



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Efeitos da ingestão de simbiótico e indol-3-carbinol sobre o processo de carcinogênese química de cólon em ratos Wistar alimentados com dieta contendo heme.

Nelci Antunes de Moura

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Dr. Luís Fernando Barbisan

**BOTUCATU – SP
2015**



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Efeitos da ingestão de simbiótico e indol-3-carbinol sobre o processo de carcinogênese química de cólon em ratos Wistar alimentados com dieta contendo heme.

Nelci Antunes de Moura

Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan
ORIENTADOR

Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho
COORIENTADOR

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre (ou Doutor) no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Dr. Luís Fernando Barbisan

BOTUCATU – SP
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM. DIVISÃO TÉCNICA DE
BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Moura, Nelci Antunes de.

Efeitos da ingestão de simbiótico e indol-3-carbinol sobre o processo de carcinogênese química de cólon em ratos Wistar alimentados com dieta contendo heme / Nelci Antunes de Moura. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luís Fernando Barbisan

Coorientador: Robson Francisco de Carvalho

Capes: 20603002

1. Cólon (Anatomia) - Câncer. 2. Carcinogênese. 3. Câncer - Quimioprevenção. 4. Heme.

Palavras-chave: Carcinogênese de cólon; Heme; Indol 3-carbinol; Quimioprevenção; Simbiótico.

Resumo

O ferro heme presente na carne vermelha está associado ao aumento da incidência do câncer colorretal (CCR). O heme pode catalisar a formação de compostos nitrosos e a peroxidação lipídica no lúmen intestinal. No entanto, os efeitos pró-carcinogênicos do heme podem ser inibidos por alguns compostos como os sais de cálcio, clorofila entre outros. Sabe-se que o indol-3-carbinol (I3C), presente nas plantas da família das Brassicas e os simbióticos são compostos promissores na prevenção do câncer de cólon, atuando em via de proliferação, apoptose e modulação da microbiota intestinal. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi o de avaliar os efeitos da ingestão de simbiótico (prebiótico inulina associado ao probiótico *Bifidobacterium lactis bb-12*) e de I3C, isolados ou em associação sobre o processo de carcinogênese de cólon induzido pela 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em ratos Wistar alimentados ou não com dieta suplementada com heme. Os animais foram alocados em 9 grupos, os grupos 1 a 8 (n=12) receberam quatro doses de DMH (40 mg/Kg) nas duas semanas iniciais do experimento. Os grupos 1 e 9 (n=12 e 5) receberam ração basal até o final do experimento e os grupos 2 a 8 receberam ração basal suplementada com heme, heme+I3C, heme+simbiótico, heme+I3C+simbiótico, I3C, simbiótico e I3C+simbiótico, respectivamente. A eutanásia ocorreu ao final da 25ª semana. Neste momento foi realizada a coleta do cólon com os respectivos tumores e amostras de fezes do ceco. Em seguida, procedeu-se a medida dos tumores e coleta de amostras para biologia molecular. Após a fixação em formalina tamponada e a retirada dos tumores, realizou-se a contagem de focos de criptas aberrantes (FCA) pela coloração de azul de metileno. Realizou-se a análise histológica dos tumores e a análise da expressão de 95 genes relacionados a via da carcinogênese colônica, pela técnica *Taqman Low Density Array*, e a expressão proteica da E-caderina, TGFB1 (*Transforming growth factor beta 1*) e RAF1 (*Serine/threonine-protein kinase*) por *Western Blotting*. Foram analisados os índices de proliferação celular e apoptose pelo PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) e caspase 3-clivada, respectivamente, tanto nos cólons como em tumores, e a expressão de β -catenina e E-caderina nos tumores, por imunistoquímica. Células da linhagem Caco-2 foram incubadas com água fecal extraída das fezes do ceco e submetidas a testes de citotoxicidade e genotoxicidade pelos testes do MTT (*mitochondrial tetrazolium test*) e Cometa, respectivamente. Os dados foram comparados utilizando-se o software Sigma Stat 3.5 e *Expression Suite* para expressão gênica. Foi observado aumento significativo no número de criptas aberrantes (CA) no grupo que recebeu heme (G2) quando comparado ao grupo que recebeu apenas ração basal (G1). Redução significativa no número de CA foi observada no grupo que recebeu heme+I3C (G3) e heme+simbiótico (G4) quando comparado ao grupo que recebeu heme (G2). O número de FCA totais com ≥ 9 criptas aberrantes foi significativamente menor no grupo que recebeu heme+simbiótico (G4) quando comparado ao grupo que recebeu heme (G2). Entretanto, aumento significativo no número de tumores com mais de 60 mm³ foi observado no grupo suplementado com heme+I3C+simbiótico (G5), quando comparado ao grupo que recebeu heme (G2). Além disso, foi observado aumento significativo na incidência de tumores invasivos no grupo que recebeu heme+I3C+simbiótico (G5) quando comparado ao grupo que recebeu heme (G2). Os tumores do grupo suplementado com heme+I3C+simbiótico (G5) apresentaram baixa expressão dos genes *Cdh1*, *Tgfb1*, *Appl1* e alta expressão do *Raf1*, já os tumores do grupo suplementado com heme +I3C (G3) apresentaram baixa expressão do *Cdh1*. A água fecal do grupo que recebeu heme (G2) apresentou significativamente

maior citotoxicidade e genotoxicidade quando comparado ao grupo que recebeu ração basal (G1). Com relação aos tratamentos, a água fecal do grupo que recebeu heme+I3C (G3) e heme e simbiótico (G4) apresentaram água fecal significativamente com menor potencial genotóxico quando comparada ao grupo que recebeu heme (G2). No entanto, o grupo que recebeu heme+I3C+simbiótico (G5) apresentou aumento significativo na genotoxicidade da água fecal. Dessa forma, concluímos que o heme associado a uma dieta com níveis normais de cálcio não é um potente indutor de FCA, mas aumenta a citotoxicidade e genotoxicidade da água fecal. No entanto, tanto o I3C como o simbiótico reduzem os efeitos citotóxicos/genotóxicos da ingestão de heme. Contudo, a associação do heme+I3C+simbiótico apresentou efeito promotor da carcinogênese de cólon.

Palavras-chave: carcinogênese de cólon; heme; indol 3-carbinol; quimioprevenção; simbiótico.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the third most common type of cancer worldwide. Hemin iron, which is found in red meat, catalyzes the formation of carcinogenic N-nitroso compounds and lipid peroxidation end-products in the colon lumen. The procarcinogenic effect of hemin is known to be inhibited by molecules, such as calcium, chlorophyll and others. However, the preventive effect of indole 3-carbinol and synbiotics on colon carcinogenesis remains uninvestigated. The aim of this study was to assess the modifying effects of a synbiotic (inulin+ *Bifidobacterium lactis*) and/or I3C against dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis in hemin-fed male Wistar rats. Nine groups of animals were evaluated. Groups 1–8 received a total of four s.c. DMH injections (40 mg/kg b.w.) over 2 weeks, whereas group 9 was given EDTA solution (vehicle). Two weeks after DMH-initiation, G1 and G9 were fed a basal diet while groups G2, G3, G4, G5, G6, G7 and G8 received a basal diet containing hemin, hemin+I3C, hemin+synbiotic, hemin+I3C+synbiotic, I3C, synbiotic and I3C+synbiotic, respectively, during 23 weeks. At 25 week, all animals were killed and their colons were removed. Cecal contents were collected to determine fecal water cytotoxicity and genotoxicity (DNA damage) in Caco-2 cells. Colon tumors were measured and samples were collected and stored at -80°C. The colons were fixed flat in 10% buffered formalin for 24 h and stained with 1.0% methylene blue for classical ACF analysis and quantification. Tumor incidence and multiplicity were assessed after histopathological analysis. Gene and protein expression were determined in tumor samples alone. The total number of aberrant crypts (AC) was significantly higher ($p=0.03$) in the hemin group (G2) than in the group fed basal diet (G1). AC number in both hemin+I3C (G3) and hemin+synbiotic (G4) groups was also significantly lower than in the group fed hemin (G2). Tumor volume was higher in the hemin+I3C+ synbiotic (G5) group and invasive adenocarcinoma was more frequent in the hemin+I3C+synbiotic group (G5) than in the group fed hemin (G2). Colon tumor expression analysis showed that in comparison with the group fed hemin (G2), *Cdh1*, *Tgfb1* and *Appl1* were downregulated while *Raf1* was upregulated in the group hemin+I3C+synbiotic (G5), and *Cdh1* was down-regulated in the group hemin+I3C (G3). Fecal water cytotoxicity in the hemin group (G2) was higher than in groups fed basal diet (G1) and hemin+I3C (G3). Fecal water genotoxicity was also significantly higher in the group fed hemin alone (G2) than in the basal diet group (G1), as well as, in groups fed hemin+I3C (G3) and hemin+synbiotics (G4). However, when compared to hemin alone (G2), fecal water from group hemin+I3C+ synbiotics (G5) presented the highest DNA damage levels. Our results suggest that although hemin in a regular-calcium diet was not a powerful ACF promoter, it increased fecal water cytotoxicity and genotoxicity. On the other hand, hemin associated with either I3C or synbiotics prevented ACF promotion. Nonetheless, a synergistic interaction among hemin, I3C and synbiotic did promote DMH-induced tumorigenesis.

Keywords: colon carcinogenesis, hemin, indole 3-carbinol, chemoprevention, synbiotics.

Dedicat6ria

Dedico este trabalho a toda minha família que sempre foi o alicerce da minha vida.

“Sem Deus não há vida, sem família não há base e sem amigos não há mundo colorido.”

(Verena)

Agradecimientos

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida , por me proporcionar saúde e caminhar comigo a todo instante!

Aos meus pais Oracy e Ruth pelo amor incondicional e apoio em tudo!

Aos meus irmãos: Milton e Silas, às minhas irmãs: Maria, Silmara e Mariza pelo companheirismo, amor e amizade.

A todos meus demais familiares e amigos de Itaberá.

Ao meu namorado Marcos (Spikê) pelo companheirismo, amor e disposição em me ajudar sempre!

Ao meu orientador professor Dr. Luís Fernando Barbisan, exemplo de humildade e dedicação em tudo que faz, agradeço pelos ensinamentos, paciência e confiança.

Ao meu coorientador prof. Dr. Robson Francisco Carvalho pela orientação na etapa das análises de expressão gênica, uma área até então desconhecida para mim.

Ao aluno de IC, Brunno Felipe Ramos Caetano, que foi muito mais que um aluno de iniciação científica, mas um amigo e colaborador de verdade executando seu trabalho com dedicação e responsabilidade.

Ao colega Leonardo do Laboratório do Músculo Estriado pela ajuda nas reações de RT-qPCR e análise dos dados.

Ao bioterista do Departamento de Patologia da FMB Paulo Cesar Georgete (PC) pela amizade e cuidados com os animais.

A todos os colegas do Laboratório de Carcinogênese Química Experimental, Tony, Flávia, Joyce , Mariana Fragoso, Mariana Tablas, Renata, Guilherme, Brunno e Muriel.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Morfologia pela convivência harmoniosa e agradável.

Às colegas Flávia e Joyce agora colegas de casa pela amizade sincera, conversas e muitas risadas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) pela concessão do auxílio e bolsa de doutorado.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

Obrigada!

Sumário

Resumo.....	2
<i>Abstract</i>	4
Lista de Figuras.....	11
Lista de Tabelas.....	12
Lista de Anexos.....	13
Lista de Abreviaturas.....	14
Introdução.....	15
Capítulo 1.....	16
Revisão de Literatura.....	17
1. Câncer colorretal: epidemiologia e fatores de risco.....	17
2. Carcinogênese: aspectos gerais.....	19
2.1.Carcinogênese experimental de cólon.....	22
3. Heme e carcinogênese de cólon.....	24
4. Quimioprevenção do câncer: aspectos gerais.....	28
5. Indol 3-carbinol, simbióticos: aspectos gerais e potencial quimiopreventivo.....	29
6. Justificativa e hipótese do trabalho científico.....	36
7. Referências.....	36
Capítulo 2	47
1. Objetivo.....	48
2. Material e métodos.....	48
2.1. Dietas.....	48
2.2. Delineamento experimental.....	49
2.3. Avaliação do consumo de ração e água.....	50
2.4. Eutanásia dos animais e coleta de amostras.....	50
2.5. Análise macroscópica de tumores.....	51
2.6. Análise de focos de criptas aberrantes (FCA) no cólon.....	51
2.7. Processamento histológico dos tumores e do cólon.....	52
2.8. Análise histopatológica do cólon e tumores.....	53
2.9. Reações de imunistoquímica para PCNA , caspase-3 clivada e β -catenina e E-caderina.....	54
2.10. Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR).....	54

2.10.1. Extração e quantificação de RNA total das amostras tumorais.....	54
2.10.2. Análise da qualidade de RNA das amostras tumorais.....	55
2.10.3. Reação de Transcrição Reversa.....	55
2.10.4. PCR quantitativo em Tempo Real.....	55
2.11. Western Blotting.....	56
2.12. Preparo da água fecal.....	57
2.13. Cultura Celular e exposição á água fecal.....	57
2.14. Análise de Genotoxicidade da água fecal pelo Teste do Cometa	57
2.15. Análise de Citotoxicidade da água fecal pelo teste do MTT.....	58
2.16. Análise estatística.....	58
3. Resultados.....	59
3.1. Observações gerais.....	59
3.2. Peso corpóreo e consumo de ração.....	59
3.3. Focos de criptas aberrantes (FCA).....	60
3.4. Histopatologia do cólon.....	63
3.5. Análise macroscópica e microscópica dos tumores.....	64
3.6. Proliferação celular, apoptose e acúmulo de β -catenina.....	67
3.7. Expressão gênica e proteica.....	70
3.8. Citotoxicidade da água fecal.....	72
3.9. Genotoxicidade da água fecal.....	72
4. Discussão.....	73
5. Referências.....	78
6. Anexos.....	82

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1 – Números estimados (milhares) de incidência e mortalidade em homens em regiões mais desenvolvidas e menos desenvolvidas no mundo em 2012.....	17
Figura 2 – Transição adenoma-adenocarcinoma.....	22
Figura 3 – Estrutura molecular do ferro heme.....	25
Figura 4 – Absorção intestinal do ferro heme.....	27
Figura 5 – Principais mecanismos de ação do heme sobre a carcinogênese colorretal.....	27
Figura 6 – Transformação metabólica do indol 3-carbinol.....	30
Figura 7 – Possíveis vias pelos quais I3C / DIM exerce efeitos anticarcinogênicos	31
Figura 8 – Digestão de prebióticos através do trato gastrointestinal.....	33

Capítulo 2

Figura 1 – Delineamento experimental.....	50
Figura 2 – Cólon preso à prancha de isopor mostrando vários tumores macroscópicos.....	51
Figura 3 – Focos de criptas aberrantes (FCA) identificados pela coloração de azul de metileno	63
Figura 4 – Cortes histológicos corados em HE mostrando focos de criptas aberrantes.....	63
Figura 5 – Dados de volume dos tumores.....	65
Figura 6 – Cortes histológicos corados em HE de tumores de cólon.....	67
Figura 7 – Marcação imunoistoquímica em criptas de aparência normal e tumores.....	68
Figura 8 – Marcação imunoistoquímica em criptas de aparência normal e tumores.....	69
Figura 9 – Marcação imunoistoquímica para β -catenina e e-caderina em tumores.....	70
Figura 10 – Expressão gênica relativa nos diferentes grupos experimentais.....	71
Figura 11 – Análise de citotoxicidade pelo teste do MTT.....	72
Figura 12 – Micrografias dos cometas representativos, corados com SyberGold®.....	73
Figura 13 –Análise de genotoxicidade pelo teste do cometa, para o parâmetro momento da cauda.....	73

Lista de Tabelas

Capítulo 2

Tabela 1– Composição das dietas.....	48
Tabela 2 – Peso corpóreo dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo do experimento.....	59
Tabela 3 – Consumo de água, ração dos animais dos diferentes grupos ao longo do período experimental.....	60
Tabela 4 – Efeitos das dietas contendo heme, I3C e simbióticos e suas associações sobre o desenvolvimento de focos de criptas aberrantes.....	62
Tabela 5 – Efeitos das dietas contendo heme, I3C e simbióticos e suas associações sobre o desenvolvimento de FCA displásicos induzidos pela DMH no cólon de ratos Wistar.....	64
Tabela 6 – Efeitos da dieta contendo heme, I3C e simbióticos sobre o desenvolvimento de tumores colônicos induzidos pela DMH no cólon de ratos Wistar.....	66

Lista de anexos

Anexo 1 – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal.....	82
Anexo 2 – Análise das amostras de RNA dos diferentes grupos.....	83
Anexo 3 – Lista de genes selecionados no cartão Taqman Low Density Array (TLDA).....	84
Anexo 4 – Genes diferencialmente expressos entre os diferentes grupos experimentais.....	87

Lista de abreviaturas

CCR – Câncer colorretal

FAP – Polipose Adenomatosa Familiar, do inglês *Familial adenomatous polyposis*

HNPCC – Câncer Colorectal Hereditário Não-Poliposo, do inglês *Hereditary Non poliposis Colorectal Câncer*

ROS - Espécies reativas de oxigênio, do inglês *Reactive Oxigen Species*

DMH – 1,2 dimetilhidrazina

AOM – Azoximetano

FCA – Focos de criptas aberrantes

CA – Criptas aberrantes

BCAC – cripta com acúmulo de beta-catenina, do inglês *beta-catenin-accumulated crypts*

MDF – Foco com depleção de mucina, do inglês *Mucin-depleted foci*

NOCs - compostos N-nitrosos, do inglês *N-nitroso compounds*

MDA – malondialdeído

4- HNE – 4-Hidroxinonenal

I3C – Indol 3-carbinol

DIM – Diindolimetano

FOS – Frutooligossacarídeo

AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta

HDACs – Histona desacetilase

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês *Ethylenediamine tetra acetic acid*

PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular, do inglês *Proliferating cell nuclear antigen*

RIN – Número de integridade do RNA do inglês *RNA integrity number*

TLDA – do inglês *Taqman Low Density Array*

MTT – do inglês *mitochondrial tetrazolium test.*

Introdução

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais incidente em homens e o segundo em mulheres segundo as últimas estimativas mundiais. A distribuição geográfica desse tipo de câncer tem sofrido alterações nas últimas décadas, sua incidência que era maior em países desenvolvidos, sofreu um aumento também em países em desenvolvimento, o que pode ser explicado principalmente pelo aumento na expectativa de vida e exposição à diferentes fatores de riscos. Entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CCR, pode-se destacar: o sedentarismo, o tabagismo, o alcoolismo e um dos fatores mais notáveis: os hábitos alimentares inadequados. Padrão alimentar baseado em alto consumo de gorduras, carnes vermelhas, carnes processadas, carboidratos refinados e baixa ingestão de fibras, vegetais, frutas e verduras estão associados à maior incidência de CCR.

Recentemente a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) baseado em evidências, classificou a carne vermelha processada e a carne vermelha como cancerígena e com provável potencial cancerígeno, respectivamente (Press release nº 240, IARC, disponível em http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr240_E.pdf). Um dos principais mecanismos considerado responsável pelo efeito carcinogênico da carne vermelha é a presença de grande quantidade de ferro heme que pode catalisar a formação de compostos nitrosos e a peroxidação lipídica que resulta em produtos pro-carcinogênicos. No entanto, alguns estudos experimentais já demonstraram que os efeitos pró-carcinogênicos do heme podem ser inibidos por alguns compostos como o cálcio, a clorofila, vitaminas C e E e polifenóis como a quercetina, α -tocoferol, ou polifenóis presentes no vinho tinto. O cálcio pode precipitar moléculas de heme e os demais compostos podem inibir a peroxidação lipídica ou a formação de compostos nitrosos e assim inibir o efeito citotóxico. Contudo a maioria dos estudos avaliaram os efeitos do heme após exposição a curto prazo e associado à dietas com potencial de risco para o câncer de cólon, e.g. dieta com altos níveis de gordura ou com baixo teor de cálcio. Faltam estudos que avaliam os efeitos do heme por um longo período de exposição associado a dietas com níveis normais de gordura e cálcio.

Sabendo que o indol-3-carbinol (I3C), presente nas plantas da família das Brassicas e principalmente os simbióticos são compostos promissores na prevenção do câncer de cólon, atuando em via de proliferação, apoptose e modulação da microbiota intestinal, visto que algumas bactérias tem a capacidade de favorecer a manutenção da barreira de muco protetora na mucosa colônica, o presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito da ingestão do ferro heme, de forma isolada ou associado a esses agentes quimiopreventivos adicionados à dieta com níveis normais de cálcio, sobre a etapa de promoção carcinogênese de cólon induzida pela 1,2 dimetilhidrazina (DMH).

Capítulo 1

Revisão de Literatura

1. Câncer colorretal: epidemiologia e fatores de riscos

Estudos populacionais apontam para crescimento nas taxas de morbidade e mortalidade por neoplasias no mundo. De acordo com dados do GLOBOCAN 2012 estimou-se 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes por câncer comparado com 12,7 milhões de novos casos e 7,6 milhões de mortes em 2008 no mundo (Ferlay, *et al.*, 2015). O câncer colorretal (CCR) é o terceiro mais incidente em homens e o segundo em mulheres com 1,2 milhões de novos casos e 608.700 mortes no mundo (Siegel *et al.*, 2015, Ferlay, *et al.*, 2015). No Brasil, segundo dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer), as estatísticas para o CCR se comportam da mesma forma do restante do mundo, para 2014 estimou-se 15.070 casos novos em homens e 17.530 em mulheres.

Segundo as últimas estimativas mundiais, tem se observado uma mudança nos padrões geográficos quanto à incidência de CCR. Em países asiáticos onde se tinha um baixo risco tem se observado uma tendência de aumento dessa neoplasia, enquanto em países considerados de alto risco houve uma estabilização ou até mesmo queda na incidência (Figura 1). Essas disparidades são afetadas pelas práticas de detecção precoce da doença, mais disponibilidades de tratamentos e exposição a fatores de risco (Fedewa *et al.*, 2015, Lansdorp-Vogelaar *et al.*, 2015).

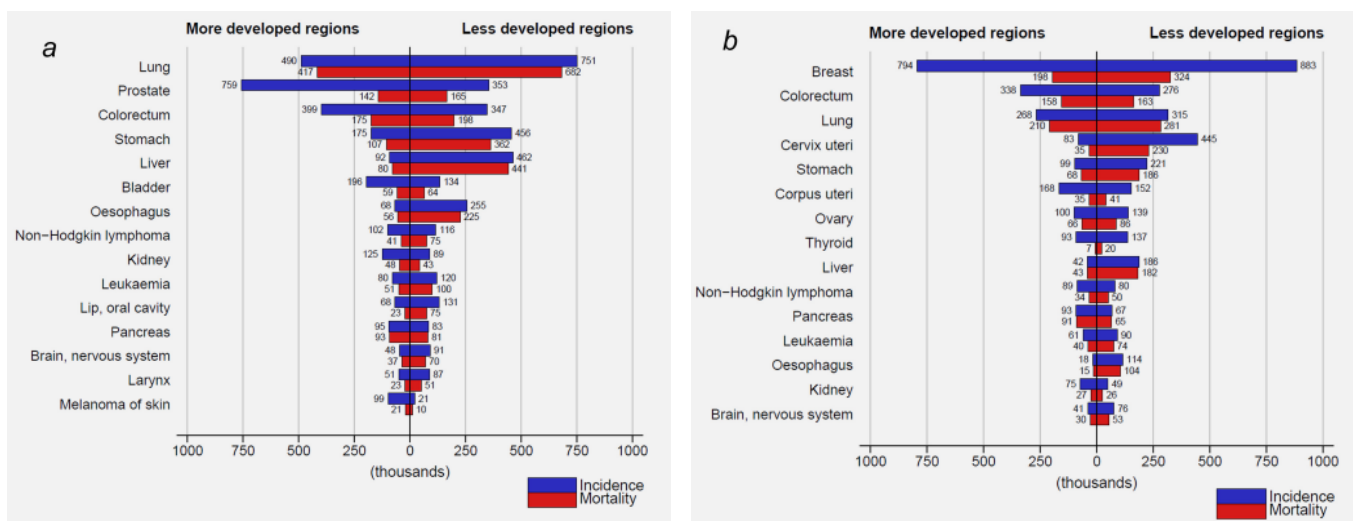


Figura 1 – (a) Números estimados (milhares) de incidência e mortalidade em homens em regiões mais desenvolvidas e menos desenvolvidas no mundo em 2012. (b) Números estimados (milhares) de incidência e mortalidade mulheres em regiões mais desenvolvidas e menos desenvolvidas no mundo em 2012. Fonte: Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Fonte: Ferlay *et al.*, *Int. J. Cancer*: 136, E359–E386, 2015.

Este tipo de câncer apresenta bom prognóstico quando diagnosticado em estágios iniciais, porém 40% dos casos são diagnosticados quando o câncer está instalado, sendo assim a sobrevida média estimada de 5 anos fica em torno de 55% em países desenvolvidos e 40% em países em

desenvolvimento (INCA, 2014). Através da detecção precoce pode-se prevenir a doença pela identificação e remoção de pólipos pré-cancerosos ou pela detecção de lesões malignas em estágios iniciais (Del Vecchio *et al.*, 2015).

O CCR é tradicionalmente dividido em casos hereditários (20%), onde há uma susceptibilidade genética, e esporádicos (80%), resultante de mutações somáticas (de la Chapelle, 2004). Os casos resultantes de predisposição genética compreendem as poliposes e não poliposes além de doenças colônicas inflamatórias hereditárias. As poliposes compreendem a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e a Polipose Hemartomatosa, que são caracterizadas pelo aparecimento de centenas de pólipos, os quais se não tratados, poderão evoluir para adenocarcinoma (de la Chapelle, 2004; Zhu & Li; 2008; Valle, 2014). O tipo não poliposo é representado pelo CCR hereditário não associado à polipose (HNPCC) ou Síndrome de Lynch caracterizada por alterações nos genes de reparo do DNA (Bonis *et al.*, 2007). Entre as doenças inflamatórias intestinais podemos citar a doença de Crohn e a colite ulcerativa, ambas envolvidas na etiologia do CCR (Pereira *et al.*, 2015).

Entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CCR, responsáveis em grande parte pelas diferenças geográficas de ocorrência dessa neoplasia, pode-se destacar: o sedentarismo, o tabagismo, o alcoolismo e um dos fatores mais notáveis: os hábitos alimentares inadequados (Khan *et al.*, 2010).

Estudos demonstram que a prática regular de atividade física pode prevenir o desenvolvimento do câncer por diversos mecanismos. O exercício pode alterar a iniciação do tumor por aumentar a atividade de enzimas seletivas para a detoxificação de carcinógenos além de reduzir danos oxidativos por aumentar a atividade de enzimas antioxidantes (Khan *et al.*, 2010). Além de alterar a etapa de iniciação, são descritos também mecanismos de ação sobre a promoção e progressão, com relatos de alteração de proliferação celular, apoptose, diferenciação, diminuição da inflamação e aumento da função imunológica (Demarzo *et al.*, 2008; Rogers *et al.*, 2008). No contexto da obesidade, o balanço positivo de energia gera estresse metabólico levando ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e hiperinsulinemia, sendo que a concentração elevada de IGF-1 circulante em mulheres obesas pode ser um preditor de proliferação celular (Sung *et al.*, 2011).

A prática do tabagismo pode estar relacionada com o aparecimento precoce do CCR em fumantes (Buc *et al.*, 2006). Em uma pesquisa de meta-análise com 36 estudos científicos foi examinada a associação entre tabagismo e CCR em termos de incidência e mortalidade, onde observou-se que os fumantes apresentavam risco significativamente maior para o desenvolvimento de CCR que os não fumantes (Liang *et al.*, 2009).

