

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/02/2018.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Brunno Felipe Ramos Caetano

**Efeitos da capsaicina na etapa de iniciação da
carcinogênese de cólon em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan

Coorientadora: Profª. Dra. Maria Aparecida Marchesan Rodrigues Kobayasi

**Botucatu
2017**

Brunno Felipe Ramos Caetano

**Efeitos da capsaicina na etapa de iniciação da
carcinogênese de cólon em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan

Coorientadora: Profª. Dra. Maria Aparecida Marchesan Rodrigues Kobayasi

**Botucatu
2017**

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

Caetano, Brunno Felipe Ramos.

Efeitos da capsaicina na etapa de iniciação da
carcinogênese de cólon em ratos / Brunno Felipe Ramos
Caetano. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Luis Fernando Barbisan

Coorientador: Maria Aparecida Marchesan Rodrigues
Kobayasi

Capes: 40105008

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

Palavras-chave: Capsaicina; Carcinogênese colorretal;
Quimioprevenção.

Dedicatória

Dedico este trabalho a Anne, Edson, Gabriel e Sandra.



Agradecimientos

Agradeço com muito apreço o meu orientador Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan pela postura ética e compromissada no exercer das funções de professor e pesquisador. Também sou muito grato pelas oportunidades e ensinamentos que me proporcionou ao longo destes sete anos. Deixo meu carinho, admiração e levo os exemplos que sempre me guiaram na minha formação acadêmica. De igual maneira agradeço minha co-orientadora Profa. Dra. Maria Aparecida Marchesan Rodrigues (aka Tuca) pelo amor e dedicação que inspira enquanto médica, pesquisadora e docente. Agradeço o apoio intelectual e financeiro que custearam todo este projeto e possibilitaram aprendizados valiosos.

Agradeço a doutoranda Mariana Baptista Tablas pelo companheirismo, dedicação e amizade que cultivamos juntos durante a execução deste projeto. Sem o carinho, apoio e as benfazejas mensagens de áudio de 4 minutos, este projeto não seria possível. Agradeço as alunas de iniciação científica Marcela Ignotti Gonçalves e Natalia Elias Ferreira Pereira, pelo igual apoio e compromisso que nos acompanharam em todas as etapas de execução deste projeto. Agradeço a Profa. Dra. Nelci Antunes de Moura, mentora e cúmplice, a qual acompanho desde minha primeira iniciação científica. Agradeço pelas oportunidades e ensinamentos durante estes anos juntos de caminhada.

Deixo especial menção ao técnico bioterista Paulo Cesar Georgete (aka PC), pela dedicação e compromisso que se estenderam por longos meses na execução deste projeto. Também sou grato pelo apoio e suporte de meus colegas de laboratório, Tony, Joyce, Mariana Fragoso, Renata, Guilherme e Muriele.

I would like to extend my sincerest thanks and appreciation to Mariza Branco da Silva for the valuable teachings and always-thoughtful suggestions.

Agradeço aos meus pais Edson e Sandra, velhotes que amo de todo o coração. Este trabalho também é fruto da disposição, apoio e investimento de vocês em minha vida. Agradeço a minha irmã Anne, pelo peculiar humor e amor que atazanam minha vida com tanta alegria. Também agradeço a meu irmão Gabriel, pelo carinho, parceria e suporte. Agradeço a minha família, meus avós, tios, tias e amigos que sempre estiveram comigo.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 130546/2015-1) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2014/21951-6) pelas bolsas de estudos concedidas. Este projeto também contou com auxílio regular à pesquisa (FAPESP, 2014/24762-0) em nome da Profa. Maria Aparecida Marchesan Rodrigues Kobayasi.

Acima de tudo, dou graças ao meu Deus a quem sirvo de consciência pura, por me amar incondicionalmente e dispensar em minha vida amigos, dons e conhecimento.

“Se clamares por inteligência e por entendimento alçares a voz, se buscares a sabedoria como prata e como a tesouros escondidos a procurares, então entenderás o temor do SENHOR e acharás o conhecimento de Deus. Porque o SENHOR dá sabedoria e da sua boca vem a inteligência e o conhecimento. “

Provérbios de Salomão, Cap. 2 vs. 3-6.

