saúde humana. Diversos estudos demonstram algumas hipóteses para a diminuição da viabilidade celular em células cancerígenas HT29 pelos compostos presentes no extrato de azeite:

- i. A fração insaponificável do extrato de azeite, constituída por triterpenos (ex. ácido maslínico e ácido ursólico) e fitoesteróis [215], poderá demonstrar efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, ao inibir a produção de ROS e a expressão do gene *COX-2* (mediador inflamatório). Esta inibição regula negativamente a via de sinalização *NF- κ B*, reduzindo a expressão de genes inflamatórios (*COX-2*, *TNF α* , *IL-8*, *IL1 β*) impedindo o crescimento do microambiente tumoral [216] em células HT29.
- ii. A sua composição em compostos fenólicos (ex. ácidos fenólicos, hidroxitirosol e tirosol) e de secoiridoides (oleaceína, oleuropeína e oleocantal) no extrato de azeite, pode contribuir para o efeito antioxidante e anticancerígeno em células de CCR como HT29 e SW480 [217,218]. Os ácidos gordos monoinsaturados também podem exercer efeito anticancerígeno em células de CCR através da indução da apoptose e da inibição da proliferação celular (ex. ácido oleico) [215].

- iii. A inibição da fosforilação da proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) através da fração insaponificável do extrato de azeite, pode ser importante para reduzir a proliferação desregulada das células cancerígenas, induzindo apoptose [94,219].
- iv. As células HT29 têm alta expressão do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) que está envolvido na proliferação celular. O EGFR atua como recetor para ligantes de fatores de crescimento como o EGF. Quando os ligantes se ligam ao EGFR, o recetor sofre uma mudança conformacional que ativa a função da tirosina cinase levando ao desencadeamento de uma cascata de sinalização intracelular que promove a proliferação celular. A ativação ou a inibição deste recetor pode influenciar a resposta das células ao tratamento. Se o extrato de azeite interferir na sinalização de EGFR isso pode explicar uma maior sensibilidade das HT29 a este extrato [217].
- v. O sistema endocanabinoide (ECS) é um sistema de sinalização celular, presente em células normais e cancerígenas, e é importante na regulação de várias funções fisiológicas, como dor e inflamação. As principais moléculas são a anandamida (AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), que funcionam como mensageiros que se ligam aos recetores canabinóides CB1 e CB2 com a função de modular diferentes processos biológicos. O extrato e os seus compostos fenólicos podem influenciar o ECS de maneira a desencadear efeitos anticancerígenos, afetando fatores importantes como a inflamação e a apoptose. Os endocanabinóides quando se ligam aos recetores CB1 e CB2 podem influenciar o crescimento e a sobrevivência das células cancerígenas. A modulação do ECS induzida por compostos fenólicos do extrato de azeite pode ser uma estratégia para prevenir o desenvolvimento do cancro [220,221].
- vi. Os compostos do extrato podem induzir a apoptose através da diminuição de BCL-2 (proteína anti-apoptótica) e aumentando BAX (proteína pró-apoptótica) que envolve a paragem do ciclo celular e a produção de ROS, desenvolvendo danos celulares [222], tal como já foi verificado pelo composto oleuropeína na linha celular HT29.

O extrato de azeite revelou menor citotoxicidade no modelo Caco-2, possivelmente devido às características deste modelo. No estado confluyente, as células Caco-2, têm capacidade para se diferenciar em células epiteliais intestinais e apresentam mecanismos de defesa mais robustos [223]. Contrariamente às células HT29, que são menos diferenciadas e têm características mais proliferativas, as células Caco-2 podem ser mais resistentes a agentes citotóxicos devido à expressão de transportadores de efluxo tais como as proteínas da família MDR (resistência a múltiplos

medicamentos). Estes transportadores são importantes na defesa celular contra agentes tóxicos e xenobióticos [224].

No entanto, o extrato de azeite induziu alguma citotoxicidade em células Caco-2, e este fenómeno pode ser explicado pela regulação negativa do promotor CNR-1, que está sobreexpresso no CCR e que pode resultar numa proliferação reduzida em células Caco-2 em modelos *in vitro* [225]. Para além disto, a inibição da fosforilação da cinase regulada por ERK1/2 e a diminuição da expressão da ciclina D1 pode promover uma baixa proliferação e sobrevivência em células Caco-2 [225].

Tendo em conta os resultados obtidos, e devido ao efeito antiproliferativo do extrato de azeite em células HT29, foi importante testar as amostras de digestão (intestino delgado e cólon) em células HT29 com o objetivo de entender se os compostos derivados da digestão do extrato de azeite apresentam ou não ação antiproliferativa.

3.2.2. Efeito antiproliferativo das amostras de digestão *in vitro* em células HT29

As amostras de digestão obtidas pelo modelo SHIME® foram testadas em células cancerígenas HT29 de modo a verificar o seu potencial efeito antiproliferativo. Para além das amostras derivadas do extrato foram também testados os brancos (sem extrato) do intestino delgado e do cólon. As curvas dose-resposta das várias concentrações testadas são apresentadas na figura 3.2.

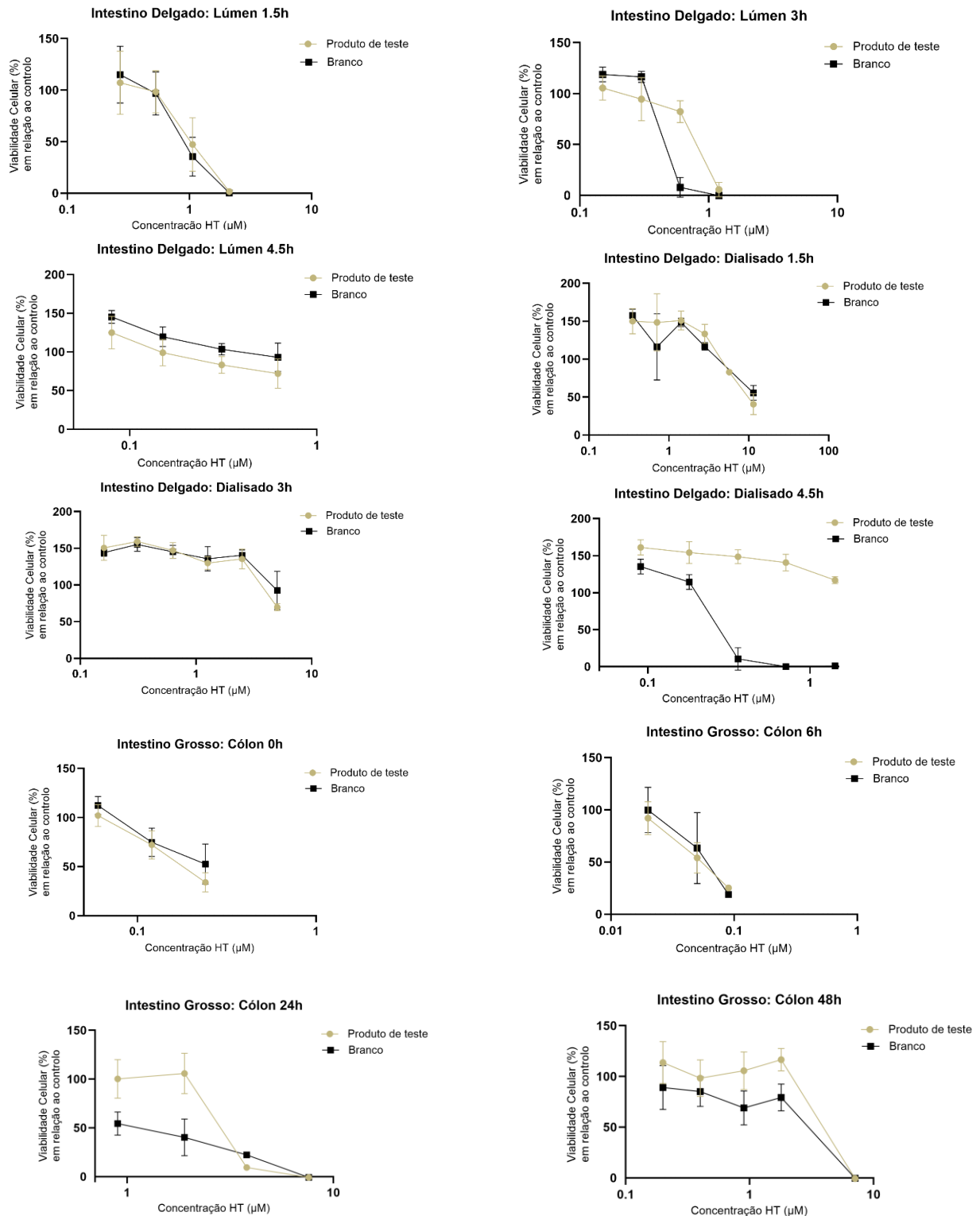


Figura 3.2. Curva dose-resposta após 72h de incubação das amostras de digestão (intestino delgado – lúmen e dialisado e cólon) nas células HT29 em modelos 2D (n=1).

As amostras resultantes da digestão *in vitro* do extrato de azeite obtidas ao longo do TGI nas frações do intestino delgado e cólon, foram utilizadas para verificar o seu potencial efeito antiproliferativo em células HT29. Analisar o efeito destas amostras é importante para entender se os compostos derivados da digestão do extrato de azeite apresentam ou não ação antiproliferativa. Para cada fração recolhida (intestino delgado lúmen e dialisado e cólon) existe um controlo branco (sem extrato) e o produto de teste (com extrato). O objetivo deste ensaio foi determinar se o produto de teste exibia maior efeito antiproliferativo em células HT29, pois contém o extrato de azeite rico em compostos fenólicos que são conhecidos pelas suas atividades antioxidantes e anticancerígenas, em comparação com o controlo branco, que contém apenas as enzimas e fluídos biológicos utilizados no modelo SHIME®. Como é possível observar pelos gráficos obtidos (figura 3.2), os resultados demonstraram que de uma forma geral foi verificado um efeito semelhante para as frações do extrato em comparação com o respetivo branco. Em alguns casos (lúmen 1.5h e 3h; dialisado 1.5h e 4.5h; cólon 24h e 48h), o branco demonstrou até mesmo um efeito antiproliferativo mais acentuado do que as respetivas frações com o extrato. Estes resultados indicam que o processo de digestão não conduziu à formação de metabolitos com maior ação antiproliferativa do que os compostos nativos existentes no extrato antes do processo de digestão. Por outro lado, a existência de efeito no branco pode indicar que estas amostras podem ter alguma citotoxicidade devido aos compostos e soluções que são usados no modelo de digestão *in vitro*. Dada a pequena quantidade de amostras derivadas do processo de digestão, não foi possível realizar ensaios de citotoxicidade em Caco-2 para avaliar esta hipótese.

O facto de o branco ter tido efeito antiproliferativo semelhante ou superior do que o produto de teste poderá ser devido a diferentes fatores, tais como:

- i. Ao longo da digestão no TGI, são utilizadas enzimas digestivas, como a pepsina, lipases, amilases e proteases que são responsáveis pela quebra de macronutrientes em compostos menores [226]. Estas enzimas podem originar compostos com atividade antiproliferativa e citotóxica [227]. Em contacto com o azeite, essa toxicidade poderá ser mascarada.
- ii. A fosfatidilcolina é um fosfolípido encontrado em todas as membranas celulares e é importante na estrutura e função das membranas [228]. A Lisofosfatidilcolina é um produto da hidrólise da fosfatidilcolina e pode influenciar processos biológicos que afetam a proliferação celular e o *stress* oxidativo [229]. O branco pode induzir a hidrólise da fosfatidilcolina pois no TGI as enzimas digestivas podem atuar sobre a fosfatidilcolina promovendo a sua degradação em lisofosfatidilcolina. Esta pode influenciar na proliferação celular uma vez que o ambiente digestivo pode gerar mais ROS.

- iii. No cólon, os ácidos gordos de cadeia curta (AGCCs), em particular o butirato, têm demonstrado efeitos antiproliferativos e indução da apoptose celular [230].
- iv. A microbiota pode gerar compostos tóxicos como a amónia, e causar efeitos adversos na proliferação celular [231].

Por outro lado, também é importante explorar o porquê de as frações derivadas da digestão do extrato perderem atividade ao longo do processo de digestão:

- i. O pH alcalino no intestino delgado e no cólon podem modificar a solubilidade e a estabilidade de compostos, alterando as suas atividades biológicas. Esse ambiente pode afetar a função dos compostos [232]. No intestino delgado e no cólon foram identificados metabolitos com atividades biológicas importantes, logo seria de esperar maior efeito antiproliferativo no produto de teste das amostras. No entanto, também o processo digestivo pode transformar os compostos fenólicos do extrato de azeite em formas que são menos eficazes e com menor efeito.
- ii. O hidroxitirosol está descrito como tendo atividade anticancerígena e antioxidante [233]. No intestino delgado (lúmen e dialisado) a sua concentração diminui (tabela 7.1 em anexo), logo, o seu efeito antiproliferativo também poderá diminuir, o que poderá justificar a falta de efeito. No cólon, a concentração aumenta, pois, como o hidroxitirosol sofre hidrólise e existe quebra de ligações [234], pode libertar compostos que sejam mais estáveis, mas menos eficazes e que tenham pouca atividade antiproliferativa.
- iii. O ácido metilmalónico é um metabolito presente naturalmente no corpo humano e está relatado na literatura científica que promove a progressão do cancro [202]. Assim, este metabolito poderá alterar as propriedades do extrato de azeite, diminuindo o seu efeito antiproliferativo. O ácido metilmalónico também pode modificar o ambiente bioquímico, alterando a eficácia dos compostos fenólicos no extrato, diminuindo o seu efeito antiproliferativo.

Estudos futuros devem ser realizados de forma a tentar perceber o impacto da digestão sobre os compostos fenólicos do extrato do azeite. No âmbito desta tese não foi possível avaliar em maior detalhe a ação das várias amostras em diferentes linhas celulares e analisar a possibilidade de purificar as amostras de forma a remover potenciais compostos interferentes derivados do processo de digestão. Como alternativa, e de forma a analisar se os metabolitos do azeite têm potencial ação anticancerígena,

na fase seguinte deste projeto procedeu-se à análise dos principais metabolitos identificados nas várias frações, de forma isolada nas várias linhas de CCR.

3.2.3. Efeito antiproliferativo dos metabolitos no modelo 2D da linha celular HT29

Através da digestão *in vitro* do extrato de azeite pelo método SHIME® seguida da análise metabolômica das amostras obtiveram-se vários metabolitos (tabela 3.2). Nas figuras 3.3A e 3.3B podemos observar a viabilidade celular desses metabolitos em relação ao controle, em células HT29 e Caco-2, após a exposição destas células a diferentes compostos e concentrações durante 72h.

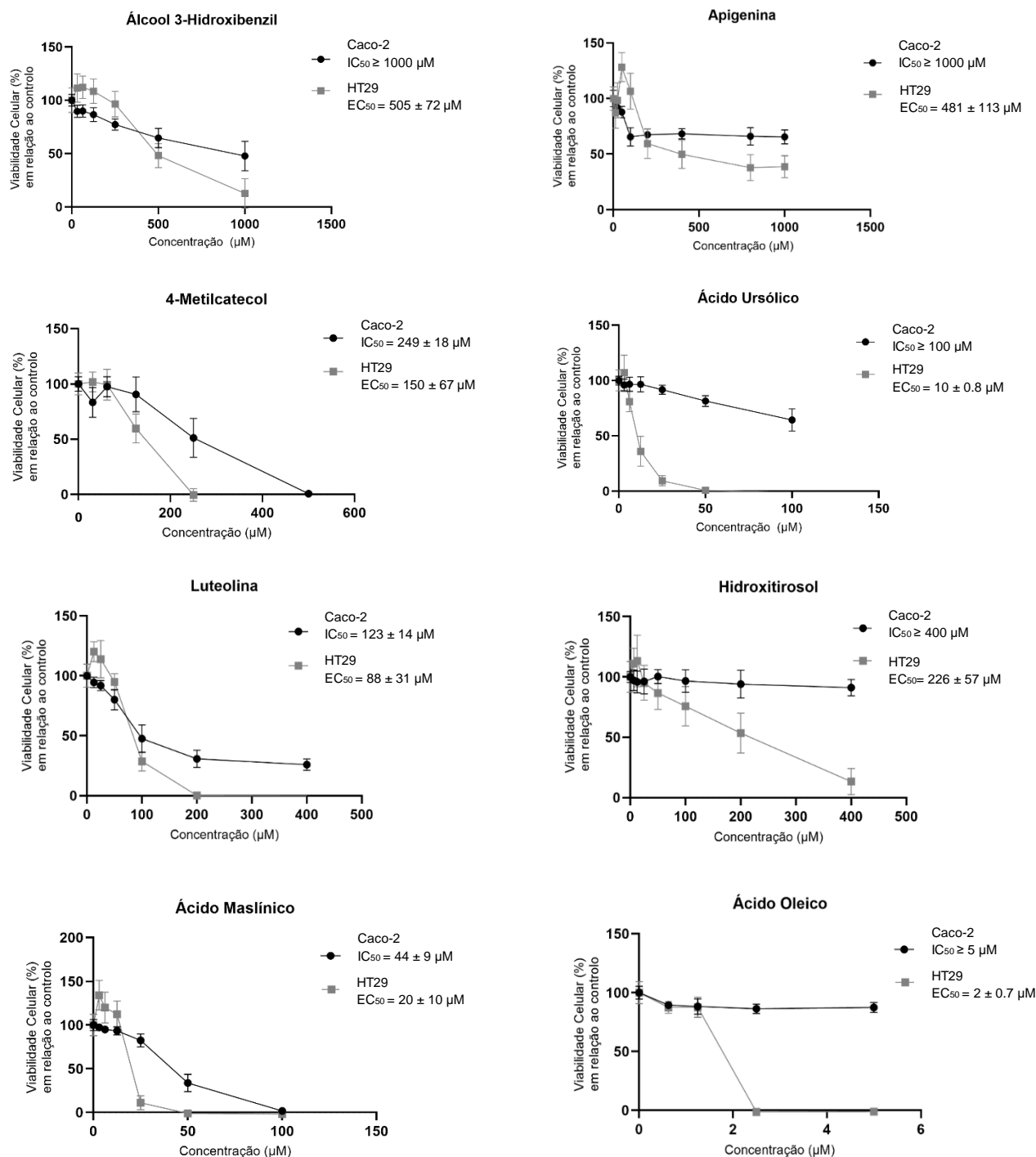


Figura 3.3A. Curva dose-resposta após 72h de incubação dos metabolitos álcool 3-hidroxibenzilo, apigenina, 4-metilcatecol, ácido ursólico, luteolina, hidroxitirosol, ácido maslínico e ácido oleico, em células HT29 e Caco-2 em modelos 2D (resultados: média ± SD (n=3)).

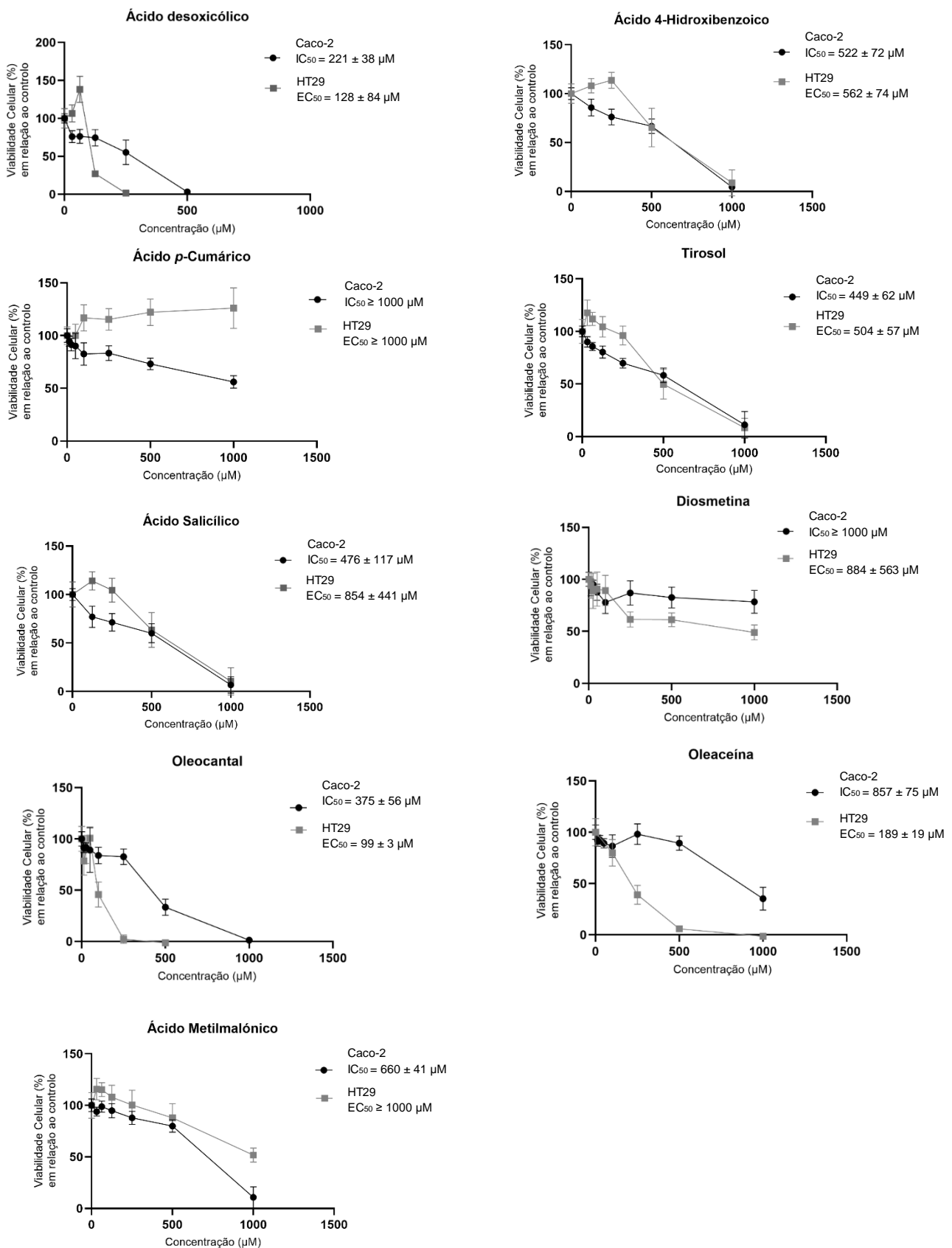


Figura 3.3B. Curva dose-resposta após 72h de incubação dos metabolitos ácido desoxicólico, ácido 4-hidroxi benzoico, ácido *p*-cumárico, tirosol, ácido salicílico, diosmetina, oleocantal, oleaceína e ácido metilmalónico, em células HT29 e Caco-2 em modelos 2D (resultados: média \pm SD (n=3)).

Para entender de que forma os metabolitos presentes no extrato de azeite exercem efeitos antiproliferativo e de citotoxicidade, foram comparados os valores de EC₅₀ e IC₅₀ entre metabolitos da mesma classe de compostos em HT29 e Caco-2. Além disso, com base na literatura disponível, é possível compreender os mecanismos de ação desses metabolitos a nível celular e molecular. A atividade apoptótica e o mecanismo de ação dos metabolitos dependem tanto da estrutura molecular quanto da linha celular utilizada nos ensaios.

A apigenina, luteolina, hidroxitirosol, ácido maslínico, ácido desoxicólico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido salicílico, ácido metilmalónico e o tirosol são compostos fitoquímicos que apresentam nos gráficos de curva dose-resposta (figura 3.3A e 3.3B) um aumento da viabilidade celular em baixas concentrações, o que indica que estes metabolitos podem estar a promover algum tipo de resposta adaptativa ou protetora nas células a um *stress* moderado. À medida que a concentração aumenta, o efeito tóxico supera esses efeitos protetores resultando numa diminuição da viabilidade celular [235]. Este fenómeno é chamado de **efeito hormético** ou **hormese**, comum em compostos fenólicos, e é descrito como uma dose-resposta bifásica a um composto, onde diferentes concentrações desse composto produzem efeitos opostos. A concentrações baixas, o composto pode ter efeitos benéficos, enquanto em concentrações mais altas, pode ser tóxica ou inibitória [236]. Existem evidências que o hidroxitirosol e o tirosol apresentaram efeito hormético nas células hepáticas humanas devido à diminuição da peroxidação lipídica [237].

O facto de apenas alguns compostos terem este efeito poderá ser devido à sua absorção, permeabilidade ou metabolização. Alguns metabolitos podem ser absorvidos de maneira mais eficiente pelas células, desencadeando respostas específicas [238].

3.2.3.1. Fenóis simples

Os fenóis simples são compostos orgânicos constituídos por um anel de benzeno ligado a um ou mais grupos -OH e têm uma estrutura plana [239]. Estes compostos estão amplamente distribuídos na natureza incluindo no extrato de azeite e desempenham funções importantes na saúde humana e em processos biológicos. O tirosol, hidroxitirosol, o álcool 3-hidroxibenzilo e o 4-metilcatecol são fenóis simples presentes no extrato de azeite com propriedades antioxidantes, anticancerígenas e anti-inflamatórias. O hidroxitirosol é um composto fenólico que foi descoberto pela primeira vez a partir de águas residuais da azeitona produzidas durante a extração de azeite. Para além do azeite, o hidroxitirosol também é encontrado em subprodutos da azeitona como folhas de azeitona e bagaço de azeitona [240]. O hidroxitirosol é constituído por dois grupos -OH ligados a um anel de benzeno nas posições orto (conformação orto-di-hidroxi) [241]. O tirosol é um composto fenólico com propriedades antioxidantes, mas menos eficaz que o hidroxitirosol, pois apesar de ter uma estrutura química semelhante ao hidroxitirosol tem um grupo -OH a menos na cadeia lateral [242]. O álcool 3-hidroxibenzilo é um composto fenólico que contém um anel de benzeno, um grupo -OH e um grupo

álcool (-CH₂OH) na sua estrutura química e tem propriedades antioxidantes e anticancerígenas. O 4-metilcatecol é um composto fenólico que contém um anel de benzeno e 2 grupos -OH (figura 3.4).

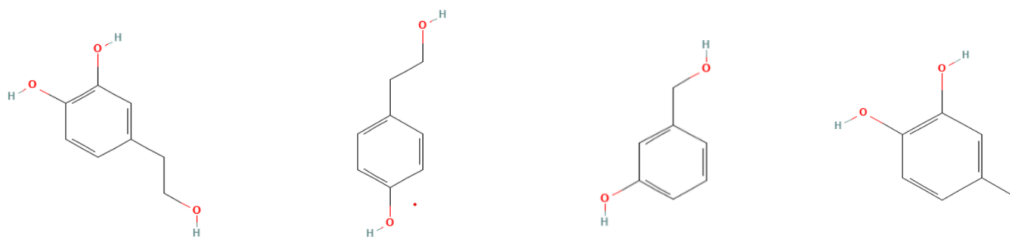


Figura 3.4. Estruturas químicas do hidroxitirosol, tirosol, álcool 3-hidroxibenzilo e 4-metilcatecol, respectivamente (PubChem).

Na tabela 3.3 estão representados os valores de EC₅₀ e de IC₅₀ dos fenóis simples nas linhas celulares HT29 e Caco-2, respectivamente.

Tabela 3.3. Representação dos valores de EC₅₀ e de IC₅₀ do hidroxitirosol, tirosol, álcool 3-hidroxibenzilo e 4-metilcatecol, nas linhas celulares HT29 e Caco-2, respectivamente.

Metabolito	Hidroxitirosol	Tirosol	Álcool 3-hidroxibenzilo	4-metilcatecol
Valor de EC ₅₀ (µM) em HT29	226 ± 57	504 ± 57	505 ± 72	150 ± 67
Valor de IC ₅₀ (µM) em Caco-2	≥ 400	449 ± 62	≥ 1000	249 ± 18

Comparando os quatro compostos da mesma classe, o hidroxitirosol e o 4-metilcatecol são os que apresentam maior efeito antiproliferativo a concentrações mais baixas pois têm um valor de EC₅₀ inferior, contrariamente ao álcool 3-hidroxibenzilo que tem menor efeito antiproliferativo pois tem um maior valor de EC₅₀. Relativamente à citotoxicidade em Caco-2, o hidroxitirosol e o álcool 3-hidroxibenzilo são os compostos que apresentam menor efeito citotóxico, o que sugere uma menor sensibilidade destas células a estes compostos. O 4-metilcatecol é o que apresenta maior citotoxicidade em células Caco-2 (menor IC₅₀) e o tirosol tem alguma citotoxicidade nas células Caco-2 e tem um efeito antiproliferativo moderado em células HT29.

A forma como estes fenóis simples atuam nas células de CCR e o seu possível efeito antiproliferativo pode depender de diversos fatores, tais como:

- i. As estruturas químicas semelhantes dos fenóis podem ser responsáveis por efeitos anticancerígenos semelhantes. Por exemplo, ambos os compostos neutralizam ROS devido à sua capacidade de doar hidrogénios dos grupos -OH [239]. Neste caso, neutralizar o ROS é importante pois algumas células cancerígenas dependem de níveis aumentados destas espécies reativas de oxigénio, logo a sua redução inibe a sinalização essencial para a sua proliferação e sobrevivência [243].
- ii. Os valores de acidez (pKa) na maioria dos fenóis estão entre os 8 e 10 o que significa que são mais fortes que a água (pKa da água é 14). O pKa é uma característica que influencia a ionização destas moléculas em diferentes ambientes fisiológicos. No caso de células de CCR o pKa influencia a forma como o fenol se encontra no ambiente celular (ionizado ou não ionizado), sendo que a forma ionizada pode ser mais reativa e ao interagir com enzimas ou proteínas intracelulares pode interferir com processos de replicação do DNA ou sinalização celular [239].
- iii. A linha celular HT29 possui mutações no gene *APC* que regula a via de sinalização Wnt/ β -catenina. Os fenóis simples podem afetar a regulação do ciclo celular influenciando a forma como as células respondem aos compostos que interferem nessa via [244]. A disfunção do gene *p53* pode ser motivo para as células HT29 serem menos ou mais propensas a induzir apoptose em resposta a certos compostos.

Hipóteses para o efeito antiproliferativo do hidroxitirosol em células HT29:

- i. A expressão reduzida do recetor EGFR está associada à diminuição da proliferação celular pois o EGFR é uma das principais vias que promove a divisão celular. Uma menor ativação de EGFR pelo hidroxitirosol significa menos sinalização para as vias proliferativas, o que resulta num crescimento tumoral mais lento [217]. Foi relatado que a inibição de EGFR por hidroxitirosol a concentrações de até 100 μ M pode ocorrer em células HT29 e Caco-2 quando se consome 50 mL de extrato de azeite [245].
- ii. Os efeitos antiproliferativos e o mecanismo de ação celular do hidroxitirosol foram descritos pela capacidade de bloquear o ciclo celular nas fases G2 e M, devido à inibição da fosforilação da cinase regulada por ERK 1/2 e da redução da expressão da ciclina D1, responsáveis pela regulação do ciclo celular [201], [246].

- iii. O hidroxitirosol pode exercer atividade antiproliferativa em células de CCR provocando alterações na transcrição de genes envolvidos na morte celular programada (*BNIP3*, *BNIP3L*, *PDCD4* e *ATF3*) e ativando a caspase-3, uma enzima importante na apoptose [93].
- iv. O efeito antiproliferativo do hidroxitirosol também pode estar relacionado com a sobreexpressão do gene *COX-2* [247]; ativação de genes envolvidos na apoptose como o *BCL-2*, *caspase-3* e *p53* [128,248] e com a produção de peróxido de hidrogénio extracelular (H_2O_2). O H_2O_2 é uma ROS que em concentrações controladas tem um papel fundamental na sinalização celular. A acumulação deste composto pode levar a *stress* oxidativo e danos no DNA. As células cancerígenas estão sob mais *stress* do que as células normais, logo o aumento de H_2O_2 poderá contribuir para a morte celular ou inibição da proliferação [91].
- v. Estudos anteriores demonstraram que, após 72h de incubação com hidroxitirosol em células HT29, observou-se uma diminuição significativa da viabilidade celular (não detetada às 24 e 48h) a uma concentração de 100 μM [201]. No entanto, outros estudos demonstraram que apenas a concentração de 750 μM existe redução de 50% da viabilidade celular [249]. Nos resultados obtidos neste trabalho o valor de EC_{50} foi de $226 \pm 57 \mu M$. Esta discrepância de resultados pode ser atribuída a variáveis experimentais como o meio de cultura utilizado, método de deteção da viabilidade celular (brometo de 3-(4.5-dimetiltiazol-2-il)-2.5-difeniltetrazólio (MTT) vs. *PrestoBlue*TM) e a densidade celular.
- vi. À semelhança dos resultados obtidos, estudos anteriores também reportaram um valor de EC_{50} (136.7 μM) para células HT29, após 48h de exposição do hidroxitirosol [250]. É importante observar que o tempo de incubação do hidroxitirosol pode ser um fator que contribui para a diferença nos resultados (48h vs. 72h).

Efeito antiproliferativo do hidroxitirosol em Caco-2:

Como mencionado anteriormente, as células Caco-2 têm a capacidade de se diferenciar em células semelhantes a enterócitos. Quando diferenciadas, desenvolvem características epiteliais mais maduras o que pode torná-las menos proliferativas, mais semelhantes às células epiteliais saudáveis e menos suscetíveis a compostos citotóxicos. Como descrito na literatura e de acordo com os resultados obtidos ($IC_{50} \geq 400\mu M$), o hidroxitirosol não apresenta citotoxicidade em células Caco-2 até à concentração de 500 μM , logo é um composto promissor [251].

Efeito do tirosol em células de CCR:

O hidroxitirosol e o tirosol podem exercer mecanismos de ação semelhantes na diminuição da viabilidade celular em células HT29 devido às estruturas químicas semelhantes [252]. Contudo, geralmente o tirosol é menos eficaz que o hidroxitirosol, o que justifica a diferença dos valores de EC₅₀ apresentados nas figuras 3.3A e 3.3B. A principal diferença entre os dois compostos é a presença do grupo -OH adicional na posição orto-difenólica e do grupo catecol no hidroxitirosol o que lhe confere uma maior eficiência e maior atividade antioxidante e antiproliferativa do que o tirosol [242,253].

Embora o tirosol possa desempenhar funções semelhantes ao hidroxitirosol nos processos acima mencionados, a sua eficácia é consideravelmente menor. Para superar esta limitação, poderá ser necessário utilizar concentrações mais altas de tirosol, o que pode causar efeitos colaterais ou toxicidade em células normais [254].

Efeito antiproliferativo do álcool 3-hidroxibenzilo em células de CCR:

O álcool 3-hidroxibenzilo e a sua relação com o cancro não está amplamente documentado na literatura científica em comparação com outros fenóis. Contudo, podemos ver alguns possíveis mecanismos baseados nas propriedades gerais dos fenóis e na estrutura química deste composto.

- i. Através da sua estrutura química, o álcool 3-hidroxibenzilo poderá ter um efeito antioxidante através do grupo -OH que permite neutralizar ROS e reduzir o *stress* oxidativo, inibindo a proliferação celular de células de CCR.
- ii. Por ser um fenol, o álcool 3-hidroxibenzilo, pode ativar vias apoptóticas e atuar de forma semelhante aos outros fenóis.
- iii. Pode atuar de forma extracelular, ligando-se a recetores da superfície celular desencadeando uma cascata de sinalização intracelular sem que seja necessário o composto entrar na célula.