Outro fator de risco para o desenvolvimento do CCR é o alcoolismo, sendo os principais mecanismos o efeito genotóxico do acetaldeído, principal metabólito do etanol, produção de ROS e mudanças no metabolismo do folato (Boffetta & Hashibe, 2006).

Contudo, o fator de risco mais notável para o desenvolvimento do CCR é o padrão alimentar baseado no alto consumo de gorduras, carnes vermelhas, carnes processadas, carboidratos refinados e baixa ingestão de fibras, vegetais, frutas e verduras. O alto consumo de gorduras leva a uma maior liberação de ácidos biliares os quais podem ser convertidos em agentes carcinogênicos, enquanto que o consumo de fibras solúveis e insolúveis podem agir como protetoras, acelerando o trânsito intestinal, reduzindo o tempo de contato da mucosa com possíveis agentes mutagênicos (Khan *et al.*, 2010; Murphy *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2014). Além disso, alguns alimentos possuem compostos com capacidade de modular a microbiota intestinal de forma que há redução de bactérias produtoras de substâncias carcinogênicas e aumento de espécies não patogênicas produtoras de ácidos graxos de cadeia curta como o ácido butírico, um importante composto com propriedades apoptóticas, que pode atuar na diferenciação e parada do ciclo celular e até mesmo na regulação epigenética (Pool-Zobel *et al.*, 2005; Rajendran *et al.*, 2011). Todos esses fatores de riscos são modificáveis, portanto, mudanças no estilo de vida podem estar relacionados à menor incidência de CCR na população.

2. Carcinogênese: aspectos gerais

O desenvolvimento de uma neoplasia é um processo longo e em múltiplas etapas, nas quais modificações genéticas (mutações pontuais, amplificações e deleções gênicas) e epigenéticas (metilação do DNA e metilação e acetilação de histonas) são progressivamente acumuladas no genoma das células (Irigaray & Belpomme, 2010). O acúmulo de mutações em genes que regulam o crescimento, proliferação e diferenciação celulares, gerando instabilidade genômica, têm sido detectados no genoma de células neoplásicas (Schulte-Hermann *et al.*, 1999). Os genes alterados em neoplasias e diretamente envolvidos na transformação maligna são conhecidos como oncogenes e supressores tumorais (Rundle, 2006; Ushijima *et al.*, 2006). O resultado da expressão diferenciada desses genes é o crescimento descontrolado e anárquico de células neoplásicas que demonstram uma desorganização estrutural tecidual (displasia), alteração na comunicação célula-célula e célula-matriz extracelular e desbalanço entre proliferação celular e apoptose (Majno & Joris, 1996). As células neoplásicas também apresentam outras características malignas que lhes conferem uma maior capacidade adaptativa comparada às células normais. As principais são auto-suficiência a sinais de crescimento, insensibilidade a sinais anti-proliferativos, baixa diferenciação celular (anaplasia), capacidade de evasão da apoptose e da vigilância imunológica, potencial replicativo

ilimitado pela reposição de telômeros, angiogênese sustentada e capacidade invadir e colonizar tecidos distantes do hospedeiro (Kroemer & Pouyssegur, 2008; Majno & Joris, 1996).

A carcinogênese química é um complexo processo de alterações genéticas que pode ser dividido em três ou quatro etapas: iniciação, promoção, progressão e metástase (Dragan & Pitot, 1991). A iniciação é caracterizada pela exposição de células normais a uma dose mínima de um ou mais agentes cancerígenos, resultando em alterações na sequência de bases nitrogenadas do DNA dessas células. Essa interação resulta em alterações profundas nas moléculas-alvo que podem levar a célula à morte celular pela destruição drástica de proteínas e lipídeos, fabricação de proteínas anômalas ou a aquisição de mutações no material genético celular. Dessa forma as células-alvo normais se tornam células iniciadas (ou neoplásicas) apenas quando sobreviverem ao estímulo mutagênico em seu DNA e tais mutações não são reparadas (Schulte-Hermann *et al.*, 1999).

Estas mutações, não reparadas, acabam sendo fixadas no DNA após a fase “S” do ciclo celular, no qual ocorre duplicação de todo o material genético da célula. A partir desse momento, a célula encara a mutação como material genético intrínseco e transcreve a nova sequência como se fosse o DNA original da célula. Com o passar do tempo e ainda na presença do insulto mutagênico ou genotóxico, a célula acumula progressivamente numerosas mutações no seu genoma (Vincent & Gatenby, 2008).

Na segunda etapa do desenvolvimento neoplásico, a promoção, as células iniciadas sofrem um processo de expansão clonal, originando as lesões pré-neoplásicas. Nessa fase, a presença de agentes promotores é essencial para o desenvolvimento de lesões proliferativas, anaplásicas e displásicas. Os agentes promotores apresentam mecanismos de ação não genotóxicos (ou epigenéticos) como a ativação de proteínas-quinases envolvidas na fosforilação de substratos das vias de transdução de sinais de resposta a fatores de crescimento (Herman, 2005). A resposta aos agentes promotores é diferente nas células iniciadas e normais, resultando na expansão celular clonal seletiva das células iniciadas. A multiplicação seletiva dos clones de células iniciadas resulta no acúmulo progressivo de mais mutações e aumento na instabilidade genética que culminam com o desenvolvimento de células anaplásicas e malignas (Pitot, 1991, Vincent & Gatenby, 2008).

A progressão é caracterizada pela presença de numerosas células neoplásicas transformadas com elevado grau de anaplasia, desequilíbrio entre proliferação celular e apoptose. O agente cancerígeno promotor se torna dispensável nessa etapa da carcinogênese, pois as células que atingiram esse estágio de desenvolvimento tumoral são auto-suficientes a estímulos de crescimento e multiplicação celulares e resistentes à mecanismos de indução apoptótica intrínsecos de células normais. Com o acúmulo de novas mutações em genes específicos que controlam a capacidade invasiva das células, processo facilitado nessa etapa devido ao elevado número de mitoses, as

células neoplásicas adquirem o fenótipo maligno. O próximo passo das células malignas é a infiltração vascular e linfática e colonização de tecidos distantes do hospedeiro (focos secundários de tumores). Esse é o estágio terminal da carcinogênese, denominado de metástase (Pitot, 1991).

Para a carcinogênese colônica, dados clínicos e histopatológicos sugerem que a grande maioria dos carcinomas colorretais se originam de lesões benignas, os adenomas. Existe um modelo genético proposto por Fearon & Vogelstein para a o desenvolvimento do câncer de cólon que ficou conhecido como sequência adenoma-adenocarcinoma (Figura 2). O processo se inicia com uma mutação no gene APC, aproximadamente 80% dos pacientes com câncer de cólon e portadores de FAP apresentam mutação no APC (Fodde *et al.*, 2001, Jasperson & Burt, 2015). A proteína codificada por esse gene está envolvida na regulação da β -catenina, esta por sua vez é a mediadora central da via de sinalização Wnt capaz de controlar a transcrição de genes durante o desenvolvimento normal ou maligno. A via canônica de sinalização Wnt controla processos de proliferação celular, diferenciação e motilidade; na ausência de sinalização Wnt a β -catenina é mantida em baixos níveis, uma vez que é recrutada para a degradação por um complexo ubiquitina-proteossoma pela proteína APC (Jamieson *et al.*, 2012) Na presença da sinalização Wnt a β -catenina é estabilizada em forma hipofosforilada, sendo assim, não é degradada sendo translocada para o núcleo onde estimula fatores de transcrição de genes como da família LEF/ TCF responsáveis por regular ciclo celular, motilidade e diferenciação. A via Wnt/ β -catenina é ativada por perda de função por mutação do APC, na carcinogênese essa via está constantemente ativada (MacDonald *et al.*, 2009, Kim & Jim, 2013).

Posteriormente à mutação do APC ocorre a mutação do gene K-RAS, essa mutação bloqueia a ação de enzimas GTPase permitindo uma ativação descontrolada da cascata Ras o que resulta em inibição da apoptose e aumento da proliferação celular. Na sequência, a mutação do gene pró-apoptótico p53, marca o limite da transição adenoma-adenocarcinoma (Fearon & Vogelstein, 1990; Vogelstein *et al.*, 1998).

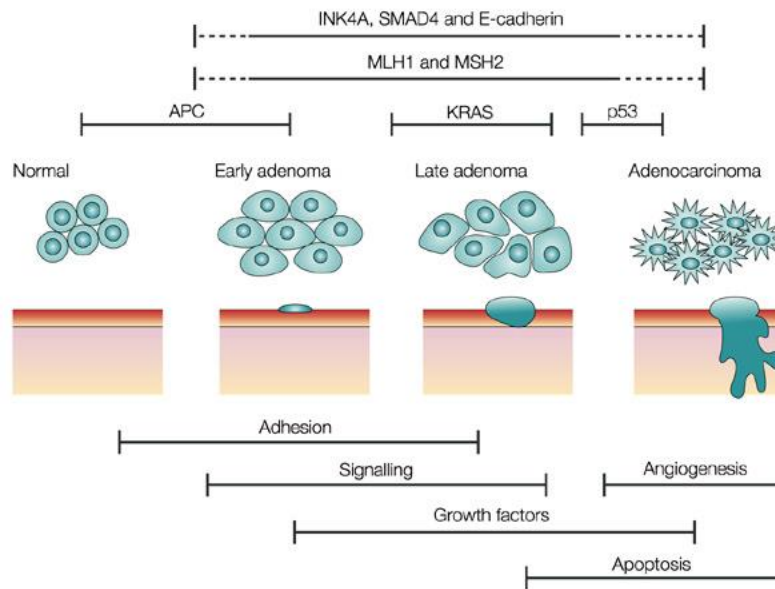


Figura 2 – Transição adenoma-adenocarcinoma. Sequência de mutações que caracterizam a transição do epitélio colônico normal para adenoma e adenocarcinoma invasivo. Perda da função do gene APC que codifica proteína envolvida na adesão e transcrição, encontrada em 85% dos casos de câncer colorretal (CCR). KRAS uma GTPase que controla proliferação é mutada em 50 a 60% dos casos de CCR, acompanhada da perda da expressão da glicoproteína de adesão E-caderina. Mutação nos genes de reparo MLH1 e MSH2 contribuem para instabilidade genética. SMAD4 envolvida no controle da proliferação e apoptose. Mutação na TP53 levam no aumento à resistência à apoptose. Fonte: Clinical development of gene therapy for colorectal cancer. Fonte: David Kerr. Nature Reviews Cancer 3, 615-622, 2003.

Os adenomas são pólipos com crescimento benigno que podem sofrer transformação maligna. São lesões definidas pela formação de neoplasia intraepitelial com células com núcleo hipercromático com vários graus de estratificação e perda de polaridade. Podem ser sésseis ou pedunculados e são classificados basicamente em tubulares, vilosos ou tubulovilosos. Enquanto, a definição de adenocarcinoma é dada aos tumores que tem a capacidade de invadir a camada muscular da mucosa. Os tumores que não tem essa capacidade são denominados adenocarcinomas *in situ*. Os adenocarcinomas podem ser classificados basicamente em tubulares, mucinosos e carcinoma com células em anel de sinete (Hamilton & Aaltonen, 2000).

2.1. Carcinogênese experimental de cólon

Existem alguns carcinógenos químicos bastante utilizados para induzir a carcinogênese de cólon em roedores. Eles podem ser diretos ou indiretos, os diretos não requerem catálise por ação de enzimas para formar espécies reativas. Já os indiretos, requerem ação enzimática para serem convertidos em espécies eletrofílicas que irão reagir com o DNA e formar adutos em bases específicas, o que irá conduzir uma célula normal à uma célula transformada (Tanaka, 2009).

A 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e seu metabólito o azoximetano (AOM) são os carcinógenos mais usados em estudos de carcinogênese colônica. Ambos são de ação indireta, e sua ativação se inicia por uma série de reações oxidativas que ocorrem no fígado via CYP 2E1 e seus metabólitos são transportados pelo sangue ou pela bile para o intestino grosso, o principal alvo de ação desse agente (Newell & Heddle, 2004, Tanaka, 2009). Os produtos do metabolismo desses compostos induzem a formação de adutos de grupos metil no DNA, mutações pontuais, separação aberrante de cromátides irmãs e induz apoptose no cólon, aumentando a proliferação de colonócitos. A DMH é usada como agente carcinogênico completo, pois induz as etapas de iniciação e promoção e possui alta especificidade para o cólon de várias espécies de roedores (Newell & Heddle, 2004).

As lesões iniciais que surgem no cólon dos roedores denominam-se focos de criptas aberrantes (FCA). Estas são consideradas lesões pré-neoplásicas e marcadores do câncer de cólon e utilizada como biomarcador em estudos experimentais de quimioprevenção (Corpet, 2005). Essas lesões são encontradas no cólon de roedores tratados com cancerígenos DMH/AOM e nos seres humanos acometidos pela polipose ou câncer de cólon (Raju, 2008). As criptas aberrantes (CA) foram primeiramente descritas por Bird em 1987 e podem ser identificadas na mucosa do cólon com uma abertura luminal alterada, mais espessas e maiores que as adjacentes, podem ser únicas ou formar focos (Tudek *et al.*, 1989). Estas são observadas, com maior frequência, no cólon médio e distal tanto em roedores como no homem e são consideradas precursoras da carcinogênese de cólon (Di Gregorio *et al.*, 1997; Bononi *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2002). Em ratos com predisposição ao CCR observa-se criptas displásicas com acúmulo de β -catenina, chamadas de BCAC, no entanto não é claro se esses focos são um subgrupo de FCA (Tanaka, 2009).

Os FCA apresentam índices de proliferação celular maiores que os da mucosa normal (Polyak *et al.*, 1996; Shpitz *et al.*, 1997). Além disso, foi também observado que os FCA apresentam mudanças no padrão de atividade enzimática, como redução das taxas da hexosaminidase (Barrow *et al.*, 1990; Pretlow *et al.*, 1990) e da produção de mucinas, com aumento de sialomucinas e perda de sulfomucinas, fenômeno geralmente associado ao grau de displasia e multiplicidade das criptas. Os FCA displásicos com redução na quantidade de mucinas são denominados MDF (Mucin-Depleted Foci) (Uchida, 1997; Femia, 2004; Yoshimi, 2004). Experimentalmente, essas lesões são quantificadas na mucosa colônica corada com azul de metileno em roedores expostos à carcinógenos, no entanto nem sempre existe uma boa correlação entre o desenvolvimento de FCA e o desenvolvimento de tumores em ratos (Tanaka, 2009).

Existem muitas similaridades entre os tumores colônicos em seres humanos e os induzidos pela DMH em roedores, entre elas a cinética da proliferação celular e a síntese de mucina mostram alterações análogas entre o câncer humano e o induzido quimicamente. Com o uso da DMH é

possível boa taxa de tumores em um período curto de latência, o que pode ser conseguido com uma dose única ou com uma série de doses semanais equivalentes (Newell & Heddle, 2004; Kamaleeswari *et al.*, 2006).

3. *Heme e carcinogênese de cólon*

Pesquisas recentes de meta-análises têm demonstrado a associação entre o alto consumo de carne vermelha, tanto fresca como processada e o CCR (Sandhu *et al.*, 2001; Norat *et al.*, 2002; Larsson & Wolk, 2006). Alguns mecanismos são explorados com relação ao risco de CCR e o consumo de carne vermelha, entre eles pode-se citar: 1) A produção de aminas heterocíclicas mutagênicas durante o cozimento a altas temperaturas. 2) Alta quantidade de gordura saturada. 3) Produção de compostos nitrosos (CN). 4) Grande quantidade de ferro heme disponível no lúmen (Sinha *et al.*, 1994, 1998, Santarelli *et al.*, 2008, Alexander *et al.*, 2009, Bastide *et al.*, 2015).

No entanto, já se sabe que as carnes brancas são as maiores responsáveis pela produção de aminas heterocíclicas, porém, não há relação entre o consumo de carne branca e a incidência de CCR (Sinha *et al.*, 1994). A relação entre consumo de gordura saturada e CCR, segundo alguns pesquisadores, também não está claramente estabelecida (Clinton *et al.*, 1992, Alexander *et al.*, 2009). Dessa forma, alguns pesquisadores sugerem que o principal fator responsável pela associação da ingestão de carne vermelha com CCR é a presença do ferro heme, abundante na carne vermelha (Santarelli *et al.*, 2008; Bastide *et al.*, 2011, 2015).

O heme constitui 95% do ferro funcional no organismo humano bem como dois terços da ingestão média de uma pessoa em países desenvolvidos. O ferro é essencial para a vida dos organismos e serve como cofator para diversos processos biológicos como metabolismo energético, respiração celular, transporte de oxigênio, síntese de DNA e crescimento celular (Papanikolaou & Pantopoulos, 2005). Sendo assim, alguns estudos têm examinado a associação da ingestão de heme, com riscos de doenças comuns como CCR, câncer de pâncreas, câncer de pulmão, diabetes tipo 2 e doenças cardíacas. Por outro lado, é importante notar que a deficiência de heme pode causar doenças como anemias e doença de Alzheimer (Bastide *et al.*, 2011; Hooda *et al.*, 2014).

O ferro heme é formado por um grupo prostético composto de protoporfirina IX e um Fe (II) (Figura 3). O anel tetrapirrólico de porfirina é sintetizado a partir do precursor do ácido 5-aminolevulínico (ALA) por uma série de reações no citoplasma e nas mitocôndrias (Papanikolaou & Pantopoulos, 2005). O heme está inserido nas hemoproteínas, hemoglobina, mioglobina e em citocromos. A elevada concentração de mioglobina é responsável pela coloração vermelha da carne; na carne vermelha processada o ferro heme é nitrosilado devido à presença de nitritos e nitratos (Bastide *et al.*, 2011).

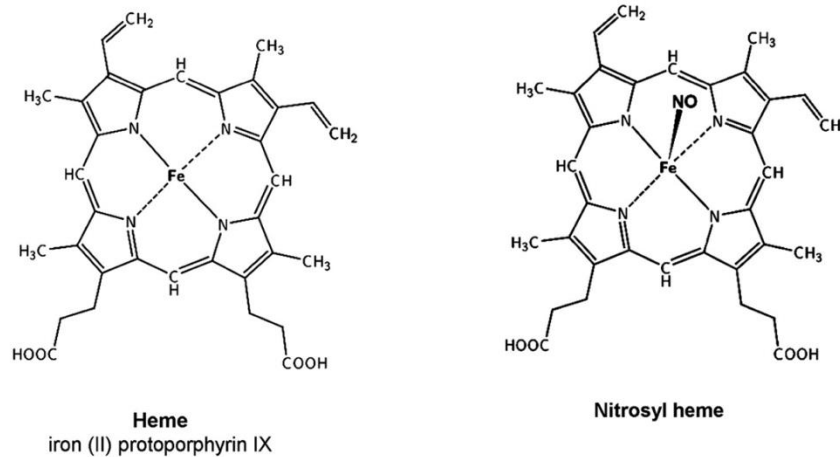


Figura 3- Estrutura molecular do ferro heme, presente na carnes frescas e nitrosil heme presente nas carnes processadas. Fonte: Bastide *et al.*, Cancer Prev Res,4(2):177-84. 2011.

O heme é liberado devido ao baixo pH e pela ação de enzimas proteolíticas presentes no estômago. Como demonstrado na Figura 4, o heme pode ser absorvido de diferentes maneiras pelo enterócito. A absorção pelos enterócitos pode ser facilitada pelo sistema de transporte vesicular através da proteína carreadora de heme HRG-1 ou ainda ser importado diretamente através da proteína carreadora de heme HCP1. Tanto o heme importado diretamente como o heme no interior das vesículas poderão ser metabolizados pela heme oxigenase (HO-1) presente no retículo endoplasmático, essa enzima é responsável pela liberação do Fe^{2+} do anel porfirínico. O Fe^{2+} é transportado para o citoplasma pelo transportador de metal divalente (DMT1) o qual junta-se ao conjunto de ferro no citoplasma. O Fe^{2+} é liberado na corrente sanguínea pelos enterócitos através da ferroportina presente na membrana basolateral. Uma parte do heme intacto pode ser transportado diretamente para a corrente sanguínea através do transportador de heme FLVCR1 presente na membrana basolateral. O transportador de heme FLVCR1 também é responsável em transportar o heme em excesso para fora da célula a fim de evitar citotoxicidade (Hooda *et al.*, 2014).

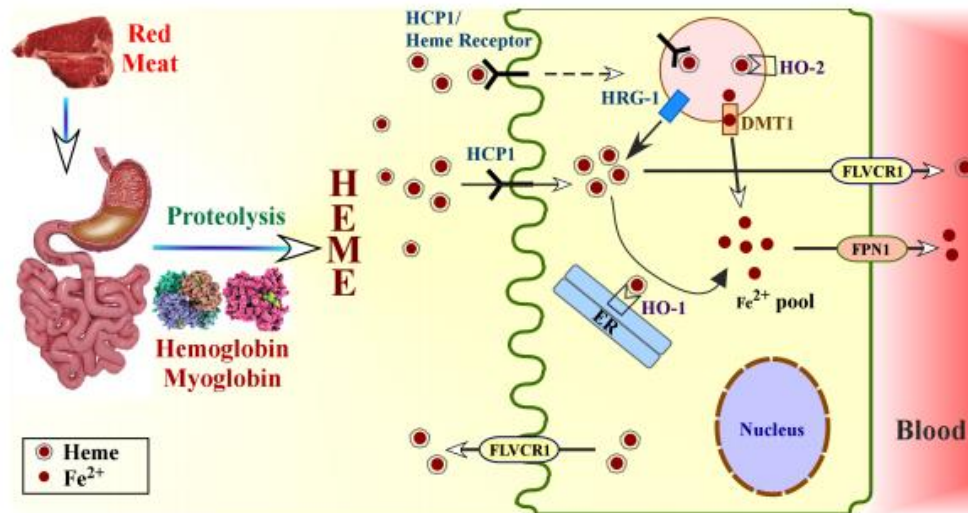


Figura 4 – Absorção intestinal do ferro heme. O heme é liberado da hemoglobina e mioglobina pela ação de proteases do estômago e intestino. A absorção do heme pelos enterócitos pode ser facilitada pelo sistema de transporte vesicular ou pelo transportador de heme. Além disso ele pode ser diretamente importado para os enterócitos pelo HCP1. Ele é transportado do citoplasma das vesículas possivelmente pelo HRG-1 e em seguida, é metabolizado por HO-1 presente no retículo endoplasmático. Alternativamente, o heme no interior das vesículas pode ser metabolizado pela ação de HO-2 presente na membrana da vesícula, e o ferro (Fe^{2+}) é transportado para o citoplasma por transportador de metal DMT1 para juntar o conjunto de ferro no citoplasma. O Ferro é liberado na corrente sanguínea através da ferroportina presente na membrana basolateral. Uma fração do heme intacto pode ser absorvido diretamente para a corrente sanguínea através do transportador FLVCR1. FLVCR1 pode exportar o heme em excesso para dentro do lúmen para evitar toxicidade. HCP1, proteína transportadora de heme 1; HRG-1, heme gene responsivo-1; FLVCR1, receptor da superfície celular para o vírus da leucemia felina, subgrupo C; HO-1/2, heme oxigenase-1/2; DMT1, transportador de metal divalente; FPN1, ferroportina-1; ER, retículo endoplasmático. Fonte: Hooda *et al.*, *Nutrients*, 13;6(3):1080-102, 2014.

Desta forma, o heme não absorvido e o liberado pela descamação do epitélio reage no lúmen. Estudos demonstram que o heme irrita o epitélio resultando em aumento na proliferação celular dos colonócitos (Sesink *et al.*, 1999, 2000; Oates & West, 2006).

A Figura 5 ilustra os principais mecanismos que suportam a hipótese de associação do heme livre no lúmen com o risco de CCR que são basicamente: catalisar a formação de compostos nitrosos e a peroxidação lipídica resultando em produtos genotóxicos e citotóxicos no lúmen (Sesink *et al.*, 1999; Santarelli *et al.*, 2008; Bastide *et al.*, 2011).

O heme pode catalisar a formação de compostos nitrosos que são produzidos pela reação de nitrito e óxidos de nitrogênio com aminas secundárias e N-alquilamidas, resultando na formação de agentes alquilantes que podem reagir com DNA (Santarelli *et al.*, 2009). A produção de compostos nitrosos pode aumentar significativamente na presença do heme, sendo assim é comum a adição de ácido ascórbico na carne processada como um aditivo antioxidante a fim de diminuir a ação desse composto no lúmen intestinal (Cross *et al.*, 2003; Cross & Sinha, 2004).

Outra importante reação catalisada pelo heme no intestino é a peroxidação lipídica. Os resíduos de ácidos graxos poli-insaturados de fosfolípidios são extremamente sensíveis aos processos de oxidação. A peroxidação lipídica é iniciada pelo ataque de um radical livre aos lipídeos da membrana ou provenientes da dieta, essa reação é catalisada pelo heme através da seguinte reação: $\text{LOOH (lipídeo hidroperóxido)} + \text{Fe heme} = \text{LOOFe} = \text{LO} + \text{OFe}$. Os produtos iniciais são lipídeos hidroperóxidos que são rapidamente reduzidos pela glutatona peroxidase e reagem com metais para produzir uma variedade de compostos reativos como epóxidos e aldeídos. Os principais aldeídos produtos da peroxidação lipídica são os malondialdeídos (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Marnett, 2000, Bastide *et al.*, 2011).

O MDA induz dano de DNA e é mutagênico em cultura de células humanas, esse aldeído é capaz reagir com o DNA e formar adutos como malondialdeído-deoxiguanosina já encontrado em biópsias de CCR humano (Leuratti *et al.*, 2002, Niedernhofer *et al.*, 2003). Em contraste com o MDA, o 4-HNE é fracamente mutagênico, no entanto, parece ser o principal produto tóxico da água fecal resultante da peroxidação lipídica e que pode induzir apoptose e necrose em células de carcinoma humano pela ativação da caspase-3 (Awasthi *et al.*, 2003).

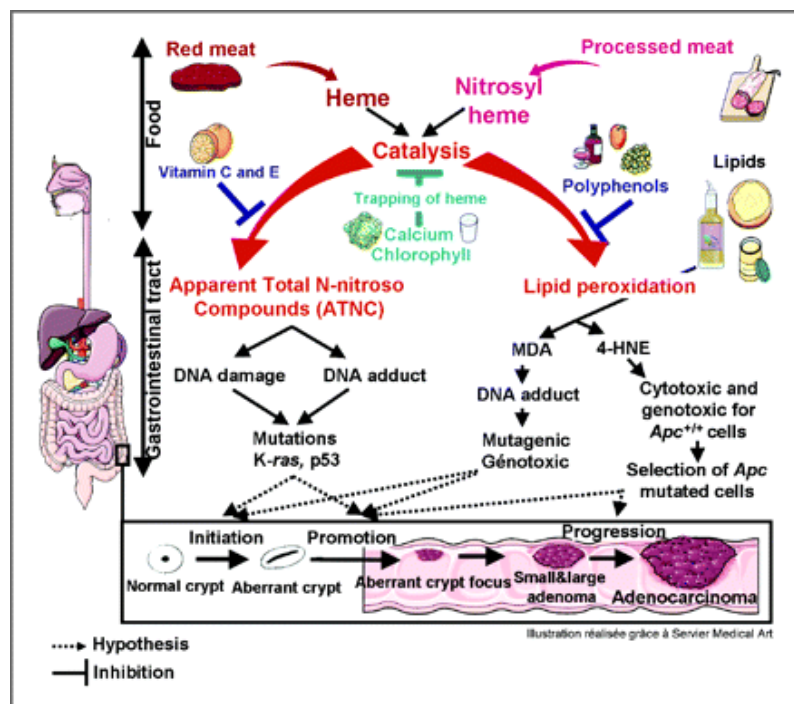


Figura 5- Principais mecanismos de ação do heme sobre a carcinogênese colorretal. O heme catalisa a formação de ATNC e produtos finais da peroxidação lipídica. Os efeitos catalíticos do heme podem ser inibidos pelo cálcio e clorofila, a formação endógena de ATNC é inibida por vitaminas C e E, e os polifenóis podem inibir a peroxidação lipídica. Fonte: Bastide *et al.*, *Cancer Prev Res*,4(2):177-84. 2011.