Sumário

Dedicatória.....	4
Agradecimentos	6
Lista de Figuras.....	11
Lista de Tabelas	12
Resumo	13
Abstract.....	14
Capítulo 1	
Revisão da Literatura	16
1. Câncer colorretal.....	16
1.1 – Etiologia, fatores de risco e epidemiologia.....	16
1.2 – Carcinogênese de cólon	18
1.3 – Carcinogênese experimental do cólon	20
2. Quimioprevenção do câncer	22
3. Capsaicina.....	24
3.1 – <i>Capsicum</i> : taxonomia e notas etnobotânicas	24
3.2 – Aspectos químicos e farmacológicos da capsaicina	26
3.3 – Aspectos controversos da capsaicina na carcinogênese.....	30
3.3.1 – <i>Ensaio toxicológicos: uma questão de pureza</i>	30
3.3.2 – <i>Carcinógeno ou co-carcinógeno?</i>	31
3.3.3 – <i>Potencial quimiopreventivo</i>	31
4 – Hipóteses.....	33
5 – Objetivo.....	33
Capítulo 2	
Article Capsaicin modulates cell proliferation, apoptosis and suppress colonic pre-neoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats 51	
Abstract.....	52
1. Introduction.....	53
2. Material and Methods	54

2.1 – Chemicals.....	54
2.2 – Study Design.....	54
2.3 – DNA damage in peripheral blood leukocytes.....	55
2.4 – Fecal water genotoxicity.....	55
2.5 – Serum biochemistry and tissue collection.....	56
2.6 – RNA isolation and reverse transcription.....	56
2.7 – Quantitative real-time PCR.....	57
2.8 – Immunohistochemistry analysis.....	57
2.9 –Tumor volume and histopathological analysis	58
2.10 – Identification and Quantification of ACF	58
2.12 – Statistical Analysis.....	58
3. Results.....	59
- <i>Short term assays:</i>	59
3.1 – DNA Damage in peripheral blood leukocytes.....	59
3.2 – Fecal water genotoxicity	59
3.3 – Body parameters, liver weight, serum biochemistry and histopathology.....	59
3.4 – Evaluation of differential gene expression	60
3.4 – Ki-67 and active caspase-3 immunohistochemistry	60
- <i>Medium term assays:</i>	60
3.6 – Tumor volume and histopathological analysis	60
3.7 – ACF formation.....	61
4. Discussion.....	61
5. Conclusion	65
6. Acknowledgments.....	66
Figures and Tables	82
Anexo.....	98

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1 – Bases moleculares da carcinogênese colorretal.....	19
Figura 2 – A fumaça irritante resultante da queima de pimentas era utilizada como forma de punição pelos maias	25
Figura 3 – Regiões da molécula de capsaicina	27
Figura 4 – Topologia do TRPV1 demonstrando múltiplos sítios regulatórios para proteína kinase C e A (PKC e PKA), calmodulina (CaM), fostatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), capsaicina e resinoferotoxina	29

Capítulo 2

Figure 1 – Schematic diagram of the experimental protocol	83
Figure 2 – Detection of DNA damage by the comet assay	84
Figure 3 – Histopathology of colonic mucosa	85
Figure 4 – Effects of capsaicin administration on Ki-67 and Caspase-3 labeling indexes (%) in the colonic crypts of DMH-treated and untreated animals	86
Figure 5 – DMH-induced aberrant crypt foci (ACF) in rats	87
Figure 6 – Volume and histopathology of tumors induced by DMH in control and capsaicin-treated rats	88

Lista de Tabelas

Capítulo 2

Table 1 – Body weight, food intake and liver parameters	89
Table 2 – Genes differentially expressed in the colon of capsaicin-treated rats	90
Table 3 – Significantly enriched gene ontology (GO) annotated terms in up-regulated genes of capsaicin 50mg/kg (G3) treated rats	91
Table 4 – Incidence and multiplicity of various tumors induced by DMH in control and capsaicin-treated rats	92
Table 5 – Inhibitory effects of capsaicin treatment on the number of aberrant crypt foci pre-neoplastic lesions	92
Supplementary Dataset 1 – List of selected genes for qRT-PCR analysis of colonic samples and associated biological processes	95