Existem poucos estudos que reportem o efeito antiproliferativo do 4-metilcatecol nas células do CCR. No entanto, a estrutura química deste composto fenólico suporta as atividades antioxidante e antiproliferativa, bem como a participação em vias de sinalização para apoptose [255]. Pode interagir com componentes da ECM ativando vias de sinalização pró-apoptóticas [256]. Na literatura é demonstrado que este composto tem efeito anticancerígeno noutros tipos de cancro, como o melanoma, induzindo apoptose [257].

3.2.3.2. Flavonóides

Os flavonóides estão presentes nos metabolitos secundários das plantas. Quimicamente os flavonóides são caracterizados por 15 átomos de carbono e constituídos por 2 anéis de benzeno (A e B) ligados por meio de um anel de pirano heterocíclico (C). Podem ser divididos em flavonóis (quercetina), flavonas (luteolina, apigenina e diosmetina), entre outros. Estas classes diferem ao nível da oxidação e no padrão de substituição do anel C, enquanto os compostos individuais dentro de uma classe diferem nos anéis A e B [258].

Os flavonóides apresentam atividade anticancerígena, antiviral, anti-inflamatória e antioxidante. As propriedades antioxidantes destes compostos são particularmente importantes para a regulação da proliferação celular e para a modulação de diversas vias de sinalização celular [259]. A eficácia dos flavonóides é influenciada pela sua estrutura química, que pode variar devido a substituições incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações e glicosilações [260]. Relativamente à atividade anticancerígena, os flavonóides podem atuar através de mecanismos como a regulação negativa de *p53* e paragem do ciclo celular. A luteolina, a apigenina e a diosmetina são compostos que pertencem à mesma classe dos flavonóides e apresentam atividades importantes para a saúde [261]. Tal como outros flavonóides, a luteolina é encontrada na forma de glicosídeos, que são metabolizados por bactérias intestinais e clivados durante o processo de digestão [262,263]. Tem 2 grupos -OH na sua estrutura química. A apigenina é um flavonóide com propriedades anticancerígenas em células de CCR e apresenta apenas um grupo -OH. A diosmetina é um flavonoide metoxilado, o que significa que possui grupos metoxi (-OCH₃) na sua estrutura (figura 3.5).

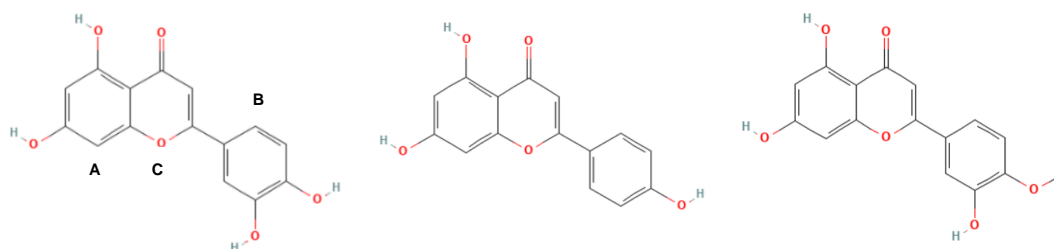


Figura 3.5. Estruturas químicas da luteolina, apigenina e diosmetina, respetivamente (PubChem).

Na tabela 3.4 estão representados os resultados obtidos após 72h de incubação dos metabolitos luteolina, apigenina e diosmetina, em células HT29 e Caco-2 (figuras 3.3A e 3.3B).

Tabela 3.4. Representação dos valores de EC₅₀ e de IC₅₀ dos flavonóides luteolina, apigenina e diosmetina nas linhas celulares HT29 e Caco-2, respetivamente.

Metabolito	Luteolina	Apigenina	Diosmetina
Valor de EC ₅₀ (µM) em HT29	88 ± 31	481 ± 113	884 ± 563
Valor de IC ₅₀ (µM) em Caco-2	123 ± 14	≥ 1000	≥ 1000

Estes resultados demonstram que a luteolina tem maior efeito antiproliferativo (menor valor de EC₅₀) em células HT29 do que a apigenina e a diosmetina. No entanto, a apigenina e a diosmetina têm menor efeito citotóxico em células Caco-2 (maior valor de IC₅₀), comparativamente à luteolina.

Os valores de EC₅₀ e IC₅₀ da luteolina foram comparados estatisticamente utilizando um teste t de Student, indicando que as diferenças entre os valores não são estatisticamente significativas. Este resultado sugere que, apesar da diferença aparente entre os valores médios, não há evidência suficiente para concluir que os efeitos da luteolina nestas duas linhas celulares são diferentes.

O valor de EC₅₀ da diosmetina em células HT29 foi de 884 ± 563 µM, apresentando um desvio padrão bastante elevado (64%). O valor de EC₅₀ foi estimado utilizando o *software GraphPad Prism 10*, com base na curva dose resposta gerada a partir dos resultados obtidos para determinadas concentrações de compostos. Este valor de EC₅₀ sugere uma significativa variabilidade entre os ensaios realizados, que pode ser atribuída a diferentes fatores, tais como, heterogeneidade das respostas celulares, condições experimentais e possível degradação do composto. Adicionalmente, esta variação pode estar associada ao intervalo de concentrações utilizado, uma vez que não foram testadas concentrações intermédias que poderiam permitir uma determinação mais precisa da curva dose-resposta. No entanto, dado que este composto não foi selecionado para estudos subsequentes, a necessidade de uma avaliação mais detalhada torna-se dispensável neste contexto.

Hipóteses para o efeito antiproliferativo da luteolina em células HT29:

- i. A luteolina tem um grupo -OH a mais do que a apigenina, logo, pode apresentar uma maior capacidade antioxidante neutralizando ROS de forma mais eficaz [89], o que está de acordo com os valores de EC₅₀ obtidos. A configuração, substituição e número total de grupos -OH influencia a atividade antioxidante.
- ii. Estudos *in vitro* demonstram que a luteolina inibe a apoptose e a proliferação de células HT29 a concentrações entre 20 e 60 µM nas fases G1/S e G2/M do ciclo celular [264,265].

- iii. A luteolina pode suprimir a expressão de proteínas anti-apoptóticas e diminuir a produção de ciclina B1, uma proteína importante na progressão do ciclo celular. Níveis reduzidos desta proteína dificultam a divisão celular e, conseqüentemente, a proliferação [264].
- iv. Estudos anteriores demonstraram que a luteolina produziu uma redução de 50% de viabilidade celular à concentração de 175 μM nas células HT29 após 72h de incubação. Outro estudo reportado indicou uma diminuição da viabilidade celular das células HT29 na concentração de 30 μM [266]. Estes estudos divergem dos resultados obtidos neste estudo ($EC_{50} = 88 \pm 31 \mu\text{M}$). Esta diferença pode ser justificada por diferenças no método de detecção da viabilidade celular (MTT vs. *PrestoBlue*TM) e no meio de cultura celular (DMEM vs. RPMI).

Hipóteses para o efeito antiproliferativo da apigenina em células HT29:

- i. A apigenina pode inibir a proteína cinase II (CK2). Esta proteína adiciona grupos fosfato a outras proteínas (fosforilação) modificando a sua função. Desempenha um papel fundamental na regulação de várias funções celulares tais como: proliferação celular, sobrevivência celular e resposta ao *stress*. A apigenina, ao inibir a CK2, vai interromper o ciclo celular levando a uma redução da proliferação das células cancerígenas, promovendo a apoptose [267].
- ii. A inativação da proteína Akt e a desfosforilação da proteína pro-apoptótica BAD através da apigenina, promove a diminuição da sobrevivência celular [267]. A Akt é uma proteína cinase B que desempenha um papel fundamental na sobrevivência celular, logo ao inibir esta proteína, a viabilidade celular diminui. A BAD é uma proteína pró-apoptótica da família da BCL-2 que regula a membrana mitocondrial, importante na indução da apoptose em células cancerígenas HT29 [268].
- iii. As proteínas LST1 e MST2 estão envolvidas na via de sinalização Hippo que é importante na regulação do crescimento celular. Se a apigenina atuar sobre estas duas proteínas, impede que células HT29 proliferem de forma descontrolada promovendo a apoptose [269].
- iv. Conforme evidenciado na literatura, a apigenina obteve uma redução da viabilidade celular em células HT29 a uma concentração de 45.9 μM , o que é bastante discrepante tendo por comparação os resultados obtidos ($EC_{50} = 481 \pm 113 \mu\text{M}$). Isto poderá ser devido ao ensaio de detecção de viabilidade utilizado (MTT vs. *PrestoBlue*TM).

A baixa citotoxicidade do flavonóide apigenina em células Caco-2 pode ser explicada através da glicoproteína P (P-gp). A P-gp é uma proteína de membrana que funciona como transportador de efluxo

que transporta as substâncias citotóxicas para fora das células. Estudos indicam que a apigenina pode aumentar a expressão de P-gp em células Caco-2 resultando numa maior capacidade de efluxo de substâncias xenobióticas, e reduzindo a sua acumulação intracelular. Este mecanismo pode ser benéfico para proteger as células intestinais [270]. Relativamente à diosmetina, esta em comparação a outros flavonóides não apresenta um efeito antiproliferativo significativo, devido ao seu valor de EC_{50} elevado ($EC_{50} = 884 \pm 563 \mu\text{M}$). No entanto, a diosmetina não é citotóxica em células Caco-2 que mimetizam o epitélio intestinal.

Hipóteses para o efeito antiproliferativo da diosmetina em células HT29:

- i. Os grupos metoxi- podem influenciar a atividade antiproliferativa e antioxidante devido à sua interação com radicais livres [271]. Os grupos metoxi ao neutralizar radicais livres podem diminuir o *stress* oxidativo provocando danos nas células.
- ii. Estudos científicos demonstraram que a diosmetina reduziu 50% da viabilidade celular em células HT29, a uma concentração de $13.8 \mu\text{M}$, o que não coincide com os resultados obtidos ($EC_{50} = 884 \pm 563 \mu\text{M}$). Esta diferença poderá ser devido ao meio de cultura utilizado (DMEM vs. RPMI) e ao método da viabilidade celular (MTT vs. *PrestoBlue*[™]) [272].

3.2.3.3. Ácidos triterpénicos

Os ácidos triterpénicos são compostos fitoquímicos encontrados em várias frutas e vegetais, com diversas atividades biológicas (anti-inflamatórias, antioxidantes e anticancerígenas) e têm sido utilizados em estudos *in vitro* e *in vivo*. Uma das grandes vantagens é que são utilizados como agentes citotóxicos para células cancerígenas mantendo as células saudáveis ilesas. Contrariamente, os fármacos sintéticos provocam efeitos colaterais e agem indiferenciadamente em células normais ou cancerígenas [273]. Os triterpenos pentacíclicos podem ser divididos em 3 classes: lupano (betulina), oleanano (ácido maslínico) e ursano (ácido ursólico) [274]. O ácido maslínico é o principal triterpeno encontrado em folhas e azeitonas de *Olea europaea* L. e possui dois grupos -OH e um grupo carboxilato (-COOH). O ácido ursólico possui apenas um grupo -OH e um grupo carboxilato [275] (figura 3.6). Ambos contêm na sua estrutura química 5 anéis de carbono que promovem uma rigidez molecular e uma superfície hidrofóbica o que pode influenciar a sua interação com proteínas e o seu efeito [276].

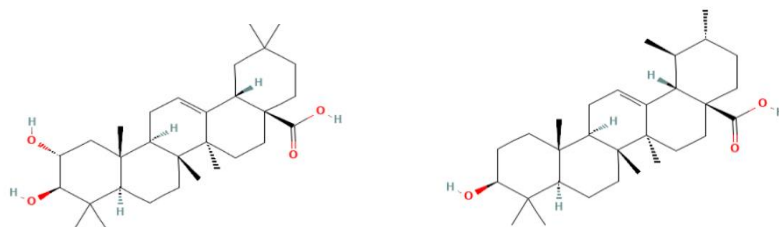


Figura 3.6. Estruturas químicas do ácido maslínico e ácido ursólico, respetivamente (PubChem).

Na tabela 3.5 estão representados os resultados obtidos após 72h de incubação dos ácidos triterpénicos (ácido maslínico e ácido ursólico) em células HT29 e Caco-2 (figuras 3.3A e 3.3B).

Tabela 3.5. Representação dos valores de EC_{50} e de IC_{50} do ácido maslínico e do ácido ursólico nas linhas celulares HT29 e Caco-2, respetivamente.

Metabolito	Ácido maslínico	Ácido ursólico
Valor de EC_{50} (μM) em HT29	20 ± 10	10 ± 0.8
Valor de IC_{50} (μM) em Caco-2	44 ± 9	≥ 100

Os resultados indicam que ambos os metabolitos são promissores devido ao seu efeito antiproliferativo significativo em células HT29. No entanto, o ácido ursólico demonstra um valor de EC_{50} menor ($10 \pm 0.8 \mu\text{M}$) e menos efeito citotóxico em células Caco-2, quando comparado com o ácido maslínico.

Estruturalmente, estes compostos são semelhantes, mas as diferenças podem influenciar as suas propriedades biológicas. O ácido maslínico possui um grupo -OH adicional em comparação com o ácido ursólico (figura 3.6), o que pode sugerir uma maior eficácia na inibição da proliferação celular. No entanto, os resultados obtidos não corroboram esta afirmação indicando que o efeito antiproliferativo não depende só da estrutura química. O ácido ursólico apresentou maior efeito antiproliferativo do que o ácido maslínico pois pode ser mais eficiente em termos de biodisponibilidade e penetração celular, provocando maior efeito antiproliferativo [277].

Os valores de EC_{50} ($20 \pm 10 \mu\text{M}$) em células HT29 e de IC_{50} ($44 \pm 9 \mu\text{M}$) em células Caco-2, obtidos para o ácido maslínico apresentaram erros relativos de 49% e 21%, respetivamente. O erro relativamente elevado de 49% no primeiro caso sugere uma maior variabilidade entre as réplicas experimentais, o que pode indicar a necessidade de otimização das condições experimentais ou testar concentrações intermédias que poderiam permitir uma determinação mais precisa da curva dose-resposta. No entanto, o erro de 21% observado no segundo caso é mais aceitável, indicando que, embora haja uma variabilidade moderada, os resultados podem ser considerados razoavelmente consistentes.

O ácido ursólico exerce efeitos antiproliferativos em células HT29 através de diferentes fatores, nomeadamente:

- i. Em células HT29, Caco-2 e HCT116, o ácido ursólico poderá diminuir o fator de transcrição NF- κ B reduzindo a expressão de oncogenes, proteínas anti-apoptóticas (BCL-xL e BCL-2) e promover a apoptose em células cancerígenas [278].
- ii. A estrutura pentacíclica permite que o ácido ursólico interaja com a bicamada lipídica das membranas celulares de forma eficaz, potencialmente alterando a fluidez da membrana ou interferindo com proteínas de membrana importantes para a sobrevivência celular. Em células HT29 este fator pode levar à perturbação da homeostase celular e à indução de morte celular [279].
- iii. Os grupos -OH e o carboxilato poderão permitir que o ácido ursólico atue como um agente antioxidante, neutralizando os radicais livres reduzindo o *stress* oxidativo. No entanto, nas células HT29, o ácido ursólico pode induzir *stress* oxidativo em excesso, levando à morte celular por piroptose e apoptose [280]. A presença de átomos de O₂ também poderá permitir que o ácido ursólico consiga interagir com íons metálicos influenciando as vias de sinalização importantes para as células, como por exemplo, a via PI3K/Akt/mTOR, inibindo a proliferação e sobrevivência das células HT29 [281].
- iv. Foi relatado na literatura que as células de CCR- HCT116 e HT29 incubadas com ácido ursólico apresentaram aumento da apoptose. O ácido ursólico em concentrações de 2.5-40 μ M inibiu o crescimento e viabilidade celular das células HT29 [282], o que vai de acordo com os resultados obtidos ($EC_{50} = 10 \pm 0.8 \mu$ M). Outros estudos indicaram um valor de EC_{50} (45 μ M) para o ácido ursólico em células em HT29, valor este que foi superior ao do nosso estudo, no entanto as células foram incubadas menos tempo (24h de exposição vs. 72h) [283], logo o tempo de exposição pode ser um fator importante.

As células cancerígenas HT29 exibem um metabolismo energético alterado, conhecido como o efeito de Warburg, onde existe aumento na glicólise. Esse metabolismo acelerado pode tornar as células HT29 mais suscetíveis a compostos que induzem *stress* oxidativo, como o ácido ursólico [284]. As Caco-2 apresentam um metabolismo normal, logo são menos afetadas por este composto.

O ácido maslínico exerce efeitos antiproliferativos em células HT29 e Caco-2 através de diferentes fatores, nomeadamente:

- i. Estudos demonstraram que a concentração de ácido maslínico necessária para diminuir 50% da viabilidade celular em células Caco-2 após 72h de incubação foi de 40.7 μM [285] [286], o que está de acordo com os resultados obtidos ($\text{EC}_{50} = 44 \pm 9 \mu\text{M}$).
- ii. O ácido maslínico pode desencadear a apoptose através da ativação de vias de sinalização relacionadas com o stress em células HT29.
- iii. Estudos demonstraram que o ácido maslínico teve efeito antiproliferativo após 72h de incubação em linhas celulares HT29, HCT116 e SW480. O valor de EC_{50} das HT29 foi de $50 \pm 1.3 \mu\text{M}$, valor que está acima do obtido ($\text{EC}_{50} = 20 \pm 10 \mu\text{M}$). Esta diferença pode advir do método utilizado para a deteção da viabilidade celular (MTT vs. *PrestoBlue*TM) ou da marca do produto [287].

O ácido maslínico é um triterpeno com atividade anticancerígena e com efeito antiproliferativo significativo como demonstrado na tabela 3.5. Contudo, este composto também apresenta citotoxicidade em algumas concentrações [288] em células Caco-2, o que o torna menos promissor para terapias anticancerígenas.

3.2.3.4. Secoiridóides

Os Secoiridóides são uma classe de compostos fenólicos encontrados em todas as espécies de plantas Oleaceae, incluindo a oliveira europeia (*olea europaea L.*). Têm efeitos benéficos para a saúde como atividade antioxidante, anti-inflamatória, neuroprotetora e anticancerígena *in vivo* e *in vitro*. O oleocantal e a oleaceína são secoiridóides presentes no extrato de azeite. O oleocantal é um composto fenólico do extrato responsável pelo sabor picante e ardor na garganta e tem propriedades anti-inflamatórias que se assemelham ao efeito do ibuprofeno. Tem na sua estrutura química um anel de benzeno com um grupo aldeído que pode induzir *stress* oxidativo. A oleaceína, também presente no extrato de azeite, resulta da hidrólise da oleuropeína e atua como agente antioxidante e anti-inflamatório. É constituída por um anel aromático e um grupo éster (figura 3.7) [289].

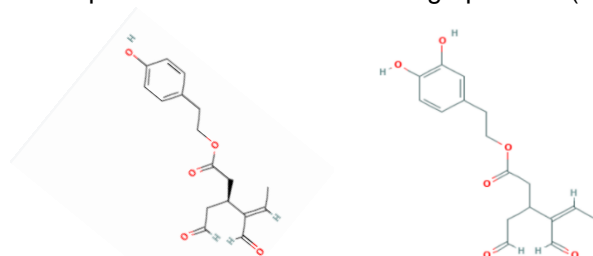


Figura 3.7. Estruturas químicas da oleocantal e oleaceína, respetivamente (PubChem).

Na tabela 3.6 estão representados os valores de EC₅₀ e IC₅₀ dos secoiridoides oleocantal e oleaceína e oleocantal, em células HT29 e Caco-2.

Tabela 3.6. Representação dos valores de EC₅₀ e de IC₅₀ dos secoiridoides oleocantal e oleaceína nas linhas celulares HT29 e Caco-2, respetivamente.

Metabolito	Oleocantal	Oleaceína
Valor de EC₅₀ (µM) em HT29	99 ± 3	189 ± 19
Valor de IC₅₀ (µM) em Caco-2	375 ± 56	857 ± 75

Estes resultados demonstram que o oleocantal em comparação com a oleaceína, é o composto que tem maior efeito antiproliferativo na linha celular HT29, mas em contrapartida é o mais citotóxico em células Caco-2. A oleaceína também apresenta efeito antiproliferativo em células cancerígenas e é menos citotóxica em células Caco-2, indicando assim uma maior seletividade para as células-alvo. A diferença de resultados entre as duas linhas de CCR pode advir da incorporação dos compostos.

Os valores de EC₅₀ e de IC₅₀ para o oleocantal e a oleaceína, apresentam erros relativos baixos, indicando boa consistência e precisão nos ensaios. Para o oleocantal em HT29, o valor de EC₅₀ (99 ± 3 µM) apresenta um erro muito pequeno (3%), sugerindo elevada reprodutibilidade dos resultados. O valor de IC₅₀ para o oleocantal em Caco-2 (375 ± 55.7 µM) apresenta um erro relativo relativamente mais elevado (14.9%), mas ainda dentro de uma gama aceitável (20-30%). Tendo em conta a oleaceína, os valores de EC₅₀ em HT29 (190 ± 19 µM) e de IC₅₀ em Caco-2 (857 ± 75 µM) têm erros relativos de 10% e 8.8%, respetivamente, o que é considerado razoável e indica uma boa precisão nos resultados experimentais.

Hipóteses para a atividade antiproliferativa do oleocantal:

- i. O oleocantal pode atuar como um inibidor do gene COX-2, como composto anti-inflamatório e anticancerígeno, tanto em estudos *in vivo* como *in vitro*. Em células de CCR-HT29 e SW480, o oleocantal induz a apoptose aumentando a produção de ROS que causa danos no DNA e morte celular [290].
- ii. O oleocantal pode provocar efeito anti-inflamatório através da inibição da 5-lipoxigenase (5-LOX). O 5-LOX é uma enzima envolvida na biossíntese de leucotrienos que são mediadores inflamatórios que promovem inflamações agudas e crónicas. Ao inibir esta

enzima em HT29, o oleocantal demonstra ser um agente anti-inflamatório potente importante para doenças como o cancro [291].

- iii. A inibição da PARP e a ativação da caspase-3 estão relacionadas com a apoptose celular em células HT29 pelo oleocantal. A PARP é uma enzima envolvida na reparação do DNA, logo a sua inibição impede essa reparação nas células cancerígenas levando à acumulação de danos. A caspase-3 é uma enzima importante na via da apoptose, logo a sua ativação pelo oleocantal poderá ser um alvo terapêutico adequado [290,292].
- iv. Estudos demonstraram que o oleocantal induziu a apoptose resultando em danos no DNA e morte celular em células HT29 e SW480 a concentrações 25-50 μM [290]. Este resultado está próximo do valor obtido nos nossos resultados ($\text{EC}_{50} = 99 \pm 3 \mu\text{M}$).

Pesquisadores sugerem que a resistência das células Caco-2 ao oleocantal é devido à sinalização de mTOR (alvo da rapamicina nos mamíferos). O mTOR é uma proteína cinase com um papel fundamental na regulação do crescimento celular, proliferação e sobrevivência. Em células Caco-2 a via do mTOR é ativada, o que contribui para a proliferação e sobrevivência das células [293].

Hipóteses para a atividade antiproliferativa da oleaceína:

A oleaceína é derivada da oleuropeína e é posteriormente convertida em ácido oleonólico e hidroxitirosol. Ainda existe pouca informação do efeito deste metabolito no CCR, mas está a ser cada vez mais explorado.

- i. A oleaceína pode inibir a proliferação celular e pode aumentar a expressão de proteínas pró-apoptóticas (BAX e p53) e diminuir a expressão da proteína BCL-2 [217] em células de CCR.
- ii. Este composto poderá inibir a via P13K/Akt que é ativada por células cancerígenas, levando à diminuição da sobrevivência celular e a um aumento da apoptose [294]. A diminuição da atividade da COX-2 pelo efeito da oleaceína também poderá reduzir a inflamação.

O facto destes dois compostos divergirem na sua estrutura química, em que o oleocantal é constituído por um grupo aldeído e a oleaceína por um grupo éster pode fazer com que apresentem propriedades bioativas distintas. O grupo aldeído normalmente é muito reativo e pode favorecer os mecanismos da apoptose e pirotose [289]. Contudo, os ésteres podem ser hidrolisados em ambientes biológicos, libertando grupos -OH e alterando a atividade biológica do composto.

3.2.3.5. Ácido dicarboxílico

Os ácidos dicarboxílicos são compostos orgânicos encontrados na natureza, com diversas aplicações biológicas como intermediários em vias metabólicas. Têm dois grupos carboxilato na sua estrutura química, e de acordo com a distância entre estes podem ser classificados em ácidos alifáticos ou aromáticos. O ácido metilmalónico é alifático (figura 3.8) e é produzido no organismo como um intermediário na metabolização de aminoácidos e ácidos gordos. É um subproduto do metabolismo do propionato ligado à deficiência de vitamina B12, altera o metabolismo celular e atua como uma molécula de sinalização. Normalmente, o ácido metilmalónico está presente em níveis baixos no corpo, contudo, níveis aumentados podem advir da falta de vitamina B12 ou de doenças [295]. A concentração normal de ácido metilmalónico no corpo humano é de 0 a 40 μM , sendo que nos idosos pode chegar aos 80 μM devido à deficiência de vitamina B12 e é por isso um biomarcador promissor para diagnósticos de cancro [296].

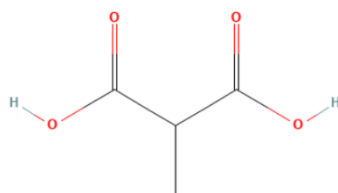


Figura 3.8. Estrutura química do ácido metilmalónico (PubChem).

Na tabela 3.7 estão representados os valores de EC_{50} e IC_{50} do ácido metilmalónico em células HT29 e Caco-2 (figuras 3.3A e 3.3B).

Tabela 3.7. Representação dos valores de EC_{50} e de IC_{50} do ácido metilmalónico nas linhas celulares HT29 e Caco-2, respetivamente.

Metabolito	Ácido metilmalónico
Valor de EC_{50} (μM) em HT29	≥ 1000
Valor de IC_{50} (μM) em Caco-2	660 ± 41

Os resultados obtidos demonstram que o ácido metilmalónico não causa efeito antiproliferativo em células HT29, logo não existe diminuição da viabilidade celular. Em Caco-2, o ácido metilmalónico foi mais citotóxico com redução de 50% da viabilidade celular a uma concentração de 660.3 μM .

Apesar de estar relatado que o ácido metilmalónico promove a progressão do CCR através da proliferação celular, migração e invasão em células de CCR- HCT116 e SW480 [297], nos resultados

obtidos o ácido metilmalónico não obteve esse efeito, ou seja, não diminuiu a viabilidade celular, mas também não proporcionou um aumento da proliferação.

Hipóteses para o efeito antiproliferativo do ácido metilmalónico em células de CCR:

- i. O ácido metilmalónico pode promover resistência à apoptose em células de CCR ao induzir o gene *SOX4* que tem um papel importante na sobrevivência e proliferação das células cancerígenas. Este gene está envolvido na EMT e metastização [298]. Ao promover EMT, o ácido metilmalónico, pode facilitar a invasão das células cancerígenas colorretais para outros tecidos, aumentando o carácter metastático do tumor [298].
- ii. O ácido metilmalónico está envolvido em processos metabólicos, logo pode influenciar o metabolismo celular das células de CCR, alterando a forma como estas consomem nutrientes e energia. Esta alteração pode ajudar ao crescimento rápido das células cancerígenas [298].

3.2.3.6. Ácidos gordos

Os AGCCs, como o ácido oleico, são os principais metabolitos produzidos pela fermentação bacteriana e são importantes na saúde intestinal [299]. O ácido oleico (figura 3.9) é o MUFA mais abundante na dieta humana, influencia a fluidez da membrana e as vias de sinalização e tem efeito anti-inflamatório, antioxidante e anticancerígeno devido à indução da apoptose e inibição da expressão de oncogenes [300].

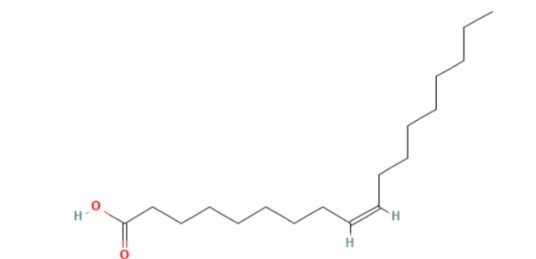


Figura 3.9. Estrutura química do ácido oleico (PubChem).

Na tabela 3.8 estão representados os valores de EC_{50} e IC_{50} do composto ácido oleico, em células HT29 e Caco-2 (figuras 3.3A e 3.3B).

Tabela 3.8. Representação dos valores de EC₅₀ e de IC₅₀ do ácido oleico nas linhas celulares HT29 e Caco-2, respetivamente.

Metabolito	Ácido oleico
Valor de EC ₅₀ (µM) em HT29	2 ± 0.7
Valor de IC ₅₀ (µM) em Caco-2	≥ 5

Estes resultados indicam que o ácido oleico tem efeito antiproliferativo significativo sobre as células cancerígenas HT29 a concentrações baixas, e não demonstra citotoxicidade nas células Caco-2. Estes resultados tornam este metabolito bastante promissor, do ponto de vista fisiológico, para o tratamento contra o CCR. Este efeito antiproliferativo do ácido oleico foi relatado na literatura [301].

O valor de EC₅₀ do ácido oleico nas células HT29 foi de 2 ± 0.7 µM, o que indica um erro relativo de cerca de 35%. Este valor sugere que os resultados têm uma variabilidade considerável, logo, seria útil otimizar as condições experimentais, aumentar o número de réplicas para melhorar a precisão dos ensaios ou testar concentrações intermédias. Relativamente ao valor de IC₅₀, este foi superior a 5 µM, o que significa que o ácido oleico não demonstrou uma inibição significativa da viabilidade celular dentro da faixa de concentrações testada. Para obter um valor de IC₅₀ mais preciso seria necessário testar concentrações superiores a 5 µM e, assim, avaliar de forma mais detalhada a resposta do composto.

Hipóteses para o efeito antiproliferativo do ácido oleico em células de CCR:

- i. O ácido oleico tem propriedades anfipáticas o que significa que é constituído por uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica. Devido a esta característica, o ácido oleico poderá integrar-se nas membranas celulares das células de CCR, afetando a fluidez e a função dos recetores de membrana [302], podendo levar à inibição da proliferação.
- ii. As células cancerígenas perdem a capacidade de se diferenciar de forma correta quando expostas ao ácido oleico. A diferenciação pelo aumento das enzimas sucrase-isomaltase e dipeptidilpeptidase (DPP-IV) pode ser um sinal de que as células estão menos propensas à proliferação [301].
- iii. Estudos anteriores demonstraram que o ácido oleico obteve um valor de EC₅₀ de (9.9 µM) em células HT29 após 48h [303]. Este valor é discrepante com o obtido neste trabalho (EC₅₀ = 2 ± 0.7 µM), mas que pode ser justificado pelo tempo reduzido de incubação deste composto nas células (48h vs. 72h).

3.2.3.7. Ácido biliar

Os ácidos biliares primários (BAs) são sintetizados a partir do colesterol no fígado e são biotransformados no cólon em BAs secundários pela microbiota intestinal. Os BAs no intestino regulam a digestão e absorção do colesterol e desempenham funções na sinalização e modulação da proliferação de células epiteliais [304]. O ácido desoxicólico (figura 3.10) é um ácido biliar secundário derivado do ácido cólico que é um ácido biliar primário produzido pelo fígado. Níveis aumentados de ácidos biliares pode estar associado a um maior risco de CCR [305].

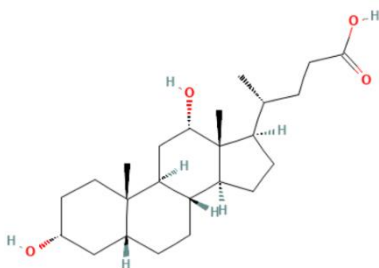


Figura 3.10. Estrutura química do ácido desoxicólico (PubChem).

Na tabela 3.9 estão representados os valores de EC_{50} e IC_{50} do composto ácido desoxicólico, em células HT29 e Caco-2 (figuras 3.3A e 3.3B).

Tabela 3.9. Representação dos valores de EC_{50} e de IC_{50} do ácido desoxicólico nas linhas celulares HT29 e Caco-2, respetivamente.

Metabolito	Ácido desoxicólico
Valor de EC_{50} (μM) em HT29	128 ± 84
Valor de IC_{50} (μM) em Caco-2	221 ± 38

O ácido desoxicólico apresentou efeito antiproliferativo, pois reduziu 50% da viabilidade celular a uma concentração de $128 \mu\text{M}$ em células cancerígenas HT29. Relativamente às células Caco-2, a viabilidade celular diminui a concentrações mais altas, e é relativamente citotóxico.

Estudos já existentes na literatura demonstraram que o efeito do ácido desoxicólico em células cancerígenas é contraditório, pois em alguns casos pode contribuir para diminuição da viabilidade celular em células cancerígenas e noutros pode contribuir para a progressão do tumor. Estas diferenças podem advir da linha celular de CCR utilizada e a sua capacidade de metastização.

O valor de EC_{50} do ácido desoxicólico em células HT29 foi de $128 \pm 84 \mu\text{M}$, com um erro relativo de 65.6%, o que indica uma elevada variabilidade nos resultados. Este resultado elevado sugere que os ensaios podem necessitar de otimização para melhorar a precisão e consistência dos dados obtidos

ou necessitar de testar mais concentrações. Contrariamente, o valor de IC₅₀ em células Caco-2 foi de 221 ± 38 µM, com um erro relativo de 17.2%, o que demonstra uma maior consistência e confiabilidade dos resultados. A diferença nos erros relativos sugere que a resposta ao ácido desoxicólico pode ser mais reprodutível nas células Caco-2.

Hipóteses para o efeito antiproliferativo do ácido desoxicólico em células CCR:

- i. O uPAR é um recetor da superfície celular que em linhas de CCR está sobreexpresso contribuindo para a invasão tumoral. O bloqueio da ativação de uPAR pelo ácido desoxicólico diminuiu a viabilidade de células de CCR – LoVo e SW480 [306].
- ii. Os grupos -OH influenciam a hidrofobicidade dos ácidos biliares. O ácido desoxicólico é hidrofóbico, possui dois grupos -OH e é pouco polar (figura 3.10). Esta estrutura aumenta a sua capacidade de interagir fortemente com as membranas celulares, o que pode danificar a integridade da membrana. Estudos demonstraram que esta hidrofobicidade dos ácidos biliares pode estar relacionada com a sua capacidade de induzir a apoptose em células colorretais HT29 [305].

Hipótese para o efeito cancerígeno do ácido desoxicólico em células CCR:

- i. A E-caderina é uma proteína responsável pela adesão celular em tecidos epiteliais, através da ajuda das cateninas. Se o ácido desoxicólico afetar a ligação entre a E-caderina e as cateninas, isso pode enfraquecer a coesão entre células facilitando a invasão das células cancerígenas o que pode levar a características de tumores invasivos [306].

3.2.3.8. Ácidos monohidroxibenzoicos

Os ácidos monohidroxibenzoicos são um grupo de compostos orgânicos com um grupo -OH e um grupo carboxilato no anel de benzeno (figura 3.11). Têm diversas funções na indústria farmacêutica e cosmética. Existe uma relação entre o ácido benzoico (BA) e os ácidos monohidroxibenzoicos pois partilham de uma estrutura básica semelhante: contêm um anel de benzeno. Os derivados BA são compostos químicos com um anel de benzeno, mas com modificações na sua molécula, normalmente pela substituição de átomos de hidrogénio e grupos funcionais. Alguns exemplos são: ácido hidroxibenzoico (HBA), ácido di-hidroxibenzoico (DHBA), ácido dimetoxibenzoico (DMBA) e ácido mono-hidroxi-dimetoxi-benzoico (MHDMBA) [307].