A associação entre ingestão de heme e CCR tem sido amplamente explorada em diferentes condições e modelos experimentais. Sesink e colaboradores observaram que dieta suplementada com heme por 14 dias foi responsável por aumentar a peroxidação lipídica, citotoxicidade da água fecal e proliferação epitelial por 70% em ratos (Sesink *et al.*, 1999). Pierre *et al.*, 2003 também mostraram que dieta com baixo teor de cálcio e suplementada com heme e hemoglobina foi capaz de aumentar o número de FCA em ratos. De acordo com Ijssennagger *et al.*, 2013 heme na ração associada à dieta ocidental por 14 dias foi capaz de causar hiperproliferação nas células da mucosa colônica de camundongos C57Bl6/J. De Vogel *et al.*, 2005, em estudo com ratos Wistar, alimentados com dieta com baixo teor de cálcio e suplementada com heme na ração por 14 dias, observaram aumento de citotoxicidade e hiperproliferação dos colonócitos.

Em conclusão, o heme catalisa a formação de compostos genotóxicos e mutagênicos, o que pode suportar a hipótese de associação do consumo de carne vermelha e CCR. No entanto, os efeitos pró-carcinógenos do heme podem ser inibidos por alguns compostos, os sais de cálcio e a clorofila podem precipitar moléculas de heme e inibir o efeito citotóxico e hiperproliferativo do heme no epitélio colônico de rato (de Voge *et al.*, 2000; Sesink *et al.*, 2001, Pierre *et al.*, 2003, Balder *et al.*, 2006, Pierre *et al.*, 2008). Além disso, a formação endógena de compostos nitrosos é inibida pelas vitaminas C e E e a lipoperoxidação é inibida por polifenóis como a quercetina, α -tocoferol, ou polifenóis presentes no vinho tinto (Ross & Kasum, 2002, Vulcain *et al.*, 2005, Gorelik *et al.*, 2008).

4. Quimioprevenção do câncer: aspectos gerais

A quimioprevenção do câncer é definida como a utilização de compostos químicos específicos, naturais ou sintéticos com finalidade de prevenir, retardar ou reverter o processo de desenvolvimento de neoplasias. A atividade quimiopreventiva ou quimioprotetora já foi identificada para vários compostos sintéticos e naturais, como extrato de plantas medicinais e compostos químicos sintéticos (Wattemberg, 1996; Kelloff, 2000, Namasivayam, 2011).

O maior desafio da quimioprevenção é justamente identificar e isolar os principais agentes químicos antitumorais presentes nos extratos de plantas medicinais, vegetais, e frutas, bem como, entender os mecanismos de ação envolvidos no processo. As substâncias químicas anticarcinogênicas mais conhecidas apresentam propriedades antioxidantes, antimutagênicas, estimuladoras da resposta imunológica antitumoral, estimuladoras do sistema de detoxificação de drogas, bloqueadoras da divisão celular e/ou antiangiogênicas (Tsuda *et al.*, 2004, Pan & Ho, 2008).

Atualmente, mais de 20 classes diferentes de substâncias e compostos químicos já foram identificadas como agentes quimiopreventivos. Estes compostos químicos foram classificados como bloqueadores ou supressores de acordo com o estágio da carcinogênese em que atuam (Wattenberg, 1992, Tsuda *et al.*, 2004).

Os compostos quimiopreventivos enquadrados no grupo dos agentes bloqueadores são capazes de inibir a etapa de iniciação da carcinogênese química por impedirem o dano genotóxico causado pela interação dos carcinógenos com seus alvos celulares, principalmente o DNA. Eles ainda podem ser classificados, de acordo com seu mecanismo de ação antineoplásico, em três categorias: 1) agentes bloqueadores que inibem a ativação metabólica do carcinógeno; 2) agentes bloqueadores que aumentam a atividade de enzimas detoxificadoras; 3) agentes bloqueadores que capturam as formas reativas de cancerígenos (Wattenberg, 1993, Pan & Ho, 2008).

Além dos agentes bloqueadores que inibem a iniciação da carcinogênese, existem outras classes de substâncias quimiopreventivas que tem a capacidade de modular os estágios subsequentes à etapa de iniciação da carcinogênese. Essas moléculas quimiopreventivas, denominadas agentes supressores tumorais, atuam prevenindo a evolução clonal das células transformadas durante as fases de promoção e progressão da carcinogênese (Manson *et al.*, 2000; Wattenberg, 1993; Greenwald, 2001). Os supressores tumorais são diferenciados dos agentes bloqueadores por serem efetivos quando administrados após a exposição celular ao carcinógeno nos modelos de carcinogênese química experimental. Os agentes supressores tumorais atuam exatamente na etapa de promoção da carcinogênese. Essas moléculas são capazes de reverter ou prevenir os eventos de promoção ou atuar em vias específicas da evolução neoplásica. Os mecanismos de ação dos agentes supressores não são tão bem definidos como os dos agentes bloqueadores. Basicamente, os agentes supressores atuam de duas maneiras principais: 1) induzindo a diferenciação celular nos tecidos, inclusive nas células transformadas; ou 2) neutralizando o acúmulo de eventos genotóxicos nas células transformadas e a sua consequência como a ativação de oncogenes e inativação do gene P53, o “guardião do genoma” (Wattenberg, 1993).

5. *Indol-3-carbinol e simbióticos: aspectos gerais e potencial quimiopreventivo*

O indol-3-carbinol (I3C) é um composto derivado do glucosinolato encontrado naturalmente em uma série de plantas da família *Brassicaceae* particularmente do gênero *Brassica* que abrange uma série de plantas bastante comuns na alimentação humana como couve, repolho, couve-flor, brócolis, couve-de-bruxelas entre outras. O I3C é formado a partir da hidrólise do glucosinolato quando este é esmagado ou cozido (Aggarwal & Ichikawa, 2005).

Após a ingestão, em ambiente ácido do estômago, o I3C é convertido em compostos poliméricos que são as formas biologicamente ativas desse composto, sendo a principal delas o 3,3'-diindolimetano (DIM), como demonstrado na Figura 6 (Rogan, 2006). Esses compostos são absorvidos no intestino delgado e distribuídos pelos tecidos sendo possível a detecção no plasma até 8 horas após a administração de 400 mg de I3C em humanos voluntários (Arneson *et al.*, 1999).

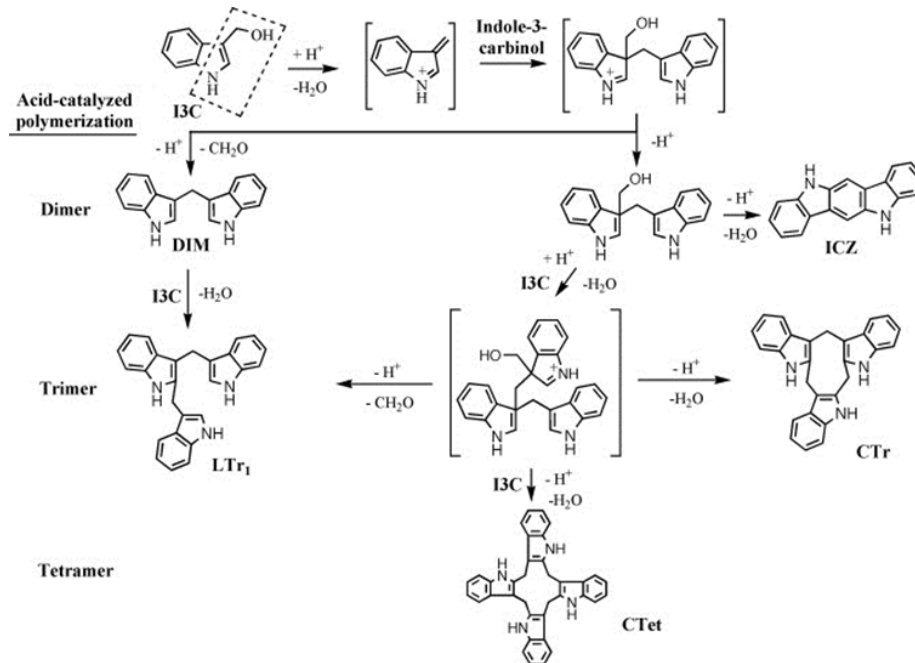


Figura 6 – Transformação metabólica do indol 3-carbinol. Fonte: Weng *et al.*, Cancer Lett. 18;262(2):153-63, 2008.

O I3C tem um grande número de mecanismos de ação associados com a quimioprevenção do câncer como demonstrado na Figura 7, entre eles, atividades antiproliferativas, pró-apoptóticas, indutoras de enzimas de detoxificação, anti-angiogênicas e antimetastáticas (Aggarwal & Shishodia, 2006).

Alguns metabólitos do I3C tem atividade anti-estrogênica, competem pelo receptor de estrógeno. O estrógeno é um hormônio que modula o crescimento e diferenciação dos tecidos em condições normais, em tecidos tumorais esse hormônio estimula a proliferação celular, promovendo crescimento tumoral. Esses metabólitos podem reduzir a ação do estrógeno sobre essas células tumorais agindo como supressores em tecidos estimulados por estrógenos como, por exemplo, o tecido mamário (Riby *et al.*, 2000).

Outro mecanismo de ação do I3C é na indução de enzimas de detoxificação de carcinógenos. São enzimas de fase I do citocromo P450, a CYP 1 e a CYP2B e as de fase II, glutathione-S-transferase (GSTs) que são os dois principais grupos de enzimas capazes de realizar a biotransformação de agentes com potencial genotóxico (Pool-Zobel *et al.*, 2005). Estudo com ratas Sprague-Dawley demonstrou que a administração de 250mg/kg de peso corpóreo de I3C por via

oral foi capaz de induzir a expressão dos genes CYP1A1, CYP1B1 and CYP2B1/2 no fígado e CYP1A1 na glândula mamária. Por isso, a atividade anticarcinogênica do I3C se dá pelo aumento do metabolismo e inativação de carcinógenos químicos e ainda redução da quantidade de carcinógenos que se ligam ao DNA prevenindo a formação de adutos (Horn *et al.*, 2002). Além disso, já se sabe que o I3C pode agir sobre fatores de transcrição como o ER, Sp1 e NF- κ B em diversas vias, agindo tanto de forma direta como indireta. Isso pode resultar na modulação da expressão de genes envolvidos no metabolismo de carcinógenos, reparo de DNA, progressão do ciclo celular e apoptose (Kim & Milner, 2005). Um dos maiores efeitos do I3C é bloquear a progressão do ciclo celular como visto em células de câncer de mama, próstata e queratinócitos, mediante a modulação da ciclina dependente de quinases (CDKs) além de alterar a expressão do fator de transcrição Sp1, ambos os genes críticos na progressão do ciclo celular (Cover *et al.*, 1998, Chinni *et al.*, 2001, Cram *et al.*, 2001, Matsuzaki *et al.*, 2004).

Segundo Plate & Gallaher, o I3C pode ser um inibidor da carcinogênese no cólon por reduzir a incidência de FCAs e aumentar a expressão de enzimas de detoxificação de carcinógenos em ratos Wistar alimentados com 1,36 mmols/kg administrados duas semanas antes e 10 semanas após a administração do carcinógeno (Plate & Gallaher, 2006). Xu *et al.*, 1996 também demonstraram redução de FCAs em estudo com ratos F344 após ingestão de 0,1% de I3C na dieta durante 8 semanas .

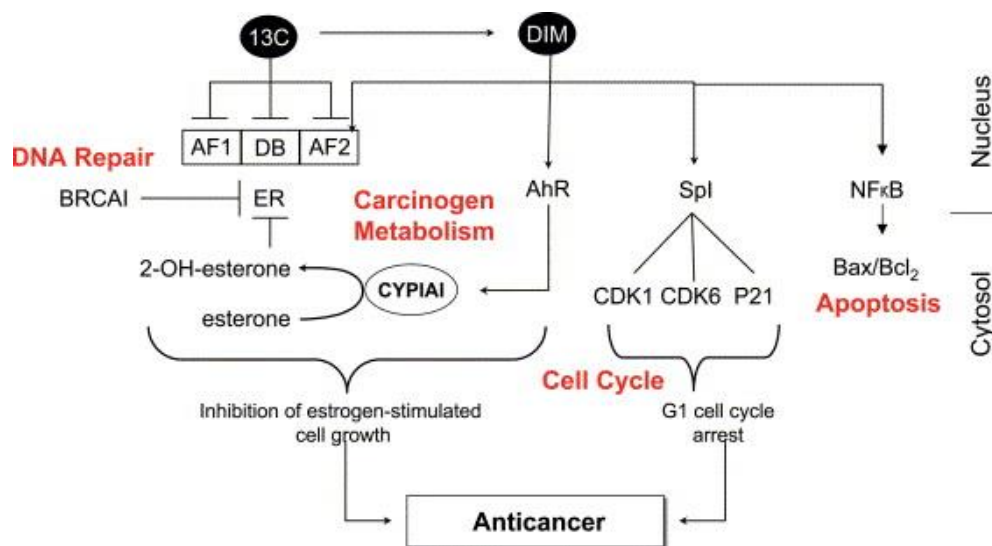


Figura 7- Possíveis vias pelos quais I3C / DIM exerce efeitos anticarcinogênicos . I3C / DIM estão envolvidos em vias de progressão do ciclo celular, apoptose , metabolismo carcinogênico e reparo do DNA, além de agir sobre fatores de transcrição. Fonte: Kim & Milner / Journal of Nutritional Biochemistry 16 , 65–73, 2005.

No entanto alguns estudos demonstram efeito promotor do I3C sobre a carcinogênese química. Observou-se aumento de incidência e multiplicidade adenocarcinomas e de lesões hiperplásicas uterinas induzidas quimicamente em ratas alimentadas com dieta contendo 50 ou 200 ppm de I3C. Pence *et al.*, 1986 estudaram a ação sinérgica do I3C com ácido cólico e sebo bovino sobre a carcinogênese de cólon induzida pelo DMH em ratos F344 e concluíram que o I3C é um importante fator para o desenvolvimento tumoral (Pence *et al.*, 1986). Suziu *et al.*, 2005 observaram aumento da multiplicidade e volume de tumores colônicos induzidos pelo AOM em ratos F344 alimentados com 0,01 e 0,05% de I3C na dieta (Suziu *et al.*, 2005). Dessa forma o I3C é um composto que precisa ser mais estudado em diferentes modelos e protocolos experimentais a fim de elucidar seu em diversos órgãos.

Outro composto que apresenta efeitos promissores na quimioprevenção da carcinogênese do cólon são os simbióticos, formados pela associação de prebióticos e probióticos. São agentes capazes de levar à alteração de atividades metabólicas da microflora intestinal, produção de ácidos graxos de cadeia curta e elevação da resposta imune entre outros mecanismos (Fotiadis *et al.*, 2008).

Segundo Gibson & Roberfroid, prebióticos são substâncias não digeríveis que quando consumidas conferem um efeito fisiológico benéfico ao hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento ou a atividade de um número limitado de bactérias autóctones do intestino grosso (Gibson & Roberfroid, 1995). Os prebióticos são os oligossacarídeos não-digeríveis, no entanto, é comum se classificar como prebióticos carboidratos como alguns tipos de fibras e amidos resistentes. Os prebióticos mais conhecidos são os frutooligossacarídeos (FOS), a oligofrutose e a inulina e são encontrados em alimentos como chicória, yacon, cebola, banana entre outros (Kelly, 2008, Vyas & Ranganathan, 2012).

Já os probióticos, são microrganismos vivos que quando ingeridos melhoram a saúde do hospedeiro por promover o balanço da microflora intestinal, sendo os mais utilizados o *Bifidobacterium sp* e os *Lactobacilus sp*. Um probiótico deve ser não-patogênico e resistir ao baixo pH no estômago e à ação dos sais biliares (de Vrese & Schrezenmeir, 2008, Hardy *et al.*, 2013).

Combinações de prebióticos e probióticos podem resultar em efeito aditivo ou sinérgico sobre a função gastrointestinal, o termo simbiótico foi proposto para a mistura de prebióticos e probióticos que afetam benéficamente o hospedeiro. A associação simbiótica favorece a implantação e sobrevivência dos organismos vivos no trato gastrointestinal, quando comparado com a administração de forma isolada (Fotiadis *et al.*, 2008).

Como demonstrado na Figura 8, os prebióticos resistem à digestão enzimática no trato gastrointestinal e chegam até o cólon intactos. No cólon eles passam pela fermentação bacteriana a

qual libera como produtos o dióxido de carbono e hidrogênio, lactato e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como acetato, propionato e butirato (de Vrese & Schrezenmeir, 2008, Fotiadis *et al.*, 2008, De Preter *et al.*, 2011). Os AGCC por sua vez são responsáveis por abaixar o pH do lúmen intestinal além agir mais diretamente a nível celular, como discutido mais adiante. Além disso, ocorre aumento no número de bactérias probióticas, principalmente *Bifidobacterium sp* e *Lactobacilos sp* em detrimento às bactérias patogênicas, isso ocorre devido à maior oferta de substratos para fermentação (prebióticos) e ao ambiente acidificado proporcionado pela produção de AGCC (Gibson *et al.*, 2005, De Preter *et al.*, 2011). A capacidade de fermentação seletiva por *Bifidobacterium sp* e *Lactobacilos sp* difere os prebióticos das demais fibras alimentares (Tuohy *et al.*, 2007).

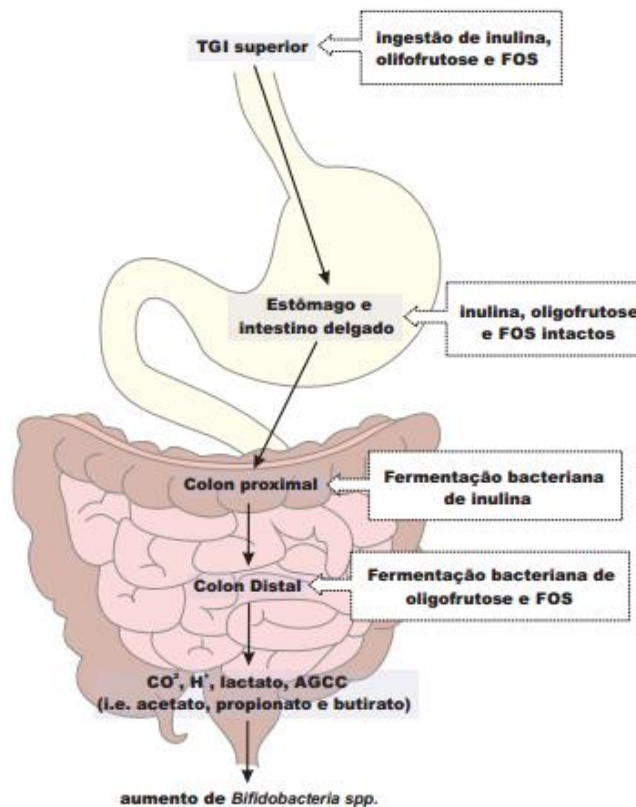


Figura 8 – Digestão de prebióticos através do trato gastrointestinal (TGI). Os prebióticos chegam intactos no intestino onde sofrem fermentação bacteriana. O produtos dessa fermentação são: dióxido de carbono e hidrogênio, lactato e ácidos graxos de cadeia curta, AGCC (acetato, propionato e butirato). FOS – Frutooligossacarídeos. Fonte: Arquivo pessoal.

Como mencionado anteriormente alguns pesquisadores demonstram que a associação de prebióticos com probióticos tem efeitos aditivos ou sinérgicos. A combinação de inulina e *B. Longum* foi mais efetiva na redução de FCA induzida pelo AOM quando comparada com o tratamento com estes compostos de forma isolada (Rowland *et al.*, 1998, Vyas & Ranganathan,

2012). No entanto há uma gama de estudos com esses compostos de forma isolada que demonstram seus efeitos benéficos para a saúde do trato gastrointestinal, assim pode-se dizer que esses estão interligados uma vez que o consumo de prebióticos favorece o crescimento de probióticos.

O consumo de prebióticos faz com que haja uma diminuição do tempo de trânsito intestinal, conseqüentemente há uma redução do tempo de contato de agentes genotóxicos com a mucosa colônica prevenindo possíveis danos ao DNA dos colonócitos (Pool-Zobel *et al.*, 2005, 2007). Esse efeito foi verificado em indivíduos sadios após consumo de 6,4g de FOS por 2 semanas através da ingestão de xarope de yacon, uma raiz com grande quantidade de FOS (Geyer *et al.*, 2008). Além disso, o baixo pH do meio colônico inibe o crescimento de bactérias patogênicas produtoras de amônias e aminas tóxicas, assim pode-se dizer que há uma colonização por bactérias probióticas principalmente do gênero *Bifidobacterium* (Cuummings *et al.*, 2001).

Gibson *et al.*, demonstraram o efeito bifidogênico (capacidade de estimular o crescimento de *Bifidobacterium* no cólon) em estudo com humanos sadios. O estudo mostrou que 15g por dia de FOS por 15 dias é capaz de modificar a composição da microbiota, o número total de *Bifidobacterium* excretado em 24 horas aumentou de cinco a oito vezes após o consumo de oligofrutose e inulina, respectivamente (Gibson *et al.*, 1995).

As bactérias do gênero *Bifidobacterium sp* produzem vitaminas do complexo B além de estimularem o ataque à células malignas agindo como imunomoduladoras, já os *Lactobacilus sp*, são capazes de modular a produção de citocinas inflamatórias. A administração de *Lactobacilus casei shirota* em roedores induziu a produção de diversas citocinas como IFN- γ , IL-1 β and TNF- α , resultando em inibição do crescimento tumoral e aumento da sobrevivência dos animais. Além disso, a administração oral da mesma cepa de probióticos foi capaz de inibir o crescimento de tumores transplantados em roedores (Matsuzaki, 1998).

Outro mecanismo potencial de prevenção pelos probióticos é a capacidade de aumentar a atividade de enzimas de detoxificação de carcinógenos como as do citocromo P450 e glutathiona S-transferase (GSTs). Em estudo *in vivo* foi avaliada a capacidade de algumas espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacilus* em realizar a inativação de carcinógenos. Observou-se aumento nos níveis de NADPH-citocromo P450 redutase nas células do fígado e do cólon de ratos Sprague-Dawley após o consumo de *L. Acidophilus* (Pool-Zobel *et al.*, 1996).

A produção de AGCC é um mecanismo chave dos efeitos conferidos pela ingestão de prebióticos e probióticos isolados ou em associação simbiótica. Em testes *in vitro*, observou-se que o butirato é capaz de inibir proliferação celular e promover apoptose e em modelos animais já se observou redução de FCA e de tumores colônicos (Wong *et al.*, 2005, Pool-Zobel *et al.*, 2005).

Estudos demonstraram que população com baixa incidência de pólipos ou mesmo CCR (i.e., nativos africanos) tinham altas concentrações de AGCC (Ou *et al.*, 2012, 2013). Em estudo *in vitro* foi investigada a capacidade antimutagênica dos AGCC sobre a ação de oito mutágenos, onde se observou que o ácido butírico foi capaz de inibir a ação deletéria de todos os mutágenos testados (Lankaputhra & Shah, 1998). O butirato tem a capacidade de estimular a produção de glutathione S-transferase (GSTs), enzima envolvida na detoxificação de compostos que podem causar dano oxidativo no DNA (Challa *et al.*, 1997, Lo *et al.*, 2002). Experimento *in vitro* demonstrou que o tratamento com butirato resultou em aumento na expressão e atividade das GSTs, o que levou a redução de genotoxicidade induzida pelo 4-hydroxy-2-nonenal em células HT 29, linhagem de células de câncer de cólon humano (Ebert *et al.*, 2001). A indução de GSTs pode ser o mecanismo chave para entender o efeito antimutagênico do butirato o que evidencia o efeito quimiopreventivo dos prebióticos/ probióticos ou simbióticos no CCR. Como demonstrado por Challa *et al.*, a administração de *Bifidobacterium longum* and lactulose inibiu a formação de FCA induzidas pelo AOM (Challa *et al.*, 1997).

O butirato pode ainda agir a nível de controle epigenético como inibidor da histona desacetilase (HDAC). Alterações epigenéticas podem ser críticas para o desenvolvimento do câncer, como as mudanças na atividade das HDACs (Chi & Wang, 2010). As caudas das histonas são carregadas positivamente o que facilita ligação com grupos fosfatos do DNA, carregados negativamente. A acetilação de histonas ocorre normalmente no DNA das células, ela neutraliza as cargas positivas na histona o que diminui a capacidade de ligar-se ao DNA, fazendo com que ocorra normalmente a transcrição gênica. A HDAC remove grupos acetil aumentando as cargas positivas da cauda da histona o que promove uma ligação de alta afinidade com o DNA, esse processo condensa a estrutura do DNA (cromatina) prevenindo a transcrição gênica, se isso ocorre em genes controladores do ciclo celular pode contribuir para a carcinogênese (Rajendran *et al.*, 2011). As HDACs são superexpressas no CCR e o silenciamento delas tem sido associado às vias moleculares de regulação do ciclo celular, proliferação e apoptose (Wilson *et al.*, 2008). Os inibidores de HDAC são clinicamente avaliados como agentes anticâncer (Ma & Diasio, 2009).

A grande maioria dos estudos de quimioprevenção do câncer geralmente investiga os efeitos dos compostos isoladamente, no entanto a alimentação humana é variada, pode-se dizer que há uma mistura de compostos agindo conjuntamente. Não se sabe se os efeitos são potencializados, se há um sinergismo, ou se os mesmos são inibidos. Dessa forma são necessários estudos que avaliem a atividade conjunta de agentes quimiopreventivos a fim de investigar se os efeitos se comportam da mesma maneira.

6. *Justificativas e hipótese do trabalho científico*

Poucos estudos de carcinogênese química de cólon em roedores trabalham com a interação de compostos biológicos/químicos indutores e/ou inibidores nas etapas de iniciação ou promoção tumoral. As associações de compostos biológicos/químicos podem levar a efeitos nulos, aditivos, sinérgicos ou antagônicos quando comparado com as administrações individualizadas. Assim, o desafio desta proposta de tese de doutorado foi a de avaliar efeitos de interações de compostos clássicos como o heme, I3C e uma associação simbiótica na etapa de promoção da carcinogênese de cólon iniciada pela DMH em ratos Wistar.