Resumo

A capsaicina (8-Metil-N-vanilil-(trans)-6-nonamida) é um composto alcaloide lipofílico e o principal componente responsável pela pungência em pimentas vermelhas, consumidas mundialmente. Estudos sobre o potencial mutagênico e genotóxico da capsaicina apontam resultados inconsistentes e conflitantes. Neste estudo, avaliamos o potencial genotóxico e os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos anti-proliferativos e pró-apoptóticos da capsaicina na carcinogênese de cólon induzida pela 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em ratos. Ratos Wistar machos com sete semanas de idade foram randomicamente alocados em seis grupos (n=16). Durante as quatro primeiras semanas do experimento, os grupos 1 e 6 receberam doses intragástricas de óleo de milho (veículo da capsaicina), enquanto a capsaicina foi administrada nas doses de 5mg/kg aos grupos 2 e 4 e 50 mg/kg aos grupos 3 e 5, três vezes por semana. Durante a terceira e quarta semanas, todos os animais receberam quatro injeções subcutâneas de DMH (grupos 1-3, 40mg/kg) ou EDTA (grupos 4-6, veículo do DMH), duas vezes por semana. Os animais foram sacrificados 24 horas (n=6) e 22 semanas (n=10) após o tratamento com a DMH. Vinte e quatro horas após o tratamento com a DMH, a administração de capsaicina diminuiu significativamente a genotoxicidade induzida pela DMH em leucócitos do sangue periférico, bem como a genotoxicidade da água fecal em células tumorais CaCO-2. A capsaicina também reduziu o índice de proliferação de Ki-67 e aumentou a expressão de caspase-3 ativada no cólon dos animais tratados com DMH. A administração de capsaicina promoveu o aumento da expressão de genes associados às vias de resposta adaptativa a químicos, apoptose, desenvolvimento tecidual e diferenciação celular no cólon. Ao fim da vigésima segunda semana, a capsaicina na maior dose reduziu o número de focos de criptas aberrantes (FCA) e aumentou o número de tumores pequenos, bem diferenciados e não-invasivos. Estes resultados sugerem que a capsaicina foi capaz de suprimir a proliferação celular e induzir a apoptose através da regulação das vias do NF- κ B e do estresse do retículo endoplasmático, assim como modular os genes envolvidos no desenvolvimento tecidual e diferenciação celular, reduzindo a formação de lesões pre-neoplásicas e tumores.

+ **Palavras-chave:** carcinogênese colorretal; capsaicina; quimioprevenção.

Abstract

Capsaicin (8-Methyl-N-vanillyl-(trans)-6-nonenamide), a lipophilic alkaloid compound, is the major pungent ingredient found in red peppers consumed worldwide. Most reports on capsaicin potential mutagenicity and genotoxicity have yielded inconsistent findings. In this study, we evaluated capsaicin putative genotoxicity and molecular mechanisms underlying anti-proliferative and pro-apoptotic effects of capsaicin on DMH-induced rat colon carcinogenesis. Seven-weeks old male Wistar rats were randomly assigned into six experimental groups (n=16 each). During the first four weeks, corn oil was given to groups 1 and 6, while intragastric capsaicin was administered at 5mg/kg to groups 2 and 4, and at 50mg/kg to groups 3 and 5, three times/week. On weeks 3 and 4, the animals received subcutaneous injections of either DMH (groups 1-3, 40mg/kg) or EDTA (groups 4-6, vehicle), twice a week. The animals were sacrificed 24 hours (n=6) and 22 weeks (10) after DMH treatment. Capsaicin significantly decreased DMH-induced genotoxicity in peripheral blood leukocytes and fecal water genotoxicity in CaCO-2 cells, 24 hours after the last DMH administration. Capsaicin also reduced Ki-67 proliferation index and increased caspase-3 apoptosis in the colon from the DMH-treated animals. Evaluation of differential gene expression showed that capsaicin administration up-regulated genes associated with adaptive response to chemicals, apoptosis, tissue development and cell differentiation. High dose of capsaicin reduced the number of aberrant crypt foci (ACF) and increased the number of small, well differentiated and non-invasive tumors, 22 weeks after DMH-treatment. These findings revealed that capsaicin was able to suppress cell proliferation and to induce apoptosis via NF- κ B regulation and endoplasmic reticulum (ER)-stress induction, as well as to modulate genes involved in tissue development and cell differentiation, reducing the formation of ACF preneoplastic lesions and tumors.