O ácido 4-hidroxibenzoico e o ácido salicílico fazem parte da classe de HBA e contêm o grupo -OH na posição 4 do anel de benzeno e um grupo -OH na posição 2 do anel de benzeno, respetivamente [308]. O ácido acetilsalicílico (aspirina) é um derivado do ácido salicílico, e ambos têm

propriedades anti-inflamatórias. A eficácia do ácido acetilsalicílico em reduzir o risco de CCR é relatada entre 20-40% e estudos demonstraram que a sua ingestão por 5 ou mais anos reduz o risco associado a adenomas e carcinomas colorretais. Embora a aspirina seja recomendada para prevenção primária do CCR o seu papel na prevenção secundária e terciária ainda não está esclarecido [309].

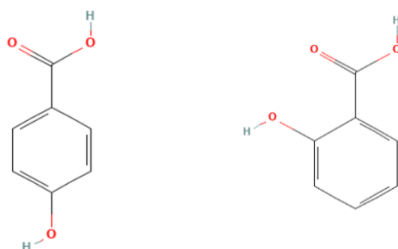


Figura 3.11. Estrutura química do ácido 4-hidroxibenzoico e do ácido salicílico, respetivamente (PubChem).

Na tabela 3.10 estão representados os valores de EC_{50} e IC_{50} dos metabolitos ácido 4-hidroxibenzoico e ácido salicílico, em células HT29 e Caco-2 (figuras 3.3A e 3.3B).

Tabela 3.10. Representação dos valores de EC_{50} e de IC_{50} dos ácidos monohidroxibenzoicos 4-hidroxibenzoico e ácido salicílico nas linhas celulares HT29 e Caco-2, respetivamente.

Metabolito	Ácido 4-hidroxibenzoico	Ácido salicílico
Valor de EC_{50} (μM) em HT29	562 ± 74	854 ± 441
Valor de IC_{50} (μM) em Caco-2	522 ± 72	476 ± 117

Tendo em conta os resultados obtidos, o ácido 4-hidroxibenzoico tem um valor de EC_{50} menor comparado ao ácido salicílico, indicando que é mais eficaz na redução da viabilidade celular nas células HT29. Ambos os compostos apresentam alguma citotoxicidade, no entanto, o ácido salicílico tem menos efeito citotóxico em células Caco-2 (menor IC_{50}). Em comparação com outros compostos acima relatados, estes não são os mais promissores, tendo em conta os seus valores de EC_{50} e IC_{50} .

O ácido 4-hidroxibenzoico apresentou valores de EC_{50} em HT29 de $562 \pm 74 \mu\text{M}$ e de IC_{50} em Caco-2 de $522 \pm 72 \mu\text{M}$, com erros relativos semelhantes de cerca de 13% para ambos. Estes valores sugerem uma resposta relativamente consistente nas duas linhagens celulares, indicando que o ácido 4-hidroxibenzoico pode ter um efeito semelhante em ambas. Já o ácido salicílico apresentou valores de EC_{50} em HT29 de $854 \pm 441 \mu\text{M}$ e de IC_{50} em Caco-2 de $476 \pm 117 \mu\text{M}$. A maior diferença entre os valores de EC_{50} e IC_{50} (cerca de $378 \mu\text{M}$) e o elevado erro relativo do EC_{50} para HT29 (51.7%) indicam

uma maior variabilidade e sugerem que o comportamento do ácido salicílico nas células HT29 pode ser menos previsível. A diferença observada entre as duas linhagens celulares pode ser estatisticamente significativa.

Não existem muitos estudos na literatura acerca da relação entre o efeito antiproliferativo dos HBAs e o CCR. Contudo existem algumas hipóteses, tais como:

- i. O ácido 4-hidroxibenzóico pode inibir as enzimas COX-1 e COX-2 e as vias de sinalização mTOR, Wnt e NF-kB que estão envolvidas na sobrevivência e proliferação celular [309].
- ii. Um estudo realizado com o ácido salicílico, indicou que até à concentração de 1000 μM este composto não afeta a viabilidade celular, ou seja, não há diminuição da proliferação de células cancerígenas. Contudo, nos resultados obtidos, pode-se ver uma diminuição da viabilidade celular a uma concentração de 850 μM em células HT29. Esta diferença de resultados pode advir do meio de cultura diferente (McCoy's 5^a vs. RPMI) e tempo de incubação [310].
- iii. Um estudo anterior demonstrou que as células HT29 e Caco-2 foram incubadas com BA durante 72h e a viabilidade celular foi avaliada utilizando o teste MTT. Os resultados obtidos indicam 50% da redução da viabilidade celular deste composto em células HT29 e Caco-2, nas concentrações 5491 μM e 2710 μM , respetivamente [311]. Os valores de EC_{50} observados foram significativamente superiores aos obtidos (tabela 3.10). Esta discrepância pode ser atribuída ao facto de o composto utilizado neste estudo ser diferente (ácido 4-hidroxibenzóico), apesar de ambos pertencerem à mesma classe.

A explicação na literatura acerca do efeito anticancerígeno dos HBAs no CCR é limitada, contudo, existem estudos destes compostos noutras linhas de cancro, como o cancro de mama e do pulmão que demonstram efeito anticancerígeno [312].

3.2.3.9. Ácido hidroxicinâmico

Os ácidos hidroxicinâmicos (HCAs), ácido cafeico, *p*-cumárico e ferúlico, são compostos fenólicos com propriedades antioxidantes encontrados em plantas, ajudam a combater o *stress* oxidativo e reduzem o risco de doenças crónicas [313]. As características estruturais dos HCAs foram relatadas como importantes para a atividade antioxidante: grupo -OH, anel de benzeno e grupo carboxilato (figura 3.12). A maioria das investigações concluiu que a presença do grupo orto-dihidroxifenil (catecol) é importante para a atividade antioxidante [314].

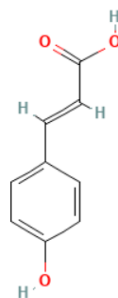


Figura 3.12. Estrutura química do ácido *p*-cumárico (PubChem).

Na tabela 3.11 estão representados os valores de EC₅₀ e IC₅₀ do ácido *p*-cumárico, em células HT29 e Caco-2 (figuras 3.3A e 3.3B).

Tabela 3.11. Representação dos valores de EC₅₀ e de IC₅₀ do ácido hidroxicinâmico *p*-cumárico nas linhas celulares HT29 e Caco-2, respetivamente.

Metabolito	Ácido <i>p</i> -cumárico
Valor de EC ₅₀ (µM) em HT29	≥ 1000
Valor de IC ₅₀ (µM) em Caco-2	≥ 1000

Estes resultados sugerem que o ácido *p*-cumárico é pouco promissor, pois apesar de não ser citotóxico em células de Caco-2, também não teve efeito antiproliferativo em células cancerígenas, logo tem baixa eficácia. Embora o ácido *p*-cumárico seja descrito na literatura como um agente anticancerígeno, os resultados obtidos neste estudo não corroboraram essa atividade. Não foi observada uma redução da viabilidade celular na linha de CCR testada [315].

Hipóteses para o ácido *p*-cumárico não causar efeito antiproliferativo:

- i. Apesar de o ácido *p*-cumárico ter um grupo -OH e este ter propriedades antioxidantes, o efeito anticancerígeno de um composto não depende só dos grupos funcionais, mas também da sua estrutura global e da concentração, o que pode justificar a falta de efeito deste composto.
- ii. Estudos anteriores demonstraram que o ácido *p*-cumárico induziu a apoptose em linhas de CCR, incluindo HT29, DLD-1, SW480 e Caco-2 e interrompeu o ciclo celular em HT29 e Caco-2 nas fases G1 e G2, em concentrações de 1400 µM e 1500 µM, respetivamente. No

entanto, nos resultados obtidos neste estudo não foi observado efeito antiproliferativo com a concentração máxima testada de 1000 μM . Isto sugere que, para observar um efeito significativo, seria necessário testar concentrações mais altas conforme relatado [315,316].

- iii. Outro estudo demonstrou efeito antiproliferativo do ácido *p*-cumárico com um valor de EC_{50} = 1600 μM para células HT29. A discrepância entre esse resultado e o obtido nos nossos resultados ($\geq 1000 \mu\text{M}$) deve-se a vários fatores: a concentração do composto testado (1600 vs. 1000 μM), o meio de cultura utilizado (DMEM vs. RPMI) e o método de avaliação da viabilidade celular (MTT vs. *PrestoBlue*[™]). Estas variáveis podem influenciar os resultados e a capacidade deste composto em induzir efeito antiproliferativo em células HT29 [317].

Em suma, as classes de compostos mais promissoras foram os fenóis simples, ácidos triterpénicos, secoiridóides, ácidos gordos e ácidos biliares, pois os compostos presentes nestas classes foram os que apresentaram menor valor de EC_{50} , logo, obtiveram maior efeito antiproliferativo. De modo a perceber o efeito destes metabolitos noutra linha celular de CCR, utilizou-se a linha celular LoVo que apresenta características mais metastáticas.

3.3. Efeito antiproliferativo do extrato de azeite e dos metabolitos em modelos 2D e 3D na linha celular LoVo

3.3.1. Efeito antiproliferativo do extrato de azeite no modelo 2D na linha celular LoVo

De forma a testar o efeito antiproliferativo do extrato de azeite e dos metabolitos utilizou-se outra linha celular cancerígena com características metastáticas (LoVo), originária de uma metástase de adenocarcinoma do cólon. A metastização é responsável pela maioria das mortes associadas ao cancro, logo, testar compostos em células metastáticas é crucial para avaliar se esses compostos podem ser capazes de inibir a formação de metástases e, conseqüentemente, contribuir para identificar novas terapias mais eficientes para o CCR. No entanto, as células metastáticas são mais agressivas e resistentes a tratamentos, logo, se um composto tiver efeito pode tornar-se promissor para o desenvolvimento de terapias [318,319].

Esta linha celular ainda não foi amplamente investigada, resultando numa quantidade limitada de dados disponíveis na literatura científica. Devido à sua menor utilização em pesquisas, comparada a outras linhas celulares, ainda há algumas lacunas no conhecimento sobre as suas características e comportamento biológico.

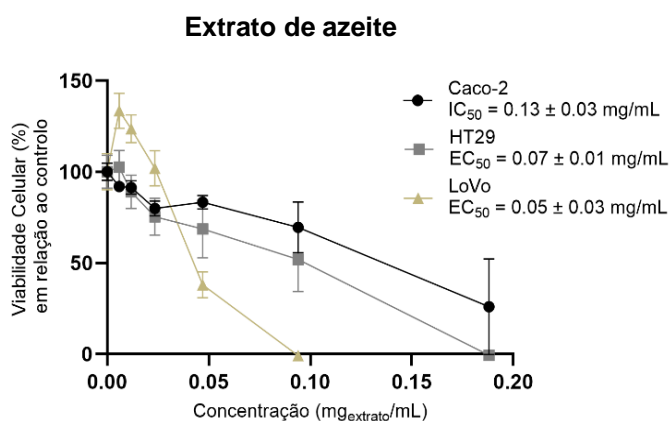


Figura 3.13. Curva dose-resposta após 72h de incubação do extrato de azeite em HT29, LoVo e Caco-2 em modelos 2D (resultados: média ± SD (n=3)).

A figura 3.13 demonstra a comparação entre as curvas dose-resposta após 72h de incubação do extrato de azeite nas 3 linhas celulares, LoVo, HT29 e Caco-2 de modo a verificar os potenciais efeitos antiproliferativo e de citotoxicidade, respetivamente.

Comparando as duas linhas de CCR, o extrato apresentou menor valor de EC_{50} (0.05 ± 0.03 mg/mL) na linha celular LoVo do que em HT29 ($EC_{50} = 0.07 \pm 0.01$ mg/mL) indicando que os compostos presentes no azeite apresentam maior efeito antiproliferativo numa linha celular com características metastáticas. No entanto, a diferença entre os valores de EC_{50} não é significativa.

Não existe muita informação acerca desta linha celular. Contudo, estudos demonstram que o extrato de azeite exerce efeitos antiproliferativos em outras linhas de CCR como na linha celular HT29, como visto anteriormente (secção 3.2.1).

Hipóteses para que o extrato de azeite tenha mais efeito na linha celular LoVo:

- i. As células LoVo podem apresentar uma regulação diferente das vias NF- κ B ou MAPK, associadas à inflamação e sobrevivência celular. A inibição destas vias por compostos presentes no extrato de azeite pode ser uma razão para explicar a maior sensibilidade por parte destas células [320].
- ii. As células LoVo normalmente apresentam uma mutação no gene *APC* o que desencadeia a ativação da via Wnt/ β -catenina responsável pela proliferação celular. Se os compostos presentes no extrato de azeite atuarem nesta via, podem inibir a proliferação celular e diminuir a viabilidade e sobrevivência das células LoVo [244].

A literatura indica que os compostos do extrato de azeite têm ação antiproliferativa em várias linhas de CCR, como descrito anteriormente em HT29 (secção 3.2.1). Estudos anteriores em outra linha celular HT115, indicaram que o azeite virgem regulou de forma negativa a subunidade alfa-2 da integrina, o que promoveu a diminuição da disseminação do tumor e do número de metástases em modelos *in vitro*. Em células SW620, o azeite virgem inibiu as enzimas responsáveis pela síntese de ácidos gordos (FAZ), levando à redução da proliferação celular e à indução da apoptose. Esses mecanismos observados em diferentes linhas celulares oferecem hipóteses sobre como o azeite virgem pode atuar também em células LoVo [225].

3.3.2. Efeito antiproliferativo dos metabolitos no modelo 2D da linha celular LoVo

Nas figuras 3.14A e 3.14B está apresentada a viabilidade celular dos vários metabolitos (72h de incubação) no ensaio antiproliferativo em células LoVo e no ensaio de citotoxicidade em células Caco-2 no modelo 2D.

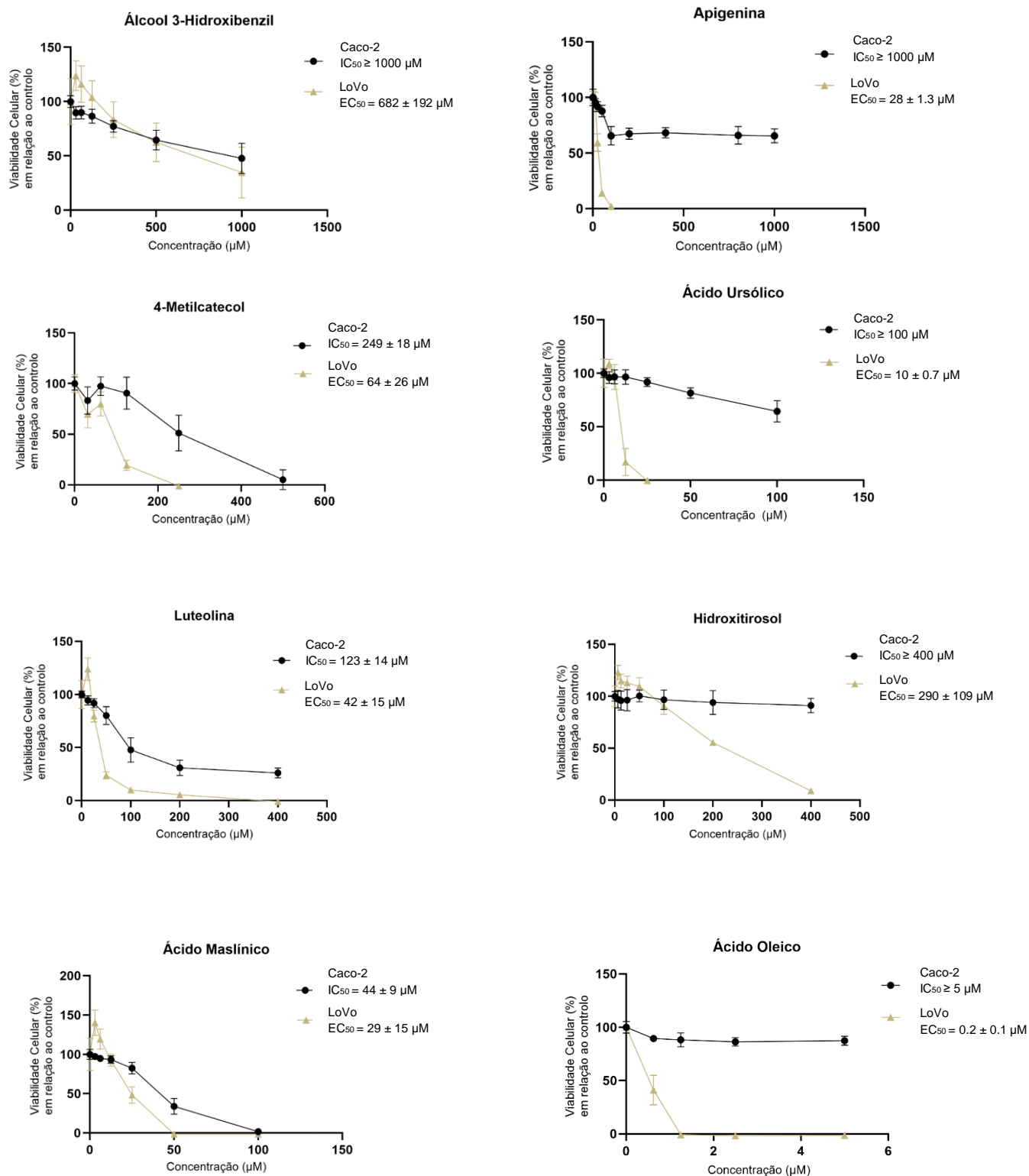


Figura 3.14A. Curva dose-resposta após 72h de incubação dos metabolitos álcool 3-hidroxibenzilo, apigenina, 4-metilcatecol, ácido ursólico, luteolina, hidroxitirosol, ácido maslínico e ácido oleico em células LoVo e Caco-2 em modelos 2D (resultados: média ± SD (n=3)).

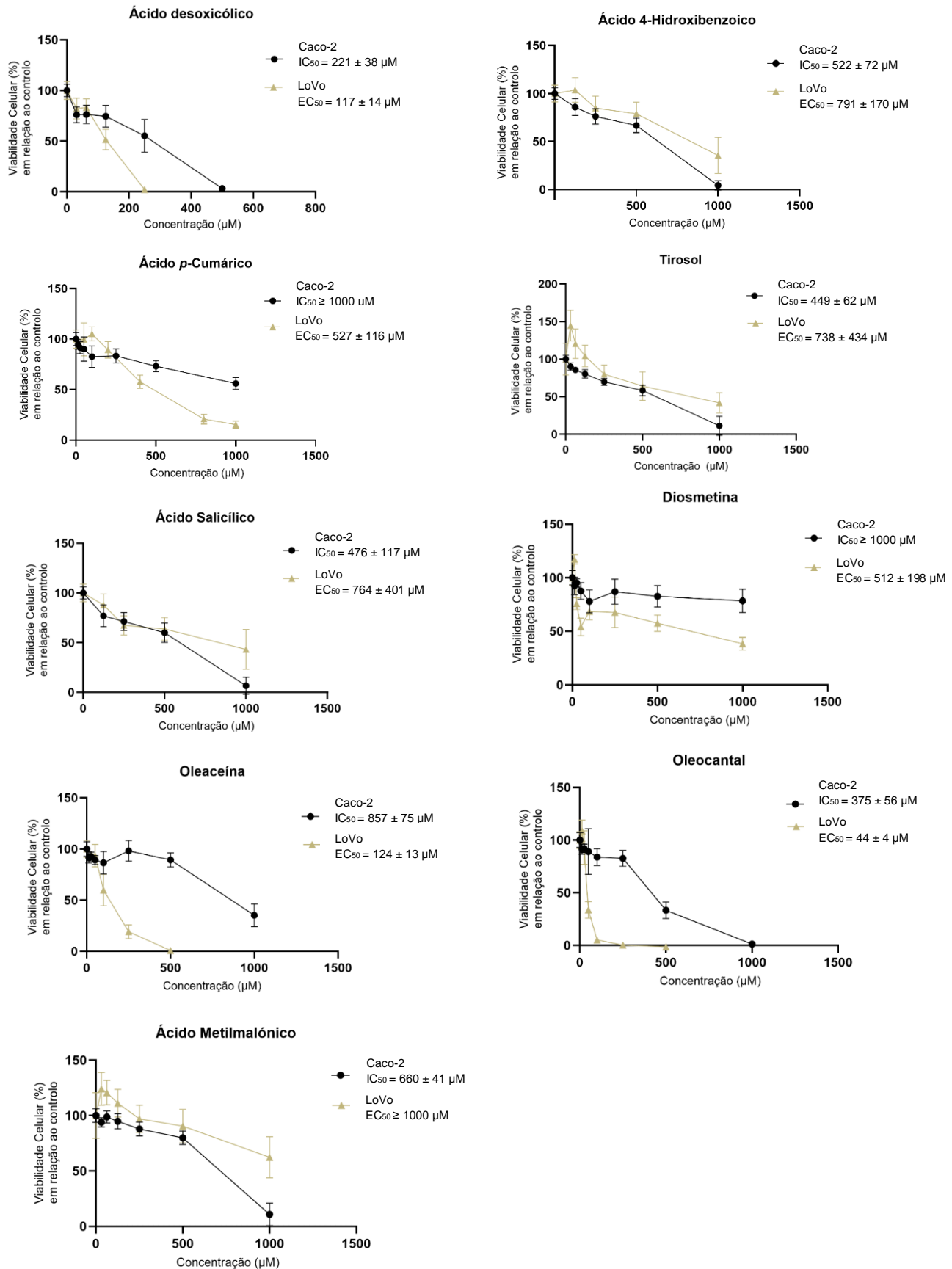


Figura 3.14B. Curva dose-resposta após 72h de incubação dos metabolitos ácido desoxicólico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido *p*-cumárico, tirosol, ácido salicílico, diosmetina, oleocantal, oleaceína e ácido metilmalónico, em células LoVo e Caco-2 em modelos 2D (resultados: média ± SD (n=3)).

3.3.2.1. Fenóis simples

Como mencionado anteriormente, os fenóis simples são o hidroxitirosol, tirosol, álcool 3-hidroxibenzilo e o 4-metilcatecol, e possuem efeito antiproliferativo em células de CCR. Na tabela 3.12 estão representados os valores de EC_{50} para as células LoVo e o valor de IC_{50} para a linha celular Caco-2 (figuras 3.14A e 3.14B).

Tabela 3.12. Representação dos valores de EC_{50} e IC_{50} dos fenóis simples nas linhas celulares LoVo e Caco-2, respetivamente.

Metabolito	Hidroxitirosol	Tirosol	Álcool 3-hidroxibenzilo	4-metilcatecol
Valor de EC_{50} (μM) em LoVo	290 \pm 109	738 \pm 434	682 \pm 192	64 \pm 26
Valor de IC_{50} (μM) em Caco-2	\geq 400	449 \pm 62	\geq 1000	249 \pm 18

Através destes resultados obtidos, pode-se verificar que nas células LoVo, o 4-metilcatecol e o hidroxitirosol são os metabolitos com maior efeito antiproliferativo (menor valor de EC_{50}) e o hidroxitirosol é o menos citotóxico (menor valor de IC_{50} : $IC_{50} \geq 400 \mu\text{M}$). O tirosol é o que apresenta menor efeito antiproliferativo nas células LoVo (maior valor de EC_{50} : $EC_{50} = 738 \pm 434 \mu\text{M}$). Comparando as duas linhas de CCR- LoVo e HT29, todos os compostos, à exceção do 4-metilcatecol, obtiveram mais efeito antiproliferativo nas células HT29, ou seja, reduziram 50% da viabilidade celular a concentrações mais baixas do que nas células LoVo. Estes resultados eram expectáveis, pois as LoVo são uma linha celular mais resistente e metastática [162] e por isso, têm maior resistência a agentes terapêuticos, incluindo os compostos fenólicos. Para além disso, as células metastáticas podem ter perfis de expressão génica que conferem resistência à apoptose induzida por agentes citotóxicos [319].

O tirosol apresentou um valor de EC_{50} em LoVo de $738 \pm 434 \mu\text{M}$, com um erro relativo elevado de 58.7%, indicando uma considerável variabilidade nos resultados sugerindo que a resposta ao tirosol nas células LoVo é menos previsível e que pode ser necessária uma otimização das condições experimentais para melhorar a precisão e reduzir a variabilidade. Em Caco-2, o valor de IC_{50} foi de $449 \pm 62 \mu\text{M}$, com um erro relativo de 13.8%, o que mostra uma resposta mais consistente e confiável do tirosol nesta linhagem celular.

Hipóteses para o efeito antiproliferativo dos fenóis simples em células LoVo:

- i. Estudos anteriores demonstraram que o hidroxitirosol e o Tirosol exibiram atividade anticancerígena em células HCT116, através da paragem do ciclo celular e da indução da apoptose [321].

- ii. Estudos demonstraram que após 72h de incubação com hidroxitirosol, obteve-se um valor de EC_{50} (140.8 μ M) em células LoVo e um valor de EC_{50} (92.8 μ M) na linha celular HCT116. A diferença entre os resultados obtidos neste trabalho ($EC_{50}= 290 \pm 109 \mu$ M) e a literatura poderá ter a ver com a diferença no método de viabilidade celular, meio de cultura utilizado ou inóculo utilizado [201].

O hidroxitirosol é um composto muito promissor e tem atividade anticancerígena em diferentes linhas de cancro (colorretal, mama, entre outros) devido à sua capacidade de induzir a apoptose e ROS. As hipóteses mencionadas acima acerca do efeito antiproliferativo do hidroxitirosol, tirosol, do álcool 3-hidroxibenzilo e do 4-metilcatecol na linha celular HT29 podem adequar-se a esta linha de CCR.

3.3.2.2. Flavonóides

A apigenina, a luteolina e a diosmetina pertencem à classe dos flavonóides e têm efeitos biológicos relevantes. Na tabela 3.13 estão representados os valores de EC_{50} e IC_{50} destes metabolitos, em células LoVo e Caco-2 (figuras 3.14A e 3.14B), respetivamente.

Tabela 3.13. Representação dos valores de EC_{50} e de IC_{50} dos flavonoides apigenina, luteolina e a diosmetina nas linhas celulares LoVo e Caco-2, respetivamente.

Metabolito	Apigenina	Luteolina	Diosmetina
Valor de EC_{50} (μM) em LoVo	28 \pm 1.3	42 \pm 15	512 \pm 198
Valor de IC_{50} (μM) em Caco-2	\geq 1000	123 \pm 14	\geq 1000

Nas células LoVo, a apigenina tem maior efeito antiproliferativo (menor valor de EC_{50}) o que indica que é mais eficaz na redução da proliferação celular do que a luteolina. A apigenina e a diosmetina não apresentaram citotoxicidade em células Caco-2 para as concentrações testadas. A luteolina apresenta um efeito antiproliferativo a concentrações baixas, contudo, é mais citotóxico.

Relativamente às duas linhas de CCR- HT29 e LoVo, a apigenina demonstrou maior efeito antiproliferativo em células LoVo do que em HT29, pois teve uma redução de 50% da viabilidade celular a concentrações mais inferiores do que nas HT29 ($EC_{50}= 481 \pm 113 \mu$ M). A luteolina e a diosmetina também demonstraram ter mais efeito antiproliferativo na linha celular LoVo, contudo, a diferença foi menos acentuada em comparação com a apigenina. Estes resultados são muito promissores, pois estes compostos produziram um maior efeito antiproliferativo numa linha celular mais resistente e metastática. Este facto pode acontecer pois as células metastáticas costumam ter níveis elevados de

stress oxidativo; logo, se os compostos aumentarem o *stress oxidativo* as células podem ficar comprometidas e diminuir a sua viabilidade [318].

A diosmetina é o flavonóide menos eficaz, pois é o composto que apresentou maior valor de EC_{50} quando comparada com outros metabolitos. Logo, não demonstrou um efeito antiproliferativo significativo em nenhuma linha celular.

Efeito antiproliferativo da apigenina, luteolina e diosmetina em linhas de CCR:

Como existe pouca informação acerca desta linha celular, seria importante comparar estes compostos com outra linha celular de CCR também metastática, a SW620.

- i. Após 72h, apigenina reduziu 50% da viabilidade celular na linha celular SW620 a uma concentração de 30.6 μM [249]. Este resultado é semelhante ao obtido nas células LoVo ($EC_{50} = 28 \pm 1.3 \mu\text{M}$) o que indica que este composto tem efeito sobre as células de CCR metastáticas.
- ii. Outro estudo demonstrou que a apigenina inibiu a proliferação celular nas células LoVo após 24h ($EC_{50} = 34.5 \mu\text{M}$) [250]. O valor de EC_{50} obtido nestes resultados ($EC_{50} = 28 \pm 1.3 \mu\text{M}$) é idêntico ao descrito na literatura. Contudo, as diferenças podem advir do meio de cultura utilizado, do tempo de incubação dos compostos na linha celular e do método de detecção da viabilidade celular. Estes resultados podem ser justificados pela diminuição do marcador vimentina e pelo aumento da E-caderina, provocando uma diminuição das características invasivas das células [250].
- iii. Em estudos anteriores observou-se que a luteolina diminuiu 50% da viabilidade celular das células LoVo a uma concentração de 25.1 μM [322], inferior ao obtido no presente trabalho ($EC_{50} = 42 \pm 15 \mu\text{M}$). Esta diferença, apesar de não ser significativa, pode ser devido ao tempo de incubação utilizado na literatura (48h vs. 72h) e ao método da detecção da viabilidade celular (sulforodamina B vs. *PrestoBlue*TM).
- iv. Em estudos publicados na literatura, a diosmetina obteve um valor de EC_{50} ($15 \pm 2 \mu\text{M}$) na linha celular LoVo após 72h de incubação. Este valor é bastante inferior ao obtido no presente estudo ($EC_{50} = 512 \pm 198 \mu\text{M}$), o que sugere que outros fatores possam estar a ter impacto nesta diferença de resultados, tais como, o meio de cultura utilizado na literatura (RPMI 1640 e Opti-MEM vs. F12K) e o ensaio de MTT (vs. *PrestoBlue*TM) para a detecção da viabilidade celular [323].

A apigenina, a luteolina e a diosmetina são flavonas, logo a sua estrutura plana e a presença de uma ligação dupla entre os átomos de carbono C2 e C3 é importante para uma maior atividade antiproliferativa relativamente a outros compostos fenólicos em diferentes linhas de CCR. A inibição da P-gp nas células LoVo por estas flavonas pode ser benéfica para o tratamento do CCR [322]

3.3.2.3. Ácidos Triterpénicos

Relativamente aos ácidos triterpénicos, na tabela 3.14 estão representados os valores de EC₅₀ e IC₅₀ dos metabolitos ácido maslínico e ácido ursólico, em células LoVo e Caco-2 (figuras 3.14A e 3.14B), respetivamente.

Tabela 3.14. Representação dos valores de EC₅₀ e de IC₅₀ dos ácidos triterpénicos ácido maslínico e ácido ursólico nas linhas celulares LoVo e Caco-2, respetivamente.

Metabolito	Ácido maslínico	Ácido ursólico
Valor de EC₅₀ (µM) em LoVo	29 ± 15	10 ± 0.7
Valor de IC₅₀ (µM) em Caco-2	44 ± 9	≥ 100

O ácido ursólico apresenta maior efeito antiproliferativo na linha celular LoVo e menor efeito citotóxico em Caco-2, em comparação com o ácido maslínico. O ácido maslínico também apresenta redução da viabilidade celular a concentrações baixas em células LoVo, mas possui citotoxicidade. Comparando as duas linhas de CCR- HT29 e LoVo, o ácido maslínico apresentou maior efeito antiproliferativo nas células HT29 (EC₅₀= 20 ± 9 µM) e o ácido ursólico demonstrou uma maior atividade antiproliferativa nas células LoVo.

Ensaio antiproliferativos do ácido maslínico e do ácido ursólico em células LoVo:

- i. Estudos anteriores demonstraram que o ácido ursólico teve efeito nas células LoVo após 72h de incubação, a uma concentração de 16.8 µM. Esta concentração é ligeiramente superior, mas semelhante à obtida (10 ± 0.7 µM) [324]. Contrariamente, outro estudo demonstrou que, após 48h de incubação das células LoVo, o ácido ursólico apresentou um valor de EC₅₀ de 60 µM, que difere do obtido nos nossos resultados. As discrepâncias podem ser devido ao menor tempo de incubação utilizado na literatura (48h vs. 72h). Um período de incubação mais prolongado poderia ter mostrado um efeito antiproliferativo superior [325].

- ii. Há poucos estudos acerca do efeito do ácido maslínico em células LoVo, mas considerando que LoVo é uma linha de CCR, é normal supor que os mecanismos pelos quais o ácido maslínico exerce o seu efeito antiproliferativo (ex: indução da apoptose) noutras linhas de CCR possam ser semelhantes para as células LoVo [286].

3.3.2.4. Secoiridóides

Como já visto anteriormente, o oleocantal e a oleaceína pertencem à classe dos secoiridóides. Na tabela 3.15 estão representados os valores de EC₅₀ e IC₅₀ dos metabolitos oleocantal e oleaceína, em células LoVo e Caco-2 (figuras 3.14A e 3.14B), respetivamente.

Tabela 3.15. Representação dos valores de EC₅₀ e de IC₅₀ dos secoiridóides oleocantal e oleaceína nas linhas celulares LoVo e Caco-2, respetivamente.

Metabolito	Oleocantal	Oleaceína
Valor de EC₅₀ (µM) em LoVo	44 ± 4	124 ± 13
Valor de IC₅₀ (µM) em Caco-2	375 ± 56	857 ± 75

O oleocantal apresentou maior efeito antiproliferativo em células LoVo do que a oleaceína, pois obteve um menor valor de EC₅₀. No entanto, o oleocantal apresentou maior citotoxicidade em células Caco-2 do que a oleaceína. Estes dois metabolitos apresentaram ambos maior efeito antiproliferativo em células LoVo do que nas células HT29.

Poucos estudos existem na literatura sobre o efeito do oleocantal e oleaceína na linha celular LoVo; em baixo, sugerem-se algumas hipóteses para os resultados obtidos.

Hipóteses do efeito antiproliferativo do oleocantal e da oleaceína em células LoVo:

- i. O oleocantal pode atuar nas células LoVo como um inibidor da COX-2, tal como em outras linhas de CCR (ex: HT29 e SW480) [326].
- ii. O oleocantal pode induzir a apoptose aumentando a produção de ROS que causa danos no DNA e morte celular nas células LoVo [326].
- iii. O oleocantal pode ativar a AMPK que está envolvido na inibição da proliferação celular e na apoptose de células cancerígenas [217].

3.3.2.5. Ácido dicarboxílico

Na tabela 3.16 estão representados os valores de EC₅₀ e IC₅₀ do ácido metilmalónico, em células LoVo e Caco-2 (figuras 3.14A e 3.14B), respetivamente.

Tabela 3.16. Representação dos valores de EC₅₀ e de IC₅₀ do ácido metilmalónico nas linhas celulares LoVo e Caco-2, respetivamente.

Metabolito	Ácido metilmalónico
Valor de EC₅₀ (µM) em LoVo	≥ 1000
Valor de IC₅₀ (µM) em Caco-2	660 ± 41

Está relatado que o ácido metilmalónico promove a progressão do CCR através da proliferação celular, migração e invasão em células de CCR: HCT116 e SW480 [297]. Nos resultados obtidos, o ácido metilmalónico não provocou qualquer diminuição na viabilidade de células de CCR- HT29 e LoVo após 72h de incubação.

3.3.2.6. Ácidos gordos

Na tabela 3.17 estão representados os valores de EC₅₀ e IC₅₀ do ácido oleico, em células LoVo e Caco-2 (figuras 3.14A e 3.14B), respetivamente.