7. *Referências*

- Aggarwal BB1, Ichikawa H. Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. *Cell Cycle*, 4(9):1201-15, 2005.
- Aggarwal BB1, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol.* 14;71(10):1397-421. 2006.
- Alexander DD, Cushing CA, Lowe KA, Scurman B, Roberts MA. Meta-analysis of animal fat or animal protein intake and colorectal cancer. *Am J Clin Nutr.*, 89:1402–9, 2009
- Arneson DW, Hurwitz A, McMahon LM and Robaugh D: Presence of 3,3'-diindolylmethane in human plasma after oral administration of indole-3-carbinol. *Proc Am Assoc Cancer Res.*, 40: 429, 1999.
- Awasthi YC, Sharma R, Cheng JZ, Yang Y, Sharma A, Singhal SS, et al. Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. *Mol Aspects Med.*, 24:219–30, 2003.
- Baird, W.M., Hooven, L.A., Mahadevan, B. Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-DNA Adducts and Mechanism of Action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45:106-14, 2005.
- Balder HF, Vogel J, Jansen MC, Weijenberg MP, Van den Brandt PA, Westenbrink S, et al. Heme and chlorophyll intake and risk of colorectal cancer in the Netherlands cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 15(4):717-25, 2006.
- Barrow, BJ, O'riordan, MA, Stellato, TA, Calkins, BM, Pretlow, TP, Enzyme-altered foci in colons of carcinogen-treated rats. *Cancer Res.*, 50: 1911-6, 1990.
- Bastide NM, Pierre FH, Corpet DE. Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prev Res.*, 4(2):177-84, 2011.
- Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med.*, 21(6):167-223. 2000.

- Bird, RP, Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogenesis: preliminary findings. *Cancer Pathogenesis Lett.*, 37: 147-51, 1987.
- Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.*, 7(2):149-56, 2006.
- Bonis PA, Trikalinos TA, Chung M, Chew P, Ip S, DeVine DA, Lau J. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: diagnostic strategies and their implications. *Evid Rep Technol.*, 150:1-180, 2007.
- Bononi, AP, Caetano, CS, Rocha, NS, Oliveira, SV, Salvadori, DMF, Camargo, JLV, Lesões da bexiga e do cólon de ratos Wistar submetidos à carcinogênese química de duas etapas, *Rev. Bras. Cancerol.*,45(4): 13-24, 1999.
- Bradlow HL, Michnovicz J, Telang NT and Osborne MP: Effects of dietary indole-3-carbinol on estradiol metabolism and spontaneous mammary tumors in mice. *Carcinogenesis*, 12: 1571-74, 1991.
- Buc E, Kwiatkowski F, Alves A, Panis Y, Manton G, Slim K. Tobacco smoking: a factor of early onset of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.*, 49(12):1893-6, 2006.
- Challa A, Rao D, Chawan C, Shackelford L. *Bifidobacterium longum* and lactulose suppress azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis* 18:517–21, 1997.
- Chang X, Tou JC, Hong C, Kim HA, Riby JE, Firestone GL and Bjeldanes LF: 3,3'-Diindolylmethane inhibits angiogenesis and the growth of transplantable human breast carcinoma in athymic mice. *Carcinogenesis*, 26: 771-78, 2005.
- Chi P, Allis CD, Wang GG: Covalent histone modifications - miswritten, mis interpretation and mis-erased in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 10:457-469, 2010.
- Chinni SR, Li Y, Upadhyay S, Koppolu PK and Sarkar FH: Indole-3-carbinol (I3C) induced cell growth inhibition, G cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells. *Oncogene*, 20:2927-2936, 2001.
- Clinton SK, Imrey PB, Mangian HJ, Nandkumar S, Visek WJ. The combined effects of dietary fat, protein, and energy intake on azoxymethane-induced intestinal and renal carcinogenesis. *Cancer Res.*, 52:857–65, 1992.
- Constantine Iosif Fotiadis, Christos Nikolaou Stoidis, Basileios Georgiou Spyropoulos, and Eleftherios Dimitriou Zografos. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World J Gastroenterol.*, 14(42): 6453–6457, 2008.
- Corpet DE, Pierre F: How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. *Eur J Cancer*, 4:1911-22, 2005.
- Cover CM, Hsieh SJ, Tran SH, Hallden G, Kim GS, Bjeldanes LF and Firestone GL: Indole-3-carbinol inhibits the expression of cyclin-dependent kinase-6 and induces a G cell cycle arrest of

- human breast cancer cells independent of estrogen receptor signaling. *J Biol Chem.*, 273:3838-3847, 1998.
- Cram EJ, Liu BD, Bjeldanes LF and Firestone GL: Indole-3-carbinol inhibits CDK6 expression in human MCF-7 breast cancer cells by disrupting Sp1 transcription factor interactions with a composite element in the CDK6 gene promoter. *J Biol Chem.*, 276: 22332-340, 2001.
- Cross AJ, Pollock JR, Bingham SA Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal N-nitrosation arising from red meat. *Cancer Res.*, 63(10):2358-60. 2003.
- Cross AJ, Sinha R Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environ Mol Mutagen.*, 44(1):44-55, 2004.
- Cummings, J.H, Macfarlane, G.T, Englyst, H.N. Prebiotic digestion and fermentation. *Am J Clin Nutr.*, 73: 415S–420S, 2001.
- de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, 4(10):769-80. 2004.
- De Preter V1, Hamer HM, Windey K, Verbeke K . The impact of pre- and/or probiotics on human colonic metabolism: does it affect human health? *Mol Nutr Food*, 55(1):46-57, 2011.
- de Vogel J, Jonker-Termont DS, Katan MB, Van Der Meer R. Natural chlorophyll but not chlorophyllin prevents heme-induced cytotoxic and hyperproliferative effects in rat colon. *J Nutr* 135:1995–2000,,2005.
- de Vogel J, Jonker-Termont DS, van Lieshout EM, Katan MB, van der Meer R. Green vegetables, red meat and colon cancer: chlorophyll prevents the cytotoxic and hyperproliferative effects of haem in rat colon. *Carcinogenesis*, 26(2):387-93, 2005.
- de Vrese M1, Schrezenmeir J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. Volume 111 of the series *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* pp 1-66, 2008. Del Vecchio Blanco G, Paoluzi OA, Sileri P, Rossi P, Sica G, Pallone F. Familial colorectal cancer screening: When and what to do? *World J Gastroenterol.*, 21(26):7944-53, 2015.
- Demarzo MM1, Martins LV, Fernandes CR, Herrero FA, Perez SE, Turatti A, Garcia SB. Exercise reduces inflammation and cell proliferation in rat colon carcinogenesis *Med Sci Sports Exerc.*, 40(4):618-21, 2008.
- Di Gregorio, C, Losi, L, Fante, R, Modica, S, Ghidoni, M, Pedroni, M, Tamassia, MG, Gafa, L, Ponz De Leon, M, Roncucci, L, Histology of aberrant crypt foci in the human colon, *Histopathology*, 30:328-34, 1997.
- Dragan, YP, Pilot, HC, Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J*, 5, 2280-6, 1991.
- Ebert M, Beyer-Sehlmeyer G, Liegibel U, Kautenburger T, Becker T, Pool-Zobel B. Butyrate induces glutathione S-transferase in human colon cells and protects from genetic damage by 4-hydroxy-2-nonenal. *Nutr Cancer*, 41:156–164, 2001.

- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5):759-67, 1990.
- Fedewa SA, Cullati S, Bouchardy C, Welle I, Burton-Jeangros C, Manor O, Courvoisier DS, Guessous I. Colorectal Cancer Screening in Switzerland: Cross-Sectional Trends (2007-2012) in Socioeconomic Disparities. *PLoS One* 6;10(7), 2015.
- Femia, AP, Dolara, P, Caderni, G, Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoximethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 25: 277-81, 2004.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*136(5):E359-86, 2015.
- Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* (1):55-67, 2001.
- Fruehauf JP, Meyskens FL Jr. Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res.*, 13(3):789-94. 2007.
- Garikapaty VP, Ashok BT, Chen YG, Mittelman A, Iatropoulos M and Tiwari RK: Anti-carcinogenic and anti-metastatic properties of indole-3-carbinol in prostate cancer. *Oncol Rep.*, 13: 89-93, 2005.
- Geyer M1, Manrique I, Degen L, Beglinger C. Effect of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on colonic transit time in healthy volunteers. *Digestion*, 78(1):30-3. 2008.
- Gibson G. R., Beatty E. R., Wang X., Cummings J. H. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*, 108:975–982, 1995.
- Gorelik S, Ligumsky M, Kohen R, Kanner J. A novel function of red wine polyphenols in humans: prevention of absorption of cytotoxic lipid peroxidation products. *FASEB J.*, 22:41–6. 2008.
- Greenwald, P., Clifford, C.K., Milner, J.A. Diet and cancer prevention. *European Journal of Cancer*, 37:.948-65, 2001.
- Hamilton, S.R., Aaltonen, L.A., World Health Organization Classification of Tumors Pathology and Genetics, vol. 6. IARC Press, pp. 103. 2000.
- Hardy H1, Harris J, Lyon E, Beal J, Foey AD. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients*. 29;5(6):1869-912, 2013.
- Herman, J.G. Epigenetic changes in cancer and preneoplasia. *Cold Spring Hard Symp Quant Biol.*, 70:329-33, 2005.
- Hooda J, Shah A, Zhang Heme,an essential nutrient from dietary proteins, critically impacts diverse physiologica and pathological processes. *Nutrients*6(3):1080-102, 2014.

- Horn TL, Reichert MA, Bliss RL and Malejka-Giganti D: Modulations of P450 mRNA in liver and mammary gland and P450 activities and metabolism of estrogen in liver by treatment of rats with indole-3-carbinol. *Biochem Pharmacol.*, 64: 393-404, 2002
- Ijssennagger N, Rijnierse A, de Wit NJ, Boekschoten MV, Dekker J, Schonewille A, Müller M, van der Meer R. Dietary heme induces acute oxidative stress, but delayed cytotoxicity and compensatory hyperproliferation in mouse colon. *Carcinogenesis* 34(7):1628-35, 2013.
- Instituto Nacional do Cancer – INCA. Câncer colorretal 2014, disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>.
- Irigaray, P., Belpomme, D. Basic properties and molecular mechanism of exogenous chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, 31: 135-48, 2010.
- Jaspersen K, Burt RW. The Genetics of Colorectal Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.*, 24(4):683-703, 2015.
- Jamieson C, Sharma M, Henderson BR. Wnt signaling from membrane to nucleus: β -catenin caught in a loop. *Int J Biochem Cell Biol.* 44(6):847-50, 2012.
- Kamaleeswari, M., Tuvelan, M., Nalini, N, Effects of dietary caraway (*Carum carvi* L.) on aberrant crypt foci development, fecal steroid, and intestinal alkaline phosphatase activities in 1,2-dimethylhydrazine- induced colon carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 214(3): 290-296, 2006.
- Kelloff, G. Aberrant crypts as a biomarker for colon cancer: evaluation of potential chemopreventive agents in the rat. *Cancer Epidemiol., Biomarkers and Prev.*, 5:355-60, 1996.
- Kelly, G. Inulin-Type Prebiotics – a review: part 1. *Alternative Medicine Review.* 13: 315-329, 2008
- Kerr CA, Hines BM, Shaw JM, Dunne R, Bragg LM, Clarke J, Lockett T, Head R. Genomic homeostasis is dysregulated in favour of apoptosis in the colonic epithelium of the azoxymethane treated rat. *BMC Physiol.*, 23;13:2. 2013
- Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies. *Cancer Lett.*, 293(2):133-43. 2010.
- Kim YS and Milner JA: Targets for indole-3-carbinol in cancer prevention. *J Nutr Biochem.*, 16: 65-73, 2005.
- Kim W1, Kim M, Jho EH. Wnt/ β -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem J.* 450(1):9-21, 2013.
- Kojima T, Tanaka T and Mori H: Chemoprevention of spontaneous endometrial cancer in female Donryu rats by dietary indole-3-carbinol. *Cancer Res.*, 54: 1446-49, 1994.
- Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell.*, 13(6):472-82, 2008.

- Lankaputhra W, Shah N. Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. *Mutat Res* 397:169–182, 1998.
- Lansdorp-Vogelaar I, Goede SL, Ma J, Xiau-Cheng W, Pawlish K, van Ballegooijen M, Jemal A. State disparities in colorectal cancer rates: Contributions of risk factors, screening, and survival differences. *Cancer*. (5):728-36, 2015.
- Larsson SC, Wolk A. Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer*;119:2657–64. 2006.
- Lee SH, Kim JS, Yamaguchi K, Eling TE and Baek SJ: Indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane induce expression of NAG-1 in a p53-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 63-69, 2005.
- Leuratti C, Watson MA, Deag EJ, Welch A, Singh R, Gottschalg E, et al. Detection of malondialdehyde DNA adducts in human colorectal mucosa: relationship with diet and the presence of adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 11:267–73, 2002.
- Liang PS, Chen TY, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* , 15;124(10):2406-15, 2009.
- Lo P, Yu R, Chou C, Tsai Y Antimutagenic activity of several probiotic bifidobacteria against benzo[a]pyrene. *J Biosci Bioeng* 94:148–153, 2002.
- Ma X, Ezzeldin HH, Diasio RB:Histone deacetylase inhibitors: current status and overview of recent clinical trials.*Drugs*, 69:1911-1934, 2009.
- MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009;17:9–26.
- Majno, G., Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, 146(1):16-9, 1995.
- Manson, M.M., Gescher, A., Ann Hudson, E., Plummer, S.M., Squires, M.S., Prigent, S.A. Blocking and suppressing mechanisms of chemoprevention by dietary constituents. *Toxicol. Lett.*, 112–113: 499–505, 2000.
- Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* (3):361-70, 2000.
- Matsuzaki T. Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Int J Food Microbiol.*, 26(2): 133-140, 1998.
- Matsuzaki Y, Koyama M, Hitomi T, Kawanaka M and Sakai T: Indole-3-carbinol activates the cyclin-dependent kinase inhibitor p15(INK4b) gene. *FEBS Lett* 576: 137-140, 2004.
- Morse, M.A., Stoner, G.D. Cancer chemoprevention: principles and prospects, *Carcinogenesis*, 14:1737–46,1993.
- Murphy N, Norat T, Ferrari P, Jenab M, Bueno-de-Mesquita B, Skeie G, Dahm CC, Overvad K, Olsen A, Tjønneland A, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Racine A, Kaaks R, Teucher

- B, Boeing H, Bergmann MM, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Lagiou P, Palli D, Pala V, Panico S, Tumino R, Vineis P, Siersema P, van Duijnhoven F, Peeters PH, Hjartaker A, Engeset D, González CA, Sánchez MJ, Dorronsoro M, Navarro C, Ardanaz E, Quirós JR, Sonestedt E, Ericson U, Nilsson L, Palmqvist R, Khaw KT, Wareham N, Key TJ, Crowe FL, Fedirko V, Wark PA, Chuang SC, Riboli E. Dietary fibre intake and risks of cancers of the colon and rectum in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *PLoS One*. 7(6):e39361, 2012.
- Namasivayam, N. Chemoprevention in experimental animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, p.60–71, 2011.
- Newell, LE, Heddle, JA, The potent colon carcinogen, 1,2- dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. *Mut Res*, 564(1):1-7, 2004.
- Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem.*; 278:31426–33, 2003.
- Norat T, Lukanova A, Ferrari P, Riboli E . Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer*;98:241–56, 2002.
- Plate AY1, Gallaher DD. Effects of indole-3-carbinol and phenethyl isothiocyanate on colon carcinogenesis induced by azoxymethane in rats. *Carcinogenesis*. 27(2):287-92. 2006.
- Oates PS, West AR. Heme in intestinal epithelial cell turnover, differentiation, detoxification, inflammation, carcinogenesis, absorption and motility. *World J Gastroenterol.* , 21;12(27):4281-95, 2006.
- Ou J, Carbonero F, Zoetendal EG, DeLany JP, Wang M, Newton K, Gaskins HR, O’Keefe SJD. Diet, microbiota, and microbial metabolites in colon cancer risk in rural Africans and African Americans. *Am J Clin Nutr* 98:111–120, 2013.
- Ou J, DeLany JP, Zhang M, Sharma S, O’Keefe SJD) Association between low colonic short-chain fatty acids and high bile acids in high colon cancer risk populations. *Nutr Cancer* 64:34–40, 2012.
- Pan MH, Ho CT. Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. *Chem Soc Rev*. 2008;37(11):2558-74.
- Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005; 202(2):199-211.
- Pence BC, Buddingh F, Yang SP. Multiple dietary factors in the enhancement of dimethylhydrazine carcinogenesis: main effect of indole-3-carbinol. *J Natl Cancer Inst*. 77(1):269-76, 1986.
- Pereira C, Grácio D, Teixeira JP, Magro F. Oxidative Stress and DNA Damage: Implications in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. (10):2403-17, 2015. Pierre F, Santarelli R, Tache S, Gueraud F, Corpet DE. Beef meat promotion of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis biomarkers is suppressed by dietary calcium. *Br J Nutr.*,99:1000–6, 2008.

- Pierre F, Tache S, Petit CR, Van Der Meer R, Corpet DE. Meat and cancer: haemoglobin and haemin in a low-calcium diet promote colorectal carcinogenesis at the aberrant crypt stage in rats. *Carcinogenesis*, (10):1683-90, 2003.
- Plate AY1, Gallaher DD. Effects of indole-3-carbinol and phenethyl isothiocyanate on colon carcinogenesis induced by azoxymethane in rats. *Carcinogenesis*. 27(2):287-92, 2005.
- Polyak, K, Hamilton, SR, Vogelstein, B, Kinsler, KE. Early alteration of cell-cycle-regulated gene expression in colo-rectal neoplasia. *Am. J. Pathol.*, 149:381-7, 1996.
- Pool-Zobel B1, Veeriah S, Böhmer FD Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens - focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. *Mutat Res*. 2005 Dec 11;591(1-2):74-92, 2005.
- Pool-Zobel BL, Neudecker C, Domizlaff I, Ji S, Schillinger U, Rumney C, Moretti M, Vilarini I, Scassellati-Sforzolini R, Rowland I. Lactobacillus- and bifidobacterium-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr Cancer.*, 26(3):365-80, 1996.
- Pool-Zobel BL, Sauer J. Overview of experimental data on reduction of colorectal cancer risk by inulin-type fructans. *J Nutr*. 137(11 Suppl):2580S-2584S, 2007.
- Pool-Zobel BL. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. *Br J Nutr. Suppl 1*:S73-90, 2005.
- Pretlow, TP, O'riordan, MA, Kolman, MF, Jurcisek, JA, Colonic aberrant crypts in azoximethane-treated F344 rats have decreased hexosaminidase activity. *Am. J. Pathol.*, 136: 13-26, 1990.
- Rajendran P, Delage B, Dashwood WM, Yu TW, Wuth B, Williams DE, Ho E, Dashwood RH. Histone deacetylase turnover and recovery in sulforaphane-treated colon cancer cells: competing actions of 14-3-3 and Pin1 in HDAC3/SMRT corepressor complex dissociation/reassembly. *Mol Cancer*,30: 10:68, 2011.
- Raju J. Azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci: relevance in studying chemoprevention of colon cancer. *World J Gastroenterol.*, 21;14(43):6632-5, 2008.
- Riby JE, Chang GH, Firestone GL, Bjeldanes LF. Ligand-independent activation of estrogen receptor function by 3,3'-diindolylmethane in human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 2000; 60:167-177.
- Rodrigues, MAM., Silva, LAG., Salvadori, DMF., Camargo, JLV, Montenegro, MR, Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium term bioassay for colon medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Braz J. Med. Biol. Res*,35:351-355, 2002.
- Rogan EG. The natural chemopreventive compound indole-3-carbinol: state of the science. *In Vivo*. 20(2):221-8, 2006.
- Rogers CJ, Colbert LH, Greiner JW, Perkins SN, Hursting SD. Physical activity and cancer prevention : pathways and targets for intervention. *Sports Med.*, 38(4):271-96. 2008.

- Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr*;22:19–34, 2002.
- Rowland IR, Rumney CJ, Coutts JT, Lievens LC. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, 19: 281-285, 1998.
- Rundle, A. Carcinogen-DNA adducts as a biomarker for cancer risk. *Mutat Res.*, 600:23-36, 2006.
- Sandhu MS, White IR, Mcpherson K. Systematic review of the prospective cohort studies on meat consumption and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* ;10:439–46, 2001.
- Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr Cancer*;60:131–44, 2008.
- Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Marian, B., Grasl-Kraupp, B. Active cell death (apoptosis) and cellular proliferation as indicators of exposure to carcinogens. *IARC Sci. Publ.*, 146, 273-85, 1999.
- Sesink AL, Termont DS, Kleibeuker JH, Van der Meer R. Red meat and colon cancer: the cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme. *Cancer Res.*; 59(22):5704-9. 1999.
- Sesink AL, Termont DS, Kleibeuker JH, Van Der Meer R. Red meat and colon cancer: dietary haem, but not fat, has cytotoxic and hyperproliferative effects on rat colonic epithelium. *Carcinogenesis.*, 21(10):1909-15, 2000.
- Sesink ALA, Termont DSML, Kleibeuker JH, VanDerMeer R. Red meat and colon cancer: dietary haem-induced colonic cytotoxicity and epithelial hyperproliferation are inhibited by calcium. *Carcinogenesis*; 22:1653–9, 2001.
- Shpitz, B, Bomstein, Y, Mekori, Y, Cohen, R, Kaufman, Z, Grankin, M, Bernheim, J. Proliferating cell nuclear antigen as a marker of cell kinetics in aberrant crypt foci hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas of the human colon. *Am. J. Surg*,174:425-30, 1997.
- Siegel RL1, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 65(1):5-29, 2015.
- Sinha R, Rothman N, Brown ED, Mark SD, Hoover RN, Caporaso NE, et al. Pan-fried meat containing high levels of heterocyclic aromatic amines but low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons induces cytochrome p4501a2 activity in humans. *Cancer Res.*,54:6154–9, 1994.
- Sinha R, Rothman N, Salmon CP, Knize MG, Brown ED, Swanson CA, Rhodes D, Rossi S, Felton JS, Levander OA. Heterocyclic amine content in beef cooked by different methods to varying degrees of doneness and gravy made from meat drippings. *Food Chem Toxicol.*, 36(4):279-87. 1998.
- Sung MK, Yeon JY, Park SY, Park JH, Choi MS. Obesity-induced metabolic stresses in breast and colon cancer. *Ann N Y Acad Sci.*, 1229:61-8, 2011.

- Tanaka, T, Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *Journal of Carcinogenesis*, 8:5. 2009.
- Tsuda H, Ohshima Y, Nomoto H, Fujita K, Matsuda E, Iigo M, Takasuka N, Moore MA. Cancer prevention by natural compounds. *Drug Metab Pharmacokinet.*, 19(4):245-63. 2004.
- Tudek, B, Bird, RP, Bruce E, WR, Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. *Cancer Res.*, 49, 1236-40, 1989.
- Tuohy K.M. Inulin-type fructans in healthy aging. *J Nutr.*, v. 137, n.11, p. 2590S-2593S, 2007. Uchida, K, Kado, S, Onoue, M, Tohyama, K, Relationship between the nature of mucus and crypt multiplicity in aberrant crypt foci in the rat colon. *Jpn. Cancer Res.*, 88:807-14, 1997.
- Ushijima, T., Nakajima, T., Maekita, T. DNA methylation as a marker for the past and future. *J. Gastroenterol.*, 41, 401-7, 2006.
- Valle L. Genetic predisposition to colorectal cancer: where we stand and future perspectives. *World J Gastroenterol.* 20(29):9828-49. 2014.
- Vincent TL, Gatenby RA, An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. *Inter J Oncol.*, 32: 729-737, 2008.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* . 1;319(9):525-32, 1988.
- Vulcain E, Goupy P, Caris-Veyrat C, Dangles O. Inhibition of the metmyoglobin-induced peroxidation of linoleic acid by dietary antioxidants: action in the aqueous vs. lipid phase. *Free Radic Res.*, 39(5):547-63, 2005.
- Vyas U1, Ranganathan N. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond. *Gastroenterol Res Pract.* 2012:872716. 2012.
- Wattenberg LW. Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer Res.* 1;52(7 Suppl):2085s-2091s. 1992.
- Wattenberg, L.W. Chemoprevention of Cancer. *Prev. Med*, 25, 44-45, 1996.
- Weng JR, Tsai CH, Kulp SK, Chen CS. Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent. *Cancer Lett.* 18;262(2):153-63, 2008.
- Wilson AJ, Byun DS, Nasser S, Murray LB, Ayyanar K, Arango D, Figueroa M, Melnick A, Kao GD, Augenlicht LH, Mariadason JM:HDAC4 promotes growth of colon cancer cells via repression of p21. *Mol Biol Cell*, 19:4062-4075, 2008.
- Wong CS, Sengupta S, Tjandra JJ, Gibson PR. The influence of specific luminal factors on the colonic epithelium: high-dose butyrate and physical changes suppress early carcinogenesis events in rats. *Dis Colon Rectu*, 48(3):549-59, 2005.
- Yoshimi, N, Morioka, T, Kinko, T, Inamine, M, Kaneshiro, T, Shimizu, T, Suzui, M, Yamada, Y, Mori, H, Histological and immunohistochemical observations of mucin-depleted foci (MDF)

stained with alcian blue, in rat colon carcinogenesis induced with 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride. *Cancer Sci.*, 95: 792-797, 2004.

Xu M, Bailey AC, Hernaez JF, Taoka CR, Schut HA, Dashwood RH. Protection by green tea, black tea, and indole-3-carbinol against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced DNA adducts and colonic aberrant crypts in the F344 rat. *Carcinogenesis*, (7):1429-34. 1996.

Zeng H, Lazarova DL, Bordonaro M. Mechanisms linking dietary fiber, gut microbiota and colon cancer prevention. *World J Gastrointest Oncol.*, 15;6(2):41-51, 2014.

Zhu H, Li YR. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. *Exp Biol Med.*, 237(5):474-80, 2012.

Capítulo 2

1. Objetivo

O objetivo do presente projeto foi o de avaliar o efeito da administração de simbiótico (prebiótico inulina associado ao probiótico *Bifidobacterium bifidus Bb-12*) e do indol-3-carbinol sobre a etapa de promoção da carcinogênese de cólon induzido pela 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em ratos Wistar alimentados com dieta suplementada ou não com heme.

2. Material e métodos

2.1. Dietas

As dietas foram preparadas como demonstradas na Tabela 1, os compostos foram adicionados à ração em pó Nuvilab-CR1, Nuvital-PR usada como referência na alimentação de ratos, contendo aproximadamente 220g de proteína bruta, 70g de fibra bruta, 90 g de matéria mineral, 70 g de matéria mineral, 14 g de cálcio e 8 g de fósforo por kg do produto. Após completa homogeneização e umidificação, realizada em misturador industrial (CAF-modelo M60), as rações foram peletizadas em máquina peletizadora (Chavantes – PR), secas por ventilação e acondicionadas em sacos plásticos previamente identificados e mantidas sobre refrigeração (-4°C).

Tabela 1- Composição das dietas (g/kg)

Composto	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6	Dieta 7
Heme	0,32	0,32	0,32	0,32	-	-	-
I3C	-	1	-	1	1	-	1
Inulina	-	-	50	50	-	50	50
<i>B. lactis</i>	-	-	$2,5 \times 10^{10}$	$2,5 \times 10^{10}$	-	$2,5 \times 10^{10}$	$2,5 \times 10^{10}$

Compostos: Heme 0,5 mmol/kg (CAS n° 16009-13-5) Sigma-Aldrich, EUA (de Vogel *et al.*, 2005). Indol-3-carbinol 0,1% (CAS n° 700-06-1) Sigma-Aldrich, EUA (Wang *et al.*, 2005). Inulina 5% BENEIO Orafti®, Siba Ingredientes – São Paulo – SP (Rowland *et al.*, 1998). *Bifidobacterium lactis* Bb-12 – $2,5 \times 10^{10}$ unidades formadoras de colônia, CHR Hansen – Latic Ingredientes – Sorocaba – SP (Rowland *et al.*, 1998).

2.2. Delineamento Experimental

Foram utilizados 101 ratos da linhagem Wistar com seis semanas de idade e pesando em média 200 gramas. Todos os animais utilizados no presente estudo foram adquiridos da ANILAB Animais de Laboratório (Paulínia - SP) e mantidos no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, em gaiolas plásticas opacas, com tampa de aço inox na forma de grade, forradas com maravalha de pinho, contendo cinco animais cada. O período de aclimação foi de uma semana. O certificado de aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal está contido no **Anexo 1**.