+ **Keywords:** colorectal cancer; capsaicin; chemoprevention.

Capítulo 1

Revisão da Literatura

1. Câncer colorretal

1.1 – Etiologia, fatores de risco e epidemiologia

O cólon é uma das sedes mais frequentes de neoplasias no homem (Siegel, Desantis, and Jemal 2014). O câncer colorretal (CCR) é um conjunto de doenças heterogênicas resultantes do acúmulo progressivo de alterações genéticas e epigenéticas que culminam no crescimento descontrolado de células epiteliais colônicas (Yamagishi et al. 2016). O CCR é tradicionalmente classificado como tipo hereditário, onde há susceptibilidade genética, e tipo esporádico, resultante de mutações somáticas adquiridas (Stigliano et al. 2014). Estima-se que os componentes hereditários representem cerca de 15 a 30% dos novos casos de CCR ao ano (Mundade et al. 2014). Os casos hereditários são atribuídos a síndromes como polipose adenomatosa familiar (PAF) e câncer colorretal hereditário não-polipoide (HNPCC), também denominado síndrome de Lynch (Del Vecchio Blanco et al. 2015). A maioria dos casos de CCR (70 a 85%) é representada pela forma esporádica da doença, em que não há fatores de risco genéticos identificados (Yamagishi et al. 2016). O desenvolvimento do CCR esporádico é influenciado por hábitos alimentares, estilo de vida, fatores ambientais e mutações somáticas adquiridas (Arnold et al. 2016).

Em termos etiológicos, não há uma causa específica para o desenvolvimento do CCR (Hagggar and Boushey 2009). Diversos componentes multifatoriais podem estar envolvidos em interação com a predisposição hereditária e influências ambientais (Slattery et al. 1999; Johnson et al. 2013). O desenvolvimento econômico e a adoção do estilo de vida ocidental levaram à exposição a fatores ambientais e sociais, aumentando o risco de desenvolvimento da doença (Wu et al. 2016). As taxas de incidência e mortalidade do CCR correlacionam-se com estes padrões caracterizados pelo consumo excessivo de alimentos processados e aquisição de hábitos sociais como tabagismo, alcoolismo e sedentarismo (Hannan, Jacobs, and Thun 2009; Pericleous, Mandair, and Caplin 2013; Cong et al. 2014). Outros fatores etiológicos que contribuem para o desenvolvimento do CCR incluem histórico de ocorrência de pólipos intestinais, doenças inflamatórias intestinais (colite ulcerativa e doença de Crohn) e fatores hereditários associados com o aumento da incidência do CCR (Kim and Chang 2014; Axelrad, Lichtiger, and Yajnik 2016).

O CCR é o terceiro tipo mais comum de câncer e a quarta maior causa de mortes entre homens e mulheres no mundo (Favoriti et al. 2016). De acordo com as últimas estimativas mundiais e projeções demográficas do projeto GLOBOCAN (International

Agency for Research on Cancer, IARC 2012), estima-se um aumento de 60% no impacto global do CCR, o que representará cerca de 2,2 milhões de novos casos e 1,1 milhão de mortes em 2030 (Ferlay et al. 2015). A compreensão dos padrões atuais de distribuição geográfica e evolução da doença numa perspectiva global é imperativa para a contextualização regional, bem como para prospecções futuras que envolvam ações de prevenção e intervenção para o CCR (Arnold et al. 2016). Em termos nacionais, o CCR é o terceiro tipo de câncer mais prevalente entre homens e o segundo entre mulheres (Tabela 1), estimando-se uma incidência de 34.280 novos casos para o ano de 2016 (INCA, 2016).