Tabela 3.17. Representação dos valores de EC₅₀ e de IC₅₀ do ácido gordo nas linhas celulares LoVo e Caco-2, respetivamente.

Metabolito	Ácido oleico
Valor de EC₅₀ (µM) em LoVo	0.2 ± 0.1
Valor de IC₅₀ (µM) em Caco-2	≥ 5

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que o ácido oleico teve maior efeito antiproliferativo em células LoVo do que em células HT29 (EC₅₀= 2 ± 0.7 µM), uma vez que diminui 50% da viabilidade celular a concentrações mais baixas nas células LoVo. No entanto, o erro relativo de 50% no valor de EC₅₀ indica uma certa variabilidade nos resultados, o que pode sugerir que a reprodutibilidade pode ser melhorada. Por outro lado, o valor de IC₅₀ em Caco-2 foi determinado como

sendo superior a 5 μM , indicando que o ácido oleico não exerce efeito significativo nas células Caco-2 nas concentrações testadas. Essa diferença de resposta entre as duas linhagens celulares sugere que o ácido oleico pode ter uma ação seletiva, sendo mais eficaz nas células LoVo do que nas Caco-2.

Embora a relação entre o ácido oleico e as células LoVo ainda esteja pouco explorada na literatura, os efeitos observados indicam que este composto pode atuar de forma semelhante ao que foi descrito para outras linhas de CCR.

3.3.2.7. Ácido biliar

Na tabela 3.18 estão representados os valores de EC_{50} e IC_{50} do ácido desoxicólico, em células LoVo e Caco-2 (figuras 3.14A e 3.14B), respetivamente.

Tabela 3.18. Representação dos valores de EC_{50} e de IC_{50} do ácido desoxicólico nas linhas celulares LoVo e Caco-2, respetivamente.

Metabolito	Ácido desoxicólico
Valor de EC_{50} (μM) em LoVo	117 \pm 14
Valor de IC_{50} (μM) em Caco-2	221 \pm 38

O efeito do ácido desoxicólico nas linhas de CCR utilizados nos ensaios antiproliferativos foi muito semelhante, no entanto, teve mais efeito antiproliferativo em células LoVo. O efeito deste composto é muito controverso, pois na literatura está relatado como promotor e inibidor do cancro. Alguns estudos demonstram que o ácido desoxicólico pode promover a progressão do cancro ao aumentar a expressão da ciclina D1, a fosforilação da β -catenina e a expressão de uPA e uPAR em células LoVo e SW480 [305].

Na literatura, associam o ácido desoxicólico a efeitos positivos em cancro do fígado [327], contudo, poucos estudos existem entre o efeito antiproliferativo deste composto e o CCR.

3.3.2.8. Ácidos monohidroxibenzoicos

Na tabela 3.19 estão representados os valores de EC_{50} e IC_{50} dos metabolitos ácido 4-hidroxibenzoico e ácido salicílico, em células LoVo e Caco-2 (figuras 3.14A e 3.14B), respetivamente.

Tabela 3.19. Representação dos valores de EC₅₀ e de IC₅₀ dos compostos ácido 4-hidroxibenzoico e ácido salicílico nas linhas celulares LoVo e Caco-2, respetivamente.

Metabolito	Ácido 4-hidroxibenzoico	Ácido salicílico
Valor de EC₅₀ (µM) em LoVo	791 ± 170	764 ± 401
Valor de IC₅₀ (µM) em Caco-2	522 ± 72	476 ± 117

Estes resultados indicam que o efeito antiproliferativo destes dois metabolitos nas células LoVo é bastante semelhante, com valores de EC₅₀ elevados indicando que nenhum dos compostos se destaca como particularmente promissor para um efeito antiproliferativo acentuado. Para além disto, estes compostos têm um valor de IC₅₀ inferior ao valor de EC₅₀, logo, a sua ação antiproliferativa não é relevante. Relativamente às duas linhas de CCR, utilizadas no ensaio antiproliferativo, o ácido 4-hidroxibenzoico teve maior efeito antiproliferativo em HT29, ao contrário do ácido salicílico que teve maior efeito em células LoVo. Este resultado pode ser justificado pela forma como cada metabolito interage com alvos moleculares, pois o ácido 4-hidroxibenzoico pode ser mais eficaz em HT29 devido à sua capacidade de interagir com vias de sinalização que afetem o crescimento dessas células. Já o ácido salicílico pode ter mais efeito em linhas metastáticas, como as LoVo devido à sua possível capacidade de influenciar vias inflamatórias e proliferativas [328].

3.3.2.9. Ácido hidroxicinâmico

Na tabela 3.20 estão representados os valores de EC₅₀ e IC₅₀ do ácido *p*-cumárico, em células LoVo e Caco-2 (figuras 3.14A e 3.14B), respetivamente.

Tabela 3.20. Representação dos valores de EC₅₀ e de IC₅₀ do ácido *p*-cumárico nas linhas celulares LoVo e Caco-2, respetivamente.

Metabolito	Ácido <i>p</i>-cumárico
Valor de EC₅₀ (µM) em LoVo	527 ± 116
Valor de IC₅₀ (µM) em Caco-2	≥ 1000

Estes resultados sugerem que o ácido *p*-cumárico teve algum efeito antiproliferativo em LoVo, contudo, é menos eficaz comparado a outros compostos.

Em células HT29, este metabolito não demonstrou capacidade de inibir a proliferação celular, indicando assim uma baixa atividade antiproliferativa nessas células (secção 3.2.3). Isso pode sugerir que as concentrações utilizadas não foram suficientemente altas para observar um efeito antiproliferativo significativo, como descrito anteriormente. No entanto, do ponto de vista fisiológico, aumentar excessivamente as concentrações não seria viável. Por outro lado, o facto deste metabolito não ter citotoxicidade em Caco-2 é um aspeto positivo, pois é vantajoso a nível terapêutico.

Os ácidos hidroxicinâmicos ainda não foram muito explorados ao nível do seu efeito antiproliferativo em CCR.

Em suma, de entre estas classes de compostos, as mais promissoras em células LoVo foram os fenóis simples, flavonóides, ácidos triterpénicos e os ácidos gordos. Assim, alguns dos compostos destas classes foram selecionados (álcool 3-hidroxibenzilo, 4-metilcatecol, ácido maslínico, ácido oleico, apigenina, ácido ursólico, luteolina e hidroxitirosol) com base no seu valor de EC_{50} (menor valor de EC_{50} - maior efeito antiproliferativo) para serem testados em modelos 3D, em esferóides LoVo.

3.3.3. Efeito antiproliferativo dos metabolitos no modelo 3D da linha celular LoVo

Entre os metabolitos testados em modelos 2D, oito foram selecionados para serem estudados em modelos 3D em esferóides LoVo (figura 3.15). A escolha dos metabolitos foi baseada tendo em conta os seguintes fatores: valor de EC_{50} (menor valor de EC_{50} em LoVo 2D representa maior efeito antiproliferativo); classe dos compostos; identificação nas frações do intestino delgado e cólon. Para cada composto foram obtidas curvas dose-resposta para os ensaios antiproliferativos em 3D e os resultados foram comparados com as respetivas curvas em células LoVo 2D e em Caco-2 confluentes (modelo de ensaio de citotoxicidade).

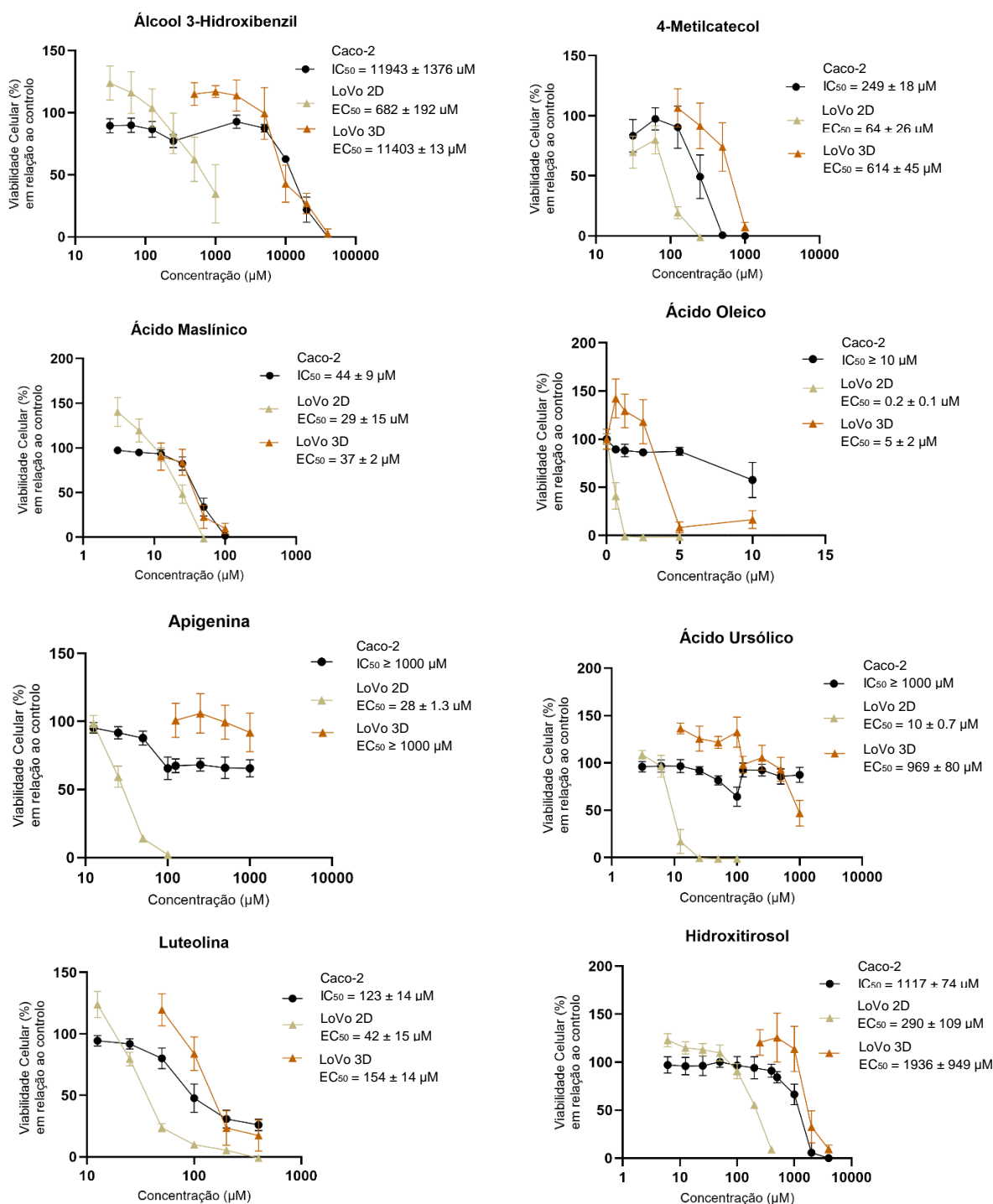


Figura 3.15. Curva dose-resposta após 72h de incubação dos metabolitos em LoVo e Caco-2 em modelos 3D (resultados: média \pm SD (n=6)).

A cultura das células numa estrutura tridimensional favorece o aumento das interações célula-célula e simula de forma mais realista o microambiente tumoral *in vivo* [199]. Os esferóides LoVo apresentam regiões de hipoxia [329], núcleo necrótico e possivelmente, maior número de células estaminais cancerígenas que estão associadas à resistência quimioterápica [199].

Considerando que as células LoVo são uma linha celular de CCR mais metastática e menos estudada em comparação às HT29, optou-se por utilizá-la para os ensaios antiproliferativos em modelos 3D com os metabolitos mais promissores identificados em modelos 2D. Os metabolitos selecionados foram: álcool 3-hidroxibenzilo, 4-metilcatecol, ácido maslínico, ácido oleico, apigenina, ácido ursólico, luteolina e hidroxitirosol, com base no seu valor de EC_{50} (tabela 3.1) em células LoVo nos modelos 2D, com base na sua localização ao longo do TGI e na sua classe. A formação e o crescimento dos esferóides foram efetuados utilizando *spinner vessels*. Este recipiente com capacidade de 125 mL garante a agitação adequada para a suspensão de esferóides durante 7 dias. A utilização deste sistema de cultura permite a produção de um grande número de esferóides homogêneos de CCR, que podem ser inoculados em microplacas para bioensaios direcionados para a avaliação do efeito anticancerígeno de compostos.

Nos modelos 3D observa-se que é necessário utilizar concentrações mais elevadas nos metabolitos para alcançar efeitos significativos nas células LoVo, pois as células cultivadas demonstram mais resistência aos tratamentos em comparação com as células cultivadas em modelos 2D. De uma forma geral, o efeito antiproliferativo dos metabolitos em modelos 2D é superior aos modelos 3D devido a diferentes fatores, tais como: fenótipo quimio-resistente do modelo 3D [199] e as células estão organizadas numa estrutura que simulam melhor o ambiente tumoral *in vivo*, com interações célula-célula ou célula-ECM mais complexas [330]. Estas interações resultam em diversos efeitos, nomeadamente:

- i. Maior resistência aos compostos;
- ii. A penetração do metabolito é mais difícil em esferóides pois as camadas externas das células 3D podem bloquear a difusão dos compostos, diminuindo a sua eficácia;
- iii. O metabolismo das células 3D pode estar alterado, comparativamente às células em 2D, o que pode influenciar a forma como os compostos são absorvidos;
- iv. Algumas células também podem entrar em estados de quiescência ou adquirir características semelhantes a células estaminais cancerígenas, que são normalmente mais resistentes aos tratamentos [329].

Os resultados obtidos indicam que o ácido oleico e o ácido maslínico mostraram eficácia semelhante nos modelos 2D e 3D das LoVo (valores de EC_{50} idênticos), o que sugere que estes metabolitos possuem características que lhes permitem contornar as barreiras impostas pelo ambiente 3D. O ácido oleico, como visto anteriormente, é um ácido gordo com propriedades anfipáticas, o que

significa que se integra facilmente nas membranas celulares, alterando a sua composição lipídica, afetando a fluidez [331]. Isto pode permitir a sua entrada nas células. O ácido maslínico pode induzir a apoptose nas células mais periféricas do esferóide pois têm alta taxa de proliferação e exposição direta do composto, contrariamente às células que estão mais próximas do centro necrótico [199], com pouca quantidade de O₂, menos ativas metabolicamente, havendo menor eficácia do composto.

Ao comparar os oito compostos testados, o ácido maslínico (EC₅₀ = 37 ± 2 µM), a luteolina (EC₅₀ = 154 ± 14 µM), e o ácido oleico (EC₅₀ = 5 ± 2 µM) apresentaram maior efeito antiproliferativo em modelos 3D (menor valor de EC₅₀), o que indica que reduziram 50% da viabilidade celular em concentrações mais baixas, relativamente aos outros metabolitos. O efeito destes metabolitos poderá ser devido aos mecanismos acima descritos. O álcool 3-hidroxibenzilo, é um composto pouco promissor, pois tem efeito antiproliferativo a concentrações muito elevadas, pouco relevantes a nível fisiológico.

Os compostos fenólicos podem atuar diretamente na ECM, que é responsável pelo suporte ao crescimento tumoral e na disseminação de metástases [332]. Como as células LoVo são células metastáticas, é possível que a diminuição da viabilidade celular observada esteja relacionada com a interferência dos compostos fenólicos na ECM. Um exemplo é a apigenina que inibe as metaloproteinases de matriz que são enzimas que facilitam a formação das metástases [333]. Ao inibir essas enzimas, a apigenina pode dificultar a progressão metastática e invasão das LoVo. Como se pode observar na figura 3.3 a apigenina diminuiu a viabilidade celular em 50% a uma concentração baixa (28.1 µM), em modelos 2D. Contrariamente, em modelos 3D não teve efeito antiproliferativo para as concentrações testadas (até 1000 µM).

Essa diferença de efeito pode ser atribuída às variações na interação da apigenina com a ECM em 2D e 3D. Em modelos 2D, a ECM é mais simples e menos representativa do ambiente natural tridimensional das células, o que pode explicar a eficácia da apigenina. Em 3D a ECM é mais complexa e a apigenina pode não ter o mesmo impacto na viabilidade celular [334].

Os restantes metabolitos (hidroxitiroso, 4-metilcatecol, ácido ursólico) apresentaram efeito antiproliferativo, mas menos significativo, o que pode estar relacionado com a fraca penetração e difusão dos metabolitos no esferóide. Todos os metabolitos apresentaram maior citotoxicidade em Caco-2 quando expostos a concentrações mais altas, com exceção do ácido ursólico, ácido oleico e apigenina (IC₅₀ > 1000 µM), o que indica que estas células são sensíveis a estes compostos a concentrações superiores.

A tabela 3.21 mostra os valores de EC₅₀ e IC₅₀ obtidos nas linhas celulares HT29, LoVo e Caco-2, em modelos 2D e 3D, do extrato de azeite e dos metabolitos.

Tabela 3.21. Representação dos valores de IC₅₀ e EC₅₀ em diferentes metabolitos nas linhas celulares Caco-2, HT29 e LoVo em 2D e 3D.

Metabolito	IC ₅₀ em Caco-2 2D (µM)	EC ₅₀ em HT29 2D (µM)	EC ₅₀ em LoVo 2D (µM)	EC ₅₀ em LoVo 3D (µM)	IC ₅₀ em Caco-2 (µM)*
Extrato de azeite	0.13 ± 0.03	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.03	-	-
Ácido metilmalónico	660 ± 41	> 1000	> 1000	-	-
Álcool 3-Hidroxibenzoilo**	≥ 1000	505 ± 72	682 ± 192	11403 ± 1352	11943 ± 1376
Hidroxitirosol**	≥ 400	226 ± 57	290 ± 109	1936 ± 949	1117 ± 74
Tirosol	449 ± 62	504 ± 57	738 ± 434	-	-
Ácido maslínico**	44 ± 9	20 ± 10	29 ± 15	37 ± 2	44 ± 9
Ácido ursólico**	≥ 100	10 ± 0.8	10 ± 0.7	969 ± 80	≥ 1000
Luteolina**	123 ± 14	88 ± 31	42 ± 15	154 ± 14	123 ± 14
Ácido 4-hidroxibenzoico	522 ± 72	562 ± 74	791 ± 170	-	-
4-metilcatecol**	249 ± 18	150 ± 67	64 ± 26	614 ± 45	249 ± 18
Apigenina**	≥ 1000	481 ± 113	28 ± 1.3	≥ 1000	≥ 1000
Ácido oleico**	≥ 5	1.6 ± 0.7	0.2 ± 0.1	5 ± 2	≥ 10
Oleaceína	857 ± 75	189 ± 19	124 ± 13	-	-
Oleocantal	375 ± 55	99 ± 3	44 ± 4	-	-
Ácido salicílico	476 ± 118	854 ± 441	764 ± 401	-	-
Ácido desoxicólico	221 ± 37	128 ± 84	117 ± 14	-	-
Diosmetina	≥ 1000	884 ± 563	512 ± 198	-	-
Ácido <i>p</i> -cumárico	≥ 1000	≥ 1000	527 ± 116	-	-

*As células Caco-2 foram testadas apenas em modelos 2D, mas as concentrações foram acertadas de acordo com as concentrações utilizadas em células LoVo em modelos 3D.

**Os metabolitos marcados a laranja foram testados em modelos 2D e 3D.

Na figura 3.16 são comparados os valores de EC₅₀ dos metabolitos utilizados nos ensaios antiproliferativos em modelos 2D e 3D. A apigenina não aparece no gráfico pois não foi possível calcular o seu valor de EC₅₀ (≥ 1000 µM).

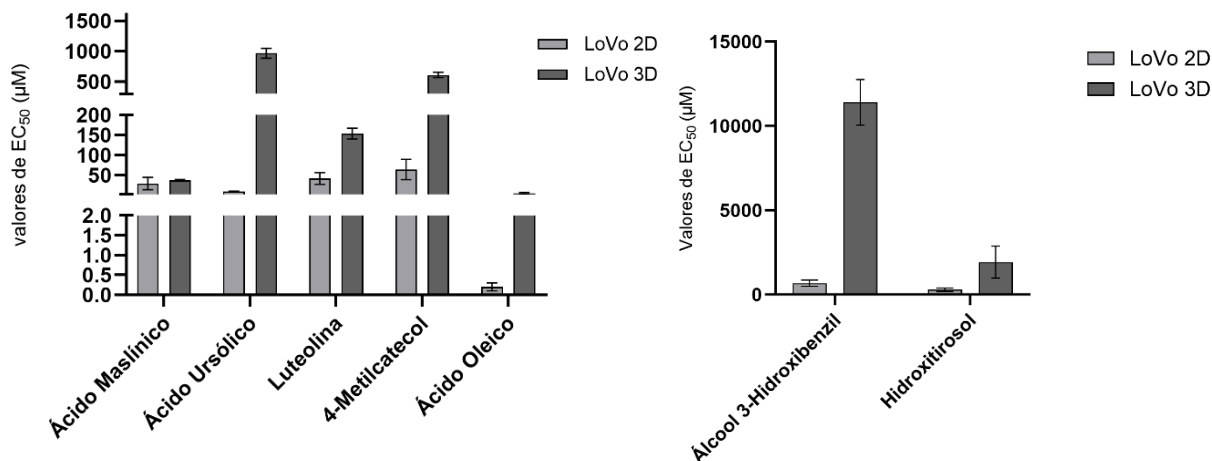


Figura 3.16. Gráfico de barras dos valores de EC₅₀ dos 8 metabolitos mais promissores na linha celular LoVo em modelos 2D e 3D.

Todos os metabolitos obtiveram maior efeito antiproliferativo em modelos 2D do que em 3D, o que era expectável pois são modelos mais simples, com exceção do ácido maslínico que teve efeito semelhante em ambos os modelos. Através dos valores de EC₅₀ obtidos nos ensaios de atividade antiproliferativa em modelos 2D e 3D para a linha celular LoVo (tabela 3.3), foi realizada uma análise estatística para comparar a atividade antiproliferativa dos metabolitos nos dois modelos e comparar todos os metabolitos dentro de cada modelo (tabela 3.22). A análise revelou que, em geral, os efeitos observados nos modelos 2D foram mais pronunciados do que nos modelos 3D, exceto para o ácido maslínico, onde os efeitos foram semelhantes nos dois modelos.

Tabela 3.22. Comparação dos valores de EC₅₀ obtidos nos ensaios de atividade antiproliferativa em modelos 2D e 3D. Realizou-se a análise estatística One-way ANOVA usando o *software GraphPad Prism 10*.

Os resultados identificados com letras diferentes (A-F) na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$). Os resultados identificados com letras diferentes (a-b) na mesma linha são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

Metabolitos	LoVo 2D (µM)	LoVo 3D (µM)
Álcool 3-Hidroxibenzilo	682 ± 192 ^{Aa}	11403 ± 1352 ^{Ab}
Hidroxitirosol	290 ± 109 ^{Ba}	1936 ± 949 ^{Bb}
Ácido Maslínico	29 ± 15 ^{Ca}	37 ± 2 ^{Ca}
Ácido Ursólico	10 ± 0.7 ^{Ca}	968 ± 80 ^{Bb}
Luteolina	42 ± 15 ^{Ca}	153 ± 14 ^{Ca}
4-Metilcatecol	64 ± 26 ^{Ca}	614 ± 45 ^{ECBa}
Apigenina	28 ± 1.3 ^{Ca}	≥ 1000 *
Ácido Oleico	0.2 ± 0.1 ^{Ca}	5 ± 2 ^{FCa}

*A apigenina não foi classificada na estatística para o grupo LoVo 3D pois apresenta um valor de EC₅₀ ≥ 1000 µM.

Comparando cada metabolito entre os modelos 2D e 3D, o álcool 3-hidroxibenzilo destacou-se por apresentar diferença significativa (valor de EC₅₀ superior) em relação aos restantes metabolitos testados. Contrariamente, para o ácido maslínico e ácido oleico, os valores de EC₅₀ não apresentaram diferença significativa entre os dois modelos.

No modelo 3D, o álcool 3-hidroxibenzilo destacou-se pelo valor de EC₅₀ mais elevado, cerca de 1600 vezes superior ao ácido oleico que tem um valor de EC₅₀ de 5 µM, sendo significativamente diferente dos restantes metabolitos. Com base no valor de EC₅₀ este composto demonstrou um potencial efeito antiproliferativo superior.

Os metabolitos que apresentaram maior efeito antiproliferativo em modelos 3D na linha celular LoVo foram o hidroxitirosol, ácido maslínico, ácido oleico e luteolina. Por este motivo foram seleccionados para verificar se têm efeito na subpopulação de CECs na linha celular LoVo.

3.4. Efeito dos metabolitos em reduzir a subpopulação de células estaminais cancerígenas presentes no modelo 3D da linha celular LoVo

Aldeído desidrogenases (ALDHs) fazem parte da família de enzimas dependentes de NAD que catalisam a oxidação de aldeídos em ácidos carboxílicos. Estão localizadas no citoplasma, mitocôndrias ou núcleo [335]. Existem 19 isoformas conhecidas de ALDH que estão relacionadas com diferentes tipos de cancro. A expressão da isoforma depende do tipo de célula e tecido [336]. A enzima aldeído desidrogenase 1 (ALDH1) é uma enzima desintoxicante, presente em células colorretais normais e malignas, conferindo resistência ao *stress* oxidativo. É usada como um marcador essencial para identificar e isolar as CECs do CCR, sendo essencial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra o cancro [337]. O ensaio ALDEFLUOR™ é utilizado para detetar a atividade da enzima ALDH em CECs. Neste ensaio, as células com atividade da enzima ALDH convertem o substrato fluorescente, o aldeído BAAA no seu ácido carboxílico BAA, que se acumula dentro da célula. Esta acumulação pode ser detetada por citometria de fluxo, permitindo a identificação e isolamento dessas células [336]. As células que apresentam maior fluorescência são classificadas como ALDH⁺, o que indica uma elevada atividade da enzima, associada a propriedades estaminais (teste). Durante o ensaio, é realizado um controlo negativo onde uma amostra de células é incubada com o inibidor DEAB, que inibe a atividade da ALDH, impedindo a conversão do substrato para produto fluorescente (amostra DEAB). Este passo serve como controlo negativo, permitindo distinguir entre a fluorescência devida à atividade da ALDH e qualquer outra fluorescência. Ao comparar a fluorescência das células incubadas com e sem DEAB, a identificação das células ALDH⁺ é mais precisa [338].

Os metabolitos com maior efeito antiproliferativo (menor valor de EC₅₀) no modelo 3D na linha celular LoVo foram testados através da citometria de fluxo pelo kit ALDEFLUOR™ para a deteção, identificação e avaliação de CECs baseadas na atividade da enzima ALDH1. Assim, o objetivo foi determinar se os metabolitos hidroxitirosol, luteolina, ácido oleico e ácido maslínico eram capazes de afetar o fenótipo das CE e evitar a quimioresistência e reincidência das células através da modulação da atividade de ALDH1. As concentrações seleccionadas foram as que não apresentavam citotoxicidade em células Caco-2 e que tinham efeito antiproliferativo em células LoVo (figura 3.15). Para o hidroxitirosol testou-se as concentrações: 125 µM, 250 µM e 500 µM, para a luteolina: 50 µM e 100 µM, para o ácido oleico: 1.5 µM e 3 µM e para o ácido maslínico: 12.5 µM e 25 µM, com o objetivo de avaliar o efeito dose-resposta destes metabolitos na redução de células com características estaminais.

Na figura 3.17 é apresentada a percentagem da subpopulação ALDH⁺ em células LoVo nos modelos 2D e 3D onde se observa que o modelo 3D apresentou uma percentagem de células ALDH⁺ significativamente maior ($p < 0.001$) (2D= 10.72% e 3D=29.36%) (figuras 3.18). Esta diferença sugere que o modelo 3D utilizado tem maior percentagem de células com características estaminais e por isso

foi selecionado para testar o efeito do hidroxitirosol, ácido ursólico, ácido maslínico e luteolina nesta subpopulação.

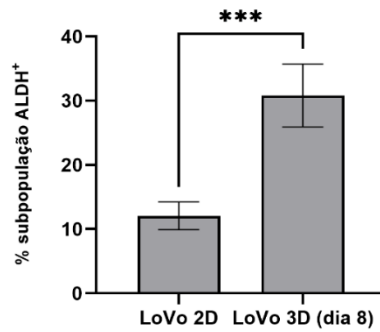


Figura 3.17. Percentagem da subpopulação ALDH⁺ em células LoVo. *** significa que os dois grupos são estatisticamente diferentes a $p < 0.001$.

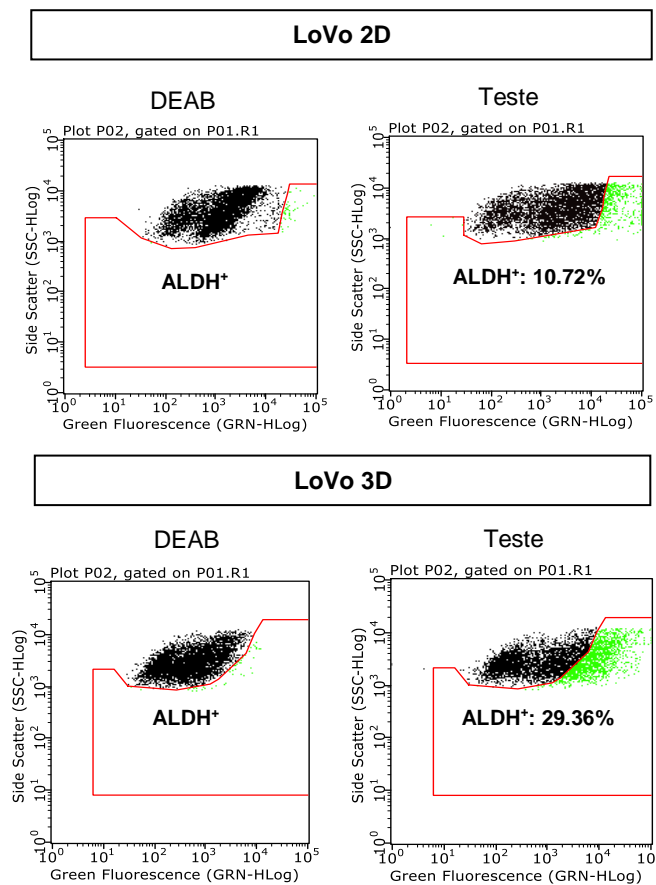


Figura 3.18. Atividade da ALDH1 em células LoVo em modelos 2D e 3D, após 72h de incubação. A subpopulação de células ALDH⁺ estão identificadas a verde (n=3).

A falta de eficácia de algumas terapias deve-se ao facto de alguns fármacos que são usados não serem capazes de atuar sobre a subpopulação de CECs, responsáveis pela reincidência do cancro. Assim, a identificação de compostos bioativos naturais que sejam capazes de reduzir esta subpopulação é uma estratégia relevante para (co)terapia de CCR. Os compostos bioativos podem atuar sobre a subpopulação de CECs por meio da regulação de processos como diferenciação, ciclo celular e vias de sinalização [337].

Para avaliar essa capacidade, os esféróides incubados com os metabolitos foram analisados pela presença desta subpopulação ALDH⁺ utilizando o kit ALDEFUOR™ e recorrendo à citometria de fluxo. Nas figuras 3.19 e 3.20 é apresentado o efeito do hidroxitirosol sobre a subpopulação ALDH⁺.

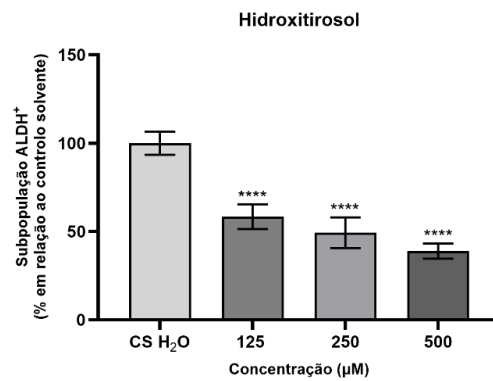
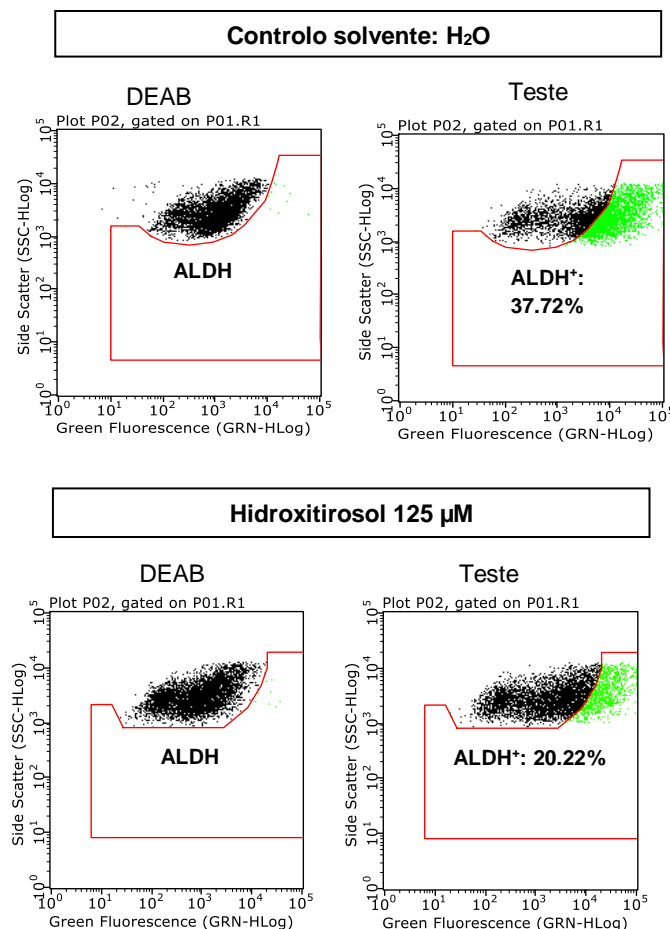


Figura 3.19. Efeito do hidroxitirosol, a diferentes concentrações, na subpopulação de ALDH⁺. **** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo solvente (água), com $p < 0,0001$.



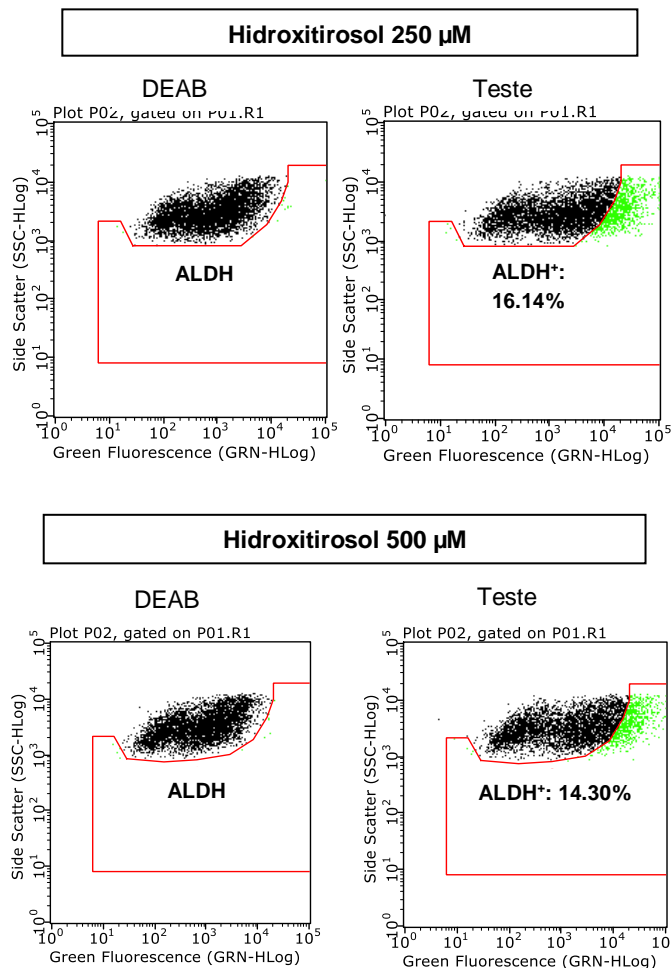


Figura 3.20. Atividade da ALDH1 em esferóides LoVo, após 72h de exposição com hidroxitirosol, a diferentes concentrações, avaliada pelo ensaio ALDEFLUOR™. O efeito dos metabolitos na atividade da ALDH1 foi normalizado relativamente ao CS (n=3).