Após a fase de aclimação, os animais foram distribuídos aleatoriamente em nove grupos experimentais com 5 a 12 animais cada. Durante todo o período experimental, foram controladas as condições ambientais do biotério: temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$) e período de 12/12 horas claro/escuro. O protocolo experimental está representado na Figura 1 e os grupos experimentais foram os seguintes:

Grupo controle positivo

Grupo 1 – Os animais receberam quatro doses de 40 mg/kg de 1,2-dimetilhidrazina (DMH, via subcutânea) durante as duas primeiras semanas do experimento sendo duas doses por semana (uma dose às segundas-feiras e outra dose às quintas-feiras). Os animais receberam ração em pó Nuvilab-CR1 e água *ad libitum* até o final do experimento. Os animais foram sacrificados na 25^a semana do experimento.

Grupos teste positivos

Grupos 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 – Os animais foram iniciados com a DMH como descritos acima. Durante as duas primeiras semanas do experimento os animais receberam ração Nuvilab-CR1 e a partir da terceira semana ração Nuvilab-CR1 suplementada com heme, heme +I3C, heme+simbiótico, heme+I3C+simbiótico, I3C, simbiótico e I3C+simbiótico, respectivamente. Os animais foram sacrificados na 25^a semana do experimento.

Grupo controle negativo

Grupo 9 – Os animais receberam as quatro injeções s.c. de EDTA (veículo da DMH) durante as duas semanas do experimento, os animais receberam ração Nuvilab-CR1 durante todo período experimental e água *ad libitum*, os mesmos foram sacrificados na 25^a semana do experimento.

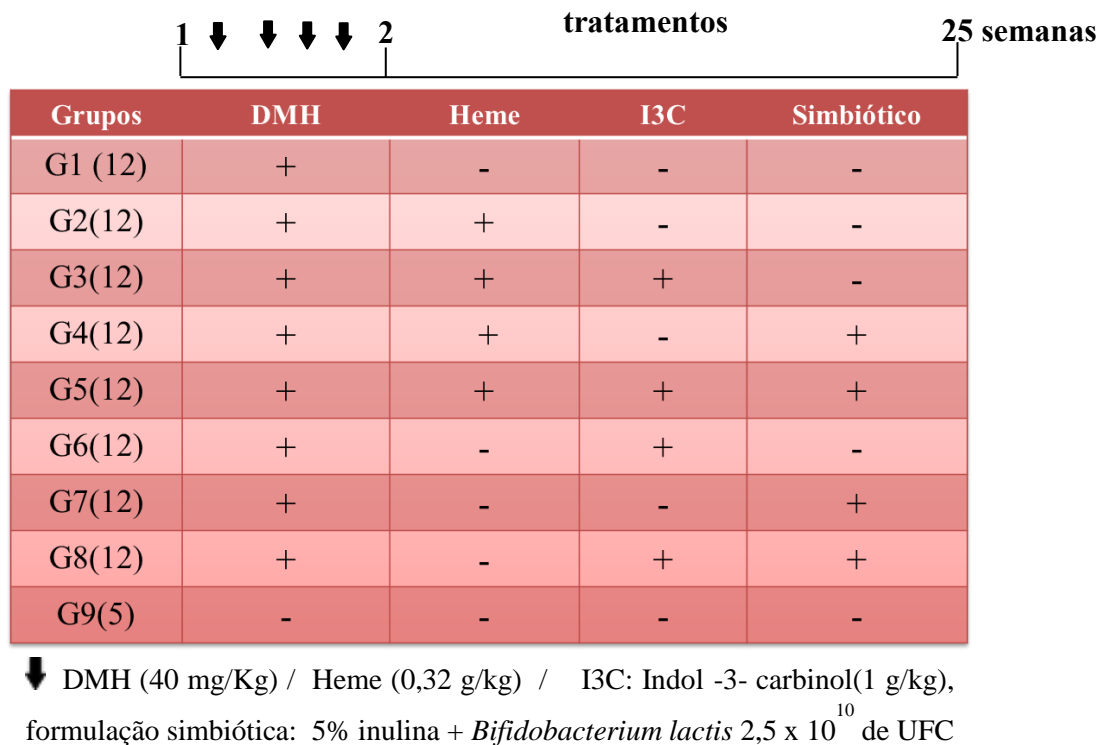


Figura 1 – Delineamento experimental

2.3. Avaliação do consumo de ração e água

Os animais receberam água filtrada em bebedouros de vidro com tampa de borracha e bico metálico, com capacidade para 500 ml. O consumo de ração e água foi medido duas vezes por semana por caixa. Pela média de consumo da caixa foi obtido o consumo estimado individual e a média estimada de ingestão de ração de cada grupo.

2.4. Eutanásia dos animais e coleta de amostras

A eutanásia dos animais ocorreu por exsanguinação após administração de anestésico (xilasina/ketamina). Após a eutanásia foi realizada incisão na face ventral do animal ao longo da linha média, da cavidade oral até o final da cavidade abdominal para coleta do cólon. Após a ressecção do osso púbico, expondo o reto, o cólon foi removido. Com uma tesoura foi procedida a incisão da parede longitudinalmente na linha mesentérica no sentido cólon proximal/reto expondo o conteúdo fecal. Foram coletadas amostras de fezes do ceco e em seguida o cólon foi preso à prancha de isopor com alfinetes (Figura 2). Prosseguiu-se com a limpeza dos resíduos fecais do cólon com solução de NaCl 0,9% e na sequência foi realizada a medida dos tumores observados

macroscopicamente. A seguir foi coletado um tumor de padrão macroscópico polipóide por animal e dividido ao meio, uma porção foi acondicionada em tubos criogênicos *RNase/DNase free* para extração de RNA destinado à análise de expressão gênica e a outra porção foi acondicionada em tubos criogênicos para extração de proteínas destinada à análise de expressão proteica. As amostras de tumor destinadas às análises moleculares foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido até o armazenamento definitivo em freezer -80°C . Após as coletas dessas amostras, os cólons foram mergulhados em formalina tamponada por 24 h para fixação, lavados em água corrente por 12 horas e mantidos em álcool 70% até o momento da coloração pelo azul de metileno para contagem de FCA.



Figura 2 – Cólon preso à prancha de isopor mostrando vários tumores macroscópicos.

2.5. Análise macroscópica dos tumores

No momento da eutanásia foram feitas as medidas de comprimento, largura e profundidade de todos os tumores encontrados. Posteriormente, foi calculado o volume desses tumores tendo como base a figura geométrica de um esferoide alongado cujo volume é calculado através da fórmula: $(4/3 \times 3,14 \times (\text{comprimento}/2) \times (\text{largura}/2) \times (\text{profundidade}/2)]$. Os tumores foram classificados em três categorias: pequeno: $< 30 \text{ mm}^3$, médio: $30\text{-}60 \text{ mm}^3$ e grande: $> 60 \text{ mm}^3$. Após a etapa de fixação, os tumores macroscópicos foram retirados dos cólons, fragmentados e colocados em cassetes de plástico e mantidos em álcool 70% até o momento do processamento histológico.

2.6. Análise de FCA no cólon

Para a detecção de focos de criptas aberrantes (FCA), os cólons foram retirados do álcool 70%, lavados em água corrente e subsequentemente, corados em solução de azul de metileno a 1% em PBS por aproximadamente 2 minutos. Os focos de criptas aberrantes (FCA) foram analisados por campos em microscópio de luz convencional em objetiva 20x (Axiostar plus, Zeiss). A

identificação dos FCA foi baseada em seus aspectos morfológicos diferenciais segundo (Bird 1987, Rodrigues *et al.*, 2002): 1) tamanho aumentado e aspecto mais corado (camada de células epiteliais mais espessa) em plano diferente (mais elevado) das criptas intestinais normais circunjacentes; 2) abertura das criptas de aspecto alterado (circular a alongada, elíptica ou tortuosa); 3) são encontradas isoladas como criptas aberrantes ou em focos, e estes os chamados FCA ocupam área maior que a ocupada por um número equivalente de criptas morfológicamente normais. Não há criptas de morfologia normal entre as criptas aberrantes dentro desses focos.

Foram quantificados os FCA com 2, 3, 4, 9 ou mais criptas aberrantes, além do número total de CA, número total de FCA por cm² de cólon analisado. Foram analisados pela varredura do cólon proximal, medial e distal. Após a análise de FCA, fragmentos dos cólons medial e distal foram processados para inclusão em parafina na forma de *swiss roll*.

2.7. Processamento histológico dos tumores e do cólon

Fragmentos de tumores e do cólon após análise de FCA foram desidratados em banhos sucessivos em álcool 85%, álcool 95% e álcool absoluto (3x) por uma hora cada. Os tecidos foram diafanizados em xilol I, II e III e banhados em parafina I, II e III por uma hora cada reagente. Após o processamento inicial, o material foi emblocado em parafina à 60°C no autoinfusor (LEICA EG 1160, Alemanha).

Cortes histológicos de espessura entre 4 a 6 µm foram obtidos em micrótomo (LEICA RM 2145, Alemanha), colocados sobre lâminas codificadas e, então, levadas para estufa (FAMEN 002 CB, Brasil) à 60°C por 24 horas, a fim de se obter maior adesão dos cortes histológicos às lâminas. Em seguida, as lâminas foram colocadas em suporte.

Para a coloração de HE, as lâminas passaram pelas seguintes etapas: bateria de hidratação (xilol I, II e III por 5 minutos em cada; álcool absoluto I, II e III por 8 segundos cada passagem; água corrente), lavagem em água corrente, hematoxilina de Harris por 5 minutos, diferenciador por 8 segundos, água amoniacal 8 segundos, álcool absoluto por 8 segundos e eosina por 2 minutos e bateria de desidratação (álcool I, II, III, IV e V por 8 segundos cada passagem). Todos os reagentes utilizados na coloração foram obtidos da Merck (Alemanha).

Terminada a coloração, as lâminas foram transferidas para outro suporte e levadas para a montagem automática (LEICA CV 5000, Alemanha) de lamínulas (24x32mm) em meio Permount (Fisher, EUA). Após montagem, as lâminas histológicas foram rotuladas e identificadas.

2.8. Análise histopatológica do cólon e tumores

Foi realizada a análise histopatológica tanto dos tumores visíveis macroscopicamente, e coletados separadamente, quanto os encontrados nos cortes de cólon em *swiss roll*. Todas as lesões neoplásicas foram classificadas como de padrão tubular ou mucinoso e como invasivos e não-invasivos (*in situ*) baseado no critério de invasão da muscular da mucosa (Hamilton & Aaltonen, 2000). Então, foi calculado a incidência (% de ratos com tumor) e a multiplicidade (número médio de tumores por rato). Os FCA detectados nos cortes histológicos de cólon foram classificados em displásicos e convencionais, segundo os critérios de Yoshimi *et al.* 2004.

2.9. Reações de imunistoquímica para PCNA, caspase-3 clivada e β -catenina e e-caderina

A expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e caspase-3 clivada foi detectada pela técnica imunistoquímica do complexo Avidina-Biotina (ABC) e foi realizada tanto nos cortes de cólon como nos tumores colônicos. A expressão da β -catenina e e-caderina foi realizada apenas nos tumores colônicos.

Cortes histológicos de cólon e de tumor com 5 μ m de espessura foram colocados sobre lâminas histológicas silanizadas STARFROST® e passaram por desparafinização em banhos de xilol e hidratação por banhos sucessivos em álcool. A recuperação antigênica foi realizada em tampão Citrato pH=6,0 a 120°C por 5 min em panela de pressão Pascal (Dako Cytomation Denmark A/S). Em seguida foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ à 3% em PBS, durante 10 minutos e posteriormente o bloqueio de ligações inespecíficas em leite desnatado a 1% em PBS por 1 hora. As lâminas foram incubadas com PCNA na diluição de 1:200 ou anti-caspase-3 clivada na diluição de 1:100 ou anti- β -catenina na diluição de 1:500 ou e-caderina na diluição 1:100 (especificações abaixo) em ABS a 1% (Albumina Bovina Sérica, Sigma Aldrich, EUA) *overnight* a 4°C. Na etapa seguinte as lâminas foram incubadas por 15 minutos com Biotinylated link Dako Universal e 15 minutos com Streptoavidin – HRP. A revelação da peroxidase foi realizada com 3'3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro (DAB) (Sigma Chemical CO, MO, EUA) e a contra-coloração foi feita com hematoxilina de Harris. A desidratação das lâminas foi realizada em álcool e xilol e posteriormente, foi feita a montagem das lâminas em resina sintética Permount (FISHER, EUA).

Especificações dos anticorpos:

Anticorpo monoclonal anti-PCNA produzido em camundongo (DakoCytomation Denmark A/S), anti-caspase-3 clivada produzida em coelho (Cell Signaling Technology Inc., EUA), anticorpo policlonal anti- β -catenina da classe IgG produzido em coelho (Abcam, MA, EUA), anticorpo

monoclonal da classe IgG produzido em camundongo Anti-e-caderina (Abcam, MA, EUA), Kit ABC (Biotinylated link Dako Universal, EUA).

A contagem de células PCNA positivas, de células em apoptose e a análise da expressão alterada da β -catenina foi feita em microscópio de luz convencional (Axiostar Plus, Zeiss, Alemanha) com auxílio de um retículo e na objetiva de 40x. Os índices de proliferação celular (IP%) e de apoptose (IA%) foram calculados dividindo-se o número de células PCNA positivas ou caspase-3 clivada positivas pelo número total de células contadas, multiplicando o resultado por 100. Foram analisadas vinte criptas por animal, as quais foram escolhidas de forma aleatória nos três segmentos do cólon de cada animal (5 animais/grupo, totalizando 100 criptas por grupo). Foram consideradas apenas criptas inteiras dispostas perpendicularmente na mucosa colônica nos cortes histológicas. Nos tumores foram contadas um total de 500 células/tumor (5 animais/grupo).

A análise de expressão alterada da β -catenina foi analisada em tumores colônicos (7 animais ou tumores/grupo). A marcação de membrana da β -catenina foi considerada como expressão normal e a marcação nuclear considerada alterada (Kikuchi, *et al.*, 2015). A expressão de membrana da e-caderina foi considerada positiva e a ausência de marcação como negativa.

2.10. Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR)

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados seguindo as orientações do MIQE: *Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment* (Bustin, *et al.*, 2009).

2.10.1. Extração e quantificação de RNA total das amostras tumorais

O RNA total das amostras tumorais congeladas (em média 7 amostras tumorais por grupo) foi extraído utilizando o Rneasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), seguindo as instruções do fabricante. A quantificação do RNA total foi realizada utilizando-se o equipamento NanoVue (GE, EUA) e as concentrações de RNA nas amostras foram anotadas. Essas análises revelaram a contaminação de parte das amostras por proteínas (260/280nm) e/ou resíduos de compostos orgânicos (230/280nm). Sabendo-se que estes contaminantes afetam diretamente a eficiência de uma reação de PCR, tais amostras contaminadas (i.e., com razão de absorvância < 1,8) foram excluídas das análises.

2.10.2. Análise da qualidade de RNA das amostras tumorais

As amostras selecionadas na análise anterior foram subsequentemente analisadas quanto à qualidade e integridade do RNA (*RNA integrity number - RIN*) no aparelho *2100 Bioanalyzer* (Agilent technologies)

A qualidade do RNA foi verificada após a eletroforese capilar e o *RIN* foi obtido a partir da análise dos RNAs ribossômicos baseadas em microfluidos. Os valores de *RIN* variam entre 10 (RNA intacto) a 1 (RNA totalmente degradado). Em experimentos que envolvam a extração de RNA de amostras de tecido animal, valores de $RIN > 7$ são considerados adequados para a realização da quantificação em RT-qPCR enquanto que $RINs < 7$ são descartados (Schroeder *et al.*, 2006). O **Anexo 2** apresenta os valores referentes à quantificação e qualidade do RNA das amostras dos diferentes grupos experimentais.

2.10.3. Reação de Transcrição Reversa

A transcrição reversa do RNA total extraído de cada amostra tumoral foi realizada utilizando o *SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit and Master Mix* (Invitrogen™ - Life Technologies, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Esse kit proporciona um aumento na eficiência da síntese de cDNA permitindo o uso de uma concentração muito baixa ou muito alta de RNA (até 2,5 µg de RNA total em 20 µL de reação). Ele traz dois componentes (*SuperScript® Enzyme Mix + VILO™ Reaction Mix*), os quais contêm *primers* randômicos e poli -(T) que se anelam e retro-transcrevem todos os RNAs transcritos do genoma juntamente com a enzima transcriptase reversa, além dos demais componentes necessários para a conversão quantitativa de RNA total em cDNA.

A reação de transcrição reversa foi incubada a 25°C por 10 min, na sequência à 42 °C por 60 min e finalmente à 85 °C por 5 min para inativação da transcriptase reversa. Após retirado do termociclador, o cDNA foi armazenado à temperatura de -20°C até o momento do uso para as reações de RT-qPCR.

2.10.4. PCR quantitativo em Tempo Real

O perfil de expressão dos 95 mRNAs pré-selecionados (**Anexo 3**), foram analisados utilizando a plataforma *Taqman Low Density Array* (TLDA). Foram utilizadas 5 amostras de cDNA de cada grupo experimental, totalizando 40 amostras. Em cada cartão *TaqMan® Low Density Array* de 384 poços (Life Technologies, EUA) foi possível a análise simultânea de 4 amostras de cDNA por cartão.

Para cada amostra, foram utilizados 100 μ L de *TaqMan® Fast Advanced Master Mix* (Life Technologies, EUA), 16 μ L do produto da reação de transcrição reversa (cDNA) e o volume final foi ajustado para 200 μ L com água livre de nucleases; o preparo do cartão foi feito segundo as instruções do fabricante (Life Technologies). As reações de RT-qPCR foram realizadas no *QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System* (Life Technologies, EUA) e o tempo de ciclagem foram os seguintes: 50°C por 2 min para incubação da enzima *Uracil-N glycosylase* (UNG), 95°C por 20 s para ativação da polimerase, e 40 ciclos a 95°C por 1 s para denaturação e 40 ciclos a 60°C por 20s para anelamento e extensão, de acordo com indicado pelo fabricante. Foram selecionados 4 genes candidatos a endógenos de acordo com a literatura, sendo eles *Gapdh* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), *Hprt1* (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase*), *Gusb* (*glucuronidase, beta*) e *Actb* (*actin, beta*). A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método do Cq comparativo (ciclo de quantificação). Cada gene foi normalizado entre as amostras utilizando a média dos três genes endógenos que apresentaram maior estabilidade, sendo eles *Gapdh*, *Gusb* e *Actb*. Essa normalização foi feita subtraindo-se do CT de cada um dos genes o CT da média dos endógenos de cada amostra (Δ CT) e a alteração na expressão gênica foi considerada com *fold change* $\geq 1,5$.

2.11. Western Blotting

A análise de expressão protéica foi realizada nos mesmos tumores que foram selecionados para análise da expressão gênica. As proteínas foram extraídas utilizando Tris-tampão Triton (Tris 10 mM, pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% de Triton X-100, glicerol 10%, SDS a 0,1%, desoxicolato a 0,5%) e a quantidade de proteína do sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford. As amostras foram separadas em gel de poliacrilamida (mini-protean TGX gels, Bio-Rad, EUA) e, em seguida, transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, EUA). Após o bloqueio, a membrana foi incubada com os anticorpos primários (Anti-e-caderina na diluição de 1:1000, anti- TGFB1 na diluição de 1:1000, anti- RAF1 na diluição de 1:1000 e beta-actina na diluição de 1:1000), posteriormente, a membrana foi incubada com com anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-mouse na diluição 1:10000 para a e-caderina e anti-rabbit na diluição de 1:10000 para a TGFB1 e RAF1 e anti-goat na diluição de 1:15000 para a beta-actina). O Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Protein Research Products, EUA) foi utilizado para detectar anticorpos ligados. As membranas foram fotografadas utilizando o sistema IQuant Capture 350.

Especificações dos anticorpos:

Anticorpo monoclonal da classe IgG produzido em camundongo Anti-e-caderina (Abcam, MA, EUA).

Anticorpo monoclonal da classe IgG produzido em coelho Anti-Raf1(Abcam, MA, EUA).

Anticorpo policlonal da classe IgG produzido em coelho Anti-TGF beta 1(Abcam, MA, EUA).

2.12. Preparo da água fecal

Para o preparo da água fecal, as fezes dos grupos G1: controle do grupo heme, G2,G3,G4,G5 (grupos suplementados com heme) foram descongeladas, misturadas com PBS (tampão fosfato) e homogeneizadas duas vezes durante 3 minutos, na proporção de 1:1 (1 g de fezes + 1 ml de PBS). Após a homogeneização as amostras foram ultracentrifugadas a 50.000g, na temperatura de 10°C durante 30 min. O sobrenadante foi aliqotado e armazenado a -20°C até o momento do uso (Klinder *et al.*, 2007).

2.13. Cultura Celular e exposição á água fecal

Células da linhagem CaCO-2 (adenocarcinoma de cólon humano) foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro), cultivadas em meio de cultura DMEM (Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de Na-piruvato, 1% de penicilina/estreptomicina e 10% de soro fetal bovino. As células foram obtidas na vigésima sétima passagem (p=27), expandidas em garrafas de cultura celular de poliestireno de 25cm² e 75cm² e mantidas em estufa com 5% de CO² em atmosfera úmida a 37°C. Ao atingirem a trigésima primeira passagem (p=31), as células foram desprendidas com solução acutase (Sigma-Aldrich, EUA) e semeadas em garrafas de cultura celular de poliestireno.

Após 24 horas da sementeira, as células CaCO-2 aderidas às garrafas receberam meio de cultura completo contendo 10% de água fecal e foram incubadas por 4 horas em estufa à 37°C. Para os controles positivos e negativos, as células foram incubadas com 200 µM de peróxido de hidrogênio e 10% de DPBS (*Dubelcco's Phosphate Buffer Solution*), respectivamente.

2.14. Análise de Genotoxicidade da água fecal pelo Teste do Cometa

Para o teste do cometa, após a exposição à água fecal, as células CaCO-2 foram centrifugadas a 1200 g, na temperatura de 25°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em DPBS, ajustando-se a densidade para 1x10⁶/mL. Foram misturadas amostras de 10 µl da suspensão de células a 100 µl de agarose de baixo ponto de fusão (Invitrogen, EUA) e, em seguida, a mistura foi colocada em lâminas revestidas com agarose

padrão (Invitrogen, EUA), cobertas com lamínulas e levadas a geladeira por 10 minutos, a 4°C. Após esse período as lamínulas foram retiradas e as lâminas colocadas em solução de lise a 4°C por 24 à 48 horas.

Após a lise das membranas as lâminas foram colocadas em uma cuba horizontal de eletroforese por 20 minutos em tampão alcalino, sendo submetidas posteriormente à eletroforese (30V/300mA, 7W) por 20 minutos a 4°C. Ao término da eletroforese as lâminas foram neutralizadas e fixadas em etanol absoluto. Para visualização e análise dos cometas, as lâminas foram coradas com *Syber Gold*® (Invitrogen, EUA) e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX60). A análise dos cometas (nucleóides) foi conduzida de acordo com o manual técnico “*In vivo and In vitro mammalian alkaline comet assay*”, elaborado pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD, 2014). Foram analisados 50 nucleóides por lâmina, sendo todos os tratamentos e grupos feitos em duplicata. O parâmetro utilizado para se avaliar o dano no DNA foi o momento da cauda que é uma relação entre o comprimento da cauda e a quantidade de DNA (%) migrado. As unidades de medida são arbitráveis, revelando dose-resposta não linear e dependente da porcentagem de DNA na cauda (Olive *et al.*, 1990).

2.15. Análise de Citotoxicidade da água fecal pelo teste do MTT

Para o teste do MTT, células CaCO-2 na trigésima segunda passagem (p=32) foram semeadas em placas de 96 poços, na densidade de $10^4/200 \mu\text{L}$. Após 24 horas da semeadura, as células já aderidas foram expostas ao meio suplementado com 10% de água fecal, por 4 horas, à 37°C. Para os controles positivos e negativos, as células foram incubadas com 200 μM de peróxido de hidrogênio e 10% de DPBS, respectivamente. Após o período de incubação, o sobrenadante foi desprezado, sendo acrescido 100 μL de MTT (Sigma-Aldrich, EUA) em DPBS, na concentração final de 50mg/mL. As placas foram incubadas por 4h à 37°C para incorporação do MTT e formação dos cristais de formazan. Posteriormente, as células foram solubilizadas pela adição de 100 μL de uma solução contendo 95% de isopropanol e 5% de ácido fórmico. As placas foram lidas em espectrofotômetro (Biotek Instruments, USA) no comprimento de 590 nm.

2.16. Análise estatística

Os dados referentes a quantificação de FCAs e índices de apoptose em tumores foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn's. As análises histopatológica de FCAs e volume de tumores foram feitas utilizando o teste Qui-quadrado, já os índices de proliferação celular em criptas colônicas, tumores e apoptose em criptas colônicas apresentaram uma distribuição normal e foram comparados pelo teste ANOVA. Todos os testes

foram realizados no Software Sigma Stat 3.5. A análise de expressão gênica foi realizada, utilizando o *ExpressionSuite Software* v1.0.3 (Life Technologies EUA).

3. Resultados

3.1. Observações gerais

A manutenção em biotério, o tratamento com a DMH e a dieta contendo heme, I3C e simbiótico, isolados ou em associação, foram bem aceitos pelos animais visto que não ocorreu morte de nenhum animal ao longo das 25 semanas do experimento.

3.2. Peso corpóreo e consumo de ração

A Tabela 2 apresenta os valores de média e desvio padrão de peso corpóreo inicial e final e ganho de peso corpóreo dos animais dos diferentes grupos experimentais. O tratamento com a DMH, durante as duas primeiras semanas, e a introdução da dieta contendo heme, I3C e simbióticos isolados ou em associação durante 23 semanas após a etapa de iniciação, não alteraram a evolução de peso corpóreo e o ganho de peso dos animais.

Tabela 2 – Peso corpóreo dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo do experimento.¹

Grupos/tratamento ²	N ^o . de Animais	Peso corpóreo (g)		
		Inicial	Final	Ganho
Iniciados				
(G1) DMH	12	240,0 ± 10,50	486,50 ± 54,44	245,58 ± 46,54
(G2) DMH + heme	12	237,67 ± 25,31	482,50 ± 55,25	254,83 ± 46,71
(G3) DMH + heme + I3C	12	239,83 ± 19,38	486,08 ± 50,13	246,25 ± 43,46
(G4) DMH + heme + simb	12	233,33 ± 16,48	475,92 ± 36,55	242,58 ± 42,87
(G5) DMH + heme + I3C + simb	12	248,08 ± 13,22	477,08 ± 37,86	229,00 ± 43,28
(G6) DMH + I3C	12	239,58 ± 22,17	490,67 ± 42,98	251,08 ± 43,10
(G7) DMH + simb	12	246,75 ± 16,78	503,33 ± 38,07	256,58 ± 47,49
(G8) DMH + I3C + simb	12	243,42 ± 17,23	511,92 ± 44,98	258,50 ± 55,44
Não-iniciado				
(G9) Controle	05	243,60 ± 19,83	472,00 ± 66,67	228,40 ± 66,67

¹Dados estão expressos na forma de média ± desvio-padrão; ² DMH= 1,2-dimetilhidrazina (4 x 40mg/kg, sc); I3C = Indol 3-carbinol (1g/kg de ração), simb =(inulina – 5% + *Bifidobacterium lactis* Bb-12, 2,5 x 10¹⁰ UFC/kg de ração). Teste estatístico ANOVA.