Tabela 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma (retirado de INCA, 2016).

Homens			Mulheres		
Localização primária	casos novos	%	Localização primária	casos novos	%
Próstata	61.200	28,6%	Mama Feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%	Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%	Colo do Útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%	Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%	Corpo do Útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%	Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

O aumento vertiginoso na incidência e mortalidade do câncer de colón é observado nos países em desenvolvimento, particularmente na Europa Oriental, Ásia e América do Sul (Bray and Soerjomataram 2015). Em contrapartida, as taxas de incidência e mortalidade do CCR demonstram-se estáveis ou em declínio em países com alto índice de desenvolvimento humano, como Estados Unidos, Austrália, Nova Zelândia e países da Europa Ocidental (Favoriti et al. 2016). As razões pelo recente declínio nas taxas de incidência nestes países refletem em grande parte, o aumento da detecção precoce e prevenção através de procedimentos como a polipectomia (Welch and Robertson 2016). Concomitantemente com os fatores que contribuíram para a redução da incidência, o aprimoramento de técnicas no cuidado pré-operatório, bem como significativos avanços nos tratamentos quimioterápicos e radioterápicos, levaram a uma redução uniforme nas taxas de mortalidade do câncer de colón (Rahal et al. 2014; Ananthakrishnan et al. 2015).

O CCR apresenta bom prognóstico quando detectado em estágios iniciais embora cerca de 40% dos casos sejam diagnosticados tardiamente, com sobrevida média estimada de

5 anos (INCA, 2016). Intervenções baseadas na análise dos fatores de risco e a detecção precoce constituem a melhor estratégia para prevenção do avanço da incidência e mortalidade do CCR (Hagggar and Boushey 2009).

1.2 – Carcinogênese de cólon

A carcinogênese é um processo longo de múltiplas etapas nas quais modificações genéticas (mutações pontuais, ampliações e deleções gênicas) e epigenéticas (metilação do DNA e metilação e acetilação de histonas) são progressivamente acumuladas no genoma das células (Irigaray and Belpomme 2010; Singh et al. 2015). Este processo é caracterizado pelo acúmulo de mutações em genes que regulam o crescimento, proliferação e diferenciação celulares, gerando instabilidade genômica (Herman 2005). Desta forma, o processo de carcinogênese é dividido classicamente em três etapas: iniciação, promoção e progressão (Vincent and Gatenby 2008; Vineis, Schatzkin, and Potter 2010).

A etapa de iniciação é caracterizada pela exposição de células progenitoras a agentes mutagênicos, resultando na formação de adutos de DNA (Wilson 2013). Esta interação não evoca mudanças observáveis na morfologia celular, pois apenas confere um aumento permanente na suscetibilidade ao desenvolvimento neoplásico (Pitot and Dragan 1991). As células-alvo que sobrevivem ao estímulo mutagênico e contem alterações no DNA são denominadas células iniciadas (Zhou et al. 2009). Estas mutações não reparadas são fixadas no DNA após o processo de replicação, gerando mutações intrínsecas que são transcritas as gerações subsequentes (Lodish et al. 2000). A persistência de um insulto mutagênico pode gerar um acúmulo progressivo de mutações no genoma celular (Reuter et al. 2010).

A promoção tumoral corresponde a etapa subsequente e é caracterizada pela expansão clonal e seletiva de células iniciadas, originando tumores não-malignos (Pitot and Dragan 1991). Nesta etapa, a presença de agentes promotores é essencial para desencadear o desenvolvimento de lesões proliferativas, displásicas e anaplásicas (Weston and Harris 2003). Os agentes promotores apresentam mecanismos de ação não-genotóxicos, evocando resposta proliferativa desencadeada por lesões teciduais ou processos inflamatórios (Hyndman 2016). O estímulo proliferativo resulta no acúmulo progressivo de mutações e aumento da instabilidade genética (Singh et al. 2015).