Como se pode observar na figura 3.19, a subpopulação ALDH⁺ diminui à medida que a concentração de hidroxitirosol aumenta (125 µM: 20.22%; 250 µM: 16.14% e 500 µM: 14.30%), o que sugere uma relação dependente da concentração (figura 3.19) e que este composto pode ser eficaz na redução da subpopulação de CECs (figura 3.20), contribuindo para a diminuição da capacidade de regeneração tumoral.

Num estudo efetuado com linhas celulares de cancro da mama (SUM159PT e BT549), observou-se que o hidroxitirosol também diminuiu a percentagem de células ALDH⁺ nas concentrações de 25 e 50 µM após 4 dias de incubação. Esse efeito foi descrito por estar relacionado ao bloqueio da via de sinalização do TGFβ pelo hidroxitirosol. O TGFβ desempenha um papel fundamental na progressão do cancro, incluindo a regulação da autorrenovação de CECs e a resistência a tratamento. O hidroxitirosol, ao bloquear esta via, diminui a atividade das CECs [339]. Além disto, o hidroxitirosol

pode inibir a via de sinalização Wnt/ β -catenina pela diminuição do coreceptor p-LRP6 e do marcador vimentina associado à agressividade do tumor, como referido por outros autores em linhas de cancro da mama [340].

Nas figuras 3.21 e 3.22 está representado o efeito do flavonóide luteolina na subpopulação ALDH⁺.

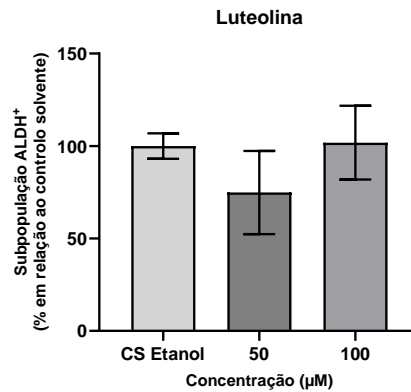
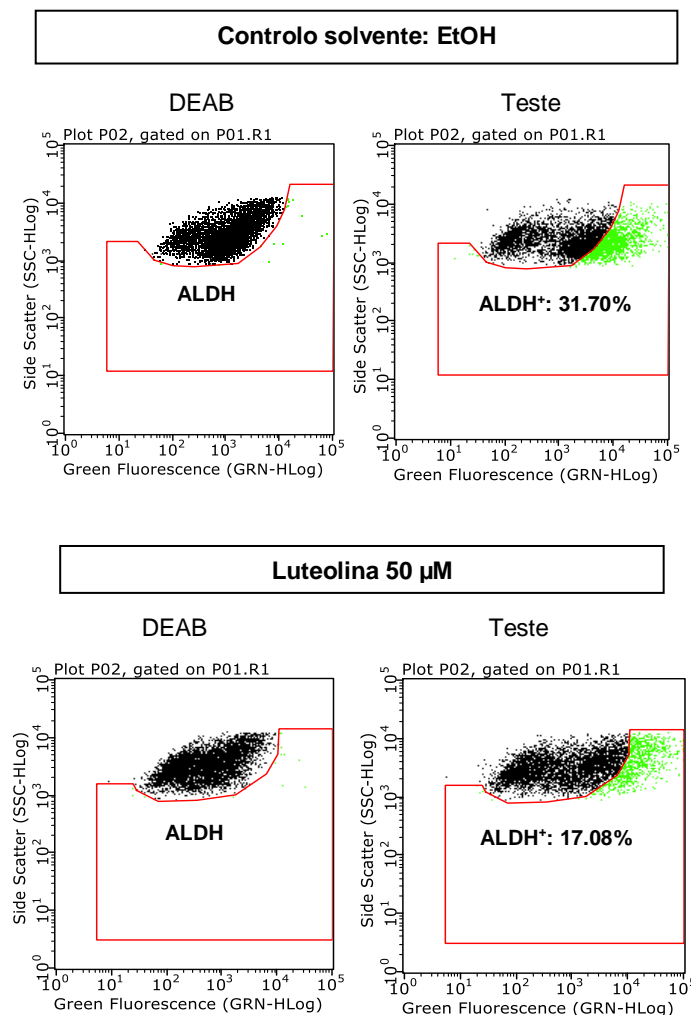


Figura 3.21. Efeito da luteolina, a diferentes concentrações na subpopulação de ALDH⁺.



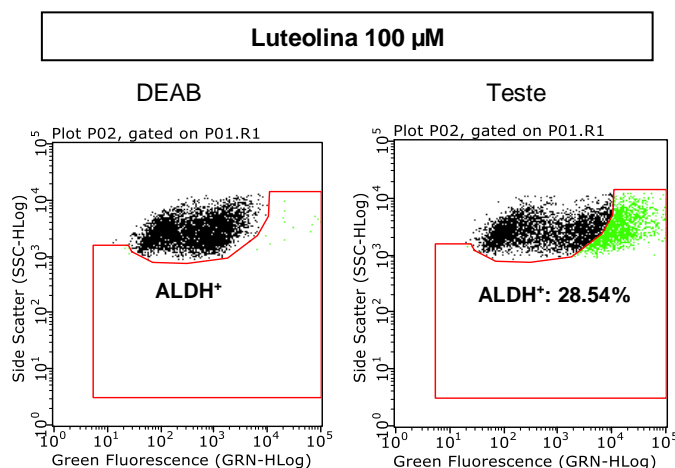


Figura 3.22. Atividade da ALDH1 em esferóides LoVo, após 72h de exposição à luteolina, a diferentes concentrações, avaliada pelo ensaio ALDEFLUOR™. O efeito dos metabolitos foi na atividade da ALDH1 foi normalizada relativamente ao CS (n=2).

Os flavonóides, como a luteolina, podem ter como alvo as CECs através de diversos mecanismos, como a modulação de vias de sinalização de autorrenovação como a via Wnt/ β -catenina, Hedgehog e Notch [341].

Tendo em conta os resultados obtidos, a luteolina não apresenta diferenças estatisticamente significativas entre as três barras do gráfico ($p > 0.05$), indicando que o composto não parece ter efeito sobre a subpopulação de células ALDH⁺ (figura 3.21 e 3.22). Este resultado sugere que a luteolina poderá estar a atuar de forma seletiva em diferentes populações celulares que não as células com características estaminais. Especificamente, este aumento poderá indicar que a luteolina está a exercer um efeito mais pronunciado sobre células mais proliferativas.

Num estudo publicado na literatura, foi indicado que a luteolina diminuiu a percentagem da subpopulação das células ALDH⁺ no cancro do ovário [342]. Esta capacidade está intrinsecamente ligada à capacidade deste composto de modular vias que atuam na proliferação e sobrevivência celular. Adicionalmente, em outro estudo com linhas de células do cancro da mama (T47-D e BT-474), a luteolina mostrou diminuir a subpopulação de células ALDH⁺ nas concentrações de 10 e 25 μ M, induzindo *stress* oxidativo, apoptose e regulação de forma negativa da via de sinalização NF- κ B que são essenciais para manter as subpopulações de CECs. Para além disso, a luteolina reduziu a secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que pode afetar a subpopulação de CECs [343]. Os resultados obtidos no presente estudo diferem dos dados publicados, uma vez que, em células LoVo, a subpopulação de células ALDH⁺ tende a aumentar com o aumento da concentração da luteolina. Este composto pode ter efeitos variados em diferentes tipos de células ao atuar em diferentes vias de sinalização.

Outro estudo publicado demonstrou que o ALDH1A3, uma isoforma do ALDH1, parece promover a proliferação e invasão de células tumorais, incluindo as CECs. Se a luteolina ativar esta isoforma, é possível que a concentrações mais altas ela aumente a subpopulação de células ALDH⁺,

ou seja, a luteolina estaria a promover a sobrevivência das células e não a inibir a sua proliferação [344].

Nas figuras 3.23 e 3.24 é apresentado o efeito do ácido maslínico na subpopulação das células ALDH⁺.

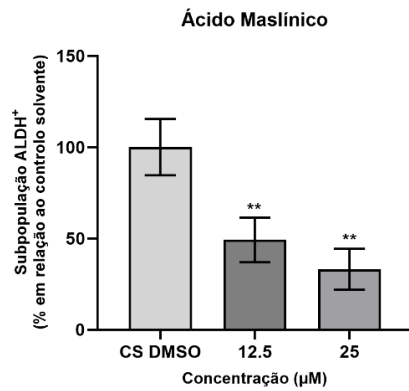
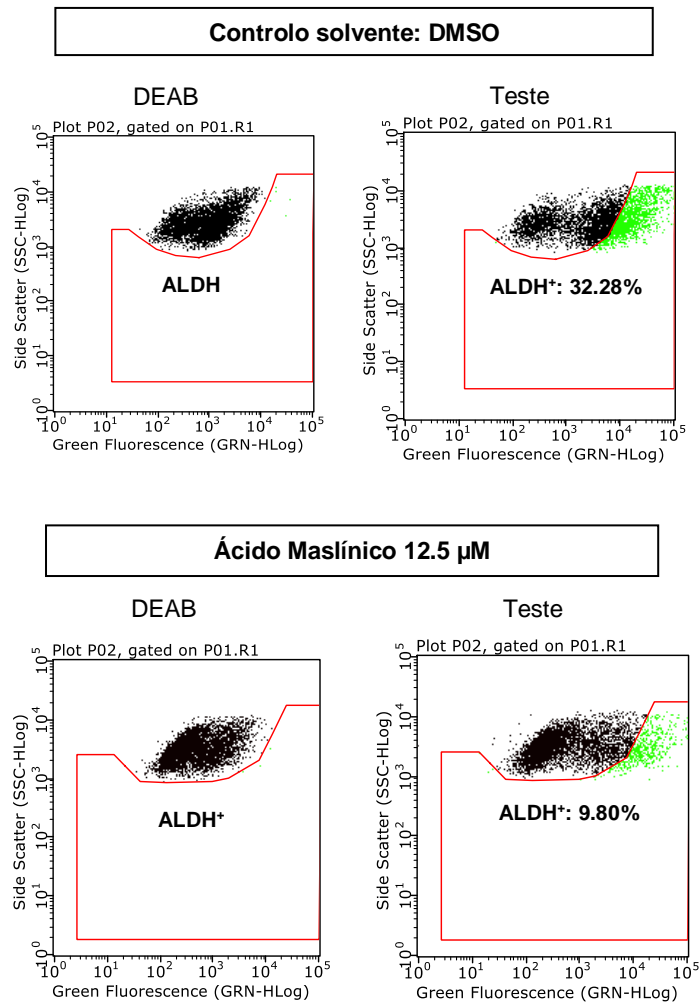


Figura 3.23. Efeito do ácido maslínico, a diferentes concentrações na subpopulação de ALDH⁺. ** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo solvente (DMSO), com $p < 0.01$.



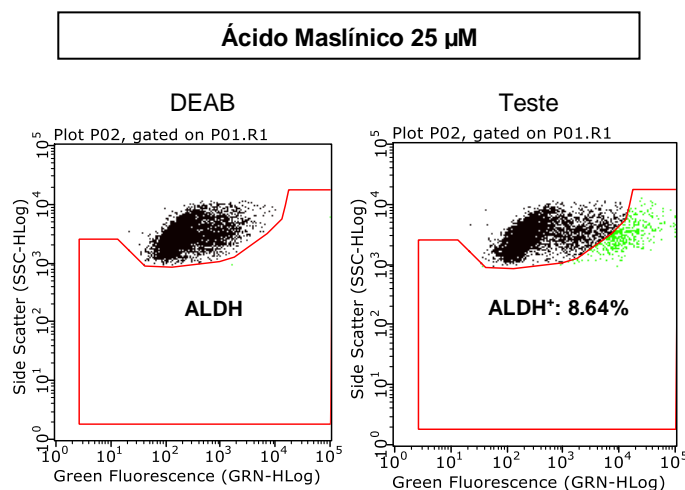


Figura 3.24. Atividade da ALDH1 em esferóides LoVo, após 72h de exposição ao ácido maslínico, a diferentes concentrações, avaliada pelo ensaio ALDEFLUOR™. O efeito dos metabolitos foi na atividade da ALDH1 foi normalizada relativamente ao CS (n=2).

O ácido maslínico demonstrou um efeito promissor na redução da subpopulação de células ALDH⁺. À medida que a sua concentração aumenta, observa-se uma diminuição na percentagem dessa subpopulação (figura 3.23 e 3.24). Este resultado sugere que este composto é capaz de reduzir a subpopulação de CECs, possivelmente induzindo a apoptose.

Não existem referências na literatura científica acerca do efeito do ácido maslínico em células estaminais cancerígenas. Contudo, o ácido ursólico que pertence à mesma classe de compostos do ácido maslínico (triterpenos) exibindo propriedades funcionais e estruturais semelhantes, já demonstrou capacidade para reduzir esta subpopulação. Foi demonstrado que o ácido ursólico reduziu a viabilidade celular da subpopulação ALDH⁺ em células HT29 e HCT116 a concentrações de 25 e 50 μ M [345].

Nas figuras 3.25 e 3.26 é apresentado o efeito do ácido oleico na subpopulação das células ALDH⁺.

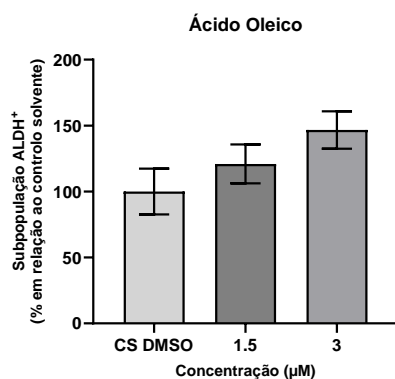


Figura 3.25. Efeito do ácido oleico, a diferentes concentrações na subpopulação de ALDH⁺.

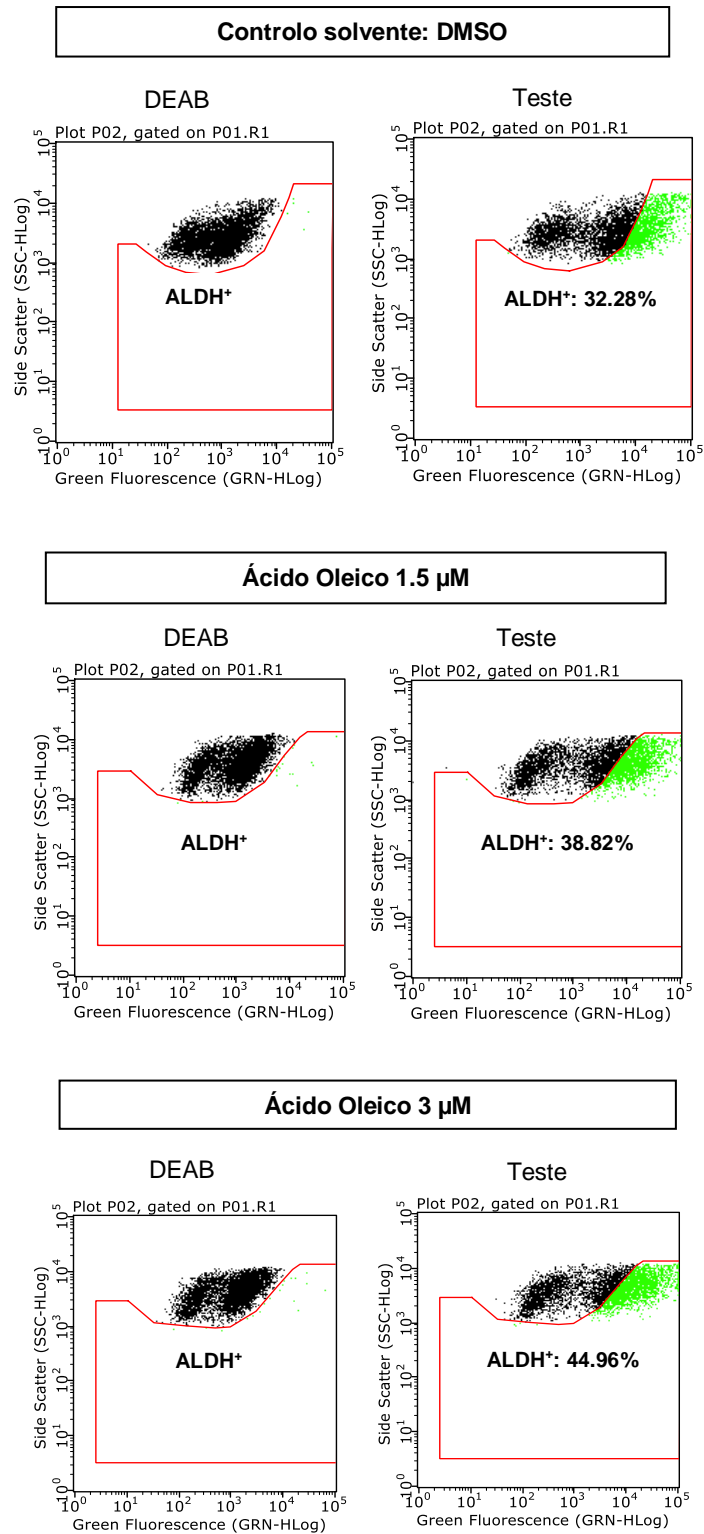


Figura 3.26. Atividade da ALDH1 em esferóides LoVo, após 72h de exposição ao ácido oleico, a diferentes concentrações, avaliada pelo ensaio ALDEFLUOR™. O efeito dos metabolitos foi na atividade da ALDH1 foi normalizada relativamente ao CS (n=1).

O efeito do ácido oleico revela uma tendência em que, à medida que a concentração deste composto aumenta, também se verifica um aumento na subpopulação de células ALDH⁺ (figuras 3.25 e 2.26). Este resultado sugere que o ácido oleico poderá estar a exercer o seu efeito noutra população de células que não as células com características estaminais.

Na literatura, existe um estudo realizado em células de cancro da mama (MCF-7/SLC e MDA-MB-231/SLC), que demonstra que o ácido oleico inibiu a percentagem de células ALDH⁺ à medida que a concentração aumentava (0, 25, 50, 100, 200 e 400 μ M) durante 24 e 48h [346]. Os resultados obtidos na presente tese foram distintos, o que sugere que a ação destes compostos nas CECs pode ser dependente da linha celular.

Além disso, observa-se uma escassez de estudos na literatura científica sobre o efeito de compostos como o ácido oleico na subpopulação de células ALDH⁺ na linha celular LoVo e outras linhas de CCR.

Em suma, os compostos mais promissores que apresentaram redução na subpopulação de células ALDH⁺ foram o hidroxitirosol e o ácido maslínico. Contrariamente, a luteolina e o ácido oleico aumentaram esta subpopulação, o que indica que estes compostos poderão ser seletivos em diferentes populações celulares, que não as células com características estaminais.

4. Conclusão

Este trabalho teve como principal objetivo estudar o efeito antiproliferativo de metabolitos intestinais derivados do azeite virgem extra em células de CCR na tentativa de identificar compostos que possam estar relacionados com o benefício deste alimento no CCR. Como a maioria dos estudos publicados até à data são referentes ao hidroxitirosol, este trabalho permitiu não só estudar o impacto deste composto fenólico, mas também outros metabolitos que podem ser formados ao longo do processo de digestão e identificados no intestino e no cólon após a ingestão do azeite.

Neste trabalho, optou-se por estudar um extrato rico em fenólicos derivado do azeite, por ser uma amostra representativa do teor compostos em bioativos derivados de diferentes azeites virgem. Esta amostra foi previamente submetida a um processo de digestão *in vitro* dinâmico, o SHIME®, que tem como objetivo representar todo o TGI, obtendo amostras de digestão do intestino delgado e cólon.

Apesar de o extrato de azeite ter demonstrado efeito antiproliferativo relevante nas 2 linhas de CCR ($EC_{50} = 0.07 \pm 0.01$ em HT29 e $EC_{50} = 0.05 \pm 0.03$ em LoVo), os ensaios preliminares realizados com as frações obtidas no processo SHIME® não demonstraram atividade: ao comparar com o controlo do processo não se verificaram diferenças positivas na atividade das frações derivadas do extrato na linha celular HT29, que é o modelo mais usado em estudos de atividade anticancerígena. De forma a contornar o problema da baixa eficácia antiproliferativa do extrato de azeite nas frações, provavelmente devido à degradação durante a digestão, poder-se-ia utilizar nanocápsulas de extrato de azeite, de forma a aumentar o seu efeito terapêutico. Estas nanocápsulas poderiam ser projetadas para libertar o extrato azeite apenas nos locais desejados, por exemplo no cólon, ao serem expostas a um pH mais elevado. As nanocápsulas lipídicas sólidas (SNLs) são a escolha mais promissora, pois são lipossolúveis e oferecem proteção eficaz ao extrato de azeite durante a passagem pelo TGI, garantindo libertação no local desejado [76,347].

Com o objetivo de identificar se os metabolitos do azeite gerados ao longo do processo de digestão tinham potencial ação anticancerígena, os estudos seguintes foram realizados com os 17 metabolitos mais relevantes identificados nas frações do intestino delgado e do cólon. De forma a verificar o efeito antiproliferativo, os 17 metabolitos foram testados em linhas de CCR- HT29, LoVo em modelos 2D. Paralelamente foram realizados testes de citotoxicidade no modelo 2D na linha celular Caco-2 que mimetiza o epitélio intestinal. Os metabolitos hidroxitirosol, tirosol, álcool 3-hidroxibenzilo, ácido maslínico e ácido 4-hidroxibenzóico obtiveram maior efeito antiproliferativo na linha celular HT29. Contrariamente, os metabolitos 4-meticatecol, apigenina, luteolina, diosmetina, ácido ursólico, oleocantal, oleaceína, ácido oleico, ácido desoxicólico, ácido salicílico e ácido *p*-cumárico obtiveram maior efeito antiproliferativo em células LoVo.

Nesta tese, foi ainda aplicado um modelo 3D de CCR para avaliar o efeito antiproliferativo dos metabolitos mais promissores em modelos 2D (álcool 3-hidroxibenzilo, hidroxitirosol, ácido maslínico, ácido ursólico, luteolina, 4-metilcatecol, apigenina e ácido oleico). Estes modelos representam melhor

o microambiente tumoral. Optou-se por utilizar o modelo de esferóides de LoVo, não só pelo facto da maioria dos compostos demonstrar mais efeito antiproliferativo nesta linha celular, como também pela razão de LoVo derivar de uma metástase, e por isso ser importante identificar compostos que tenham ação em células com estas características mais invasivas. De entre os vários compostos testados, o hidroxitirosol, o ácido maslínico, a luteolina e o ácido oleico foram os que obtiveram maior efeito antiproliferativo em modelos 3D por isso foram selecionados para verificar o seu efeito na redução da subpopulação de CECs em esferóides LoVo. O hidroxitirosol e o ácido maslínico foram os compostos mais promissores pois reduziram a subpopulação de ALDH⁺ associada às CECs que promovem a reincidência do CCR. Este estudo contribui para o avanço do conhecimento desta área do impacto benéfico do azeite no CCR e pode alavancar o desenho de alimentos funcionais ou nutracêuticos direcionados para a prevenção e terapia de CCR.

5. Trabalho futuro

Com base nos resultados obtidos ao longo deste trabalho, torna-se necessário explorar novas abordagens para aumentar o conhecimento do efeito dos metabolitos testados.

As frações obtidas ao longo do TGI (intestino delgado e cólon) pelo SHIME® deviam ser purificadas de forma a remover potenciais compostos interferentes e deviam ser testadas em células LoVo. Os metabolitos mais promissores que foram testados apenas na linha celular LoVo em modelos 3D também deverão ser estudados em esferóides já desenvolvidos no laboratório da linha celular HT29. Estes esferóides são de maiores dimensões (400-800 μm), apresentam um centro necrótico e maior percentagem de CECs [44] e desta forma podem ser um modelo complementar ao estudo desta tese. A análise do efeito destes metabolitos em esferóides, nas duas linhas celulares, permite uma análise comparativa mais abrangente. Relativamente aos ensaios de citometria de fluxo realizados com o kit ALDEFUOR™, é necessário repeti-los de modo a obter triplicados e fiabilidade nos resultados, para garantir tanto a robustez como a reprodutibilidade dos mesmos. Estudos futuros *in vitro* devem ser realizados de forma a identificar os principais mecanismos de ação de forma a alavancar a utilização destes compostos em co-terapia de cancro colorretal.

Estes estudos adicionais são importantes para explorar com mais detalhe o potencial terapêutico destes metabolitos, de modo a desenvolver novas abordagens terapêuticas.

6. Referências

1. Alzahrani, S.; Al Doghaither, H.; Al-Ghafari, A. General Insight into Cancer: An Overview of Colorectal Cancer (Review). *Mol Clin Oncol* **2021**, *15*, 271, doi:10.3892/mco.2021.2433.
2. Aku, A.; Patil, A. Understanding Cancer Etiology: A Review of the Evidence-Based Ayurvedic Framework of Cancer Etiologies. *AYU (An international quarterly journal of research in Ayurveda)* **2022**, *43*, 1, doi:10.4103/ayu.ayu_318_21.
3. Baba Al, C.C. *Comparative Oncology*; Baba Al, C.C., Ed.; Bucharest (RO): The Publishing House of the Romanian Academy, 2007;
4. Ferlay J, E.M.L.F.L.M.C.M.M.L.P.M.Z.A.S.I.B.F. Global Cancer Observatory: Cancer Today (Version 1.1). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
5. Mármol, I.; Sánchez-de-Diego, C.; Pradilla Dieste, A.; Cerrada, E.; Rodríguez Yoldi, M. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*, 197, doi:10.3390/ijms18010197.
6. Dekker, E.; Tanis, P.J.; Vleugels, J.L.A.; Kasi, P.M.; Wallace, M.B. Colorectal Cancer. *The Lancet* **2019**, *394*, 1467–1480, doi:10.1016/S0140-6736(19)32319-0.
7. Kuipers, E.J.; Grady, W.M.; Lieberman, D.; Seufferlein, T.; Sung, J.J.; Boelens, P.G.; van de Velde, C.J.H.; Watanabe, T. Colorectal Cancer. *Nat Rev Dis Primers* **2015**, *1*, 15065, doi:10.1038/nrdp.2015.65.
8. Thanikachalam, K.; Khan, G. Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients* **2019**, *11*, 164, doi:10.3390/nu11010164.
9. Bessa Caserras, X. Cribado Del Cáncer Colorrectal. *Gastroenterol Hepatol* **2016**, *39*, 68–78, doi:10.1016/S0210-5705(16)30177-7.
10. Anthony Villano, M.F.C.C.C. Colorectal Cancer Available online: <https://www.foxchase.org/anthony-villano> (accessed on 25 September 2024).
11. Sawicki, T.; Ruskowska, M.; Danielewicz, A.; Niedźwiedzka, E.; Arłukowicz, T.; Przybyłowicz, K.E. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, 2025, doi:10.3390/cancers13092025.
12. Mahmoud, N.N. Colorectal Cancer. *Surg Oncol Clin N Am* **2022**, *31*, 127–141, doi:10.1016/j.soc.2021.12.001.
13. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Wagle, N.S.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2023. *CA Cancer J Clin* **2023**, *73*, 17–48, doi:10.3322/caac.21763.
14. Buccafusca, G.; Proserpio, I.; Tralongo, A.C.; Ramezza Giuliano, S.; Tralongo, P. Early Colorectal Cancer: Diagnosis, Treatment and Survivorship Care. *Crit Rev Oncol Hematol* **2019**, *136*, 20–30, doi:10.1016/j.critrevonc.2019.01.023.
15. Buccafusca, G.; Proserpio, I.; Tralongo, A.C.; Ramezza Giuliano, S.; Tralongo, P. Early Colorectal Cancer: Diagnosis, Treatment and Survivorship Care. *Crit Rev Oncol Hematol* **2019**, *136*, 20–30, doi:10.1016/j.critrevonc.2019.01.023.
16. Gopal Menon; Alejandro Recio-Boiles1; Saran Lotfollahzadeh2; Burt Cagir. *StatPearls - Colon Cancer*, 2024;
17. Bademci, R.; Bollo, J.; Ramón y Cajal, T.; Martínez, M.C.; Hernández, M.P.; Targarona, E.M. Presentation and Follow-up of Familial Adenomatous Polyposis: Differences Between APC and MUTYH Mutations. *Cirugía Española (English Edition)* **2020**, *98*, 465–471, doi:10.1016/j.cireng.2020.06.007.
18. Boland, P.M.; Yurgelun, M.B.; Boland, C.R. Recent Progress in Lynch Syndrome and Other Familial Colorectal Cancer Syndromes. *CA Cancer J Clin* **2018**, *68*, 217–231, doi:10.3322/caac.21448.
19. Magrin, L.; Fanale, D.; Brando, C.; Corsini, L.R.; Randazzo, U.; Di Piazza, M.; Gurrera, V.; Pedone, E.; Bazan Russo, T.D.; Vieni, S.; et al. MUTYH-Associated Tumor Syndrome: The Other Face of MAP. *Oncogene* **2022**, *41*, 2531–2539, doi:10.1038/s41388-022-02304-y.
20. D'Elia, G.; Caliendo, G.; Passariello, L.; Albanese, L.; Makker, J.; Molinari, A.M.; Vietri, M.T. Hereditary Cancer Syndrome in a Family with Double Mutation in BRIP1 and MUTYH Genes. *Genes (Basel)* **2023**, *14*, 428, doi:10.3390/genes14020428.
21. Nguyen, H.T.; Duong, H.-Q. The Molecular Characteristics of Colorectal Cancer: Implications for Diagnosis and Therapy. *Oncol Lett* **2018**, *16*, 9–18, doi:10.3892/ol.2018.8679.

22. Nguyen, H.; Duong, H. The Molecular Characteristics of Colorectal Cancer: Implications for Diagnosis and Therapy (Review). *Oncol Lett* **2018**, doi:10.3892/ol.2018.8679.
23. Malki, A.; ElRuz, R.A.; Gupta, I.; Allouch, A.; Vranic, S.; Al Moustafa, A.-E. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *Int J Mol Sci* **2020**, *22*, 130, doi:10.3390/ijms22010130.
24. Jafar Nouri Nojadeh, 1, 2 Shahin Behrouz Sharif, 1, 3 and Ebrahim Sakhinia*, 1, 4, 5 Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *EXCLI J* **2018**.
25. Jasmine, F.; Haq, Z.; Kamal, M.; Raza, M.; da Silva, G.; Gorospe, K.; Paul, R.; Strzempek, P.; Ahsan, H.; Kibriya, M.G. Interaction between Microsatellite Instability (MSI) and Tumor DNA Methylation in the Pathogenesis of Colorectal Carcinoma. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, 4956, doi:10.3390/cancers13194956.
26. Francesca Battaglin, M. postdoctoral scholar, medical oncologist, M.N.M. research intern, H.-J.L.M. professor, and M.E.S.M. medical oncologist Microsatellite Instability in Colorectal Cancer: Overview of Its Clinical Significance and Novel Perspectives. **2018**, 735–745.
27. Harada, S.; Morlote, D. Molecular Pathology of Colorectal Cancer. *Adv Anat Pathol* **2020**, *27*, 20–26, doi:10.1097/PAP.0000000000000247.
28. Mohsin, N. ul A.; Aslam, S.; Ahmad, M.; Irfan, M.; Al-Hussain, S.A.; Zaki, M.E.A. Cyclooxygenase-2 (COX-2) as a Target of Anticancer Agents: A Review of Novel Synthesized Scaffolds Having Anticancer and COX-2 Inhibitory Potentialities. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 1471, doi:10.3390/ph15121471.
29. Pretzsch, E.; Bösch, F.; Neumann, J.; Ganschow, P.; Bazhin, A.; Guba, M.; Werner, J.; Angele, M. Mechanisms of Metastasis in Colorectal Cancer and Metastatic Organotropism: Hematogenous versus Peritoneal Spread. *J Oncol* **2019**, *2019*, 1–13, doi:10.1155/2019/7407190.
30. Rossi, F.; Noren, H.; Jove, R.; Beljanski, V.; Grinnemo, K.-H. Differences and Similarities between Cancer and Somatic Stem Cells: Therapeutic Implications. *Stem Cell Res Ther* **2020**, *11*, 489, doi:10.1186/s13287-020-02018-6.
31. Suhail, Y.; Cain, M.P.; Vanaja, K.; Kurywachak, P.A.; Levchenko, A.; Kalluri, R.; Kshitiz Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Syst* **2019**, *9*, 109–127, doi:10.1016/j.cels.2019.07.003.
32. Banyard, J.; Bielenberg, D.R. The Role of EMT and MET in Cancer Dissemination. *Connect Tissue Res* **2015**, *56*, 403–413, doi:10.3109/03008207.2015.1060970.
33. Jolly, M.K.; Ware, K.E.; Gilja, S.; Somarelli, J.A.; Levine, H. <sc>EMT</Sc> and <sc>MET</Sc> : Necessary or Permissive for Metastasis? *Mol Oncol* **2017**, *11*, 755–769, doi:10.1002/1878-0261.12083.
34. Rahmani, A.H.; Alsahli, M.A.; Almatroudi, A.; Almogbel, M.A.; Khan, A.A.; Anwar, S.; Almatroodi, S.A. The Potential Role of Apigenin in Cancer Prevention and Treatment. *Molecules* **2022**, *27*, 6051, doi:10.3390/molecules27186051.
35. Zakrzewski, W.; Dobrzyński, M.; Szymonowicz, M.; Rybak, Z. Stem Cells: Past, Present, and Future. *Stem Cell Res Ther* **2019**, *10*, 68, doi:10.1186/s13287-019-1165-5.
36. Chagastelles, P.C.; Nardi, N.B. Biology of Stem Cells: An Overview. *Kidney Int Suppl (2011)* **2011**, *1*, 63–67, doi:10.1038/kisup.2011.15.
37. Zhou, Y.; Xia, L.; Wang, H.; Oyang, L.; Su, M.; Liu, Q.; Lin, J.; Tan, S.; Tian, Y.; Liao, Q.; et al. Cancer Stem Cells in Progression of Colorectal Cancer. *Oncotarget* **2018**, *9*, 33403–33415, doi:10.18632/oncotarget.23607.
38. Munro, M.J.; Wickremesekera, S.K.; Peng, L.; Tan, S.T.; Itinteang, T. Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: A Review. *J Clin Pathol* **2018**, *71*, 110–116, doi:10.1136/jclinpath-2017-204739.
39. Battle, E.; Clevers, H. Cancer Stem Cells Revisited. *Nat Med* **2017**, *23*, 1124–1134, doi:10.1038/nm.4409.
40. Rippon, H.J.; Bishop, A.E. Embryonic Stem Cells. *Cell Prolif* **2004**, *37*, 23–34, doi:10.1111/j.1365-2184.2004.00298.x.
41. Zakrzewski, W.; Dobrzyński, M.; Szymonowicz, M.; Rybak, Z. Stem Cells: Past, Present, and Future. *Stem Cell Res Ther* **2019**, *10*, 68, doi:10.1186/s13287-019-1165-5.
42. Noguchi, H.; Miyagi-Shiohira, C.; Nakashima, Y. Induced Tissue-Specific Stem Cells and Epigenetic Memory in Induced Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, 930, doi:10.3390/ijms19040930.