Na Tabela 3 estão apresentados os valores de média e desvio padrão do consumo de ração nos diferentes grupos experimentais ao longo do experimento. Foi observado aumento significativo ($p=0,001$) no consumo de ração do grupo que recebeu I3C+simbiótico (G8) quando comparado com o grupo que recebeu ração padrão (G1). Aumento significativo ($p=0,001$) no consumo de ração foi observado também no grupo que recebeu heme+I3C (G3) quando comparado ao grupo que recebeu heme (G2). Os grupos que receberam heme+I3C (G3) e heme+simbiótico (G4), apresentaram maior ingestão de água ($p=0,001$) quando comparado ao grupo que recebeu heme (G2).

Tabela 3 – Consumo de água, ração dos animais dos diferentes grupos ao longo do período experimental. ¹

Grupos/tratamento ²	Nº. de Animais	Consumo	
		Ração (g)	Água (ml)
Iniciados			
(G1) DMH	12	22,57 ± 2,59	31,81 ± 3,53
(G2) DMH + heme	12	22,06 ± 2,11	29,93 ± 2,25
(G3) DMH + heme + I3C	12	23,86 ± 2,50 ^b	35,20 ± 2,74 ^b
(G4) DMH + heme + simb	12	23,50 ± 2,36	35,25 ± 3,91 ^b
(G5) DMH + heme + I3C +simb	12	24,48 ± 2,38	34,18 ± 2,95
(G6) DMH + I3C	12	22,97 ± 2,12	35,19 ± 3,60
(G7) DMH + simb	12	23,39 ± 2,31	33,56 ± 2,79
(G8) DMH + I3C + simb	12	26,94 ± 2,20 ^a	35,97 ± 3,07
Não-iniciado			
(G9) Controle	05	22,27 ± 3,49	34,30 ± 3,65

¹Dados estão expressos na forma de média ± desvio-padrão; ²DMH= 1,2-dimetilhidrazina (4 x 40 mg/kg, sc); I3C = Indol-3-carbinol (1g/kg de ração), simb=(inulina- 5% +*Bifidobacterium lactis* Bb-12, 2,5 x 10¹⁰ UFC/kg de ração). ^{a, b} diferentes dos grupos G1 e G2 respectivamente, 0,05 < p < 0,001. Teste estatístico ANOVA

3.3.Focos de criptas aberrantes (FCA)

Na Tabela 4 estão apresentados os valores de média e desvio padrão dos dados FCA totais, CA totais, e a média de FCA com até 3, 4 a 9 e > 9 criptas aberrantes por cm² de cólon. Observamos aumento significativo no número médio de CA total no grupo que recebeu heme (G2) quando comparado ao grupo que recebeu ração basal (G1). Redução significativa (0,005 < p < 0,007)

foi observada no número médio de criptas aberrantes totais no grupo que recebeu heme+I3C (G3) e heme+simbiótico (G4) quando comparado ao grupo que recebeu heme (G2). O número de FCAs totais com ≥ 9 criptas aberrantes foi significativamente menor ($p=0,02$) no grupo que recebeu heme+simbiótico (G4) quando comparado ao grupo que recebeu heme (G2). Não foi encontrado nenhum FCA no grupo que recebeu ração basal (G9). As figuras 3A e 3B representam FCAs corados com azul de metileno na montagem total do cólon, com 11 e 29 criptas aberrantes, respectivamente.

Tabela 4 - Efeitos das dietas contendo heme, I3C e simbióticos e suas associações sobre o desenvolvimento de focos de criptas aberrantes (FCA) induzidas pela DMH no cólon de ratos Wistar machos.¹

Grupos/ tratamento ²	Nº de ratos	Número de criptas aberrantes por FCA				
		1-3 criptas	4-9 criptas	≥9 criptas	CA ³	FCA
(G1)DMH	12	15,30 ± 8,86	19,03 ± 8,91	2,48±2,29	5,10±1,63	36,97±14,93
(G2)DMH+Heme	12	22,71 ± 11,60	21,90 ± 16,57	7,08±3,71	7,84±2,05 ^a	51,70±18,37
(G3)DMH+Heme+I3C	12	10,45 ± 5,90	12,64 ± 5,52	3,87±3,89	5,93±1,78 ^b	26,98±9,79
(G4)DMH+Heme+Simb	12	15,51 ± 9,29	13,94 ± 9,10	2,33±3,97 ^b	5,29±1,66 ^b	35,73±17,52
(G5)DMH+ Heme+I3C+Simb	12	18,61 ± 5,88	23,98 ± 11,59	4,27±2,99	4,72±1,55	45,16±13,55
(G6) DMH+I3C	12	16,00 ± 7,40	16,86 ± 7,23	4,88±3,63	6,67±1,89	37,75±14,42
(G7)DMH+Simb	12	22,53 ± 17,58	15,59 ± 7,83	1,86±2,07	4,63±1,53	39,99±21,35
(G8)DMH+I3C+Simb	12	16,25 ± 6,24	17,59 ± 7,32	3,44±3,32	4,71±1,55	37,29±11,57

¹Dados estão expressos na forma de média ±desvio-padrão por cm²; ² DMH= 1,2-dimetilhidrazina (4 x 40 mg/kg, sc); I-3-C – Indol-3-carbinol (1g/kg de ração), simb – (inulina – 5% + *Bifidobacterium lactis* Bb-12, 2,5 x 10¹⁰ UFC/kg de ração); ³CA= criptas aberrantes . ^{a,b} Diferente de G1 e G2 respectivamente, 0,0058<p< 0,04, Teste estatístico Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn's após ajuste de *Poisson*.

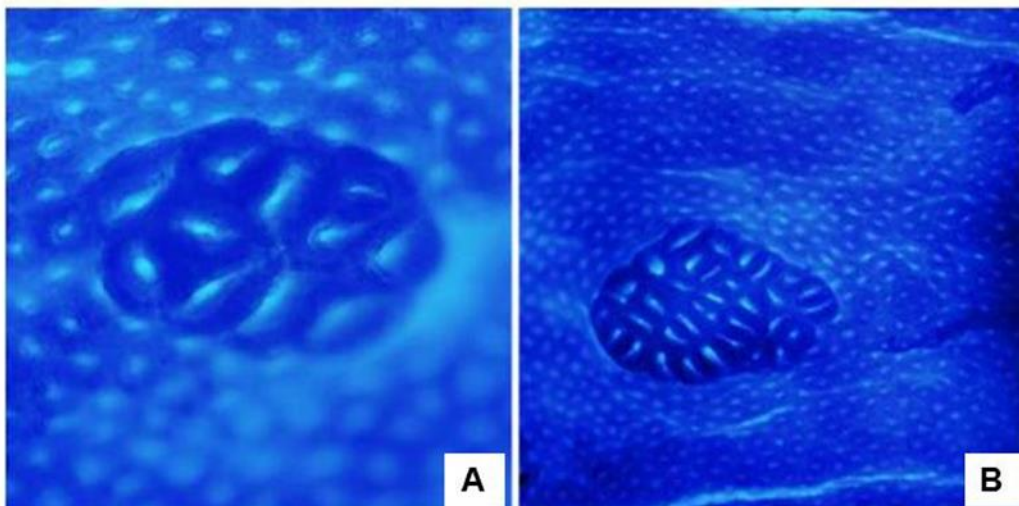


Figura 3 – Focos de criptas aberrantes (FCA) identificados pela coloração de azul de metileno: A) FCA com 11 criptas; B) FCA com 29 criptas. Objetiva de 10 x e 4x, respectivamente.

3.4. Histopatologia do cólon

Na Figura 4 estão apresentadas duas fotomicrografias representativas, de um FCA convencional (Figura 4 A) e um FCA displásico (Figura 4 B). Na Tabela 5 estão apresentadas as porcentagens de FCA displásicos e a incidência (número de animais com FCA displásico) dos mesmos em cada grupo experimental. A incidência e a quantidade de FCA displásicos foi semelhante entre os diferentes tratamentos. Não foi encontrado nenhum FCA nos cortes histológicos) no grupo que recebeu somente ração padrão (G9).

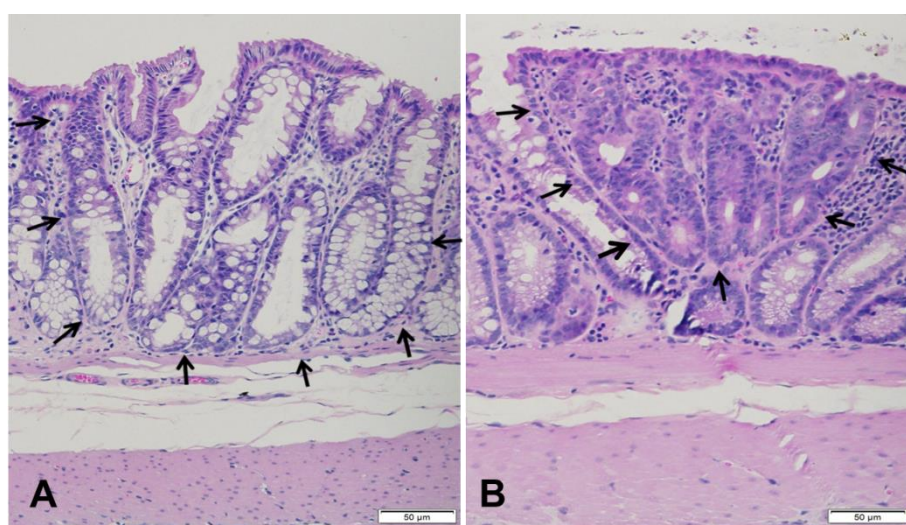


Figura 4 - Cortes histológicos corados em HE mostrando focos de criptas aberrantes. (A) FCA não-displásico e (B) FCA displásico. Setas indicam os limites das lesões. Objetiva de 20x.

Tabela 5- Efeitos das dietas contendo heme, I3C e simbióticos e suas associações sobre o desenvolvimento de FCA displásicos induzidos pela DMH no cólon de ratos Wistar.

Grupos/ tratamento ¹	Nº de ratos	FCA displásicos(%)	Incidência(%)
(G1) DMH	12	24 (75)	73
(G2) DMH+Heme	12	25 (110)	91
(G3) DMH+Heme+I3C	12	23 (88)	83
(G4) DMH+Heme+Simb	12	30 (88)	92
(G5) DMH+Heme+I3C+Simb	12	24 (103)	100
(G6) DMH+I3C	12	18 (103)	55
(G7) DMH+Simb	12	12 (80)	58
(G8) DMH+I3C+Simb	12	18 (98)	67

Dados estão expressos na forma de porcentagem. ¹DMH= 1,2-dimetilhidrazina (4 x 40 mg/kg, sc); I3C – Indol 3-carbinol (1g/kg de ração), simb: (inulina 5% + *Bifidobacterium lactis* Bb-12, 2,5 x 10¹⁰ UFC/kg de ração. FCA displásicos: % ()total de focos: convencionais e displásicos. Incidência: % de animais com FCA displásico, . Teste estatístico Qui-quadrado.

3.5. Análise macroscópica e microscópica dos tumores

A Figura 5 representa o gráfico com as porcentagens dos tumores analisados macroscopicamente em cada grupo experimental dentro de cada categoria de volume. Houve aumento significativo ($0,002 < p < 0,05$) nos tumores $\geq 60 \text{ mm}^3$ no grupo que recebeu heme+I3C+simbiótico (G5) quando comparados ao grupo que recebeu heme (G2). A Tabela 6 apresenta os dados de incidência, multiplicidade total e multiplicidade de tumores invasivos e não-invasivos nos diferentes grupos experimentais. Houve aumento significativo ($p < 0,001$) no número médio de tumores invasivos por rato no grupo que recebeu heme+I3C+simbiótico (G5) quando comparado ao grupo que recebeu heme (G2).

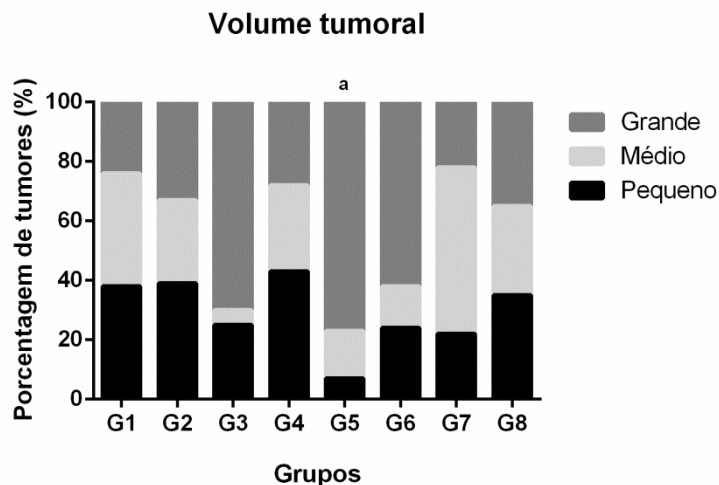


Figura 5 – Dados de tamanho dos tumor (mm^3), representados em porcentagem, no cólon dos animais dos diferentes grupos experimentais. G1=DMH, G2= DMH+heme, G3=DMH+heme+I3C, G4=DMH+heme+simbiótico, G5=DMH+I3C+simbiótico, G6=DMH+I3C, G7=DMH+simbiótico, G8=DMH+I3C+simbiótico. DMH= 1,2 dimetilhidrazina (40x40 mg/kg, s.c.), heme (0,5mmol/kg), I3C (0,01%), simbiótico (5% inulina+*Bifidobacterium lactis* Bb-12, $2,5 \times 10$ UFC). Pequeno: $\leq 0,30 \text{ mm}^3$; Médio: $0,30 - 0,60 \text{ mm}^3$, Grande $\geq 0,60 \text{ mm}^3$. ^aDiferente do grupo G2 para os tumores grandes, $p= 0,02$. Teste estatístico Qui-quadrado.

Tabela 6 - Efeitos da dieta contendo heme, I3C e simbióticos sobre o desenvolvimento de tumores colônicos induzidos pela DMH no cólon de ratos Wistar¹.

Grupos/ tratamento ²	Nº de ratos	Incidência	Multiplicidade		
			Invasivos	Não-invasivos	Total
(G1)DMH	12	8 (67)	2,00 ± 1,41	1,0 ± 0,00	2,0±1,41
(G2)DMH+Heme	12	10 (83)	1,25 ± 0,50	1,3 ± 0,48	2,6±1,07
(G3)DMH+Heme+I3C	12	11 (92)	2,83 ± 2,22	1,25 ± 0,46	3,5±2,16
(G4)DMH+Heme+Simb	12	10 (83)	2,25 ± 1,89	1,75 ± 1,03	3,2±1,81
(G5)DMH+Heme+I3C +Simb	12	12 (100)	4,90 ± 3,30 ^a	1,20 ± 0,44	6,2±3,56
(G6)DMH+I3C	12	11 (92)	2,00 ± 1,54	1,83 ± 1,32	3,1±2,66
(G7)DMH+Simb	12	12 (100)	1,00 ± 0,00	1,25 ± 0,70	1,8±1,03
(G8)DMH+I3C+Simb	12	11 (92)	2,12 ± 2,10	1,12 ± 0,35	3,2±1,94

¹Dados estão expressos na forma de média ±desvio-padrão; ² DMH= 1,2-dimetilhidrazina (4 x 40 mg/kg, sc); I3C – Indol 3-carbinol (1g/kg de ração), simb – (inulina – 5% + *Bifidobacterium lactis* Bb-12, 2,5 x 10¹⁰ UFC/kg de ração); ^a Diferente do grupo G2, p<0,001. Teste estatístico de Kruskal-wallis seguido por Dunn's.

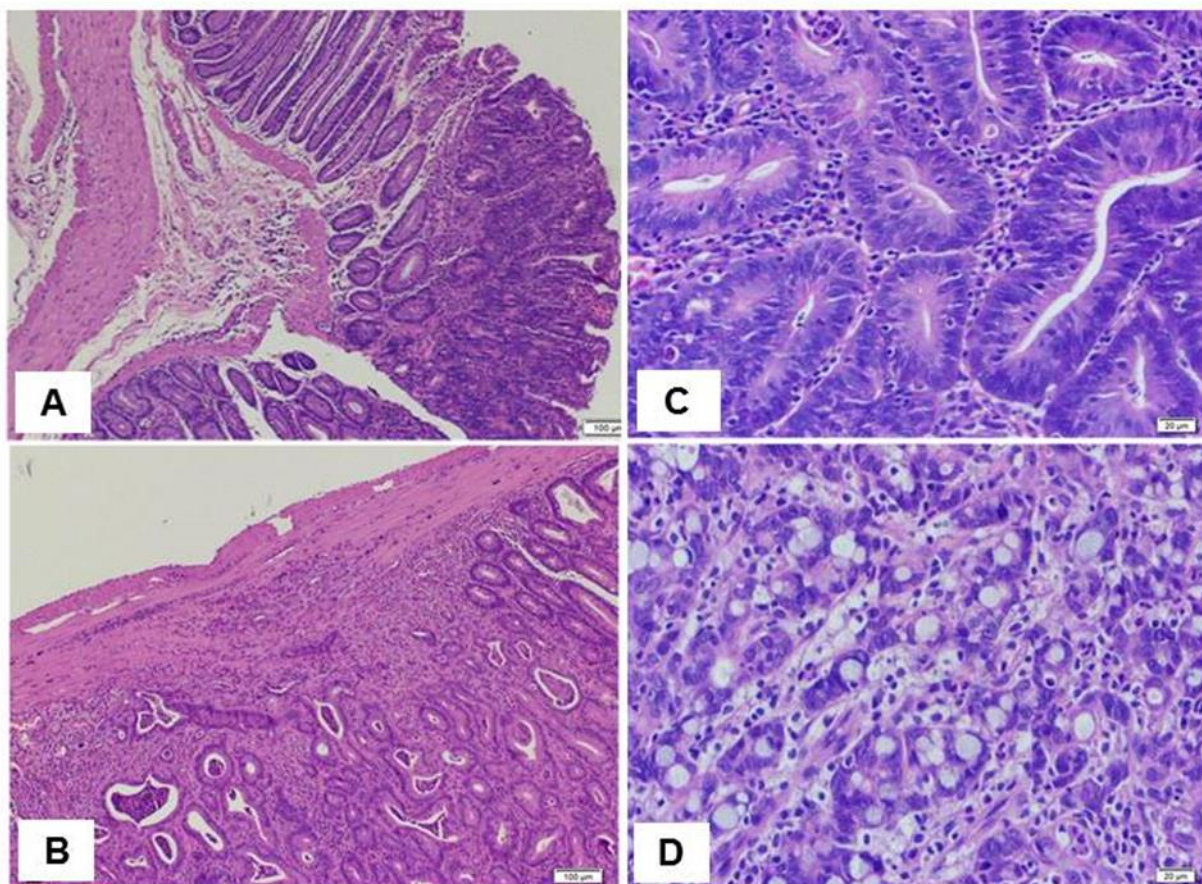


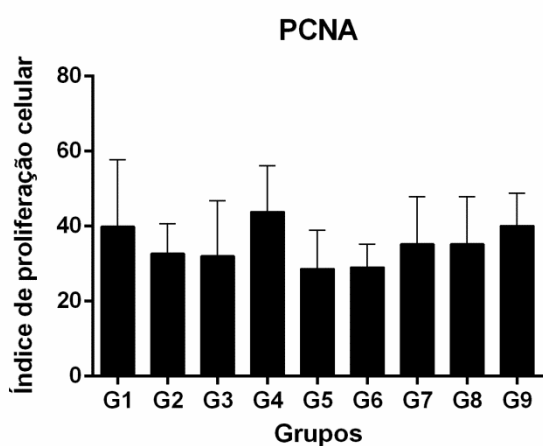
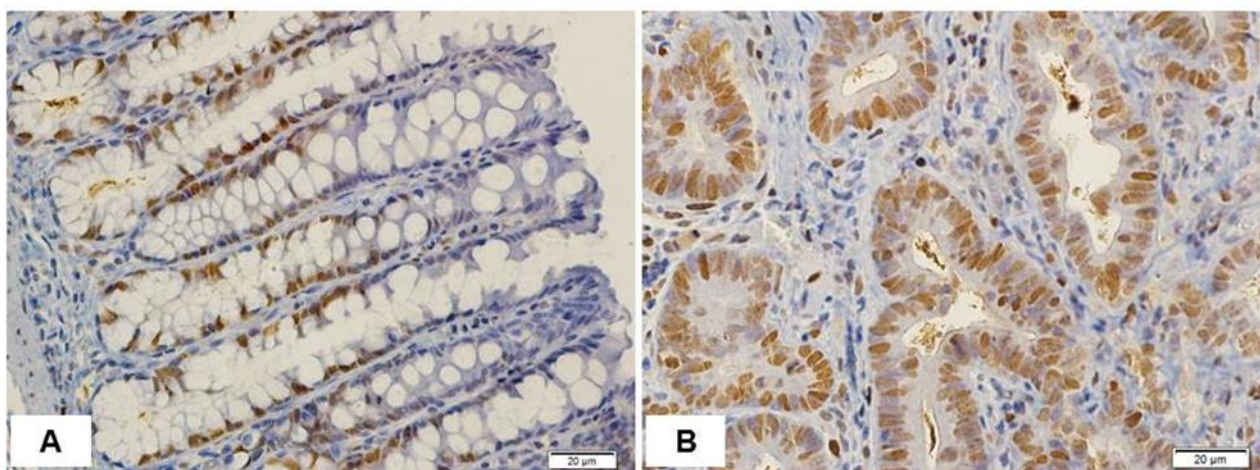
Figura 6 – Cortes histológicas coradas em HE de tumores de cólon. (A) tumor não-invasivo (grupo G4), (B) tumor invasivo (grupo G1), objetiva de 10x. (C) padrão morfológico tubular, (D) padrão morfológico mucinoso, objetiva de 40x.

3.6. Proliferação celular, apoptose e acúmulo de β -catenina

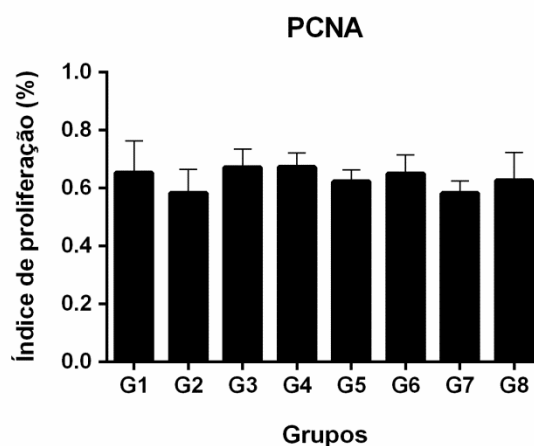
A análise de proliferação celular pela marcação imunistoquímica do PCNA e de apoptose pela marcação imunistoquímica da caspase-3 clivada foi realizada em criptas de aparência normal (Figura 7A e 8A) e em tumores colônicos (Figura 7B e 8B). Os índices de proliferação celular tanto em criptas normais como em tumores foram semelhantes entre os diferentes tratamentos (Figura 7C e 7D). Entretanto, os índices de proliferação celular foram significativamente maiores nos tumores que nas criptas colônicas.

Quanto ao índice de apoptose não houve diferença estatisticamente significativa tanto em criptas colônicas como em tumores (Figura 8C e 8D). A expressão de β -catenina foi avaliada em 7 tumores por grupo em média e foi observada a presença de marcação nuclear (Figura 9A e 9B). Observamos 100% no grupo G1 (DMH), 83% no grupo G2 (DMH+heme); 71% G3 (DMH+heme+I3C); 62,5% no grupo G4 (DMH+heme+simbiótico); 87,5% no grupo G5 (DMH+heme+I3C+simbiótico); 71% no grupo G6 (DMH+I3C); 80% no grupo G7 (DMH+simbiótico); 75% no grupo G8 (DMH+I3C+simbiótico). A análise da e-caderina foi avaliada

em 5 animais por grupo e foram quantificados os tumores que apresentavam marcação negativa. Observou-se 0% no grupo G1 (DMH), 0% no grupo G2 (DMH+heme); 20% no grupo G3 (DMH+heme+I3C); 20% no grupo G4 (DMH+heme+simbiótico); 20% no grupo G5 (DMH+heme+I3C+simbiótico); 40% no grupo G6 (DMH+I3C); 0% no grupo G7 (DMH+simbiótico); 40% no grupo G8 (DMH+I3C+simbiótico), não houve diferença estatística entre os grupos para as duas proteínas analisadas, pelo teste do Qui-quadrado.

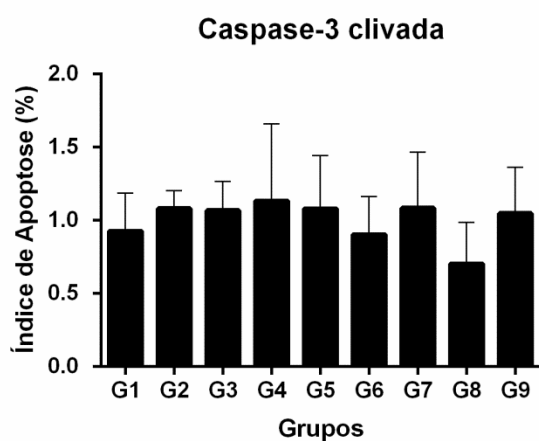
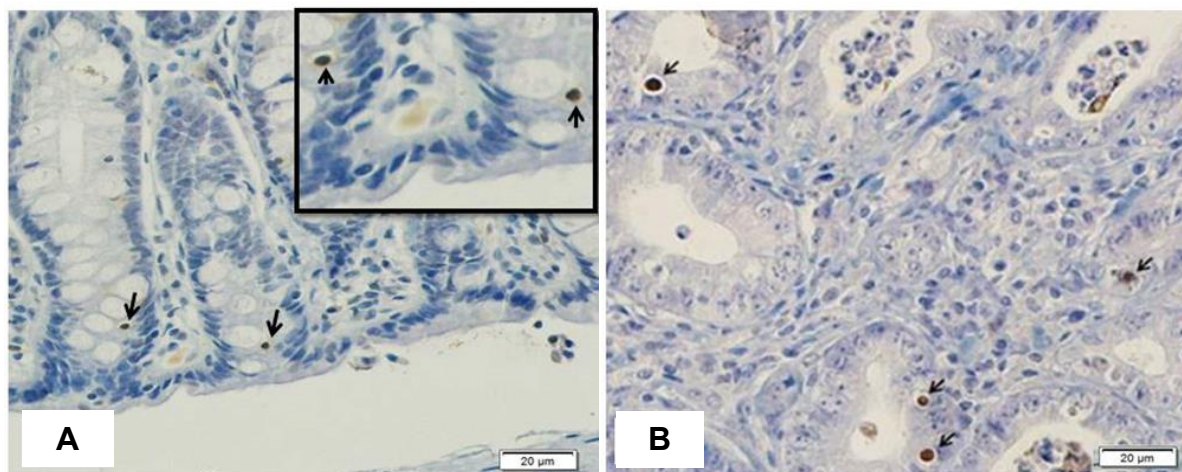


C

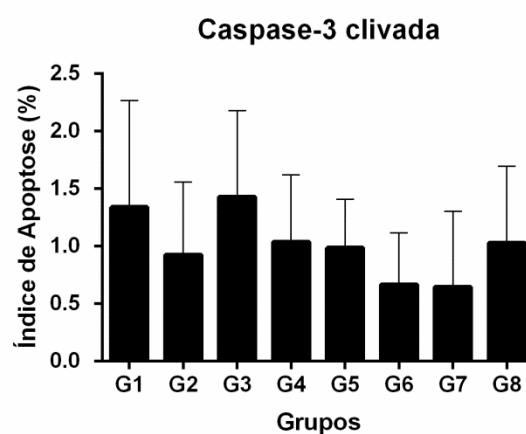


D

Figura 7 – (A e B): Marcação imunoistoquímica em criptas de aparência normal e tumores, respectivamente, para PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular, objetiva de 40x. (C e D): Índices de células em proliferação em criptas colônicas e tumores, respectivamente. G1= DMH; G2= DMH+heme; G3= DMH+heme+I3C; G4= DMH+heme+simbiótico; G5= DMH+heme+I3C+simbiótico; G6= DMH+I3C; G7= DMH+simbiótico; G8= DMH+I3C+simbiótico; G9= Basal. DMH= 1,2-dimetilhidrazina (4 x 40 mg/kg, sc); I3C – Indol 3-carbinol (1g/kg de ração), simb – (inulina – 5% + *Bifidobacterium lactis* Bb-12, 2,5 x 10¹⁰ UFC/kg de ração). Teste estatístico ANOVA.