A etapa de progressão tumoral é marcada pela transformação maligna das células neoplásicas (Yokota 2000). O fenótipo maligno é caracterizado pela autossuficiência a fatores de crescimento, insensibilidade aos sinais de inibição do crescimento celular, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual e

metástase (Hanahan and Weinberg 2011). O acúmulo progressivo de novas mutações associadas ao processo de seleção clonal possibilita a infiltração vascular e linfática (Farnsworth et al. 2014). A metástase corresponde ao estágio final do processo de carcinogênese (Steege 2016).

Durante as últimas décadas, estudos moleculares identificaram diversas alterações cruciais para o desenvolvimento do CCR esporádico (Worthley and Leggett 2010; Colussi et al. 2013). Na carcinogênese colorretal são identificados três mecanismos distintos e bem definidos, representados pelas vias de instabilidade cromossômica (CIN), via de instabilidade de microssatélites (MSI) e o fenótipo metilador de ilhas CpG (CIMP) (Al-Sohaily et al. 2012). A maioria dos CCR esporádicos são decorrentes de eventos que resultam de aberrações descritas na via de instabilidade cromossômica (Figura 1) (Orsetti et al. 2014).

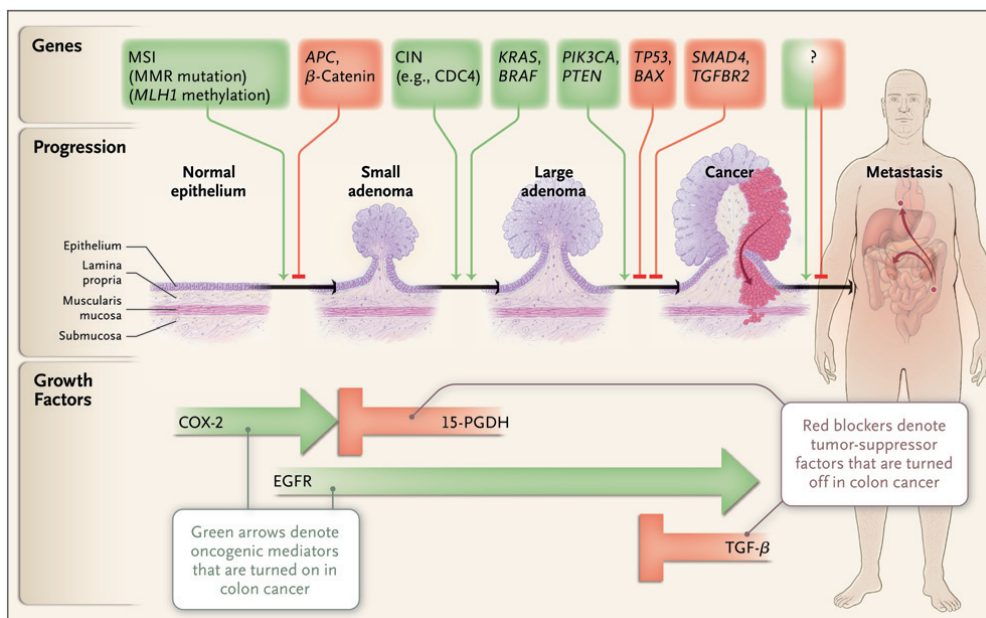


Figura 1 – Bases moleculares da carcinogênese colorretal. A instabilidade cromossômica (ou via clássica) é caracterizada pelo acúmulo progressivo de mutações em oncogenes e supressores tumorais. Retirado de Markowitz and Bertagnolli, 2009.

A via de instabilidade cromossômica está associada com cerca de 70% dos casos de CCR e apresenta a sequência clássica adenoma-adenocarcinoma (Rajagopalan et al. 2003). Esta sequência reflete um padrão de ativação mutacional de oncogenes e inativação de supressores tumorais que resultam em defeitos na segregação dos cromossomos, reparo do DNA e função dos telômeros (Tariq and Ghias 2016). As alterações genômicas desta via incluem a ativação dos proto-oncogenes KRAS, c-Src, c-Myc e inativação dos supressores

tumorais APC e TP53 (Vogelstein and Kinzler 1993; Vogelstein and Kinzler 2004; Markowitz and Bertagnolli 2009).