43. Afify, S.M.; Seno, M. Conversion of Stem Cells to Cancer Stem Cells: Undercurrent of Cancer Initiation. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, 345, doi:10.3390/cancers11030345.
44. Pereira, L.; Silva, P.; Duarte, M.; Rodrigues, L.; Duarte, C.; Albuquerque, C.; Serra, A. Targeting Colorectal Cancer Proliferation, Stemness and Metastatic Potential Using Brassicaceae Extracts Enriched in Isothiocyanates: A 3D Cell Model-Based Study. *Nutrients* **2017**, *9*, 368, doi:10.3390/nu9040368.
45. Jahanafrooz, Z.; Mosafer, J.; Akbari, M.; Hashemzaei, M.; Mokhtarzadeh, A.; Baradaran, B. Colon Cancer Therapy by Focusing on Colon Cancer Stem Cells and Their Tumor Microenvironment. *J Cell Physiol* **2020**, *235*, 4153–4166, doi:10.1002/jcp.29337.
46. Ebrahimi, N.; Afshinpour, M.; Fakhr, S.S.; Kalkhoran, P.G.; Shadman-Manesh, V.; Adelian, S.; Beiranvand, S.; Rezaei-Tazangi, F.; Khorram, R.; Hamblin, M.R.; et al. Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: Signaling Pathways Involved in Stemness and Therapy Resistance. *Crit Rev Oncol Hematol* **2023**, *182*, 103920, doi:10.1016/j.critrevonc.2023.103920.
47. Gupta, R.; Bhatt, L.K.; Johnston, T.P.; Prabhavalkar, K.S. Colon Cancer Stem Cells: Potential Target for the Treatment of Colorectal Cancer. *Cancer Biol Ther* **2019**, *20*, 1068–1082, doi:10.1080/15384047.2019.1599660.
48. Kumar, V.; Vashishta, M.; Kong, L.; Wu, X.; Lu, J.J.; Guha, C.; Dwarakanath, B.S. The Role of Notch, Hedgehog, and Wnt Signaling Pathways in the Resistance of Tumors to Anticancer Therapies. *Front Cell Dev Biol* **2021**, *9*, doi:10.3389/fcell.2021.650772.
49. Lech, G. Colorectal Cancer Tumour Markers and Biomarkers: Recent Therapeutic Advances. *World J Gastroenterol* **2016**, *22*, 1745, doi:10.3748/wjg.v22.i5.1745.
50. Sarhadi, V.K.; Armengol, G. Molecular Biomarkers in Cancer. *Biomolecules* **2022**, *12*, 1021, doi:10.3390/biom12081021.
51. Walcher, L.; Kistenmacher, A.-K.; Suo, H.; Kitte, R.; Dluczek, S.; Strauß, A.; Blandszun, A.-R.; Yevsa, T.; Fricke, S.; Kossatz-Boehlert, U. Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front Immunol* **2020**, *11*, doi:10.3389/fimmu.2020.01280.
52. Zhao, W.; Ji, X.; Zhang, F.; Li, L.; Ma, L. Embryonic Stem Cell Markers. *Molecules* **2012**, *17*, 6196–6236, doi:10.3390/molecules17066196.
53. Colorectal Cancer Alliance Stages of Colorectal Cancer .
54. Cancer Institute NSW Stages of Cancer Available online: <https://www.cancer.nsw.gov.au/about-cancer/cancer-basics/stages-of-cancer> (accessed on 25 September 2024).
55. Mohd Yusof, H.; Ab-Rahim, S.; Suddin, L.S.; Ahmad Saman, M.S.; Mazlan, M. Metabolomics Profiling on Different Stages of Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Malaysian Journal of Medical Sciences* **2018**, *25*, 16–34, doi:10.21315/mjms2018.25.5.3.
56. Esmeeta, A.; Adhikary, S.; Dharshnaa, V.; Swarnamughi, P.; Ummul Maqsummiya, Z.; Banerjee, A.; Pathak, S.; Duttaroy, A.K. Plant-Derived Bioactive Compounds in Colon Cancer Treatment: An Updated Review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2022**, *153*, 113384, doi:10.1016/j.biopha.2022.113384.
57. Cianciosi, D.; Varela-Lopez, A.; Forbes-Hernandez, T.Y.; Gasparrini, M.; Afrin, S.; Reboredo-Rodriguez, P.; Zhang, J.; Quiles, J.L.; Nabavi, S.F.; Battino, M.; et al. Targeting Molecular Pathways in Cancer Stem Cells by Natural Bioactive Compounds. *Pharmacol Res* **2018**, *135*, 150–165, doi:10.1016/j.phrs.2018.08.006.
58. Rejhová, A.; Opattová, A.; Čumová, A.; Slíva, D.; Vodička, P. Natural Compounds and Combination Therapy in Colorectal Cancer Treatment. *Eur J Med Chem* **2018**, *144*, 582–594, doi:10.1016/j.ejmech.2017.12.039.
59. Feng, C.; Lyu, Y.; Gong, L.; Wang, J. Therapeutic Potential of Natural Products in the Treatment of Renal Cell Carcinoma: A Review. *Nutrients* **2022**, *14*, 2274, doi:10.3390/nu14112274.
60. Choudhari, A.S.; Mandave, P.C.; Deshpande, M.; Ranjekar, P.; Prakash, O. Phytochemicals in Cancer Treatment: From Preclinical Studies to Clinical Practice. *Front Pharmacol* **2020**, *10*, doi:10.3389/fphar.2019.01614.
61. Garcia-Oliveira, P.; Otero, P.; Pereira, A.G.; Chamorro, F.; Carpena, M.; Echave, J.; Fraga-Corral, M.; Simal-Gandara, J.; Prieto, M.A. Status and Challenges of Plant-Anticancer Compounds in Cancer Treatment. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 157, doi:10.3390/ph14020157.

62. Redondo-Blanco, S.; Fernández, J.; Gutiérrez-del-Río, I.; Villar, C.J.; Lombó, F. New Insights toward Colorectal Cancer Chemotherapy Using Natural Bioactive Compounds. *Front Pharmacol* **2017**, *8*, doi:10.3389/fphar.2017.00109.
63. George, B.P.; Chandran, R.; Abrahamse, H. Role of Phytochemicals in Cancer Chemoprevention: Insights. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1455, doi:10.3390/antiox10091455.
64. Reboredo-Rodríguez, P.; Varela-López, A.; Forbes-Hernández, T.Y.; Gasparri, M.; Afrin, S.; Cianciosi, D.; Zhang, J.; Manna, P.P.; Bompadre, S.; Quiles, J.L.; et al. Phenolic Compounds Isolated from Olive Oil as Nutraceutical Tools for the Prevention and Management of Cancer and Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, 2305, doi:10.3390/ijms19082305.
65. Stefano Marventano, J.G.A.P.F.G.A.M. and G.Grosso. Mediterranean Diet Adherence in the Mediterranean Healthy Eating, Aging and Lifestyle (MEAL) Study Cohort. *Int J Food Sci Nutr* **2018**, *69*, 100–107.
66. G.Grosso, F.B.J.G.S.S.D.D.R.S.R.F.G.E.L.Giovannucci. Possible Role of Diet in Cancer: Systematic Review and Multiple Meta-Analyses of Dietary Patterns, Lifestyle Factors, and Cancer Risk. *Nutr Rev* **2017**, *75*, 405–419.
67. Septembre-Malaterre, A.; Remize, F.; Poucheret, P. Fruits and Vegetables, as a Source of Nutritional Compounds and Phytochemicals: Changes in Bioactive Compounds during Lactic Fermentation. *Food Research International* **2018**, *104*, 86–99, doi:10.1016/j.foodres.2017.09.031.
68. Rabizadeh, F.; Mirian, M.S.; Doosti, R.; Kiani-Anbouhi, R.; Eftekhari, E. Phytochemical Classification of Medicinal Plants Used in the Treatment of Kidney Disease Based on Traditional Persian Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2022**, *2022*, 1–13, doi:10.1155/2022/8022599.
69. Ambriz-Pérez, D.L.; Leyva-López, N.; Gutierrez-Grijalva, E.P.; Heredia, J.B. Phenolic Compounds: Natural Alternative in Inflammation Treatment. A Review. *Cogent Food Agric* **2016**, *2*, doi:10.1080/23311932.2015.1131412.
70. Rex Jeya Rajkumar S, 1 Muthukumar Nadar MSA, 1 Paulraj Mosae Selvakumar2 Phytochemicals as a Potential Source for Antimicrobial, Anti-Oxidant and Wound Healing - a Review. *MOJ Bioorganic & Organic Chemistry* **2018**, *2*.
71. DOMINGOS P.F ALMEIDA March 2006,.
72. Fernandes, I.; Oliveira, J.; Pinho, A.; Carvalho, E. The Role of Nutraceutical Containing Polyphenols in Diabetes Prevention. *Metabolites* **2022**, *12*, 184, doi:10.3390/metabo12020184.
73. Albuquerque, B.R.; Heleno, S.A.; Oliveira, M.B.P.P.; Barros, L.; Ferreira, I.C.F.R. Phenolic Compounds: Current Industrial Applications, Limitations and Future Challenges. *Food Funct* **2021**, *12*, 14–29, doi:10.1039/D0FO02324H.
74. Abbaszadeh, H.; Keikhaei, B.; Mottaghi, S. A Review of Molecular Mechanisms Involved in Anticancer and Antiangiogenic Effects of Natural Polyphenolic Compounds. *Phytotherapy Research* **2019**, *33*, 2002–2014, doi:10.1002/ptr.6403.
75. Rahaiee, S.; Assadpour, E.; Faridi Esfanjani, A.; Silva, A.S.; Jafari, S.M. Application of Nano/Microencapsulated Phenolic Compounds against Cancer. *Adv Colloid Interface Sci* **2020**, *279*, 102153, doi:10.1016/j.cis.2020.102153.
76. Panigrahi, S.S.; Syed, I.; Sivabalan, S.; Sarkar, P. Nanoencapsulation Strategies for Lipid-Soluble Vitamins. *Chemical Papers* **2019**, *73*, 1–16, doi:10.1007/s11696-018-0559-7.
77. Borzì, A.M.; Biondi, A.; Basile, F.; Luca, S.; Vicari, E.S.D.; Vacante, M. Olive Oil Effects on Colorectal Cancer. *Nutrients* **2018**, *11*, 32, doi:10.3390/nu11010032.
78. Sun, L.; Luo, C.; Liu, J. Hydroxytyrosol Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Cells through ROS Generation. *Food Funct* **2014**, *5*, 1909–1914, doi:10.1039/C4FO00187G.
79. Bernini, R.; Merendino, N.; Romani, A.; Velotti, F. Naturally Occurring Hydroxytyrosol: Synthesis and Anticancer Potential. *Curr Med Chem* **2013**, *20*, 655–670, doi:10.2174/092986713804999367.
80. Silva, I.A.Marreiros. Evaluation of Chemotherapeutic Potential of Natural Extracts Using 3d Models of Colon Cancer, Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica : Oeiras , 2013.
81. Augusti, P.R.; Conterato, G.M.M.; Denardin, C.C.; Prazeres, I.D.; Serra, A.T.; Bronze, M.R.; Emanuelli, T. Bioactivity, Bioavailability, and Gut Microbiota Transformations of Dietary Phenolic Compounds: Implications for COVID-19. *J Nutr Biochem* **2021**, *97*, 108787, doi:10.1016/j.jnutbio.2021.108787.

82. de la Rosa, L.A.; Moreno-Escamilla, J.O.; Rodrigo-García, J.; Alvarez-Parrilla, E. Phenolic Compounds. In *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*; Elsevier, 2019; pp. 253–271.
83. Tsimogiannis, D.; Oreopoulou, V. Classification of Phenolic Compounds in Plants. In *Polyphenols in Plants*; Elsevier, 2019; pp. 263–284.
84. Rahman, Md.M.; Rahaman, Md.S.; Islam, Md.R.; Rahman, F.; Mithi, F.M.; Alqahtani, T.; Almikhlaifi, M.A.; Alghamdi, S.Q.; Alruwaili, A.S.; Hossain, Md.S.; et al. Role of Phenolic Compounds in Human Disease: Current Knowledge and Future Prospects. *Molecules* **2021**, *27*, 233, doi:10.3390/molecules27010233.
85. Basak, D.; Uddin, M.N.; Hancock, J. The Role of Oxidative Stress and Its Counteractive Utility in Colorectal Cancer (CRC). *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, 3336, doi:10.3390/cancers12113336.
86. Ferreira, W.A.; Aguiar, G.S.; Pessoa, H.R.; Costa, D.C.F. da; Zago, L. Potencial Antitumoral Dos Compostos Fenólicos de Produtos Da Oliveira (*Olea Europaea* L.): Uma Revisão Integrativa Da Literatura. *Research, Society and Development* **2021**, *10*, e22101320733, doi:10.33448/rsd-v10i13.20733.
87. Amintas, S.; Dupin, C.; Boutin, J.; Beaumont, P.; Moreau-Gaudry, F.; Bedel, A.; Krisa, S.; Vendrely, V.; Dabernat, S. Bioactive Food Components for Colorectal Cancer Prevention and Treatment: A Good Match. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2023**, *63*, 6615–6629, doi:10.1080/10408398.2022.2036095.
88. Y. Z. H. Hashim, M.E.C.I.R.G.H.M. and I.R.R. Components of Olive Oil and Chemoprevention of Colorectal Cancer. *Nutr. Rev.* **2005**, *63*, 374–386.
89. Borzì, A.M.; Biondi, A.; Basile, F.; Luca, S.; Vicari, E.S.D.; Vacante, M. Olive Oil Effects on Colorectal Cancer. *Nutrients* **2018**, *11*, 32, doi:10.3390/nu11010032.
90. Anter, I.T.S.D.I.R.M.M.M.R.J.M.M.D.L.D.C.A.M. and Á.A. Evaluation of Potential Antigenotoxic , Cytotoxic and Proapoptotic Effects of the Olive Oil by-Product ' Alperujo ', Hydroxytyrosol , Tyrosol and Verbascoside. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **2014**, *772*, 25–33.
91. Lijuan Sun, a C.L. and J.L. Hydroxytyrosol Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Cells through ROS Generation. *Food Funct* **2014**, *5*, 1909–1914.
92. Pang, K.-L.; Chin, K.-Y. The Biological Activities of Oleocanthal from a Molecular Perspective. *Nutrients* **2018**, *10*, 570, doi:10.3390/nu10050570.
93. Vazquez-Aguilar, A.; Sanchez-Rodriguez, E.; Rodriguez-Perez, C.; Rangel-Huerta, O.; Mesa, M. Metabolomic-Based Studies of the Intake of Virgin Olive Oil: A Comprehensive Review. *Metabolites* **2023**, *13*, 472, doi:10.3390/metabo13040472.
94. Vrdoljak, J.; Kumric, M.; Vilovic, M.; Martinovic, D.; Tomic, I.J.; Krnic, M.; Ticinovic Kurir, T.; Bozic, J. Effects of Olive Oil and Its Components on Intestinal Inflammation and Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients* **2022**, *14*, 757, doi:10.3390/nu14040757.
95. Romani, A.; Ieri, F.; Urciuoli, S.; Noce, A.; Marrone, G.; Nediani, C.; Bernini, R. Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of *Olea Europaea* L. *Nutrients* **2019**, *11*, 1776, doi:10.3390/nu11081776.
96. Reboredo-Rodríguez, P.; Olmo-García, L.; Figueiredo-González, M.; González-Barreiro, C.; Carrasco-Pancorbo, A.; Cancho-Grande, B. Application of the INFOGEST Standardized Method to Assess the Digestive Stability and Bioaccessibility of Phenolic Compounds from Galician Extra-Virgin Olive Oil. *J Agric Food Chem* **2021**, *69*, 11592–11605, doi:10.1021/acs.jafc.1c04592.
97. Suny OER services Anatomy and Physiology II - The Small and Large Intestines Available online: <https://courses.lumenlearning.com/suny-ap2/chapter/the-small-and-large-intestines/> (accessed on 25 September 2024).
98. Volker Mai, Ph.D., M.P.H. Dietary Modification of the Intestinal Microbiota. *Nutr Rev* **2004**, *62*.
99. Montalto, M.; D'Onofrio, F.; Gallo, A.; Cazzato, A.; Gasbarrini, G. Intestinal Microbiota and Its Functions. *Digestive and Liver Disease Supplements* **2009**, *3*, 30–34, doi:10.1016/S1594-5804(09)60016-4.
100. Memmola, R.; Petrillo, A.; Di Lorenzo, S.; Altuna, S.C.; Habeeb, B.S.; Soggiu, A.; Bonizzi, L.; Garrone, O.; Ghidini, M. Correlation between Olive Oil Intake and Gut Microbiota in Colorectal Cancer Prevention. *Nutrients* **2022**, *14*, 3749, doi:10.3390/nu14183749.

101. Tilg, H.; Adolph, T.E.; Gerner, R.R.; Moschen, A.R. The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 954–964, doi:10.1016/j.ccell.2018.03.004.
102. Cheng, Y.; Ling, Z.; Li, L. The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. *Front Immunol* **2020**, *11*, doi:10.3389/fimmu.2020.615056.
103. Matsumoto, M.; Kibe, R.; Ooga, T.; Aiba, Y.; Kurihara, S.; Sawaki, E.; Koga, Y.; Benno, Y. Impact of Intestinal Microbiota on Intestinal Luminal Metabolome. *Sci Rep* **2012**, *2*, 233, doi:10.1038/srep00233.
104. Mosele, J.I.; Martín-Peláez, S.; Macià, A.; Farràs, M.; Valls, R.; Catalán, Ú.; Motilva, M. Faecal Microbial Metabolism of Olive Oil Phenolic Compounds: In Vitro and in Vivo Approaches. *Mol Nutr Food Res* **2014**, *58*, 1809–1819, doi:10.1002/mnfr.201400124.
105. López de las Hazas, M.-C.; Piñol, C.; Macià, A.; Motilva, M.-J. Hydroxytyrosol and the Colonic Metabolites Derived from Virgin Olive Oil Intake Induce Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Colon Cancer Cells. *J Agric Food Chem* **2017**, *65*, 6467–6476, doi:10.1021/acs.jafc.6b04933.
106. Martínez, N.; Prieto, I.; Hidalgo, M.; Segarra, A.B.; Martínez-Rodríguez, A.M.; Cobo, A.; Ramírez, M.; Gálvez, A.; Martínez-Cañamero, M. Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables. *Microorganisms* **2019**, *7*, 61, doi:10.3390/microorganisms7020061.
107. Bermúdez, B.; Pacheco, Y.M.; López, S.; Abia, R.; Muriana, F.J.G. Digestion and Absorption of Olive Oil. *Grasas y Aceites* **2004**, *55*, doi:10.3989/gya.2004.v55.i1.141.
108. Alberdi-Cedeño, J.; Ibargoitia, M.L.; Guillén, M.D. Study of the In Vitro Digestion of Olive Oil Enriched or Not with Antioxidant Phenolic Compounds. Relationships between Bioaccessibility of Main Components of Different Oils and Their Composition. *Antioxidants* **2020**, *9*, 543, doi:10.3390/antiox9060543.
109. Verkempinck, S.H.E.; Salvia-Trujillo, L.; Infantes Garcia, M.R.; Hendrickx, M.E.; Grauwet, T. From Single to Multiresponse Modelling of Food Digestion Kinetics: The Case of Lipid Digestion. *J Food Eng* **2019**, *260*, 40–49, doi:10.1016/j.jfoodeng.2019.04.018.
110. Borzi, A.M.; Biondi, A.; Basile, F.; Luca, S.; Vicari, E.S.D.; Vacante, M. Olive Oil Effects on Colorectal Cancer. *Nutrients* **2018**, *11*, 32, doi:10.3390/nu11010032.
111. Bohn, T.; Carriere, F.; Day, L.; Deglaire, A.; Egger, L.; Freitas, D.; Golding, M.; Le Feunteun, S.; Macierzanka, A.; Menard, O.; et al. Correlation between in Vitro and in Vivo Data on Food Digestion. What Can We Predict with Static in Vitro Digestion Models? *Crit Rev Food Sci Nutr* **2018**, *58*, 2239–2261, doi:10.1080/10408398.2017.1315362.
112. Bohn, T.; Carriere, F.; Day, L.; Deglaire, A.; Egger, L.; Freitas, D.; Golding, M.; Le Feunteun, S.; Macierzanka, A.; Menard, O.; et al. Correlation between in Vitro and in Vivo Data on Food Digestion. What Can We Predict with Static in Vitro Digestion Models? *Crit Rev Food Sci Nutr* **2018**, *58*, 2239–2261, doi:10.1080/10408398.2017.1315362.
113. Li, C.; Yu, W.; Wu, P.; Chen, X.D. Current in Vitro Digestion Systems for Understanding Food Digestion in Human Upper Gastrointestinal Tract. *Trends Food Sci Technol* **2020**, *96*, 114–126, doi:10.1016/j.tifs.2019.12.015.
114. Sensoy, I. A Review on the Food Digestion in the Digestive Tract and the Used in Vitro Models. *Curr Res Food Sci* **2021**, *4*, 308–319, doi:10.1016/j.crfs.2021.04.004.
115. García-Villalba, R.; Vissenaekens, H.; Pitart, J.; Romo-Vaquero, M.; Espín, J.C.; Grootaert, C.; Selma, M. V.; Raes, K.; Smaghe, G.; Possemiers, S.; et al. Gastrointestinal Simulation Model TWIN-SHIME Shows Differences between Human Urolithin-Metabotypes in Gut Microbiota Composition, Pomegranate Polyphenol Metabolism, and Transport along the Intestinal Tract. *J Agric Food Chem* **2017**, *65*, 5480–5493, doi:10.1021/acs.jafc.7b02049.
116. Van Rymentant, E.; Salden, B.; Voorspoels, S.; Jacobs, G.; Noten, B.; Pitart, J.; Possemiers, S.; Smaghe, G.; Grootaert, C.; Van Camp, J. A Critical Evaluation of In Vitro Hesperidin 2S Bioavailability in a Model Combining Luminal (Microbial) Digestion and Caco-2 Cell Absorption in Comparison to a Randomized Controlled Human Trial. *Mol Nutr Food Res* **2018**, *62*, doi:10.1002/mnfr.201700881.
117. Costa, C.M.; de Carvalho, N.M.; de Oliveira, D.L.; Madureira, A.R. A Critical Review on In Vitro and Ex Vivo Models of the Intestinal Epithelium of Humans and Monogastric Animals. *Gastrointestinal Disorders* **2024**, *6*, 337–358, doi:10.3390/gdisord6010023.
118. Rumney, C.J.; Rowland, I.R. In Vivo and in Vitro Models of the Human Colonic Flora. *Crit Rev Food Sci Nutr* **1992**, *31*, 299–331, doi:10.1080/10408399209527575.

119. Dixit, Y.; Kanojiya, K.; Bhingardev, N.; Ahire, J.J.; Saroj, D. In Vitro Human Gastrointestinal Tract Simulation Systems: A Panoramic Review. *Probiotics Antimicrob Proteins* **2024**, *16*, 501–518, doi:10.1007/s12602-023-10052-y.
120. Ji, H.; Hu, J.; Zuo, S.; Zhang, S.; Li, M.; Nie, S. In Vitro Gastrointestinal Digestion and Fermentation Models and Their Applications in Food Carbohydrates. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2022**, *62*, 5349–5371, doi:10.1080/10408398.2021.1884841.
121. Van de Wiele, T.R.; Oomen, A.G.; Wragg, J.; Cave, M.; Minekus, M.; Hack, A.; Cornelis, C.; Rempelberg, C.J.M.; De Zwart, L.L.; Klinck, B.; et al. Comparison of Five in Vitro Digestion Models to in Vivo Experimental Results: Lead Bioaccessibility in the Human Gastrointestinal Tract. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* **2007**, *42*, 1203–1211, doi:10.1080/10934520701434919.
122. Vazquez-Aguilar, A.; Sanchez-Rodriguez, E.; Rodriguez-Perez, C.; Rangel-Huerta, O.; Mesa, M. Metabolomic-Based Studies of the Intake of Virgin Olive Oil: A Comprehensive Review. *Metabolites* **2023**, *13*, 472, doi:10.3390/metabo13040472.
123. Rocchetti, G.; Senizza, B.; Giuberti, G.; Montesano, D.; Trevisan, M.; Lucini, L. Metabolomic Study to Evaluate the Transformations of Extra-Virgin Olive Oil's Antioxidant Phytochemicals during In Vitro Gastrointestinal Digestion. *Antioxidants* **2020**, *9*, 302, doi:10.3390/antiox9040302.
124. Reboredo-Rodríguez, P.; González-Barreiro, C.; Martínez-Carballo, E.; Cambeiro-Pérez, N.; Rial-Otero, R.; Figueiredo-González, M.; Cancho-Grande, B. Applicability of an In-Vitro Digestion Model to Assess the Bioaccessibility of Phenolic Compounds from Olive-Related Products. *Molecules* **2021**, *26*, 6667, doi:10.3390/molecules26216667.
125. Soler, A.; Romero, M.P.; Macià, A.; Saha, S.; Furniss, C.S.M.; Kroon, P.A.; Motilva, M.J. Digestion Stability and Evaluation of the Metabolism and Transport of Olive Oil Phenols in the Human Small-Intestinal Epithelial Caco-2/TC7 Cell Line. *Food Chem* **2010**, *119*, 703–714, doi:10.1016/j.foodchem.2009.07.017.
126. Mosele, J.I.; Martín-Peláez, S.; Macià, A.; Farràs, M.; Valls, R.; Catalán, Ú.; Motilva, M. Faecal Microbial Metabolism of Olive Oil Phenolic Compounds: In Vitro and in Vivo Approaches. *Mol Nutr Food Res* **2014**, *58*, 1809–1819, doi:10.1002/mnfr.201400124.
127. Monteiro, C.S.; Bortolazzo, P.C.; Bonini, C.A.A.; Dluzniewski, L.T.; da Silva, D.T.; Baranzelli, J.; Smaniotto, F.A.; Ballus, C.A.; Lozano-Sánchez, J.; Somacal, S.; et al. Effect of Micronization on Olive Pomace Biotransformation in the Static Model of Colonic Fermentation. *Food Chem* **2023**, *418*, 135921, doi:10.1016/j.foodchem.2023.135921.
128. Arangia, A.; Marino, Y.; Impellizzeri, D.; D'Amico, R.; Cuzzocrea, S.; Di Paola, R. Hydroxytyrosol and Its Potential Uses on Intestinal and Gastrointestinal Disease. *Int J Mol Sci* **2023**, *24*, 3111, doi:10.3390/ijms24043111.
129. Bertelli, M.; Kiani, A.K.; Paolacci, S.; Manara, E.; Kurti, D.; Dhuli, K.; Bushati, V.; Miertus, J.; Pangallo, D.; Baglivo, M.; et al. Hydroxytyrosol: A Natural Compound with Promising Pharmacological Activities. *J Biotechnol* **2020**, *309*, 29–33, doi:10.1016/j.jbiotec.2019.12.016.
130. Britton, J.; Davis, R.; O'Connor, K.E. Chemical, Physical and Biotechnological Approaches to the Production of the Potent Antioxidant Hydroxytyrosol. *Appl Microbiol Biotechnol* **2019**, *103*, 5957–5974, doi:10.1007/s00253-019-09914-9.
131. Karković Marković, A.; Torić, J.; Barbarić, M.; Jakobušić Brala, C. Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. *Molecules* **2019**, *24*, 2001, doi:10.3390/molecules24102001.
132. Zhang, Y.; Wang, D.; Lv, B.; Hou, X.; Liu, Q.; Liao, C.; Xu, R.; Zhang, Y.; Xu, F.; Zhang, P. Oleic Acid and Insulin as Key Characteristics of T2D Promote Colorectal Cancer Deterioration in Xenograft Mice Revealed by Functional Metabolomics. *Front Oncol* **2021**, *11*, doi:10.3389/fonc.2021.685059.
133. Santa-María, C.; López-Enríquez, S.; Montserrat-de la Paz, S.; Geniz, I.; Reyes-Quiroz, M.E.; Moreno, M.; Palomares, F.; Sobrino, F.; Alba, G. Update on Anti-Inflammatory Molecular Mechanisms Induced by Oleic Acid. *Nutrients* **2023**, *15*, 224, doi:10.3390/nu15010224.
134. Pang, K.-L.; Chin, K.-Y. The Biological Activities of Oleocanthal from a Molecular Perspective. *Nutrients* **2018**, *10*, 570, doi:10.3390/nu10050570.
135. El Haouari, M.; Quintero, J.E.; Rosado, J.A. Anticancer Molecular Mechanisms of Oleocanthal. *Phytotherapy Research* **2020**, *34*, 2820–2834, doi:10.1002/ptr.6722.

136. Boz, H. P-Coumaric Acid in Cereals: Presence, Antioxidant and Antimicrobial Effects. *Int J Food Sci Technol* **2015**, *50*, 2323–2328, doi:10.1111/ijfs.12898.
137. Boo, Y.C. P-Coumaric Acid as An Active Ingredient in Cosmetics: A Review Focusing on Its Antimelanogenic Effects. *Antioxidants* **2019**, *8*, 275, doi:10.3390/antiox8080275.
138. Ifeanyichukwu Ogobuiro; Justin Gonzales¹; Karlie R. Shumway²; Faiz Tuma³. Physiology, Gastrointestinal. In *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023*.
139. American Society of Colon and Rectal Surgeons The Colon: What It Is, What It Does and Why It Is Important Available online: <https://fascrs.org/patients/diseases-and-conditions/a-z/the-colon-what-it-is,-what-it-does> (accessed on 25 September 2024).
140. national institute of diabetes and digestive and kidney disease Your Digestive System and How It Works - National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease. **2017**.
141. Cleveland clinic Large Intestine (Colon) Available online: <https://my.clevelandclinic.org/health/body/22134-colon-large-intestine> (accessed on 25 September 2024).
142. Julie Wilkinson, B.R. The Colon and Its Fuction - Verywell Health Available online: <https://www.verywellhealth.com/what-is-the-colon-796819> (accessed on 25 September 2024).
143. Greenwood-Van Meerveld, B.; Johnson, A.C.; Grundy, D. Gastrointestinal Physiology and Function. In; 2017; pp. 1–16.
144. University of Michigan Health Digestive and Liver Health Available online: <https://www.uofmhealth.org/conditions-treatments/digestive-and-liver-health> (accessed on 25 September 2024).
145. Cheng, L.K.; O’Grady, G.; Du, P.; Egbuji, J.U.; Windsor, J.A.; Pullan, A.J. Gastrointestinal System. *WIREs Systems Biology and Medicine* **2010**, *2*, 65–79, doi:10.1002/wsbm.19.
146. Justin J. Patricia; Amit S. Dhamoon. Physiology, Digestion. **2024**.
147. Treuting, P.M.; Arends, M.J.; Dintzis, S.M. Upper Gastrointestinal Tract. In *Comparative Anatomy and Histology*; Elsevier, 2018; pp. 191–211.
148. Hostos community college Bio 140 - Human Biology I - Digestive System Processes and Regulation Available online: <https://guides.hostos.cuny.edu/bio140/5-16> (accessed on 25 September 2024).
149. Better Health channel Digestive System Available online: <https://www.betterhealth.vic.gov.au/health/conditionsandtreatments/digestive-system> (accessed on 25 September 2024).
150. Mirabelli, P.; Coppola, L.; Salvatore, M. Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, 1098, doi:10.3390/cancers11081098.
151. Kapałczyńska, M.; Kolenda, T.; Przybyła, W.; Zajączkowska, M.; Teresiak, A.; Filas, V.; Ibbs, M.; Bliźniak, R.; Łuczewski, Ł.; Lamperska, K. 2D and 3D Cell Cultures – a Comparison of Different Types of Cancer Cell Cultures. *Archives of Medical Science* **2016**, doi:10.5114/aoms.2016.63743.
152. Jin, X.; Demere, Z.; Nair, K.; Ali, A.; Ferraro, G.B.; Natoli, T.; Deik, A.; Petronio, L.; Tang, A.A.; Zhu, C.; et al. A Metastasis Map of Human Cancer Cell Lines. *Nature* **2020**, *588*, 331–336, doi:10.1038/s41586-020-2969-2.
153. Gayet, J.; Zhou, X.-P.; Duval, A.; Rolland, S.; Hoang, J.-M.; Cottu, P.; Hamelin, R. Extensive Characterization of Genetic Alterations in a Series of Human Colorectal Cancer Cell Lines. *Oncogene* **2001**, *20*, 5025–5032, doi:10.1038/sj.onc.1204611.
154. Gayet, J.; Zhou, X.-P.; Duval, A.; Rolland, S.; Hoang, J.-M.; Cottu, P.; Hamelin, R. Extensive Characterization of Genetic Alterations in a Series of Human Colorectal Cancer Cell Lines. *Oncogene* **2001**, *20*, 5025–5032, doi:10.1038/sj.onc.1204611.
155. de Wit, M.; Fijneman, R.J.A.; Verheul, H.M.W.; Meijer, G.A.; Jimenez, C.R. Proteomics in Colorectal Cancer Translational Research: Biomarker Discovery for Clinical Applications. *Clin Biochem* **2013**, *46*, 466–479, doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.10.039.
156. Lu, J.-J.; Chen, S.-M.; Ding, J.; Meng, L.-H. Characterization of Dihydroartemisinin-Resistant Colon Carcinoma HCT116/R Cell Line. *Mol Cell Biochem* **2012**, *360*, 329–337, doi:10.1007/s11010-011-1072-2.
157. Shalini Sree Kumar, 1, 2 Timothy J. Price, 3, 4 Omar Mohyeldin, 5 Matthew Borg, 4 Amanda Townsend, 3, 4 Jennifer E. Hardingham^{1, 2} KRAS G13D Mutation and Sensitivity to Cetuximab

- or Panitumumab in a Colorectal Cancer Cell Line Model. *Gastrointestinal Cancer Research* **2013**, *7*, 23–26.
158. Joanna Groden, 2 Geoff Joslyn, 3 Wade Samowitz, David Jones, 4 Nitai Bhattacharyya, Lisa Spirio, Andrew Thilveris, Margaret Robertson, Sean Egan, 5 Mark Meuth, and Ray %l@k@ Response of Colon Cancer Cell Lines to the Introduction of APC, a Colon-Specific Tumor Suppressor Gene. *CANCER RESEARCH* **1995**, *55*, 1531–1539.
 159. Verhoeckx, K.C.P.L.-E.I.K.C.L.T.M.A.R.T.S.D.W.H.. *The Impact of Food Bioactives on Health*; Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2015; ISBN 978-3-319-15791-7.
 160. Cohen, E.; Ophir, I.; Shaul, Y. Ben Induced Differentiation in HT29, a Human Colon Adenocarcinoma Cell Line. *J Cell Sci* **1999**, *112*, 2657–2666, doi:10.1242/jcs.112.16.2657.
 161. Martínez-Maqueda, D.; Miralles, B.; Recio, I. HT29 Cell Line. In *The Impact of Food Bioactives on Health*; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp. 113–124.
 162. Kuryłowicz, K.; Cierniak, A.; Madej, E.; Skalniak, Ł.; Wolnicka-Głubisz, A. Resveratrol Enhances Apoptosis Induced by the Heterocyclic Aromatic Amines in P53-Wt LoVo Cells, but Not in P53-Deficient HaCaT Cells. *Acta Biochim Pol* **2020**, doi:10.18388/abp.2020_5477.
 163. Angelis, I. De; Turco, L. Caco-2 Cells as a Model for Intestinal Absorption. *Curr Protoc Toxicol* **2011**, *47*, doi:10.1002/0471140856.tx2006s47.
 164. A. LAKSHMANA RAO*, G.G.S. CACO-2 CELLS: AN OVERVIEW. **2009**, *1*, 260–275.
 165. Habanjar, O.; Diab-Assaf, M.; Caldefie-Chezet, F.; Delort, L. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 12200, doi:10.3390/ijms222212200.
 166. Zanoni, M.; Cortesi, M.; Zamagni, A.; Arienti, C.; Pignatta, S.; Tesei, A. Modeling Neoplastic Disease with Spheroids and Organoids. *J Hematol Oncol* **2020**, *13*, 97, doi:10.1186/s13045-020-00931-0.
 167. Lee, S.-Y.; Koo, I.-S.; Hwang, H.J.; Lee, D.W. In Vitro Three-Dimensional (3D) Cell Culture Tools for Spheroid and Organoid Models. *SLAS Discovery* **2023**, doi:10.1016/j.slasd.2023.12.003.
 168. Kim, W.; Gwon, Y.; Park, S.; Kim, H.; Kim, J. Therapeutic Strategies of Three-Dimensional Stem Cell Spheroids and Organoids for Tissue Repair and Regeneration. *Bioact Mater* **2023**, *19*, 50–74, doi:10.1016/j.bioactmat.2022.03.039.
 169. Gilazieva, Z.; Ponomarev, A.; Rutland, C.; Rizvanov, A.; Solovyeva, V. Promising Applications of Tumor Spheroids and Organoids for Personalized Medicine. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, 2727, doi:10.3390/cancers12102727.
 170. Molecular Devices Spheroids - Application of Spheroids for Cancer Research and Drug Screening.
 171. Amann, A.; Zwierzina, M.; Gamerith, G.; Bitsche, M.; Huber, J.M.; Vogel, G.F.; Blumer, M.; Koeck, S.; Pechriggl, E.J.; Kelm, J.M.; et al. Development of an Innovative 3D Cell Culture System to Study Tumour - Stroma Interactions in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *PLoS One* **2014**, *9*, e92511, doi:10.1371/journal.pone.0092511.
 172. Fontoura, J.C.; Viezzer, C.; dos Santos, F.G.; Ligabue, R.A.; Weinlich, R.; Puga, R.D.; Antonow, D.; Severino, P.; Bonorino, C. Comparison of 2D and 3D Cell Culture Models for Cell Growth, Gene Expression and Drug Resistance. *Materials Science and Engineering: C* **2020**, *107*, 110264, doi:10.1016/j.msec.2019.110264.
 173. Barbosa, M.A.G.; Xavier, C.P.R.; Pereira, R.F.; Petrikaitė, V.; Vasconcelos, M.H. 3D Cell Culture Models as Recapitulators of the Tumor Microenvironment for the Screening of Anti-Cancer Drugs. *Cancers (Basel)* **2021**, *14*, 190, doi:10.3390/cancers14010190.
 174. Jubelin, C.; Muñoz-García, J.; Griscom, L.; Cochonneau, D.; Ollivier, E.; Heymann, M.-F.; Vallette, F.M.; Oliver, L.; Heymann, D. Three-Dimensional in Vitro Culture Models in Oncology Research. *Cell Biosci* **2022**, *12*, 155, doi:10.1186/s13578-022-00887-3.
 175. Ismadi, M.-Z.; Gupta, P.; Fouras, A.; Verma, P.; Jadhav, S.; Bellare, J.; Hourigan, K. Flow Characterization of a Spinner Flask for Induced Pluripotent Stem Cell Culture Application. *PLoS One* **2014**, *9*, e106493, doi:10.1371/journal.pone.0106493.
 176. Habanjar, O.; Diab-Assaf, M.; Caldefie-Chezet, F.; Delort, L. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 12200, doi:10.3390/ijms222212200.