C



D

Figura 8 – (A e B): Marcação imunoistoquímica em criptas de aparência normal e tumores, respectivamente, para PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular, objetiva de 40x. (C e D): Índices de células em proliferação em criptas colônica e tumores, respectivamente. G1= DMH; G2= DMH+heme; G3= DMH+heme+I3C; G4= DMH+heme+simbiótico; G5= DMH+heme+I3C+simbiótico; G6= DMH+I3C; G7= DMH+simbiótico; G8= DMH+I3C+simbiótico; G9= Basal. DMH= 1,2-dimetilhidrazina (4 x 40 mg/kg, sc); I3C – Indol 3-carbinol (1g/kg de ração), simb – (inulina – 5% + *Bifidobacterium lactis* Bb-12, 2,5 x 10¹⁰ UFC/kg de ração). Teste estatístico ANOVA.

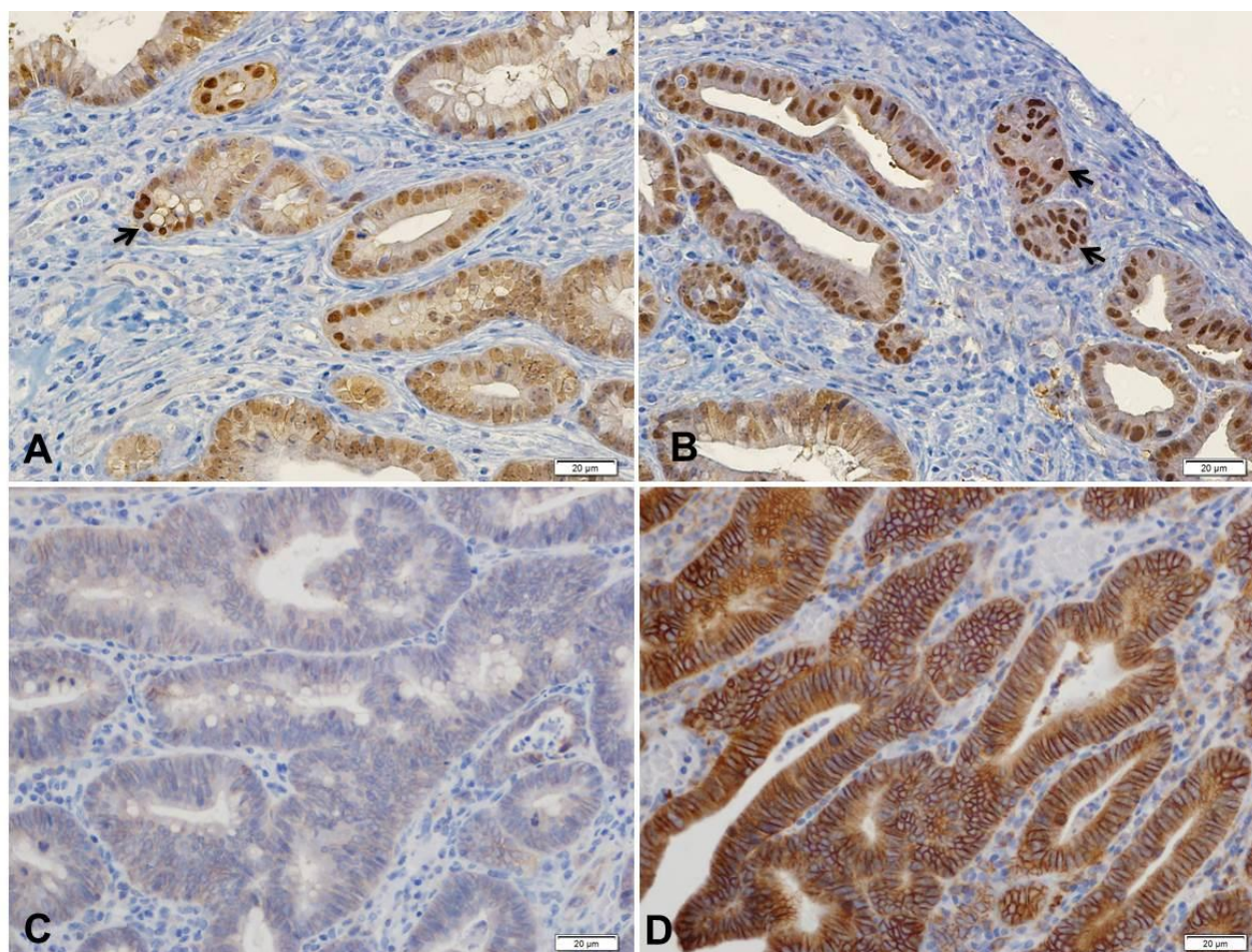


Figura 9 –Marcação imunoistoquímica para β -catenina e e-caderina em tumores. (A e B) expressão de membrana e citoplasma e acúmulo nuclear (indicado pelas setas). (C) Expressão negativa da E-caderina. (D) expressão normal da E-caderina (marcação de membrana) Objetiva 40x.

3.7. Expressão gênica e protéica

A Figura 10 apresenta os gráficos dos genes diferencialmente expressos acompanhados da respectiva expressão protéica representativa entre os diferentes grupos, esses genes estão diretamente relacionados com os achados histopatológicos do tumores. No **Anexo 4** estão representados os demais genes com expressão diferencial nos quais não estavam diretamente relacionados com esses achados.

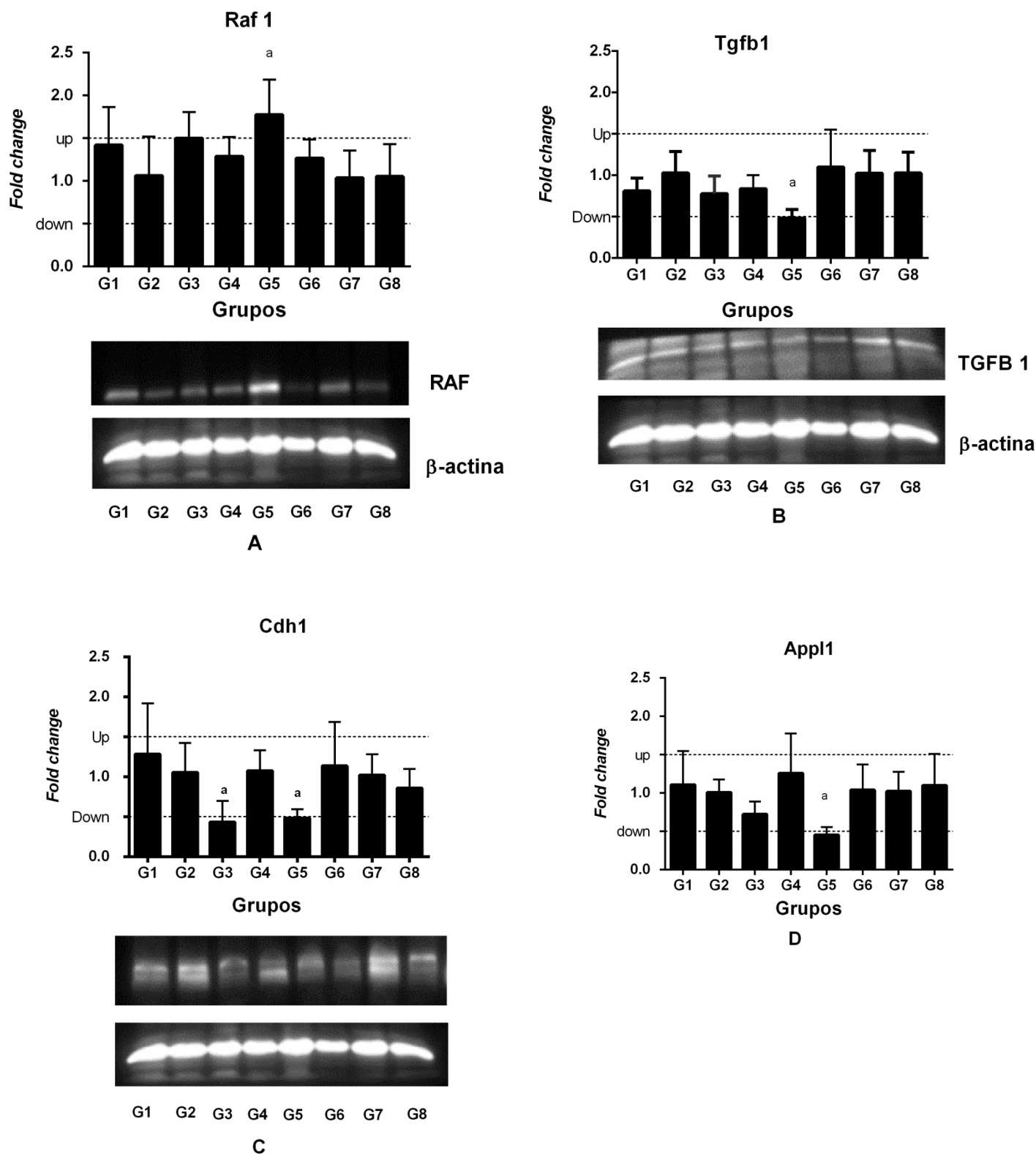


Figura 10 – Expressão gênica relativa nos diferentes grupos experimentais. (A, B e C), expressão relativa dos genes Raf1, Tgfb1, Cdh1 acompanhado da figura representativa da expressão das proteínas RAF1, TGFB e e-caderina, respectivamente. (D) expressão relativa do gene Appl1. G1= DMH; G2= DMH+heme; G3= DMH+heme+I3C; G4= DMH+heme+simbiótico; G5= DMH+heme+I3C+simbiótico; G6= DMH+I3C; G7= DMH+simbiótico; G8= DMH+I3C+simbiótico; G9= Basal. DMH= 1,2-dimetilhidrazina (4 x 40 mg/kg, sc); I3C – Indol 3-carbinol (1g/kg de ração), simb – (inulina – 5% + *Bifidobacterium lactis* Bb-12, 2,5 x 10¹⁰ UFC/kg de ração).

3.8. Citotoxicidade da água fecal

Como observado na Figura 10, o teste do MTT revelou uma maior viabilidade das células expostas DPBS (controle do teste) quando comparado aos demais grupos. Foi observado uma viabilidade significativamente menor nas células expostas à água fecal do grupo tratado com heme (G2) quando comparado com o grupo que recebeu ração basal (G1), $p \leq 0,001$. Aumento significativo na viabilidade foi observado no grupo que recebeu heme+I3C quando comparado ao seu controle G2, $p \leq 0,001$.

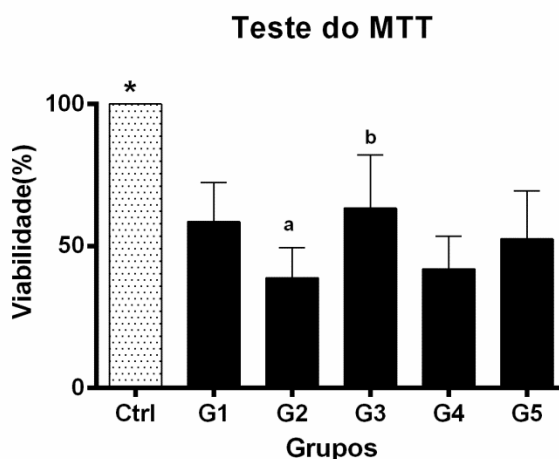


Figura 11 - Análise de citotoxicidade pelo teste do MTT. G1 = DMH + ração basal; G2 = DMH + heme; G3 = DMH + heme + indol-3-carbinol; G4 = DMH + heme + simbiótico; G5 = DMH + heme + simbiótico + indol-3-carbinol. Ctrl = Controle (DPBS) * Diferente dos demais. ^{a e b} Diferente de G1 e G2, respectivamente. $P \leq 0,001$. Teste estatístico Anova seguido de Holm-Sidak.

3.9. Genotoxicidade da água fecal

A Figura 11 representa micrografias representativas dos padrões de danos de DNA utilizados na análise do teste do cometa. Foi observado aumento significativo no parâmetro momento da cauda no grupo que recebeu heme (G2), quando comparado ao grupo que recebeu apenas ração padrão (G1). Quando comparado ao grupo que recebeu heme (G2) observou-se redução significativa da genotoxicidade da água fecal dos grupos que receberam heme+I3C (G3) e heme+simbiótico (G4), no entanto, houve aumento significativo na genotoxicidade induzida pela água fecal do grupo que recebeu heme+I3C+simbiótico (G5), $p \leq 0,001$.

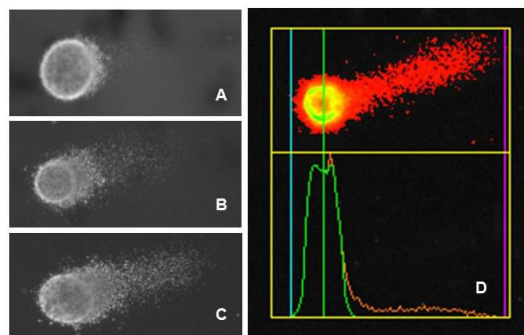


Figura 12 - Micrografias dos cometas representativos, corados com SyberGold® e visualizados em microscopia de fluorescência (A, B,C) micrografia representativa do comprimento da cauda dos diferentes tipos de danos, (D) Cometa representativo da forma de análise. Objetiva de 20x.

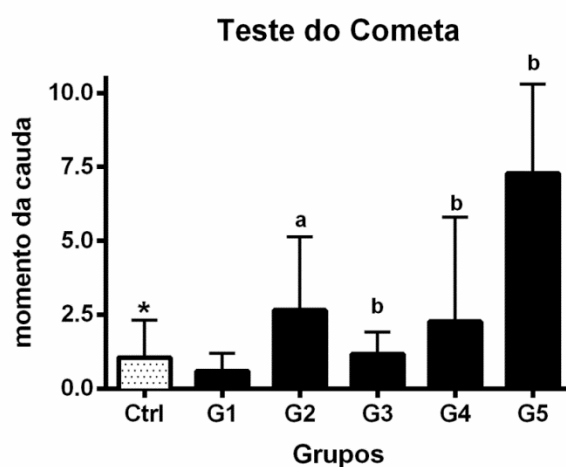


Figura 13 - Análise de genotoxicidade pelo teste do cometa, para o parâmetro momento da cauda. G1 = DMH + ração basal; G2 = DMH + heme; G3 = DMH + heme + indol-3-carbinol; G4 = DMH + heme + simbiótico; G5 = DMH + heme + simbiótico + indol-3-carbinol. Ctrl = Controle (DPBS)*diferente de G1,G2,G4 e G5. ^{a e b} Diferente de G1 e G2, respectivamente. $P \leq 0,001$. Teste estatístico de Kruskal-Wallis seguido de Tukey.

4. Discussão

O ferro heme, componente da hemoglobina e mioglobina, presente em abundância na carne vermelha, ao ser ingerido é liberado através da hidrólise da hemoglobina/mioglobina por enzimas proteolíticas do suco gástrico. O heme é absorvido do lúmen intestinal pelos enterócitos de forma controlada a fim de atender às necessidades de ferro do organismo, sem causar toxicidade celular (Oates & West, 2006; Hooda, *et al.*, 2014). A porção não absorvida e livre no lúmen pode catalisar reações que geram produtos genotóxicos e mutagênicos (Bastide *et al.*, 2011). Estudos em roedores têm demonstrado que a ingestão de heme, associado à dietas ocidentais e/ou com dietas com níveis baixos de cálcio, exerce efeito promotor sobre a carcinogênese de cólon (Sesink *et al.*, 1999; Pierre *et al.*, 2003; de Vogel *et al.*, 2005; Allam *et al.*, 2011). Entretanto, os resultados do presente estudo

indicam que a ingestão de heme acarretou em fraca atividade promotora para o desenvolvimento de FCAs e tumores colônicos induzidos pela DMH.

Os resultados dos estudos experimentais indicam que a peroxidação lipídica é um dos principais mecanismos que explicam o efeito promotor do heme sobre a carcinogênese colônica (Sesink *et al.*, 1999, de Vogel *et al.*, 2005; Bastide *et al.*, 2015). A oxidação de gorduras poliinsaturadas resulta em malondialdeído (MDA) que pode reagir com DNA e formar adutos, com potencial para indução de mutações (Marnett *et al.*, 1999, Bastide *et al.*, 2011). No entanto, alguns pesquisadores já demonstraram a ação de alguns compostos que são capazes de inibir essas reações catalisadas pelo heme. Dietas suplementadas com extrato de espinafre, clorofila ou altos níveis de cálcio foram capazes de reduzir os níveis de peroxidação lipídica e consequentemente prevenir a citotoxicidade e hiperproliferação celular no cólon de roedores induzidas pela ingestão do heme. (Pierre *et al.*, 2003; 2008; de Vogel *et al.*, 2005; Allam *et al.*, 2011).

A hipótese do nosso estudo era a de que o indol-3-carbinol e/ou simbiótico associado ao heme, em dieta com níveis normais de cálcio, exerceriam efeito protetor contra lesões pré-neoplásicas e tumores em ratos Wistar, atuando portanto sobre as etapas de promoção e progressão da carcinogênese colônica induzida pela DMH.

Os resultados de imunohistoquímica em criptas colônicas para o marcador PCNA e caspase-3 clivada revelaram que os tratamentos não alteraram as taxas de proliferação celular nem de apoptose nas células das criptas colônicas de morfologia normal.

A suplementação com 0,5 mmol/kg de heme na ração não resultou em hiperproliferação das células epiteliais das criptas colônicas ao final da 25^a semana, nas condições experimentais adotadas. Contrariamente, de Volgel *et al.*, 2005 em estudo com ratos Wistar alimentados com dieta com baixos níveis de cálcio e suplementada com 0,5mmol/kg de heme na ração por 14 dias, observaram aumento de citotoxicidade da água fecal e hiperproliferação dos colonócitos. Ijssennagger *et al.*, 2012 em um estudo com camundongos C57Bl6/J alimentados com dieta ocidental contendo 0,5µmol/g de heme por 14 dias também observaram hiperproliferação e redução dos níveis de apoptose, resultando em hiperplasia das criptas colônicas. De acordo com Ijssennagger *et al.*, 2013, 0,2 µmol/g de heme associada à dieta do tipo ocidental por 14 dias causou hiperproliferação das células epiteliais da mucosa colônica de camundongos C57Bl6/J. As células da superfície da mucosa colônica que estão em constante contato com os compostos presentes no lúmen podem sofrer danos celulares e entrar em apoptose precocemente o que faz com que se inicie uma resposta proliferativa compensatória para manter a homeostase das células epiteliais da cripta. Todos esses estudos anteriores são de exposições ao heme de curta-duração (no máximo duas semanas) e associados às dietas do tipo ocidental ou com baixos níveis de cálcio (Pierre *et al.*, 2003; Allam *et al.*, 2011; Ijssennagger, *et al.*, 2012, 2013). Pierre *et al.*, 2003, demonstraram que o cálcio é um inibidor dos

efeitos deletérios provocados pelo excesso de heme. O fosfato de cálcio é capaz de precipitar o heme livre no lúmen, dessa forma, ele é encontrado em altas concentrações nas fezes, mas apresenta-se insolúvel na água fecal. Desta forma, não há formação de produtos de peroxidação lipídica e nem atividade citolítica, o que resultaria em redução de proliferação celular colônica.

Em nosso estudo utilizamos dieta com níveis normais de cálcio e concluímos que a ingestão de 0,5 mmol/kg de heme por 23 semanas não alterou o *turnover* das células epiteliais das criptas colônicas. Observamos uma redução dos efeitos do heme sobre o epitélio colônico, quando comparamos aos demais estudos que avaliaram os efeitos do heme associado à dieta com baixos níveis de cálcio, com isso confirmamos que o cálcio é preponderante em relação à ação do heme. Somado a isso, deve-se levar em consideração o tempo de exposição ao heme como agente irritante sobre as células da mucosa que pode ter levado a uma adaptação das células frente a esse insulto. Em condições de *stress* as células desencadeiam respostas de resistência ou ativam sinais de morte celular (Fulda et al., 2010). Vários são os mecanismos envolvidos na sinalização de morte celular, não se sabe ao certo qual a duração ou nível de *stress* são necessários para esse mecanismo ser ativado. Já se sabe que as células podem se adaptar a certos níveis de insulto e se tornarem mais resistentes ao *stress* no meio (Fulda et al., 2010). Esse resultado corrobora com os achados de Winter e colaboradores (2014) que avaliaram os efeitos da ingestão de 0,2 µmol/g de heme na ração (dose similar à concentração em dieta humana com alto consumo de carne vermelha), associado a dieta do tipo ocidental, em camundongos C57Bl6/J em ensaio de curta duração (4 semanas) e em ensaio de longa duração (18 meses) em modelo de CCR espontâneo. No ensaio de curta duração foi observado aumento de proliferação nas células das criptas colônicas dos animais que receberam heme quando comparado ao grupo controle, o que está de acordo com os estudos de curto prazo, enquanto no ensaio de longa duração não houve alteração nos índices de proliferação nem de apoptose no cólon dos camundongos que receberam dieta suplementada com heme. No entanto observamos efeito citotóxico e genotóxico na água fecal, dos animais que receberam heme, sobre as células da linhagem Caco-2.

Nos estudos de curta duração de exposição ao heme a atividade citolítica da água fecal é considerada a responsável pela alteração no *turnover* das células epiteliais da mucosa do cólon dos roedores (Pierre et al., 2003, de Vogel et al., 2005). No entanto, não observamos relação entre a atividade citolítica da água fecal e alteração da homeostase das células epiteliais colônicas dos animais expostos, podendo indicar que a exposição aguda das células Caco-2 à água fecal induz citotoxicidade a qual não foi relacionada com alteração na proliferação celular nas criptas colônicas dos roedores expostos cronicamente a longo prazo, indicando um possível efeito bifásico.

Por outro lado, nossos resultados apontaram um efeito promotor discreto do heme com diferença estatística para os valores de criptas aberrantes (CA) totais. Assim como demonstrado por

Pierre *et al.*, 2003, esse efeito pode ser atribuído à maior citotoxicidade e genotoxicidade da água fecal. Já os tratamentos com I3C associado ao heme apresentou efeito protetor apenas no parâmetro CA total e o tratamento com simbiótico associado ao heme apresentou efeito protetor sobre as CA totais e nos focos de criptas aberrantes (FCA) com ≥ 9 CA, o que foi acompanhado pela redução de citotoxicidade e genotoxicidade da água fecal nesses grupos, o que pode nos indicar que ação dos compostos sobre os FCAs está relacionado com a citotoxicidade e genotoxicidade da água fecal. Bonnesen *et al.*, 2001 e Weng *et al.*, 2008 demonstraram que o I3C foi capaz de proteger contra danos e formação de adutos em linhagens de células tumorais de cólon, enquanto Plate & Gallaher, 2006 observaram redução da incidência FCA em ratos Wistar após a ingestão de 1,36 mmols I3C/kg na dieta. Quanto aos simbióticos, alguns autores já demonstraram que eles são capazes de modular a microflora colônica. Em humanos a dieta rica em carne vermelha aumenta *Bacteroides spp.*, e o consumo de simbióticos contribui para o aumento das bactérias probióticas principalmente *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (Le Leu *et al.*, 2015). Esses microorganismos produzem AGCC que faz com que ocorra diminuição do pH do meio e, conseqüentemente, a diminuição de toxinas e compostos genotóxicos no lúmen do cólon (Pool-Zobel, 2005; de Preter, *et al.*, 2011; Valdovinos-Díaz, 2013).

Em nosso estudo, observamos resultado semelhante ao de Winter *et al.*, 2014 quanto a incidência de tumores. Os animais que receberam dieta suplementada com heme não apresentaram aumento significativo na incidência ou multiplicidade de tumores quando comparados ao grupo controle. Dessa forma, o heme não foi se mostrou ser um forte promotor de tumores induzidos pela DMH, mesmo apresentando a água fecal com potencial genotóxico. No entanto, observamos aumento significativo no número de tumores considerados grandes (com mais de 60 mm³), bem como no número de tumores colônicos invasivos por animal no grupo que recebeu heme em associação com I3C e simbiótico (G5) e no grupo heme+I3C (G3), sem diferença estatística, quando comparado ao grupo controle heme (G2).

O resultado da análise de expressão gênica nos tumores do grupo que recebeu heme+I3C+simbiótico (G5) em relação ao grupo que recebeu heme (G2) mostrou que a associação desses compostos foi capaz de diminuir significativamente a expressão dos genes, *Cdh1*, *Tgfb1* e *App11* além de aumentar significativamente a expressão do oncogene *Raf1*. O gene *Cdh1* expresso numa variedade de tecidos tem importante função na arquitetura da célula epitelial normal e formação de tecidos. A proteína codificada por esse gene é vital para a manutenção da integridade das células e coesão dos tecidos, e considerado um gene supressor tumoral (Gall and Frampton, 2013; Roy, 2014). Estudos demonstram que a perda da expressão de *Cdh1* está associada com a progressão e invasividade tumoral (Berx & Roy, 2009, Kroepil *et al.*, 2012). Da mesma forma, observamos uma baixa expressão do gene *Tgfb1* que é capaz de induzir a expressão de colágenos

fibrilares pela redução da expressão da metaloproteinase-1, levando ao acúmulo de matriz extracelular (Kubiczkova *et al.*, 2012). Por outro lado, a baixa expressão desse gene leva ao aumento da motilidade celular por aumentar a expressão de enzimas proteolíticas que degradam a matriz extracelular, facilitando a invasão e metástases no contexto da tumorigênese (Skeen *et al.*, 2012; Kroepil *et al.*, 2012).

Os dados ainda revelaram uma baixa expressão do gene *Appl1* acompanhada pela alta expressão do gene *Raf1*. Broussard *et al.*, 2012 demonstrou em culturas de células HT1080 que quando o gene *Appl1* é deletado ocorre migração celular, o que poderia facilitar a invasão e metástases. Já o gene *Raf1* tem a capacidade de induzir a transformação maligna em células em cultura e sua superexpressão tem sido implicada em angiogênese, invasividade e metástase em tumores sólidos (Wellbrock *et al.*, 2004; Baccarini, 2005; Gollob *et al.*, 2006). Embora esses genes tenham tido uma expressão diferencial significativa ($FC > 1,5$) não tão elevada, no grupo que recebeu heme+I3C+simbiótico (G5) estes genes poderiam estar diretamente ligados à progressão, invasão e metástases, o que confirma os achados das análises macroscópicas e histopatológicas do cólon e a genotoxicidade da água fecal. Segundo Klinder *et al.*, 2014 a genotoxicidade da água fecal está diretamente relacionada com a incidência de tumores colônicos.