A inativação do gene APC está entre os eventos mais recentes na progressão do CCR esporádico (Tariq and Ghias 2016). A proteína codificada por este gene está envolvida no complexo de degradação da β -catenina, mediadora central da via de sinalização Wnt (Najdi, Holcombe, and Waterman 2011). A via canônica Wnt é altamente conservada em vertebrados e controla processos fundamentais de proliferação, diferenciação e motilidade celular (Schneikert and Behrens 2007). Mutações no gene APC promovem a estabilização da β -catenina que é acumulada no citoplasma e translocada para o núcleo, onde em associação com complexos de transcrição promove a expressão de genes que favorecem a proliferação celular (Kwong and Dove 2009). Outra importante via que contribui para este estado hiperproliferativo é a via do KRAS, encontrada mutada em cerca de 50% dos carcinomas colônicos (Carethers and Jung 2015). A mutação do KRAS bloqueia a ação de enzimas GTPases permitindo ativação constitutiva da cascata de sinalização RAS, resultando na inibição da apoptose e aumento da proliferação celular (Armaghany et al. 2012). Essas alterações genéticas promovem criptas aberrantes hiperplásicas e displásicas que progridem para adenomas colônicos (Pretlow and Pretlow 2005; Tan and Du 2012).

Os adenomas colônicos são lesões benignas caracterizadas por diferentes graus de displasia celular, podendo apresentar hiper Cromasia e pseudoestratificação nuclear, redução de secreção de muco e perda de polaridade celular (Colucci, Yale, and Rall 2003). As lesões adenomatosas podem ser sésseis ou pedunculadas, classificadas quanto a sua arquitetura em tubular, vilosa ou tubovilosa (Shussman and Wexner 2014). Os adenocarcinomas são lesões infiltrativas com alto grau de displasia e malignidade, classificados em tubulares ou mucinosos (Bujanda et al. 2010; Fleming et al. 2012).

A perda do supressor tumoral TP53 marca o limite da transição adenoma-adenocarcinoma (Rivlin et al. 2011; Carethers and Jung 2015). O gene TP53 é comumente mutado no CCR e está envolvido no controle do ciclo celular e apoptose, contribuindo para o estado de potencial replicativo ilimitado (Naccarati et al. 2012). Estas alterações genéticas promovem um ambiente de instabilidade cromossômica caracterizadas por acúmulos de aneuploidias e deleções (Liu et al. 2015).

1.3 – Carcinogênese experimental do cólon

Um modelo pode ser definido como uma versão simplificada e mais acessível de uma entidade complexa, compartilhando diversas similaridades com o fenômeno original

(Greek and Menache 2013). O objetivo de utilizar modelos experimentais animais no estudo do CCR é recapitular os eventos moleculares, etiologia, patologia e progressão clínica da doença (Rosenberg, Giardina, and Tanaka 2009). Um modelo ideal deve apresentar características histológicas e moleculares similares, além de representar a complexidade de interações celulares que são relevantes ao processo de carcinogênese em humanos (Johnson and Fleet 2013). Nesta perspectiva, um grande número de compostos químicos possui potencial mutagênico e são utilizados para induzir tumores em animais. Dentre os carcinógenos químicos mais utilizados destaca-se a 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e seu metabólito, o azoximetano (Perše and Cerar 2011). O modelo de indução pela DMH é um modelo bem estabelecido e largamente empregado na carcinogênese experimental de cólon, por induzir especificamente lesões colônicas com diversas similaridades morfológicas e moleculares ao câncer de cólon esporádico humano (Perse and Cerar 2005).