177. Gallo–Ramírez, L.E.; Nikolay, A.; Genzel, Y.; Reichl, U. Bioreactor Concepts for Cell Culture-Based Viral Vaccine Production. *Expert Rev Vaccines* **2015**, *14*, 1181–1195, doi:10.1586/14760584.2015.1067144.
178. Sant, S.; Johnston, P.A. The Production of 3D Tumor Spheroids for Cancer Drug Discovery. *Drug Discov Today Technol* **2017**, *23*, 27–36, doi:10.1016/j.ddtec.2017.03.002.
179. Timmins, N.; Dietmair, S.; Nielsen, L. Hanging-Drop Multicellular Spheroids as a Model of Tumour Angiogenesis. *Angiogenesis* **2004**, *7*, 97–103, doi:10.1007/s10456-004-8911-7.
180. Huang, X.; Huang, Z.; Gao, W.; Gao, W.; He, R.; Li, Y.; Crawford, R.; Zhou, Y.; Xiao, L.; Xiao, Y. Current Advances in 3D Dynamic Cell Culture Systems. *Gels* **2022**, *8*, 829, doi:10.3390/gels8120829.
181. ProDigest SHIME® Technology Available online: <https://prodigest.eu/technology/shime/> (accessed on 28 September 2024).
182. Tom Van de Wiele, P.V. den A.W.O.S.P. and M.Marzorati. Chapter 27: The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). In *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*; Verhoeckx K, C.P., López-Expósito I, Eds.; 2015.
183. Macfarlane, G.T.; Macfarlane, S. Bacteria, Colonic Fermentation, and Gastrointestinal Health. *J AOAC Int* **2012**, *95*, 50–60, doi:10.5740/jaoacint.SGE_Macfarlane.
184. Nováková, L.; Svoboda, P.; Pavlík, J. Ultra-High Performance Liquid Chromatography. In *Liquid Chromatography*; Elsevier, 2017; pp. 719–769.
185. Dong, M.W.; Zhang, K. Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography (UHPLC) in Method Development. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2014**, *63*, 21–30, doi:10.1016/j.trac.2014.06.019.
186. Hossain, M. The Mass Spectrometer and Its Components. In *Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry (SRM-MS) in Proteomics*; Springer International Publishing: Cham, 2020; pp. 17–52.
187. Scigelova, M.; Makarov, A. Orbitrap Mass Analyzer – Overview and Applications in Proteomics. *Proteomics* **2006**, *6*, 16–21, doi:10.1002/pmic.200600528.
188. Eliuk, S.; Makarov, A. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annual Review of Analytical Chemistry* **2015**, *8*, 61–80, doi:10.1146/annurev-anchem-071114-040325.
189. Michalski, A.; Damoc, E.; Hauschild, J.-P.; Lange, O.; Wieghaus, A.; Makarov, A.; Nagaraj, N.; Cox, J.; Mann, M.; Horning, S. Mass Spectrometry-Based Proteomics Using Q Exactive, a High-Performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer. *Molecular & Cellular Proteomics* **2011**, *10*, M111.011015, doi:10.1074/mcp.M111.011015.
190. Sigma-Aldrich (<https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/applications/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-culture-by-technique/cell-growth-and-maintenance>) Cell Growth & Maintenance.
191. Lall, N.; Henley-Smith, C.J.; De Canha, M.N.; Oosthuizen, C.B.; Berrington, D. Viability Reagent, PrestoBlue, in Comparison with Other Available Reagents, Utilized in Cytotoxicity and Antimicrobial Assays. *Int J Microbiol* **2013**, *2013*, 1–5, doi:10.1155/2013/420601.
192. Terry Riss, P. corresponding author1 A.N.M. 1 R.M.B. 1 N.K.M. 1 and J.V.P. *Assay Guidance Manual - Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells*; 2019;
193. Angus M. Browna, b, * A New Software for Carrying out One-Way ANOVA Post Hoc Tests. *ELSEVIER* **2005**, *79*, 89–95.
194. McKinnon, K.M. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* **2018**, *120*, doi:10.1002/cpim.40.
195. Wesley F Taylor1 and Ehsan Jabbarzadeh1, 2, 3 The Use of Natural Products to Target Cancer Stem Cells. *American Journal of Cancer Research* **2017**, *7*, 1588–1605.
196. STEMCELL Technologies ALDEFLUOR™ Kit Available online: <https://www.stemcell.com/products/aldefluor-kit.html> (accessed on 25 September 2024).
197. Corona, G.; Spencer, J.; Dessì, M. Extra Virgin Olive Oil Phenolics: Absorption, Metabolism, and Biological Activities in the GI Tract. *Toxicol Ind Health* **2009**, *25*, 285–293, doi:10.1177/0748233709102951.
198. Farràs, M.; Martínez-Gili, L.; Portune, K.; Arranz, S.; Frost, G.; Tondo, M.; Blanco-Vaca, F. Modulation of the Gut Microbiota by Olive Oil Phenolic Compounds: Implications for Lipid Metabolism, Immune System, and Obesity. *Nutrients* **2020**, *12*, 2200, doi:10.3390/nu12082200.
199. Augusti, P.R.; Quatrin, A.; Mello, R.; Bochi, V.C.; Rodrigues, E.; Prazeres, I.D.; Macedo, A.C.; Oliveira-Alves, S.C.; Emanuelli, T.; Bronze, M.R.; et al. Antiproliferative Effect of Colonic

- Fermented Phenolic Compounds from Jaboticaba (*Myrciaria Trunciflora*) Fruit Peel in a 3D Cell Model of Colorectal Cancer. *Molecules* **2021**, *26*, 4469, doi:10.3390/molecules26154469.
200. Marco D.R. Gomes da Silva¹, A.M.C.F.M.J.B.C. and R.G. *Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*; Boskou, D., Ed.; InTech, 2012; ISBN 978-953-307-921-9.
 201. by Francesco Gervasi and Fanny Pojero Use of Oleuropein and Hydroxytyrosol for Cancer Prevention and Treatment: Considerations about How Bioavailability and Metabolism Impact Their Adoption in Clinical Routine. *MDPI biomedicines* **2024**.
 202. Gomes, A.P. Methylmalonic Acid's Potential as a Prognostic Indicator for Cancer-Related Mortality. *Am J Clin Nutr* **2024**, *119*, 1099–1100, doi:10.1016/j.ajcnut.2024.03.010.
 203. Karković Marković, A.; Torić, J.; Barbarić, M.; Jakobušić Brala, C. Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. *Molecules* **2019**, *24*, 2001, doi:10.3390/molecules24102001.
 204. Bender, C.; Strassmann, S.; Golz, C. Oral Bioavailability and Metabolism of Hydroxytyrosol from Food Supplements. *Nutrients* **2023**, *15*, 325, doi:10.3390/nu15020325.
 205. Sakavitsi, M.E.; Breynaert, A.; Nikou, T.; Lauwers, S.; Pieters, L.; Hermans, N.; Halabalaki, M. Availability and Metabolic Fate of Olive Phenolic Alcohols Hydroxytyrosol and Tyrosol in the Human GI Tract Simulated by the In Vitro GIDM–Colon Model. *Metabolites* **2022**, *12*, 391, doi:10.3390/metabo12050391.
 206. Robles-Almazan, M.; Pulido-Moran, M.; Moreno-Fernandez, J.; Ramirez-Tortosa, C.; Rodriguez-Garcia, C.; Quiles, J.L.; Ramirez-Tortosa, M. Hydroxytyrosol: Bioavailability, Toxicity, and Clinical Applications. *Food Research International* **2018**, *105*, 654–667, doi:10.1016/j.foodres.2017.11.053.
 207. Mosele, J.I.; Martín-Peláez, S.; Macià, A.; Farràs, M.; Valls, R.; Catalán, Ú.; Motilva, M. Faecal Microbial Metabolism of Olive Oil Phenolic Compounds: In Vitro and in Vivo Approaches. *Mol Nutr Food Res* **2014**, *58*, 1809–1819, doi:10.1002/mnfr.201400124.
 208. Hanske, L.; Loh, G.; Sczesny, S.; Blaut, M.; Braune, A. The Bioavailability of Apigenin-7-Glucoside Is Influenced by Human Intestinal Microbiota in Rats. *J Nutr* **2009**, *139*, 1095–1102, doi:10.3945/jn.108.102814.
 209. Tian, C.; Li, J.; Bao, Y.; Gao, L.; Song, L.; Li, K.; Sun, M. Ursolic Acid Ameliorates Obesity of Mice Fed with High-Fat Diet via Alteration of Gut Microbiota and Amino Acid Metabolism. *Front Microbiol* **2023**, *14*, doi:10.3389/fmicb.2023.1183598.
 210. Williamson, G.; Clifford, M.N. Role of the Small Intestine, Colon and Microbiota in Determining the Metabolic Fate of Polyphenols. *Biochem Pharmacol* **2017**, *139*, 24–39, doi:10.1016/j.bcp.2017.03.012.
 211. María-Carmen López de las Hazas a, C.P. b, A.M. a, M.-P.R. a, A.P. c, R.S. c, L.R. c, *, M.-J.M. a Differential Absorption and Metabolism of Hydroxytyrosol and Its Precursors Oleuropein and Secoiridoids. *ELSEVIER* **2016**, *22*, 52–63.
 212. Mora-Huertas, C.E.; Fessi, H.; Elaissari, A. Polymer-Based Nanocapsules for Drug Delivery. *Int J Pharm* **2010**, *385*, 113–142, doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.018.
 213. 1. RR Neubig et al. Comitê da União Internacional de Farmacologia sobre Nomenclatura de Receptores e Classificação de Medicamentos. XXXVIII. Atualização sobre termos e símbolos em farmacologia quantitativa *Pharmacol Rev.* In; 2003; Vol. 55(4), pp. 597–606.
 214. Curti, V.; Di Lorenzo, A.; Dacrema, M.; Xiao, J.; Nabavi, S.M.; Daglia, M. In Vitro Polyphenol Effects on Apoptosis: An Update of Literature Data. *Semin Cancer Biol* **2017**, *46*, 119–131, doi:10.1016/j.semcancer.2017.08.005.
 215. Cárdeno, A.; Sánchez-Hidalgo, M.; Cortes-Delgado, A.; Alarcón de la Lastra, C. Mechanisms Involved in the Antiproliferative and Proapoptotic Effects of Unsaponifiable Fraction of Extra Virgin Olive Oil on HT-29 Cancer Cells. *Nutr Cancer* **2013**, *65*, 908–918, doi:10.1080/01635581.2013.806674.
 216. Borzì, A.M.; Biondi, A.; Basile, F.; Luca, S.; Vicari, E.S.D.; Vacante, M. Olive Oil Effects on Colorectal Cancer. *Nutrients* **2018**, *11*, 32, doi:10.3390/nu11010032.
 217. Emma, M.R.; Augello, G.; Di Stefano, V.; Azzolina, A.; Giannitrapani, L.; Montalto, G.; Cervello, M.; Cusimano, A. Potential Uses of Olive Oil Secoiridoids for the Prevention and Treatment of Cancer: A Narrative Review of Preclinical Studies. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 1234, doi:10.3390/ijms22031234.

218. Martín-Peláez, S.; Covas, M.I.; Fitó, M.; Kušar, A.; Pravst, I. Health Effects of Olive Oil Polyphenols: Recent Advances and Possibilities for the Use of Health Claims. *Mol Nutr Food Res* **2013**, *57*, 760–771, doi:10.1002/mnfr.201200421.
219. Donovan, M.G.; Selmin, O.I.; Doetschman, T.C.; Romagnolo, D.F. Mediterranean Diet: Prevention of Colorectal Cancer. *Front Nutr* **2017**, *4*, doi:10.3389/fnut.2017.00059.
220. López-Miranda, J.; Pérez-Jiménez, F.; Ros, E.; De Caterina, R.; Badimón, L.; Covas, M.I.; Escrich, E.; Ordovás, J.M.; Soriguer, F.; Abiá, R.; et al. Olive Oil and Health: Summary of the II International Conference on Olive Oil and Health Consensus Report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **2010**, *20*, 284–294, doi:10.1016/j.numecd.2009.12.007.
221. Di Francesco, A.; Falconi, A.; Di Germanio, C.; Micioni Di Bonaventura, M.V.; Costa, A.; Caramuta, S.; Del Carlo, M.; Compagnone, D.; Dainese, E.; Cifani, C.; et al. Extravirgin Olive Oil Up-Regulates CB1 Tumor Suppressor Gene in Human Colon Cancer Cells and in Rat Colon via Epigenetic Mechanisms. *J Nutr Biochem* **2015**, *26*, 250–258, doi:10.1016/j.jnutbio.2014.10.013.
222. Albogami, S.; Hassan, A. Assessment of the Efficacy of Olive Leaf (*Olea Europaea* L.) Extracts in the Treatment of Colorectal Cancer and Prostate Cancer Using In Vitro Cell Models. *Molecules* **2021**, *26*, 4069, doi:10.3390/molecules26134069.
223. Lopez-Escalera, S.; Wellejus, A. Evaluation of Caco-2 and Human Intestinal Epithelial Cells as in Vitro Models of Colonic and Small Intestinal Integrity. *Biochem Biophys Rep* **2022**, *31*, 101314, doi:10.1016/j.bbrep.2022.101314.
224. Robey, R.W.; Pluchino, K.M.; Hall, M.D.; Fojo, A.T.; Bates, S.E.; Gottesman, M.M. Revisiting the Role of ABC Transporters in Multidrug-Resistant Cancer. *Nat Rev Cancer* **2018**, *18*, 452–464, doi:10.1038/s41568-018-0005-8.
225. Francesco Serra, 1, * Francesco Spatafora, 1, * Silvia Toni, 2 Alberto Farinetti, 1 Roberta Gelmini, 1 and Anna Vittoria Mattiolicorresponding author3 Polyphenols, Olive Oil and Colorectal Cancer: The Effect of Mediterranean Diet in the Prevention. *Acta Biomed.* **2022**.
226. Whitcomb, D.C.; Lowe, M.E. Human Pancreatic Digestive Enzymes. *Dig Dis Sci* **2007**, *52*, 1–17, doi:10.1007/s10620-006-9589-z.
227. Duffy, M.J. The Role of Proteolytic Enzymes in Cancer Invasion and Metastasis. *Clin Exp Metastasis* **1992**, *10*, 145–155, doi:10.1007/BF00132746.
228. DÉBORA GONÇALVES DE SOUSA DAMACENO MESOTERAPIA COMO TRATAMENTO PARA GORDURA LOCALIZADA: UMA REVISÃO DA LITERATURA, CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UniCEUB FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE-FACES GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA: Brasília, 2018.
229. Liu, P.; Zhu, W.; Chen, C.; Yan, B.; Zhu, L.; Chen, X.; Peng, C. The Mechanisms of Lysophosphatidylcholine in the Development of Diseases. *Life Sci* **2020**, *247*, 117443, doi:10.1016/j.lfs.2020.117443.
230. Allegrini, S.; Garcia-Gil, M.; Pesi, R.; Camici, M.; Tozzi, M.G. The Good, the Bad and the New about Uric Acid in Cancer. *Cancers (Basel)* **2022**, *14*, 4959, doi:10.3390/cancers14194959.
231. Bell, H.N.; Huber, A.K.; Singhal, R.; Korimerla, N.; Rebernick, R.J.; Kumar, R.; El-derany, M.O.; Sajjakulnukit, P.; Das, N.K.; Kerk, S.A.; et al. Microenvironmental Ammonia Enhances T Cell Exhaustion in Colorectal Cancer. *Cell Metab* **2023**, *35*, 134-149.e6, doi:10.1016/j.cmet.2022.11.013.
232. Bergström, C.A.S.; Luthman, K.; Artursson, P. Accuracy of Calculated PH-Dependent Aqueous Drug Solubility. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2004**, *22*, 387–398, doi:10.1016/j.ejps.2004.04.006.
233. Ting Hu, X.-W.H.-G.J. and X.-L.X. Hydroxytyrosol and Its Potential Therapeutic Effects. *J Agric Food Chem* **2014**, *62*.
234. Miro-Casas, E.; Covas, M.-I.; Farre, M.; Fito, M.; Ortuño, J.; Weinbrenner, T.; Roset, P.; de la Torre, R. Hydroxytyrosol Disposition in Humans. *Clin Chem* **2003**, *49*, 945–952, doi:10.1373/49.6.945.
235. Calabrese, E.J.; Hayes, A.W.; Pressman, P.; Dhawan, G.; Kapoor, R.; Agathokleous, E.; Calabrese, V. Quercetin Induces Its Chemoprotective Effects via Hormesis. *Food and Chemical Toxicology* **2024**, *184*, 114419, doi:10.1016/j.fct.2023.114419.
236. Mattson, M.P. Hormesis Defined. *Ageing Res Rev* **2008**, *7*, 1–7, doi:10.1016/j.arr.2007.08.007.

237. Skaperda, Z.; Tekos, F.; Vardakas, P.; Nepka, C.; Kouretas, D. Reconceptualization of Hormetic Responses in the Frame of Redox Toxicology. *Int J Mol Sci* **2021**, *23*, 49, doi:10.3390/ijms23010049.
238. Calabrese, E.J. Cancer Biology and Hormesis: Human Tumor Cell Lines Commonly Display Hormetic (Biphasic) Dose Responses. *Crit Rev Toxicol* **2005**, *35*, 463–582, doi:10.1080/10408440591034502.
239. Sobiesiak, M. Chemical Structure of Phenols and Its Consequence for Sorption Processes. In *Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications*; InTech, 2017.
240. Touseef Ahmed Wani, F.A.M.A.G.W.N.B.N.R.I.A.W.M.A. Olive Oil and Its Principal Bioactive Compound: Hydroxytyrosol – A Review of the Recent Literature. *Trends Food Sci Technol* **2018**.
241. Arangia, A.; Marino, Y.; Impellizzeri, D.; D'Amico, R.; Cuzzocrea, S.; Di Paola, R. Hydroxytyrosol and Its Potential Uses on Intestinal and Gastrointestinal Disease. *Int J Mol Sci* **2023**, *24*, 3111, doi:10.3390/ijms24043111.
242. Rezaei-Sadabady, R.; Zarghami, N.; Barzegar, A.; Eidi, A.; Akbarzadeh, A.; Rezaei-Tavirani, M. Studies of the Relationship between Structure and Antioxidant Activity in Interesting Systems, Including Tyrosol, Hydroxytyrosol Derivatives Indicated by Quantum Chemical Calculations. *Soft* **2013**, *02*, 13–18, doi:10.4236/soft.2013.23004.
243. Napolitano, A.; De Lucia, M.; Panzella, L.; d'Ischia, M. The Chemistry of Tyrosol and Hydroxytyrosol. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*; Elsevier, 2010; pp. 1225–1232.
244. Proto, M.C.; Fiore, D.; Piscopo, C.; Franceschelli, S.; Bizzarro, V.; Laezza, C.; Lauro, G.; Feoli, A.; Tosco, A.; Bifulco, G.; et al. Inhibition of Wnt/ β -Catenin Pathway and Histone Acetyltransferase Activity by Rimonabant: A Therapeutic Target for Colon Cancer. *Sci Rep* **2017**, *7*, 11678, doi:10.1038/s41598-017-11688-x.
245. Erika Terzuoli¹, A.G.M.Z. 2 and S.D. 2 Hydroxytyrosol, a Product from Olive Oil, Reduces Colon Cancer Growth by Enhancing Epidermal Growth Factor Receptor Degradation. *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60*, 519–529 **2016**, *60*, 519–529.
246. Giulia Corona^{1, 2}, Monica Deiana², Alessandra Incani², David Vauzour¹, Maria Assunta Dess² and Jeremy P. E. Spencer¹ Hydroxytyrosol Inhibits the Proliferation of Human Colon Adenocarcinoma Cells through Inhibition of ERK1/2 and Cyclin D1. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 897–903.
247. Imran, M.; Nadeem, M.; Gilani, S.A.; Khan, S.; Sajid, M.W.; Amir, R.M. Antitumor Perspectives of Oleuropein and Its Metabolite Hydroxytyrosol: Recent Updates. *J Food Sci* **2018**, *83*, 1781–1791, doi:10.1111/1750-3841.14198.
248. López de las Hazas, M.-C.P.C.M.A.M.M.-J.. Hydroxytyrosol and the Colonic Metabolites Derived from Virgin Olive Oil Intake Induce Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Colon Cancer Cells. *J Agric Food Chem* **2017**, 1–39.
249. Fabiani, R.; De Bartolomeo, A.; Rosignoli, P.; Servili, M.; Montedoro, G.F.; Morozzi, G. Cancer Chemoprevention by Hydroxytyrosol Isolated from Virgin Olive Oil through G1 Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *European Journal of Cancer Prevention* **2002**, *11*, 351–358, doi:10.1097/00008469-200208000-00006.
250. Terzuoli, E.; Nannelli, G.; Frosini, M.; Giachetti, A.; Ziche, M.; Donnini, S. Inhibition of Cell Cycle Progression by the Hydroxytyrosol-Cetuximab Combination Yields Enhanced Chemotherapeutic Efficacy in Colon Cancer Cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 83207–83224, doi:10.18632/oncotarget.20544.
251. M. Emília Juan¹, U.W.H.D. and J.M.P. Cancer Chemopreventive Activity of Hydroxytyrosol: A Natural Antioxidant from Olives and Olive Oil. In; 2010; pp. 1295–1300.
252. Rodríguez-Morató, J.; Boronat, A.; Kotronoulas, A.; Pujadas, M.; Pastor, A.; Olesti, E.; Pérez-Mañá, C.; Khymenets, O.; Fitó, M.; Farré, M.; et al. Metabolic Disposition and Biological Significance of Simple Phenols of Dietary Origin: Hydroxytyrosol and Tyrosol. *Drug Metab Rev* **2016**, *48*, 218–236, doi:10.1080/03602532.2016.1179754.
253. Tripoli, E.; Giammanco, M.; Tabacchi, G.; Di Majo, D.; Giammanco, S.; La Guardia, M. The Phenolic Compounds of Olive Oil: Structure, Biological Activity and Beneficial Effects on Human Health. *Nutr Res Rev* **2005**, *18*, 98–112, doi:10.1079/NRR200495.
254. Paiva-Martins, F., et al. "Olive (*Olea Europaea*) Leaf Extracts Are Strong Antioxidants and Free Radical Scavengers." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*(11), 5025–5032.

255. Pan, P.; Skaer, C.W.; Stirdivant, S.M.; Young, M.R.; Stoner, G.D.; Lechner, J.F.; Huang, Y.-W.; Wang, L.-S. Beneficial Regulation of Metabolic Profiles by Black Raspberries in Human Colorectal Cancer Patients. *Cancer Prevention Research* **2015**, *8*, 743–750, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-15-0065.
256. Acharya, A.; Das, I.; Chandhok, D.; Saha, T. Redox Regulation in Cancer: A Double-edged Sword with Therapeutic Potential. *Oxid Med Cell Longev* **2010**, *3*, 23–34, doi:10.4161/oxim.3.1.10095.
257. Payton, F.; Bose, R.; Alworth, W.L.; Kumar, A.P.; Ghosh, R. 4-Methylcatechol-Induced Oxidative Stress Induces Intrinsic Apoptotic Pathway in Metastatic Melanoma Cells. *Biochem Pharmacol* **2011**, *81*, 1211–1218, doi:10.1016/j.bcp.2011.03.005.
258. Kumar, S.; Pandey, A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* **2013**, *2013*, doi:10.1155/2013/162750.
259. Dos Santos, D.S.; Farias Rodrigues, M.M. Atividades Farmacológicas Dos Flavonoides: Um Estudo de Revisão. *Estação Científica (UNIFAP)* **2017**, *7*, 29, doi:10.18468/estcien.2017v7n3.p29-35.
260. Hussen Machado* Tanus Jorge Nagem** Vera Maria Peters* Cristiane Sampaio Fonseca* Tânia Toledo de Oliveira* Flavonóides e Seu Potencial Terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução* **2008**, *27*, 33–39.
261. Lin, Y.; Shi, R.; Wang, X.; Shen, H.-M. Luteolin, a Flavonoid with Potential for Cancer Prevention and Therapy. *Curr Cancer Drug Targets* **2008**, *8*, 634–646, doi:10.2174/156800908786241050.
262. Seelinger, G.; Merfort, I.; Wölflle, U.; Schempp, C.M. Anti-Carcinogenic Effects of the Flavonoid Luteolin. *Molecules* **2008**, *13*, 2628–2651, doi:10.3390/molecules13102628.
263. Imran, M.; Rauf, A.; Abu-Izneid, T.; Nadeem, M.; Shariati, M.A.; Khan, I.A.; Imran, A.; Orhan, I.E.; Rizwan, M.; Atif, M.; et al. Luteolin, a Flavonoid, as an Anticancer Agent: A Review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2019**, *112*, 108612, doi:10.1016/j.biopha.2019.108612.
264. Islam, M.R.; Akash, S.; Rahman, M.M.; Nowrin, F.T.; Akter, T.; Shohag, S.; Rauf, A.; Aljohani, A.S.M.; Simal-Gandara, J. Colon Cancer and Colorectal Cancer: Prevention and Treatment by Potential Natural Products. *Chem Biol Interact* **2022**, *368*, 110170, doi:10.1016/j.cbi.2022.110170.
265. Seelinger, G.; Merfort, I.; Wölflle, U.; Schempp, C.M. Anti-Carcinogenic Effects of the Flavonoid Luteolin. *Molecules* **2008**, *13*, 2628–2651, doi:10.3390/molecules13102628.
266. Kang, K.A.; Piao, M.J.; Hyun, Y.J.; Zhen, A.X.; Cho, S.J.; Ahn, M.J.; Yi, J.M.; Hyun, J.W. Luteolin Promotes Apoptotic Cell Death via Upregulation of Nrf2 Expression by DNA Demethylase and the Interaction of Nrf2 with P53 in Human Colon Cancer Cells. *Exp Mol Med* **2019**, *51*, 1–14, doi:10.1038/s12276-019-0238-y.
267. Turktekin, M.; Konac, E.; Onen, H.I.; Alp, E.; Yilmaz, A.; Menevse, S. Evaluation of the Effects of the Flavonoid Apigenin on Apoptotic Pathway Gene Expression on the Colon Cancer Cell Line (HT29). *J Med Food* **2011**, *14*, 1107–1117, doi:10.1089/jmf.2010.0208.
268. Smith, A.J.; Karpova, Y.; D'Agostino, R.; Willingham, M.; Kulik, G. Expression of the Bcl-2 Protein BAD Promotes Prostate Cancer Growth. *PLoS One* **2009**, *4*, e6224, doi:10.1371/journal.pone.0006224.
269. Cicek, M.; Unsal, V.; Emre, A.; Doganer, A. Investigation of the Effects of Apigenin, a Possible Therapeutic Agent, on Cytotoxic and SWH Pathway in Colorectal Cancer (HT29) Cells. *Adv Pharm Bull* **2021**, doi:10.34172/apb.2023.020.
270. Lefort, É.C.; Blay, J. Apigenin and Its Impact on Gastrointestinal Cancers. *Mol Nutr Food Res* **2013**, *57*, 126–144, doi:10.1002/mnfr.201200424.
271. Jeong, J.-M.; Choi, C.-H.; Kang, S.-K.; Lee, I.-H.; Lee, J.-Y.; Jung, H. Antioxidant and Chemosensitizing Effects of Flavonoids with Hydroxy and/or Methoxy Groups and Structure-Activity Relationship. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* **2007**, *10*, 537, doi:10.18433/J3KW2Z.
272. Kamran, S.; Sinniah, A.; Chik, Z.; Alshawsh, M.A. Diosmetin Exerts Synergistic Effects in Combination with 5-Fluorouracil in Colorectal Cancer Cells. *Biomedicines* **2022**, *10*, 531, doi:10.3390/biomedicines10030531.
273. Mioc, M.; Milan, A.; Malița, D.; Mioc, A.; Prodea, A.; Racoviceanu, R.; Ghiulai, R.; Cristea, A.; Căruntu, F.; Șoica, C. Recent Advances Regarding the Molecular Mechanisms of Triterpenic Acids: A Review (Part I). *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, 7740, doi:10.3390/ijms23147740.

274. J. C. Furtado, N.; Pirson, L.; Edelberg, H.; M. Miranda, L.; Loira-Pastoriza, C.; Preat, V.; Larondelle, Y.; André, C. Pentacyclic Triterpene Bioavailability: An Overview of In Vitro and In Vivo Studies. *Molecules* **2017**, *22*, 400, doi:10.3390/molecules22030400.
275. Claro-Cala, C.M.; Jiménez-Altayó, F.; Zagmutt, S.; Rodríguez-Rodríguez, R. Molecular Mechanisms Underlying the Effects of Olive Oil Triterpenic Acids in Obesity and Related Diseases. *Nutrients* **2022**, *14*, 1606, doi:10.3390/nu14081606.
276. Seo, D.Y.; Lee, S.R.; Heo, J.-W.; No, M.-H.; Rhee, B.D.; Ko, K.S.; Kwak, H.-B.; Han, J. Ursolic Acid in Health and Disease. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology* **2018**, *22*, 235, doi:10.4196/kjpp.2018.22.3.235.
277. Kaps, A.; Gwiazdoń, P.; Chodurek, E. Nanoformulations for Delivery of Pentacyclic Triterpenoids in Anticancer Therapies. *Molecules* **2021**, *26*, 1764, doi:10.3390/molecules26061764.
278. Seo, D.Y.; Lee, S.R.; Heo, J.-W.; No, M.-H.; Rhee, B.D.; Ko, K.S.; Kwak, H.-B.; Han, J. Ursolic Acid in Health and Disease. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology* **2018**, *22*, 235, doi:10.4196/kjpp.2018.22.3.235.
279. Chan, E.W.C.; Soon, C.Y.; Tan, J.B.L.; Wong, S.K.; Hui, Y.W. Ursolic Acid: An Overview on Its Cytotoxic Activities against Breast and Colorectal Cancer Cells. *J Integr Med* **2019**, *17*, 155–160, doi:10.1016/j.joim.2019.03.003.
280. Chen, H.; Gao, Y.; Wang, A.; Zhou, X.; Zheng, Y.; Zhou, J. Evolution in Medicinal Chemistry of Ursolic Acid Derivatives as Anticancer Agents. *Eur J Med Chem* **2015**, *92*, 648–655, doi:10.1016/j.ejmech.2015.01.031.
281. Wumei Lin, H.Y. Anticancer Activity of Ursolic Acid on Human Ovarian Cancer Cells via ROS and MMP Mediated Apoptosis, Cell Cycle Arrest and Downregulation of PI3K/AKT Pathway. *JBUON* **2020**, *25*, 750–756.
282. Kornel, A.; Tsiani, E. Effects of Ursolic Acid on Colorectal Cancer: A Review of Recent Evidence. *Nutraceuticals* **2024**, *4*, 373–394, doi:10.3390/nutraceuticals4030022.
283. Cai, Q.; Lin, J.; Zhang, L.; Lin, J.; Wang, L.; Chen, D.; Peng, J. Comparative Proteomics—Network Analysis of Proteins Responsible for Ursolic Acid-Induced Cytotoxicity in Colorectal Cancer Cells. *Tumor Biology* **2017**, *39*, 101042831769501, doi:10.1177/1010428317695015.
284. Liberti, M. V.; Locasale, J.W. The Warburg Effect: How Does It Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci* **2016**, *41*, 211–218, doi:10.1016/j.tibs.2015.12.001.
285. Reyes-Zurita, F.J.; Rufino-Palomares, E.E.; García-Salguero, L.; Peragón, J.; Medina, P.P.; Parra, A.; Cascante, M.; Lupiáñez, J.A. Maslinic Acid, a Natural Triterpene, Induces a Death Receptor-Mediated Apoptotic Mechanism in Caco-2 P53-Deficient Colon Adenocarcinoma Cells. *PLoS One* **2016**, *11*, e0146178, doi:10.1371/journal.pone.0146178.
286. Yu, L.; Xie, X.; Cao, X.; Chen, J.; Chen, G.; Chen, Y.; Li, G.; Qin, J.; PENG, F.; Peng, C. The Anticancer Potential of Maslinic Acid and Its Derivatives: A Review. *Drug Des Devel Ther* **2021**, *Volume 15*, 3863–3879, doi:10.2147/DDDT.S326328.
287. Ooi, K.; Subramaniam, M.; Fong, L.; Goh, H.; Khoo, S.A.; Lim, Y. Apoptotic and Cytostatic Actions of Maslinic Acid in Colorectal Cancer Cells through Possible IKK- β Inhibition. *Asian Pac J Trop Biomed* **2021**, *11*, 122, doi:10.4103/2221-1691.306692.
288. Sommerwerk, S.; Heller, L.; Kuhfs, J.; Csuk, R. Urea Derivates of Ursolic, Oleanolic and Maslinic Acid Induce Apoptosis and Are Selective Cytotoxic for Several Human Tumor Cell Lines. *Eur J Med Chem* **2016**, *119*, 1–16, doi:10.1016/j.ejmech.2016.04.051.
289. Pang, K.-L.; Chin, K.-Y. The Biological Activities of Oleocanthal from a Molecular Perspective. *Nutrients* **2018**, *10*, 570, doi:10.3390/nu10050570.
290. Cusimano, A.; Balasus, D.; Azzolina, A.; Augello, G.; Emma, M.R.; Di Sano, C.; Gramignoli, R.; Strom, S.C.; Mccubrey, J.A.; Montalto, G.; et al. Oleocanthal Exerts Antitumor Effects on Human Liver and Colon Cancer Cells through ROS Generation. *Int J Oncol* **2017**, *51*, 533–544, doi:10.3892/ijo.2017.4049.
291. Bishayee, K.; Khuda-Bukhsh, A.R. 5-Lipoxygenase Antagonist Therapy: A New Approach towards Targeted Cancer Chemotherapy. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **2013**, *45*, 709–719, doi:10.1093/abbs/gmt064.
292. Sain, A.; Sahu, S.; Naskar, D. Potential of Olive Oil and Its Phenolic Compounds as Therapeutic Intervention against Colorectal Cancer: A Comprehensive Review. *British Journal of Nutrition* **2022**, *128*, 1257–1273, doi:10.1017/S0007114521002919.