A ingestão de heme+I3C (G3), modulou negativamente a expressão do gene *Cdh1*, acompanhada do aumento significativo na expressão do gene *Tnf* o qual codifica uma citocina pró-inflamatória associada a progressão da carcinogênese colônica associada a colite (Popivanova *et al.*, 2008). O papel do I3C é controverso na carcinogênese de cólon, sendo que alguns estudos demonstraram efeito promotor desse composto na carcinogênese do cólon. Suziu *et al.*, 2005 observaram aumento da multiplicidade e volume tumoral em ratos F344 alimentados com 0,01 e 0,05% de I3C na dieta. Da mesma forma, Pence *et al.*, 1986 em estudo com ratos F344 concluiu que o I3C é um importante indutor tumoral. Portanto, a associação heme+I3C poderia explicar o de aumento de tumores nesse grupo, porém sem diferença estatística.

Nossos achados apontam claramente para um efeito sinérgico adverso entre os compostos, como evidenciado pela maior genotoxicidade da água fecal, aumento de volume e invasividade tumoral, expressão diferencial de genes envolvidos tanto na progressão tumoral como em potencial de invasão. Há estudos que demonstram efeito promotor do I3C sobre a carcinogênese de cólon. Outro estudo já demonstrou mutagenicidade do I3C na presença de nitrito em teste de Ames (Sasagawa & Matsushima, 1991). Porém, em nosso estudo observamos apenas um aumento aparente no volume tumoral no grupo que recebeu heme associado ao I3C (G3) quando comparado ao seu controle, mas quando associado também aos simbióticos observou-se diferença estatisticamente significativa na multiplicidade de tumores invasivos e na genotoxicidade da água fecal. Contrariamente à maioria dos estudos que mostram efeitos positivos dos simbióticos sobre a

carcinogênese colônica, alguns autores elucidaram alguns mecanismos quais os simbióticos podem favorecer a carcinogênese colônica cólon (i.e. a disbiose, a inflamação crônica e a produção de agentes genotóxicos produzidos por algumas bactérias) (Schwabe & Jobin, 2013). Observamos maior genotoxicidade na água fecal no grupo que recebeu heme, no entanto, no grupo que recebeu o heme+I3C+simbiótico houve um aumento pronunciado da genotoxicidade da água fecal, que poderia ter sido provocado pelo favorecimento do crescimento de bactérias patogênicas, levando a promoção tumoral. Estudos com animais *germ-free* demonstraram efeito promotor da microbiota em modelos de animais geneticamente modificados e induzidos quimicamente (Sacksteder, 1976). A microbiota é modulada principalmente pela dieta do hospedeiro e a ruptura da homeostase pode alterar a relação de simbiose entre os microorganismos e promover doenças, como o câncer, as genotoxinas produzidas por determinadas espécies de bactérias levam a danos no DNA das células de órgãos que estão em contato direto, além disso, ações metabólicas do microbioma podem resultar em ativação de genotoxinas como o acetaldeído e outros carcinógenos (Schwabe & Jobin, 2013).

Dessa forma, concluímos que o heme associado a uma dieta com níveis normais de cálcio não é um potente indutor de FCA, mas aumenta a citotoxicidade e genotoxicidade da água fecal, no entanto, o I3C e o simbiótico separados são capazes de prevenir alguns dos efeitos deletérios do heme. Contudo, a associação do heme com o I3C e simbiótico apresentou efeito aditivo/sinérgico o qual induziu genotoxicidade e promoveu a tumorigênese colônica.

5. Referências

- Allam O, Bahuaud D, Taché S, Naud N, Corpet DE, Pierre FH. Calcium carbonate suppresses haem toxicity markers without calcium phosphate side effects on colon carcinogenesis. *Br J Nutr.* 105(3):384-92, 2011.
- Baccarini M1. Second nature: biological functions of the Raf-1 "kinase". *FEBS Lett.* 579(15):3271-7, 2005.
- Bastide NM, Chenni F, Audebert M, Santarelli RL, Taché S, Naud N, Baradat M, Jouanin I, Surya R, Hobbs DA, Kuhnle GG, Raymond-Letron I, Gueraud F, Corpet DE, Pierre FH. A central role for heme iron in colon carcinogenesis associated with red meat intake. *Cancer Res.* 1;75(5):870-9, 2015.
- Bastide NM, Pierre FH, Corpet DE. Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prev Res.* 4(2):177-84, 2011.
- Berridge M., Tan A., McCoy K., Wang R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. *Biochemica.* 4:14–19. 1996.
- Berx G, van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1(6), 2009.

- Bird, RP, Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogenesis: preliminary findings. *Cancer pathogenesis Lett.*, 37: 147-51, 1987.
- Bonnesen C, Eggleston IM, Hayes JD. Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res.* 15;61(16):6120-30, 2001.
- De Preter V1, Hamer HM, Windey K, Verbeke K . The impact of pre- and/or probiotics on human colonic metabolism: does it affect human health? *55(1):46-57 Mol Nutr Food* 2011.
- de Vogel J, Jonker-Termont DS, Katan MB, Van Der Meer R. Natural chlorophyll but not chlorophyllin prevents heme-induced cytotoxic and hyperproliferative effects in rat colon. *J Nutr*;135:1995–2000, 2005.
- Gall TM1, Frampton AE. Gene of the month: E-cadherin (CDH1). *J Clin Pathol.* 66(11):928, 2013.
- Glei M, Hofmann T, Küster K, Hollmann J, Lindhauer MG, Pool-Zobel BL. Both wheat (*Triticum aestivum*) bran arabinoxylans and gut flora-mediated fermentation products protect human colon cells from genotoxic activities of 4-hydroxynonenal and hydrogen peroxide. *J Agric Food Chem*, 22;54(6):2088-95, 2006.
- Gollob JA, Wilhelm S, Carter C, Kelley SL. Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway. *Semin Oncol.* (4):392-406, 2006.
- Fulda, S. , Gorman, A.M., Hori, O., Samali, A., Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *Int J Cell Biol.*: 214074. 2010.
- Hamilton, S.R., Aaltonen, L.A., World Health Organization Classification of Tumors Pathology and Genetics, vol. 6. IARC Press, pp. 103. 2000.
- Hooda J, Shah A, Zhang L. Heme, an essential nutrient from dietary proteins, critically impacts diverse physiological and pathological processes. *Nutrients.* 13;6(3):1080-102. 2014.
- Ijssennagger N, Rijnierse A, de Wit NJ, Boekschoten MV, Dekker J, Schonewille A, Müller M, van der Meer R. Dietary heme induces acute oxidative stress, but delayed cytotoxicity and compensatory hyperproliferation in mouse colon. *Carcinogenesis* 34(7):1628-35, 2013.
- Ijssennagger N1, Rijnierse A, de Wit N, Jonker-Termont D, Dekker J, Müller M, van der Meer R. Dietary haem stimulates epithelial cell turnover by downregulating feedback inhibitors of proliferation in murine colon. *Gut.* 61(7):1041-9. 2012.
- Ishikawa S, Tamaki S, Ohata M, Arihara K, Itoh M, Heme induces DNA damage and hyperproliferation of colonic epithelial cells via hydrogen peroxide produced by heme oxygenase: a possible mechanism of heme-induced colon cancer. *Mol Nutr Food Res*, 54(8):1182-91, 2010.
- Kikuchihara Y, Onda N, Kimura M, Kangawa Y, Mizukami S, Yoshida T, Shibutani M. Induction of duodenal mucosal tumors of intestinal epithelial cell origin showing frequent nuclear β -catenin accumulation similar to the concurrently induced colorectal tumors in rats after treatment with azoxymethane. *Exp Toxicol Pathol.* 67(5-6):349-53. 2015.

Klinder A, Karlsson PC, Clune Y, Hughes R, Gleib M, Rafter JJ, Rowland I, Collins JK, Pool-Zobel BL. Fecal water as a non-invasive biomarker in nutritional intervention: comparison of preparation methods and refinement of different endpoints. *Nutr Cancer*. 57(2):158-67. 2007.

Kroepil F, Fluegen G, Totikov Z, Baldus SE, Vay C, Schauer M, Topp SA, Esch JS, Knoefel WT, Stoecklein NH. Down-regulation of CDH1 is associated with expression of SNAI1 in colorectal adenomas. *PLoS One* 7(9), 2012.

Kubiczkova L1, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF- β - an excellent servant but a bad master. *J Transl Med*. 10:183, 2012.

Le Leu RK, Winter JM, Christophersen CT, Young GP, Humphreys K, Hu Y, Gratz SW, Miller RB, Topping DL, Bird AR, Conlon MA. Butyrylated starch intake can prevent red meat-induced O6-methyl-2-deoxyguanosine adducts in human rectal tissue: a randomised clinical trial. *Br J Nutr*. 114(2):220-30, 2015.

Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res*. ;424(1-2): 95, 1999. *Nat Rev Cancer* (2):121-34. 2014. Review.

Oates PS, West AR. Heme in intestinal epithelial cell turnover, differentiation, detoxification, inflammation, carcinogenesis, absorption and motility. *World J Gastroenterol*. 21;12(27):4281-95. 2006.

Olive PL, Banáth JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res*. 122(1):86-94, 1990.

Pence BC, Buddingh F, Yang SP. Multiple dietary factors in the enhancement of dimethylhydrazine carcinogenesis: main effect of indole-3-carbinol. *J Natl Cancer Inst*. 77(1):269-76, 1986.

Pierre F, Santarelli R, Taché S, Guéraud F, Corpet DE. Beef meat promotion of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis biomarkers is suppressed by dietary calcium. *Br J Nutr*. 99(5):1000-6, 2008.

Pierre F, Santarelli R, Taché S, Guéraud F, Corpet DE. Beef meat promotion of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis biomarkers is suppressed by dietary calcium. *Br J Nutr*. 99(5):1000-6. 2008.

Pierre F, Tache S, Petit CR, Van Der Meer R, Corpet DE. Meat and cancer: haemoglobin and haemin in a low-calcium diet promote colorectal carcinogenesis at the aberrant crypt stage in rats. *Carcinogenesis* 2003.

Pool-Zobel, BL, Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. *British Journal of Nutrition*, 93,(1), S73–S90, 2005.

Popivanova BK1, Kitamura K, Wu Y, Kondo T, Kagaya T, Kaneko S, Oshima M, Fujii C, Mukaida N. Blocking TNF- α in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest*. 118(2):560-70, 2008.

Schwabe RF1, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer*. 13(11):800-12. 2013.

- Rodrigues, MAM., Silva, LAG., Salvadori, DMF., Camargo, JLV, Montenegro, MR, Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium term bioassay for colon medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Braz J. Med. Biol. Res.* 35:351-355, 2002.
- Sacksteder, M. R. Occurrence of spontaneous tumors in the germfree F344 rat. *J. Natl Cancer Inst.* 57, 1371–1373, 1976
- Sasagawa C, Matsushima T. Mutagen formation on nitrite treatment of indole compounds derived from indole-glucosinolate. *Mutat Res.* 250(1-2):169-74. 1991.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.*, 31;7:3, 2006.
- Sesink AL, Termont DS, Kleibeuker JH, Van der Meer R. Red meat and colon cancer: the cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme. *Cancer Res.* 59(22):5704-9. 1999.
- Steel JC1, Waldmann TA, Morris JC. Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 33(1):35-41, 2012.
- Suzui M, Inamine M, Kaneshiro T, Morioka T, Yoshimi N, Suzuki R, Kohno H, Tanaka T. Indole-3-carbinol inhibits the growth of human colon carcinoma cells but enhances the tumor multiplicity and volume of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. *Int J Oncol.* 27(5):1391-9. 2005
- Valdovinos-Díaz MÁ. Intestinal microbiota in digestive disorders. Probiotics, prebiotics and symbiotics. *Rev Gastroenterol.*, 1:25-7. 2013.
- van Roy F. Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nature Reviews Cancer* 14, 121–134, 2014.
- Wellbrock C1, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(11):875-85, 2004.
- Weng JR, Tsai CH, Kulp SK, Chen CS. Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent. *Cancer Lett.* 18;262(2):153-63, 2008.
- Winter J, Young GP, Hu Y, Gratz SW, Conlon MA, Le Leu RK. Accumulation of promutagenic DNA adducts in the mouse distal colon after consumption of heme does not induce colonic neoplasms in the western diet model of spontaneous colorectal cancer. *Mol Nutr Food Res.* 58(3):550-8, 2014.
- Yoshimi, N, Morioka, T, Kinko, T, Inamine, M, Kaneshiro, T, Shimizu, T, Suzui, M, Yamada, Y, Mori, H, Histological and immunohistochemical observations of mucin-depleted foci (MDF) stained with alcian blue, in rat colon carcinogenesis induced with 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride. *Cancer Sci.* 95: 792-797, 2004.
- Bustin, S. a et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 55, 611–22 (2009).

6. Anexos

Anexo 1 – Certificado de aprovação pela Comissão de ética em Experimentação Animal

 <p>UNESP UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA</p>	 <p>FMB BIOTÉRIO</p>	 <p>CEEA Comitê de Ética em Experimentação Animal</p>
<p>Cidade situada da Avenida CPN nº 20 do 265499</p>		
<h2 style="text-align: center;">Certificado</h2>		
<p>Certificamos que o (Protocolo CEEA 921/2012) "Efeitos da ingestão de simbiótico e indol 3- carbinol sobre o processo de carcinogênese química de cólon em ratos Wistar alimentados como dieta contendo heme", a ser conduzido por Nelci Antunes de Moura, orientada pelo Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan, co-orientado por Robson Francisco Carvalho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.</p>		
<p>Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 29/03/2012.</p>	 <p>Alberto Santos Capelluppi Secretário da CEEA</p>	 <p>Profª Drª Maria Rosa Bet Moraes Silva Presidente da CEEA</p>
<p style="text-align: right;">Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br</p>		

Anexo 2 - Análise das amostras de RNA dos diferentes grupos experimentais.

ID ¹	Concentração (ng/μl)	260/280	RIN ²
G1			
1	116	2,0	8,2
2	442	2,0	8,0
3	78	1,9	9,2
4	402,8	2,0	8,2
5	272,4	2,0	7,9
G2			
1	452,4	2,0	8,5
2	561,6	1,9	7,8
3	131,6	2,0	8
4	252,4	2,0	8
5	130,4	2,0	7,7
G3			
1	76,4	2,0	9,3
2	885,6	1,9	8,6
3	570,9	1,8	8,3
4	590	2,0	7,6
5	528	2,0	7,0
G4			
1	75,6	2,0	7,6
2	113,6	1,8	7,4
3	86,4	2,0	7,6
4	156	2,0	7,0
5	84,4	2,0	7,0
G5			
1	427,6	1,9	8,5
2	198,0	1,9	9
3	198,0	1,9	8,6
4	448,4	1,9	8,5
5	152,8	1,9	7,5
G6			
1	396,8	2,0	8,4
2	347,6	1,9	8,5
3	397,2	1,9	7,7
4	179,2	2,0	8,6
5	134,8	1,9	7,8
G7			
1	277,6	2,0	8,7
2	545,2	2,0	8,2
3	684,8	2,0	7,2
4	136,0	2,0	8,1
5	75,6	2,0	8,5
G8			
1	150,8	2,0	8,8
2	63,2	2,0	8,3
3	200,8	2,0	8,5
4	378,4	1,9	8,1
5	205,6	1,9	7,8

¹ID = identificação da amostra; ²RIN = RNA Integrity Number

Anexo 3 - Lista de genes selecionados no cartão Taqman Low Density Array (TLDA)

	Unigene	Símbolo	Descrição
01	Rn.91450	Gapdh	encodes a member of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein family
02	Rn.47	Hprt1	catalyzes the conversion of IMP and diphosphate to hypoxanthine and 5-phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate
03	Rn.3692	Gusb	catalyzes the conversion of a beta-D-glucuronoside and H2O to an alcohol and D-glucuronate
04	Rn.94978	Actb	mRNA expression increases following axon injury; may play a role in acceleration of axonal outgrowth
05	Rn.11422	Akt1	inhibits JUN kinase activation and mediates inhibition of apoptosis
06	Rn.2592	Mapk3	kinase involved in intracellular signalling; component of Mapk signalling pathway
07	Rn.34914	Mapk1	kinase involved in intracellular signaling; component of Mapk signaling pathway
08	Rn.54443	Tp53	regulates cell cycle arrest, apoptosis, senescence and DNA repair
09	Rn.9996	Bcl2	an anti-apoptotic protein; involved in inhibiting cell death in many different cell types
10	Rn.10562	Casp3	apoptotic protease that may play a role in cell death regulation and other apoptotic processes
11	Rn.10668	Bax	Bcl2-related gene; involved in the regulation of apoptotic cell death
12	Rn.202944	Gstm1	enzyme with scavenger function; able to neutralize harmful metabolites
13	Rn.10426	Gsk3b	mediates Par6-atypical protein kinase C (aPKC) complex regulation; may induce apoptosis
14	Rn.112601	Ctnbb1	involved in mediating the interaction between cadherins and the actin cytoskeleton
15	Rn.93714	Jun	transcription factor; acts as a protooncogene
16	Rn.22279	Ccnd1	regulatory subunit of CDK4 or CDK6; regulation of the G1/S transition of the cell cycle
17	Rn.24554	Kras	oncogene and member of the small GTPase superfamily
18	Rn.6059	Sod 1	conversion of superoxide to molecular oxygen; involved in response to oxidative stress
19	Rn.87066	Akt2	may be involved in phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) mediated signaling
20	Rn.40136	Tgfb1	binds the TGFbeta receptor; plays a role in regulation of cell growth and proliferation
21	Rn.2755	Smad2	transcriptional mediator for both activin and TGF-beta
22	Rn.88057	Apc	binds microtubules; may play a role in the regulation of cell polarity
23	Rn.33262	Raf1	acts as a mitogenic protein kinase; mutant forms may play a role in transformation
24	Rn.9774	Smad4	transduces signal from TGF-beta; deletion of is associated with pancreatic carcinomas
25	Rn.10666	Dcc	Deleted in colorectal cancer; play dual roles as receptor e other signaling pathways
26	Rn.228611	Lef1	Enhancer binding factor has 98% amino acid homology with mouse Lef-1
27	Rn.233802	Mki67	Marker of cell proliferation Ki-67
28	Rn.91239	Xiap	involved in directly inhibiting key apoptotic proteases, caspase 3 and 7
29	Rn.1303	Cdh1	cell-cell adhesion molecule; may play a role in axonal growth and synapse formation
30	Rn.3174	Msh2	mismatch repair protein
31	Rn.103750	Fos	an immediate early gene encoding a nuclear protein involved in signal transduction
32	Rn.107401	Rhoa	regarded as a prominent regulatory factor in other functions such as the regulation of cytoskeletal dynamics, transcription, cell cycle progression and cell transformation
33	Rn.12072	Myc	The protein encoded by this gene is a multifunctional, nuclear phosphoprotein that plays a role in cell cycle progression, apoptosis and cellular transformation.
34	Rn.4090	Mapk8	involved in a wide variety of cellular processes such as proliferation, differentiation, transcription regulation and development.
35	Rn.29157	Rac1	regulator of many cellular processes, including the cell cycle, cell-cell adhesion, motility (through the actin network), and of epithelial differentiation
36	Rn.10599	Pik3r1	Phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylates the inositol ring of phosphatidylinositol at the 3-prime position
37	Rn.9954	Tgfr2	receptor for TGF-beta; may play a role in lung maturation and response to hypoxia

	Unigene	Símbolo	Descrição
38	Rn.10636	Smad3	transcription factor; important component of the TGF-beta signaling pathway
39	Rn.36696	Bad	may be involved in induction of programmed cell death
40	Rn.24554	Kras	oncogene and member of the small GTPase superfamily
41	Rn.24539	Tgfb2	binds the transforming growth factor-beta receptor; plays a role in regulation of cell growth and proliferation; may be involved in mesenchymal-epithelial cell interactions during development
42	Rn.5850	Map2k1	kinase that activates Mapk3 (Erk1) and Mapk1 (Erk2) kinases
43	Rn.32199	Casp9	plays a role in initiation and progression of apoptosis
44	Rn.7018	Tgfb3	involved in epithelial and endothelial cell proliferation and differentiation during development
45	Rn.9910	Mapk9	involved in a wide variety of cellular processes such as growth, proliferation, differentiation, transcription regulation, and development.
46	Rn.2202	Cycs	a component of the electron transport chain in mitochondria, may function in apoptosis
47	Rn.205813	Braf	human homolog is a serine/threonine kinase; mutation of gene is associated with human cancers
48	Rn.20391	Mlh1	may be involved in DNA mismatch repair
49	Rn.9911	Mapk10	involved in a wide variety of cellular processes such as growth, proliferation, differentiation, transcription regulation, and development
50	Rn.44193	Pik3ca	expression of the human homolog is associated with increased cell proliferation and decreased apoptosis and may play a role in ovarian cancer progression
51	Rn.31781	Axin1	interacts with adenomatosis polyposis coli, catenin (cadherin-associated protein) beta 1, glycogen synthase kinase 3 beta, protein phosphatase 2, and itself
52	Rn.105849	Tcf7l2	is a transcription factor influencing the transcription of several genes thereby exerting a large variety of functions within the cell
53	Rn.44268	Pik3cb	may play a role in hepatocyte proliferation and DNA replication
54	Rn.10506	Akt3	kinase that associates with both protein kinase C subspecies and beta gamma subunits of G proteins
55	Rn.224576	App1	The protein encoded by this gene has been shown to be involved in the regulation of cell proliferation, and in the crosstalk between the adiponectin signalling and insulin signalling pathways
56	Rn.1714	Araf	proto-oncogene, serine/threonine kinase
57	Rn.162212	Axin2	inhibits axis formation; acts as a negative regulator of the Wnt signaling pathway by inducing GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin
58	Rn.40174	Ralgds	facilitates conversion of Ras-related GTPase
59	Rn.2863	Rac2	regulate a diverse array of cellular events, including the control of cell growth, cytoskeletal reorganization, and the activation of protein kinases
60	Rn.22497	Pik3r2	regulatory subunit of the enzyme phosphatidylinositol 3-kinase; involved in cellular signaling mechanisms
61	Rn.162551	Msh3	DNA mismatch repair protein
62	Rn.11530	Pik3cd	Phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) phosphorylate inositol lipids and are involved in the immune response
63	Rn.88630	Cyct	specific cytochrome c
64	Rn.44448	Pik3r3	regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase, a mediator of various cellular signaling mechanisms
65	Rn.47032	RSA-14-44	a member of the rho/ras family of small GTPases
66	Rn.214730	Pik3r5	play important roles in cell growth, proliferation, differentiation, motility, survival and intracellular trafficking
67	Rn.106335	Tcf7	The encoded protein can bind an enhancer element and activate the CD3E gene, and it also may repress the CTNNB1 and TCF7L2 genes through a feedback mechanism
68	Rn.168155	Apc2	adenomatosis polyposis coli 2
69	Rn.67805	LOC100360342	may be involved in DNA mismatch repair
70	Rn.78564	LOC100363502	may be involved in DNA mismatch repair
71	Rn.45876	cox 2	It is involved in the conversion of arachidonic acid to prostaglandin H2, an important precursor of prostacyclin and thromboxane A2
72	Rn.92401	Cyp4a1	arachidonic acid monooxygenase; catalyzes the hydroxylation of omega-terminal carbon of the arachidonic acid

	Unigene	Símbolo	Descrição
73	Rn.11122	Gstt1	subunit of the glutathione S-transferase
74	Rn.3160	Hmox 1	catalyzes the oxidative cleavage of heme to biliverdin
75	Rn.13131	Abcg2	this protein functions as a xenobiotic transporter which may play a role in multi-drug resistance to chemotherapeutic agents including mitoxantrone and camptothecin analogues.
76	Rn.214715	Nemo	regulatory subunit of the I kappa B kinase complex, which phosphorylates and activates NF kappa B
77	Rn.103750	c-Fos	an immediate early gene encoding a nuclear protein involved in signal transduction
78	Rn.20059	Creb3l3	positive regulation of acute inflammatory response; positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
79	Rn.74256	wif1	human homolog has decreased mRNA expression in some prostate cancers and other cancers; may act as a secreted inhibitor of the Wnt signaling pathway
80	Rn.90931	Bmp2	involved in cellular signaling during limb development; induces bone formation
81	Rn.2490	IL-15	human homolog is a cytokine involved in the regulation of T and natural killer cell activation and proliferation
82	Rn.15455	Ccne1	a cyclin-like protein; may be involved in growth stimulation
83	Rn.13094	Ccna2	human homolog plays a role in regulation of DNA synthesis and of mitosis
84	Rn.6743	Ccnb2	Cyclin B2 also binds to transforming growth factor beta RII and thus cyclin B2/cdc2 may play a key role in transforming growth factor beta-mediated cell cycle control
85	Rn.24792	Fzd5	forms a receptor complex with Lpr6 that binds Wnt7A proteins
86	Rn.23638	ler3	mouse homolog plays a role in regulation of T cell proliferation
87	Rn.10400	iNoS	cytokine-inducible enzyme involved in nitric oxide (NO) production
88	Rn.2275	TNf	acts as a cytokine; binds TNF receptors; plays a role in regulation of cell proliferation, induction of apoptosis, and inflammatory response
89	Rn.7255	Dlc1	It is suggested that this gene is a candidate tumor suppressor gene for human liver cancer, as well as for prostate, lung, colorectal, and breast cancers
90	Rn.223092	wnt	member of a family of secreted glycoproteins that play a role in regulation of cell growth, differentiation, and tumorigenesis
91	Rn.228916	Ffar2	may be involved in the inflammatory response and in regulating lipid plasma levels.
92	Rn.23483	Hdac4	human homolog is a component of the DNA damage response pathway and is also involved in repression of muscle differentiation
93	Rn.10346	Gja1	gap junction component; plays a role in cell-cell communication
94	Rn.202944	Gstm1	multifunctional enzyme thought to have scavenger function; able to neutralize harmful metabolites from foreign substances
95	Rn.1303	Cdh1	cell-cell adhesion molecule; may play a role in axonal growth and synapse formation
96	Rn.9753	Ppara	nuclear steroid receptor; heterodimerizes with retinoid-X receptor (RXR), and binds to peroxisome proliferator response elements (PPREs) to initiate the transcriptional regulation of target genes

Anexo 4 – Genes diferencialmente expressos entre os diferentes grupos experimentais com os respectivos valores de *fold change* de p.

Tratamento	Gene	<i>Fold change</i> (log 2)	Valor de p
Controle DMH(G1)			
(G2) Heme	Figf	0,17	0,0012
(G2) Heme	Tgfbr2	0,56	0,003
(G2) Heme	PiK3r5	0,56	0,003
(G6) I3C	Mki67	0,3	0,02
(G7) Simb	Dlc1	0,48	0,04
(G7) Simb	Tgfbr2	0,42	0,016
(G7) Simb	Figf	0,22	0,02
(G8) I3C + simb	Map2K1	1,63	0,04
(G8) I3C + simb	Gstm1	2,34	0,003
(G8) I3C + simb	Figf	0,46	0,04
Controle DMH+ heme (G2)			
(G3)Heme + I3C	Cdh1	0,29	0,02
(G3)Heme + I3C	Tnf	1,65	0,004
(G4)Heme + simb	IL15	2,47	0,006
(G5)Heme + I3C + simb	Cdh1	0,54	0,04
(G5)Heme + I3C + simb	Tgfb1	0,56	0,02
(G5)Heme + I3C + simb)	Appl1	0,61	0,003
(G5)Heme + I3C + simb	Raf1	0,43	0,02
(G5)Heme + I3C + simb	Loc100360342	1,78	0,001

Grupos sem suplementação de heme e o grupo heme foi comparado controle DMH e grupos com suplementação de heme foi comparado ao controle heme (G2).*Fold change* log de 2, valor de p $\leq 0,05$ significativo.