A DMH é um procarcinógeno completo capaz de induzir as fases de iniciação e promoção da carcinogênese (Rosenberg, Giardina, and Tanaka 2009). A ativação metabólica da DMH ocorre através de uma série de etapas oxidativas no fígado. Os metabólitos são transportados para o intestino através da bile ou do sistema sanguíneo, onde induzem a formação de adutos (*i.e.*, introdução de grupos metil no DNA) (Femia et al. 2010). As alterações no DNA induzidas pela DMH podem ser revertidas pela ação de enzimas de reparo ou pela indução de apoptose, ou podem ainda instalar mutações específicas que levam a vantagem de crescimento com aumento na proliferação celular, levando à formação de criptas aberrantes (Glauert and Bennink 1983; Perše and Cerar 2011). Estudos clássicos demonstram que as células epiteliais colônicas de ratos e sua microflora intestinal também são capazes de metabolizar a DMH em íon metildiazônio, metabólito carcinogênico e altamente reativo, através do recrutamento de múltiplas enzimas com ações similares as oxidases (Wargovich and Felkner 1982; Oravec et al. 1986). O íon metildiazônio é um agente alquilante responsável pela metilação de bases de DNA de células de vários órgãos, incluindo as células epiteliais da zona proliferativa das criptas colônicas, resultando em hiperproliferação e aumento de mutações (Perše and Cerar 2005; Perše and Cerar 2011).

Em roedores, o câncer de cólon é precedido pelo desenvolvimento de focos de criptas aberrantes (FCA), uma lesão pré-neoplásica onde as criptas colônicas apresentam-se com diversos graus de hiperplasia e displasia, com abertura da fenda luminal e com epitélios visivelmente espessados, apresentando-se únicas ou na forma de focos, podendo progredir para pólipos seguidos de adenomas e adenocarcinomas (Bird 1987; Bird and Good 2000; Ochiai et al. 2014). Esta sequência de eventos hiperplásicos/displásicos é uma consequência

do acúmulo de múltiplas alterações genéticas e epigenéticas no epitélio colônico (Sakai, Nakajima, and Kaneda 2014). Embora nem todos os FCA progridam para uma lesão neoplásica, diversos estudos apontam que todas as neoplasias malignas surgem a partir de um FCA (Thorup 1997; Humphries and Wright 2008).

Os FCA são identificados com maior frequência no cólon medial e distal dos roedores, apresentando índices de proliferação celular maiores que os da mucosa normal e mudanças no padrão de atividade enzimática, tais como redução de expressão das hexosaminidases e de mucinas com aumento de sialomucinas, fenômeno geralmente associado ao grau de displasia e multiplicidade das criptas aberrantes (Pretlow et al. 1991; Orlando et al. 2008; Femia, Dolara, and Caderni 2004). São ainda relatadas alterações genéticas nos genes K-Ras, Apc e Tp53, relacionados à proliferação celular e presença de instabilidade de microssatélites, além de alterações em genes associados à inflamação tais como o iNOS e COX-2 (Cheng and Lai 2003; Takahashi and Wakabayashi 2004). Em alguns FCA com maior displasia há acúmulo citoplasmático e nuclear de β -catenina, um marcador potencial de progressão neoplásica (Yamada and Mori 2003; Mori et al. 2004).

Em humanos, os FCA também são encontrados nas porções distais da mucosa do cólon, especialmente em pacientes portadores de polipose familiar (Roncucci et al. 1998; Stevens et al. 2007). Embora consenso em modelos com roedores, a utilização do FCA como biomarcador do câncer de cólon e em estudos de quimioprevenção humana permanece circunstancial (Gupta and Schoen 2009; Takahashi et al. 2012). Contudo, um subconjunto de FCA apresentando displasia e caracterizados por alterações de vias genéticas que controlam a proliferação celular, são potencialmente úteis como marcadores para avaliar indivíduos de alto risco e, portanto, potenciais alvos para agentes quimioterápicos e quimiopreventivos (Shpitz et al. 1998; Wargovich, Brown, and Morris 2010).

2. Quimioprevenção do câncer

O termo quimioprevenção foi cunhado por Michael Sporn em 1976 para conceituar a *“inibição ou reversão da carcinogênese através da utilização de nutrientes não-tóxicos ou compostos farmacológicos capazes de inibir ou reverter o desenvolvimento e progressão de clones mutantes de células malignas”* (Sporn 1976). Em termos mais específicos, a quimioprevenção do CCR envolve o uso ao longo prazo de uma variedade de agentes que podem retardar, impedir ou mesmo reverter o desenvolvimento de neoplasias colônicas, sendo relevante para pacientes predispostos geneticamente e para aqueles que são sensíveis