293. Pang, K.-L.; Chin, K.-Y. The Biological Activities of Oleocanthal from a Molecular Perspective. *Nutrients* **2018**, *10*, 570, doi:10.3390/nu10050570.
294. Taticchi, A., M.S., E.S., & S.M. Extra Virgin Olive Oil and Cancer: A Preventive Relationship." *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*. **2020**, *20*, 16–35.
295. Tejero, J.; Lazure, F.; Gomes, A.P. Methylmalonic Acid in Aging and Disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **2024**, *35*, 188–200, doi:10.1016/j.tem.2023.11.001.
296. Chen, Z.; Chi, T.-Y.; Kameoka, J. Cancer Biomarker Methylmalonic Acid Detection by Molecularly Imprinted Polyaniline Paper Sensor. In Proceedings of the The 2nd International Electronic Conference on Biosensors; MDPI: Basel Switzerland, February 14 2022; p. 1.
297. Hu, C.; Ye, M.; Bai, J.; Liu, P.; Lu, F.; Chen, J.; Yu, P.; Chen, T.; Shi, X.; Tang, Q. Methylmalonic Acid Promotes Colorectal Cancer Progression via Activation of Wnt/ β -Catenin Pathway Mediated Epithelial–Mesenchymal Transition. *Cancer Cell Int* **2023**, *23*, 131, doi:10.1186/s12935-023-02973-z.
298. Gomes, A.P.; Ilter, D.; Low, V.; Endress, J.E.; Fernández-García, J.; Rosenzweig, A.; Schild, T.; Broekaert, D.; Ahmed, A.; Planque, M.; et al. Age-Induced Accumulation of Methylmalonic Acid Promotes Tumour Progression. *Nature* **2020**, *585*, 283–287, doi:10.1038/s41586-020-2630-0.
299. Carretta, M.D.; Quiroga, J.; López, R.; Hidalgo, M.A.; Burgos, R.A. Participation of Short-Chain Fatty Acids and Their Receptors in Gut Inflammation and Colon Cancer. *Front Physiol* **2021**, *12*, doi:10.3389/fphys.2021.662739.
300. Santa-María, C.; López-Enríquez, S.; Montserrat-de la Paz, S.; Geniz, I.; Reyes-Quiroz, M.E.; Moreno, M.; Palomares, F.; Sobrino, F.; Alba, G. Update on Anti-Inflammatory Molecular Mechanisms Induced by Oleic Acid. *Nutrients* **2023**, *15*, 224, doi:10.3390/nu15010224.
301. LLOR, X. The Effects of Fish Oil, Olive Oil, Oleic Acid and Linoleic Acid on Colorectal Neoplastic Processes. *Clinical Nutrition* **2003**, *22*, 71–79, doi:10.1054/clnu.2002.0627.
302. Omolo, C.A.; Kalhapure, R.S.; Jadhav, M.; Rambharose, S.; Mocktar, C.; Ndesendo, V.M.K.; Govender, T. Pegylated Oleic Acid: A Promising Amphiphilic Polymer for Nano-Antibiotic Delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2017**, *112*, 96–108, doi:10.1016/j.ejpb.2016.11.022.
303. Fermor, B.F.; Masters, J.R.W.; Wood, C.B.; Miller, J.; Apostolov, K.; Habib, N.A. Fatty Acid Composition of Normal and Malignant Cells and Cytotoxicity of Stearic, Oleic and Sterculic Acids in Vitro. *Eur J Cancer* **1992**, *28*, 1143–1147, doi:10.1016/0959-8049(92)90475-H.
304. Di Ciaula, A.; Garruti, G.; Lunardi Baccetto, R.; Molina-Molina, E.; Bonfrate, L.; Wang, D.Q.-H.; Portincasa, P. Bile Acid Physiology. *Ann Hepatol* **2017**, *16*, S4–S14, doi:10.5604/01.3001.0010.5493.
305. Centuori, S.M.; Martinez, J.D. Differential Regulation of EGFR–MAPK Signaling by Deoxycholic Acid (DCA) and Ursodeoxycholic Acid (UDCA) in Colon Cancer. *Dig Dis Sci* **2014**, *59*, 2367–2380, doi:10.1007/s10620-014-3190-7.
306. Pai, R.; Tarnawski, A.S.; Tran, T. Deoxycholic Acid Activates β -Catenin Signaling Pathway and Increases Colon Cell Cancer Growth and Invasiveness. *Mol Biol Cell* **2004**, *15*, 2156–2163, doi:10.1091/mbc.e03-12-0894.
307. Anantharaju, P.G.; Reddy, B.D.; Padukudru, M.A.; Kumari Chitturi, CH.M.; Vimalambike, M.G.; Madhunapantula, S. V. Naturally Occurring Benzoic Acid Derivatives Retard Cancer Cell Growth by Inhibiting Histone Deacetylases (HDAC). *Cancer Biol Ther* **2017**, *18*, 492–504, doi:10.1080/15384047.2017.1324374.
308. Wang, S.; Bilal, M.; Hu, H.; Wang, W.; Zhang, X. 4-Hydroxybenzoic Acid—a Versatile Platform Intermediate for Value-Added Compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* **2018**, *102*, 3561–3571, doi:10.1007/s00253-018-8815-x.
309. Sankaranarayanan, R.; Kumar, D.R.; Patel, J.; Bhat, G.J. Do Aspirin and Flavonoids Prevent Cancer through a Common Mechanism Involving Hydroxybenzoic Acids?—The Metabolite Hypothesis. *Molecules* **2020**, *25*, 2243, doi:10.3390/molecules25092243.
310. Sankaranarayanan, R.; Valiveti, C.; Dachineni, R.; Kumar, D.; Lick, T.; Bhat, G. Aspirin Metabolites 2,3-DHBA and 2,5-DHBA Inhibit Cancer Cell Growth: Implications in Colorectal Cancer Prevention. *Mol Med Rep* **2019**, doi:10.3892/mmr.2019.10822.
311. Öztürkel Kabakaş, H.; Sezer Kürkçü, M.; Onat Taşdelen, K.A.; Çöl, B. THE CYTOTOXIC EFFECT OF BENZOIC ACID ON TEN DIFFERENT CANCER CELL LINES. *Eskişehir Technical*

- University Journal of Science and Technology A - Applied Sciences and Engineering* **2024**, *25*, 66–77, doi:10.18038/estubtda.1327658.
312. Wang, X.-N.; Wang, K.-Y.; Zhang, X.-S.; Yang, C.; Li, X.-Y. 4-Hydroxybenzoic Acid (4-HBA) Enhances the Sensitivity of Human Breast Cancer Cells to Adriamycin as a Specific HDAC6 Inhibitor by Promoting HIPK2/P53 Pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **2018**, *504*, 812–819, doi:10.1016/j.bbrc.2018.08.043.
 313. Teixeira, J.; Gaspar, A.; Garrido, E.M.; Garrido, J.; Borges, F. Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *Biomed Res Int* **2013**, *2013*, 1–11, doi:10.1155/2013/251754.
 314. Razzaghi-Asl, N.; G.J.; K.H.; B.F.; F.O. Antioxidant Properties of Hydroxycinnamic Acids: A Review of Structure- Activity Relationships. In *Current Medicinal Chemistry*; 2013; Vol. 20, pp. 4436–4450.
 315. Tehami, W.; Nani, A.; Khan, N.A.; Hichami, A. New Insights Into the Anticancer Effects of *p* - Coumaric Acid: Focus on Colorectal Cancer. *Dose-Response* **2023**, *21*, 155932582211507, doi:10.1177/15593258221150704.
 316. KARAKURT, S.; ABUŞOĞLU, G.; ARITULUK, Z.C. Comparison of Anticarcinogenic Properties of Viburnum Opulus and Its Active Compound P-Coumaric Acid on Human Colorectal Carcinoma. *TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY* **2020**, *44*, 252–263, doi:10.3906/biy-2002-30.
 317. Sharma, S.H.; Rajamanickam, V.; Nagarajan, S. Antiproliferative Effect of P-Coumaric Acid Targets UPR Activation by Downregulating Grp78 in Colon Cancer. *Chem Biol Interact* **2018**, *291*, 16–28, doi:10.1016/j.cbi.2018.06.001.
 318. Obrador, E.; Salvador, R.; López-Blanch, R.; Jihad-Jebbar, A.; Alcácer, J.; Benlloch, M.; Pellicer, J.A.; Estrela, J.M. Melanoma in the Liver: Oxidative Stress and the Mechanisms of Metastatic Cell Survival. *Semin Cancer Biol* **2021**, *71*, 109–121, doi:10.1016/j.semcancer.2020.05.001.
 319. Glinsky, G. Apoptosis and Metastasis: Increased Apoptosis Resistance of Metastatic Cancer Cells Is Associated with the Profound Deficiency of Apoptosis Execution Mechanisms. *Cancer Lett* **1997**, *115*, 185–193, doi:10.1016/S0304-3835(97)04738-1.
 320. Serra, G.; Incani, A.; Serreli, G.; Porru, L.; Melis, M.P.; Tuberoso, C.I.G.; Rossin, D.; Biasi, F.; Deiana, M. Olive Oil Polyphenols Reduce Oxysterols -Induced Redox Imbalance and pro-Inflammatory Response in Intestinal Cells. *Redox Biol* **2018**, *17*, 348–354, doi:10.1016/j.redox.2018.05.006.
 321. Maria Pia Fuggeta; Andrea Cottarelli; Giulia Lanzilli; Maria Tricarico; Roberta Bernini In Vitro Antitumor Activity of Olive Oil Tyrosol and Hydroxytyrosol and Their Methyl Carbonate Derivatives. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* **2012**, *6*, 25–30.
 322. Palko-Labuz, A.; Sroda-Pomianek, K.; Uryga, A.; Kostrzewa-Suslow, E.; Michalak, K. Anticancer Activity of Baicalein and Luteolin Studied in Colorectal Adenocarcinoma LoVo Cells and in Drug-Resistant LoVo/Dx Cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2017**, *88*, 232–241, doi:10.1016/j.biopha.2017.01.053.
 323. Sordon, S.; Popłoński, J.; Milczarek, M.; Stachowicz, M.; Tronina, T.; Kucharska, A.Z.; Wietrzyk, J.; Huszcza, E. Structure–Antioxidant–Antiproliferative Activity Relationships of Natural C7 and C7–C8 Hydroxylated Flavones and Flavanones. *Antioxidants* **2019**, *8*, 210, doi:10.3390/antiox8070210.
 324. Shan, J.; Xuan, Y.; Zhang, Q.; Zhu, C.; Liu, Z.; Zhang, S. Ursolic Acid Synergistically Enhances the Therapeutic Effects of Oxaliplatin in Colorectal Cancer. *Protein Cell* **2016**, *7*, 571–585, doi:10.1007/s13238-016-0295-0.
 325. Wang, J.; Liu, L.; Qiu, H.; Zhang, X.; Guo, W.; Chen, W.; Tian, Y.; Fu, L.; Shi, D.; Cheng, J.; et al. Ursolic Acid Simultaneously Targets Multiple Signaling Pathways to Suppress Proliferation and Induce Apoptosis in Colon Cancer Cells. *PLoS One* **2013**, *8*, e63872, doi:10.1371/journal.pone.0063872.
 326. Cusimano, A.; Balasus, D.; Azzolina, A.; Augello, G.; Emma, M.R.; Di Sano, C.; Gramignoli, R.; Strom, S.C.; Mccubrey, J.A.; Montalto, G.; et al. Oleocanthal Exerts Antitumor Effects on Human Liver and Colon Cancer Cells through ROS Generation. *Int J Oncol* **2017**, *51*, 533–544, doi:10.3892/ijo.2017.4049.
 327. Nguyen, P.T.; Kanno, K.; Pham, Q.T.; Kikuchi, Y.; Kakimoto, M.; Kobayashi, T.; Otani, Y.; Kishikawa, N.; Miyauchi, M.; Arihiro, K.; et al. Senescent Hepatic Stellate Cells Caused by

- Deoxycholic Acid Modulates Malignant Behavior of Hepatocellular Carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **2020**, *146*, 3255–3268, doi:10.1007/s00432-020-03374-9.
328. Ekinci, D.; Şentürk, M.; Küfrevioğlu, Ö.İ. Salicylic Acid Derivatives: Synthesis, Features and Usage as Therapeutic Tools. *Expert Opin Ther Pat* **2011**, *21*, 1831–1841, doi:10.1517/13543776.2011.636354.
329. Soranzo, C.; Della Torre, G.; Ingrosso, A. Formation, Growth and Morphology of Multicellular Tumor Spheroids from a Human Colon Carcinoma Cell Line (LoVo). *Tumori Journal* **1986**, *72*, 459–467, doi:10.1177/030089168607200502.
330. Zoetemelk, M.; Rausch, M.; Colin, D.J.; Dormond, O.; Nowak-Sliwinska, P. Short-Term 3D Culture Systems of Various Complexity for Treatment Optimization of Colorectal Carcinoma. *Sci Rep* **2019**, *9*, 7103, doi:10.1038/s41598-019-42836-0.
331. Sundin, T.; Peffley, D.M.; Gauthier, D.; Hentosh, P. The Isoprenoid Perillyl Alcohol Inhibits Telomerase Activity in Prostate Cancer Cells. *Biochimie* **2012**, *94*, 2639–2648, doi:10.1016/j.biochi.2012.07.028.
332. Leonard, N.A.; Reidy, E.; Thompson, K.; McDermott, E.; Peerani, E.; Tomas Bort, E.; Balkwill, F.R.; Loessner, D.; Ryan, A.E. Stromal Cells Promote Matrix Deposition, Remodelling and an Immunosuppressive Tumour Microenvironment in a 3D Model of Colon Cancer. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, 5998, doi:10.3390/cancers13235998.
333. Rahmani, A.H.; Alsahli, M.A.; Almatroudi, A.; Almogbel, M.A.; Khan, A.A.; Anwar, S.; Almatroodi, S.A. The Potential Role of Apigenin in Cancer Prevention and Treatment. *Molecules* **2022**, *27*, 6051, doi:10.3390/molecules27186051.
334. Hong, J.; Fristiohady, A.; Nguyen, C.H.; Milovanovic, D.; Huttary, N.; Krieger, S.; Hong, J.; Geleff, S.; Birner, P.; Jäger, W.; et al. Apigenin and Luteolin Attenuate the Breaching of MDA-MB231 Breast Cancer Spheroids Through the Lymph Endothelial Barrier in Vitro. *Front Pharmacol* **2018**, *9*, doi:10.3389/fphar.2018.00220.
335. Feng, H.; Liu, Y.; Bian, X.; Zhou, F.; Liu, Y. ALDH1A3 Affects Colon Cancer in Vitro Proliferation and Invasion Depending on CXCR4 Status. *Br J Cancer* **2018**, *118*, 224–232, doi:10.1038/bjc.2017.363.
336. Zhou, L.; Sheng, D.; Wang, D.; Ma, W.; Deng, Q.; Deng, L.; Liu, S. Identification of Cancer-Type Specific Expression Patterns for Active Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) Isoforms in ALDEFLUOR Assay. *Cell Biol Toxicol* **2019**, *35*, 161–177, doi:10.1007/s10565-018-9444-y.
337. Pereira, C. V.; Duarte, M.; Silva, P.; Bento da Silva, A.; Duarte, C.M.M.; Cifuentes, A.; García-Cañas, V.; Bronze, M.R.; Albuquerque, C.; Serra, A.T. Polymethoxylated Flavones Target Cancer Stemness and Improve the Antiproliferative Effect of 5-Fluorouracil in a 3D Cell Model of Colorectal Cancer. *Nutrients* **2019**, *11*, 326, doi:10.3390/nu11020326.
338. Duan, J.-J.; Cai, J.; Gao, L.; Yu, S.-C. ALDEFLUOR Activity, ALDH Isoforms, and Their Clinical Significance in Cancers. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2023**, *38*, doi:10.1080/14756366.2023.2166035.
339. Cruz-Lozano, M.; González-González, A.; Marchal, J.A.; Muñoz-Muela, E.; Molina, M.P.; Cara, F.E.; Brown, A.M.; García-Rivas, G.; Hernández-Brenes, C.; Lorente, J.A.; et al. Hydroxytyrosol Inhibits Cancer Stem Cells and the Metastatic Capacity of Triple-Negative Breast Cancer Cell Lines by the Simultaneous Targeting of Epithelial-to-Mesenchymal Transition, Wnt/ β -Catenin and TGF β Signaling Pathways. *Eur J Nutr* **2019**, *58*, 3207–3219, doi:10.1007/s00394-018-1864-1.
340. Zhang, R.; Tu, J.; Liu, S. Novel Molecular Regulators of Breast Cancer Stem Cell Plasticity and Heterogeneity. *Semin Cancer Biol* **2022**, *82*, 11–25, doi:10.1016/j.semcancer.2021.03.008.
341. Kandhari, K.; Agrawal, H.; Sharma, A.; Yadav, U.C.S.; Singh, R.P. Flavonoids and Cancer Stem Cells Maintenance and Growth. In *Functional Food and Human Health*; Springer Singapore: Singapore, 2018; pp. 587–622.
342. Li, Y.; Hu, Y.; Yang, L.; Liu, J.; Cui, C.; Yang, M.; Zou, D.; Zhou, L.; Zhou, Q.; Ge, W.; et al. Luteolin Directly Binds to KDM4C and Attenuates Ovarian Cancer Stemness via Epigenetic Suppression of PPP2CA/YAP Axis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2023**, *160*, 114350, doi:10.1016/j.biopha.2023.114350.
343. Cook, M.T.; Liang, Y.; Besch-Williford, C.; Goyette, S.; Mafuvadze, B.; Hyder, S.M. Luteolin Inhibits Progesterin-Dependent Angiogenesis, Stem Cell-like Characteristics, and Growth of Human Breast Cancer Xenografts. *Springerplus* **2015**, *4*, 444, doi:10.1186/s40064-015-1242-x.

344. Feng, H.; Liu, Y.; Bian, X.; Zhou, F.; Liu, Y. ALDH1A3 Affects Colon Cancer in Vitro Proliferation and Invasion Depending on CXCR4 Status. *Br J Cancer* **2018**, *118*, 224–232, doi:10.1038/bjc.2017.363.
345. WENLONG WANG¹, C.Z.D.J.J.L.C.Z.L.L. and J.L. Ursolic Acid Inhibits the Growth of Colon Cancer-Initiating Cells by Targeting STAT3 . *Anticancer Res* **2013**, *33*, 4279–4284.
346. Kim, J.S.; Kim, D.K.; Moon, J.Y.; Lee, M.-Y.; Cho, S.K. Oleic Acid Inhibits the Migration and Invasion of Breast Cancer Cells with Stemness Characteristics through Oxidative Stress-Mediated Attenuation of the FAK/AKT/NF-KB Pathway. *J Funct Foods* **2024**, *116*, 106224, doi:10.1016/j.jff.2024.106224.
347. Gonnet, M.; Lethuaut, L.; Boury, F. New Trends in Encapsulation of Liposoluble Vitamins. *Journal of Controlled Release* **2010**, *146*, 276–290, doi:10.1016/j.jconrel.2010.01.037.

7. Anexo(s)

As concentrações de hidroxitirosol presentes na tabela 7.1 foram utilizadas para os gráficos de curva-dose resposta das amostras de digestão. As unidades foram convertidas para molaridade.

As concentrações de hidroxitirosol foram divididas pelas respectivas diluições de modo a determinar a quantidade de hidroxitirosol presente em cada diluição.

$$\text{Ex. } \frac{33.93}{16^*} = 2.1 \mu\text{M de hidroxitirosol presente na diluição 1:16} \rightarrow * \text{ primeira diluição efetuada}$$

Tabela 7.1. Análise de HPLC para identificação e quantificação do hidroxitirosol e Tirosol.

Amostra	Intestino Delgado – Lúmen			Intestino Delgado - Dialisado			Cólon			
	1.5h	3h	4.5h	1.5h	3h	4.5h	0h	6h	24h	48h
Hidroxitirosol (mg/L)	5.23 (33.93 μM)	2.85 (18.48 μM)	1.53 (9.92 μM)	3.50 (22.7 μM)	1.55 (10.05 μM)	0.88 (5.70 μM)	0.60 (3.89 μM)	0.23 (1.49 μM)	2.34 (15.18 μM)	2.19 (14.21 μM)
Tirosol (mg/L)	6.64	3.25	2.04	3.60	1.63	1.01	-	-	-	-

*O que está selecionado a laranja são as concentrações importantes para o presente estudo

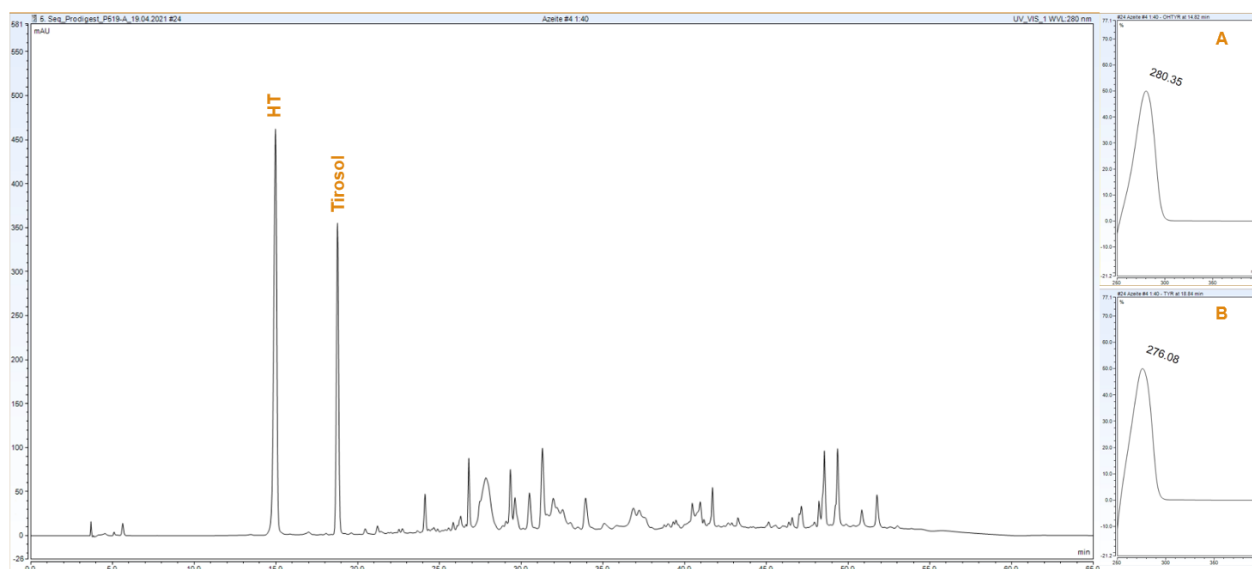
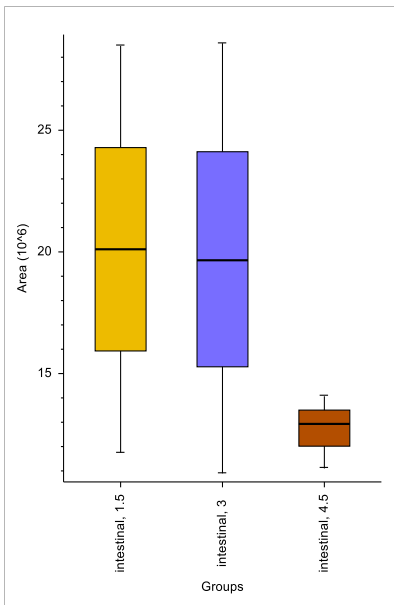
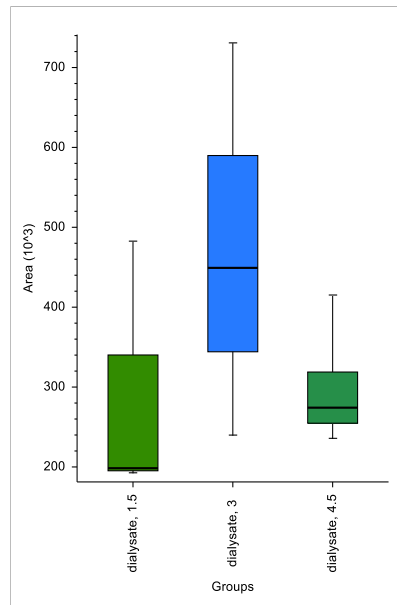


Figura 7.1. Perfil cromatográfico do extrato de azeite, a 280 nm. Os compostos hidroxitirosol e tirosol foram identificados por comparação com o tempo de retenção e espectro de absorção UV-visível (A e B) dos respectivos padrões analisados nas mesmas condições.

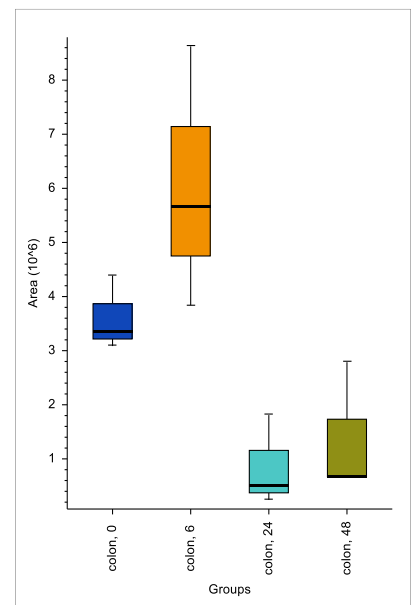
Ácido Masílico



Lúmen 1.5h, 3h e 4.5h

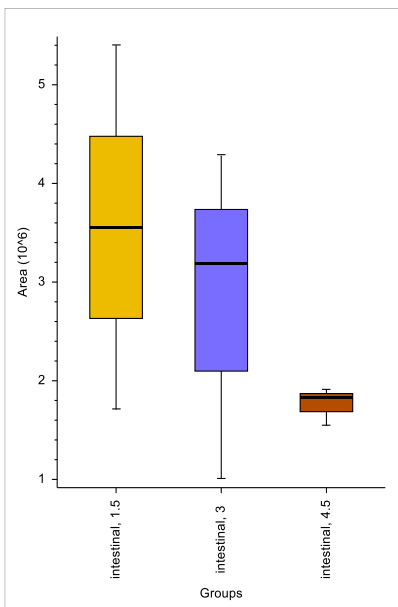


Dialisado 1.5h, 3h e 4.5h

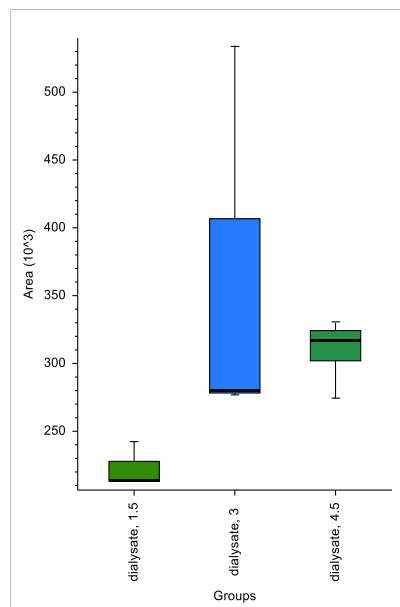


Cólon 0h, 6h, 24h e 48h

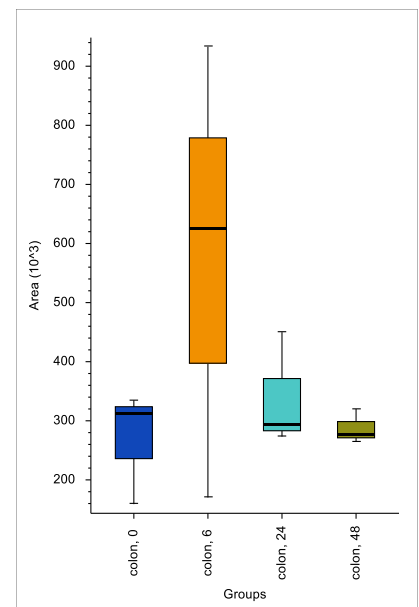
Ácido Ursólico



Lúmen 1.5h, 3h e 4.5h

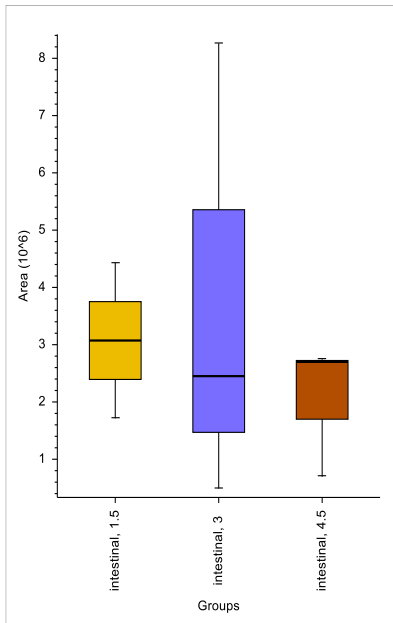


Dialisado 1.5h, 3h e 4.5h

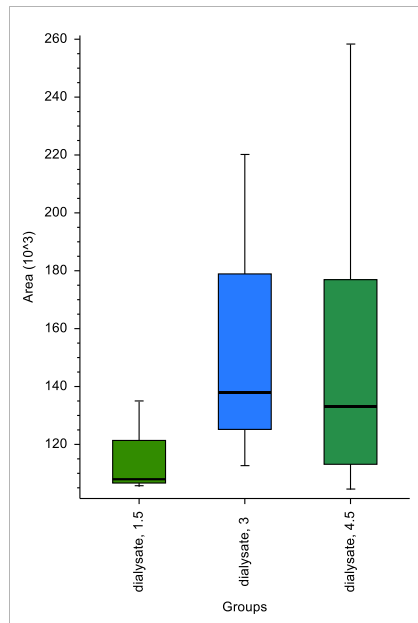


Cólon 0h, 6h, 24h e 48h

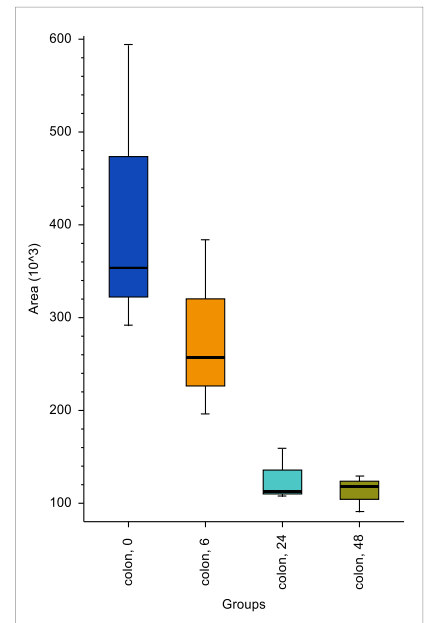
Apigenina



Lúmen 1.5h, 3h e 4.5h

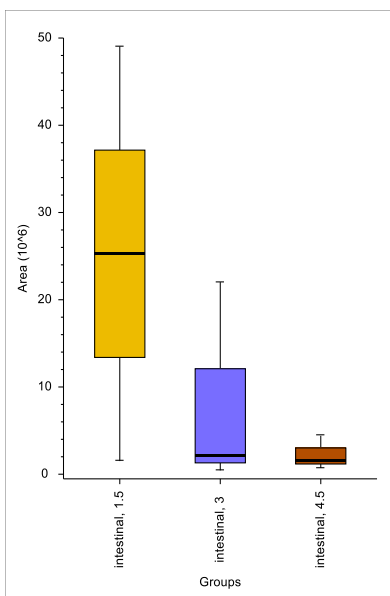


Dialisado 1.5h, 3h e 4.5h

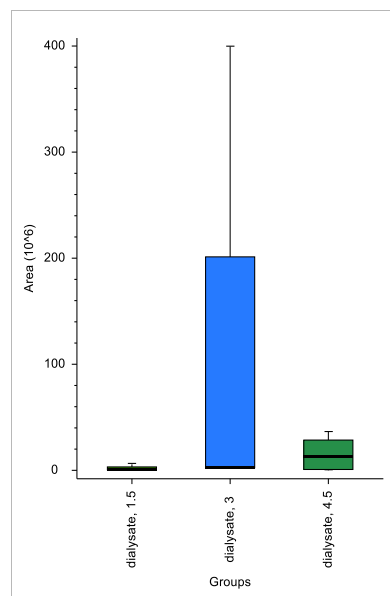


Cólon 0h, 6h, 24h e 48h

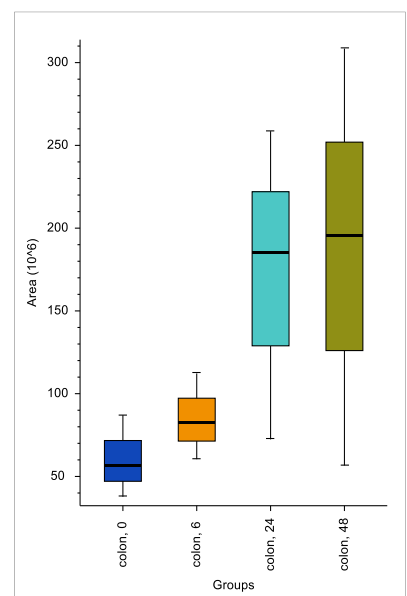
Hidroxitirosol



Lúmen 1.5h, 3h e 4.5h



Dialisado 1.5h, 3h e 4.5h



Cólon 0h, 6h, 24h e 48h

Figura 7.2. Gráficos de bigodes que representam a variação dos metabolitos identificados por comparação com padrões (ácido maslínico, ácido ursólico, apigenina e hidroxitirosol) ao longo do tempo nas diferentes fases do TGI.