



**unesp**

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



# EFEITOS DA CAPSAICINA NA ETAPA DE PROMOÇÃO/PROGRESSÃO DA CARCINOGENESE QUÍMICA DE COLÓN EM RATOS

**MARIANA BAPTISTA TABLAS**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas Estrutura e função*.

*Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan*

**BOTUCATU – SP  
2018**



**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 CAPSAICINA NA ETAPA DE  
PROMOÇÃO/PROGRESSÃO DA CARCINOGENESE QUÍMICA DE  
COLÓN EM RATOS

MARIANA BAPTISTA TABLAS

**ORIENTADOR: PROF. DR. LUÍS FERNANDO BARBISAN**  
**ORIENTADOR**

**CO-ORIENTADOR: PROFA. DRA. MARIA APARECIDA MARCHESAN RODRIGUES**  
**COORIENTADOR**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas Estrutura e função*.

*Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan*

**BOTUCATU – SP**  
**2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Tablas, Mariana Baptista.

Efeitos da capsaicina na etapa de promoção/progressão da carcinogênese química de cólon em ratos / Mariana Baptista Tablas. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Luís Fernando Barbisan

Coorientador: Maria Aparecida Marchesan Rodrigues

Capes: 20100000

1. Câncer. 2. Capsaicina. 3. Carcinogênese. 4. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: câncer; capsaicina; carcinogênese.

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço aos meus pais, Paulo Tablas e Nancy Tablas pelo apoio imenso e pela confiança nestes anos. Foram no total, seis anos de muita dedicação e luta e muitas barreiras enfrentadas entre Mestrado e Doutorado e todos este tempo sempre acreditaram em mim, fui também muito questionada pelas minhas escolhas, mas sempre respeitada. Aos meus irmãos que por estar distante deste caminho acadêmico que escolhi traçar, acredito que lhes trouxe muito orgulho.

Ao meu namorado Felipe Moraes que me mostrou de fato como é o amor, pois, abraçou minha caminhada como se fosse à dele, mostrou que o casal anda junto mesmo nas dificuldades, me trouxe inspirações, emoções, amadurecimento e muita força.

Agradeço ao meu orientador Luís Fernando Barbisan pelo apoio por ter me acolhido, aprendi muito todos estes anos, cresci como profissional e a única palavra que fica é gratidão por tudo!

Aos colegas de trabalho que com muitos anos de convívio trouxeram risadas e lágrimas, agradeço pelos ensinamentos e pela convivência, acredito que fiz boas amizades e que a distância sirva para sentir saudades de todos vocês e de tudo vivido.

A minha professora de inglês Mariza Branco, minha professora querida que me ensinou um pouco mais de inglês, me ajudou, me acalmou e mostrou como nós somos capazes de melhorar cada dia mais.

A todos que de certo modo indiretamente participaram da minha trajetória na UNESP que não caberiam neste singelo agradecimento.

E por ultimo agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP (2014/24762-0) por ter financiado este projeto.

Obrigada sempre a DEUS que cada dia da minha vida me senti abençoada, como Davi mesmo diz: *“Já fui jovem e agora sou velho, mas nunca vi o justo desamparado, nem seus filhos mendigando o pão” ( Salmo37:25 )*.

## SUMÁRIO

Resumo.....	3
Abstract .....	4
1.0 Introdução .....	5
1.1 Cólon: Anatomia, Função e Histologia .....	5
1.2 Epidemiologia e fatores de risco para o Câncer Colorretal (CCR) .....	7
1.3 Carcinogênese do cólon.....	9
1.4 Carcinógeno 1,2- Dimetilhidrazina (DMH) .....	12
1.5 Quimioprevenção .....	13
1.6 História da origem da Pimenta .....	15
1.7 Biossíntese da capsaicina e suas características moleculares.....	17
1.8 Ação da capsaicina e seus efeitos nutricionais e farmacológicos .....	20
1.9 Efeitos da Capsaicina na carcinogênese .....	23
2.0 Justificativa .....	25
3.0 Objetivo.....	25
3.1. Objetivo Geral .....	25
3.2. Objetivos Específicos .....	25
4.0 Materiais e Métodos.....	26
4.1 Animais e ambiente de experimentação .....	26
4.2 Delineamento experimental.....	26
4.3 Eutanásia dos animais .....	28
4.4 Análises Macroscópica dos tumores .....	28
4.5 Análise de FCA no cólon .....	29
4.6 Análise histopatológica de tumores.....	29
4.7 Análises imunoistoquímicas.....	29
4.8 Extração, quantificação e análise da qualidade do RNA.....	30
4.9 Reação de transcrição reversa .....	31
4.10 PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR) .....	31
5.0 Análises Estatísticas .....	32
6.0 Resultados .....	32
6.1 Dados do Experimento em Biotério .....	32
6.2 Determinação da transaminase e Creatinina .....	34

6.3	Análise de volume tumoral e incidência .....	35
6.4	Análise de FCA .....	37
6.5	Análise histopatológica de tumores.....	39
6.6	Análises imunoistoquímicas.....	40
6.7	Quantificação e análise de qualidade do RNA total.....	42
6.8	Expressão Gênica .....	43
7.0	Discussão .....	44
8.0	Conclusão.....	48
	REFERÊNCIAS.....	48
	ANEXOS .....	59

## Resumo

A capsaicina (8-metil-N-vanilil-trans-6-nonamida) é uma substância alcaloide de natureza lipofílica, responsável pela pungência de pimentas e pimentões. Apresenta propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante bem descritas na literatura científica. Assim, este projeto teve como objetivo investigar se a capsaicina apresenta efeito quimioprotetor quando administrada na etapa de promoção/progressão da carcinogênese de cólon induzida pela 1,2-dimetilhidrazina (DMH). Ratos Wistar machos foram alocados em seis grupos experimentais com 10 a 15 animais cada. Os animais dos grupos 1-3 receberam quatro injeções subcutâneas (s.c) do carcinógeno DMH (40mg/kg, duas doses/semana) e os animais do grupo 4-6 receberam quatro injeções s.c de solução de EDTA. Os grupos 2 e 4 receberam por gavagem 5mg/kg p.c e os grupos 3 e 5 receberam 50mg/kg p.c de capsaicina diluída em óleo de milho até o final da 24ª semana do experimento. Após a eutanásia dos animais, os cólons distal, medial e proximal foram corados com azul de metileno a 2% para detecção de focos de criptas aberrantes (FCA). Após a análise de FCAs, os cólons foram processados para análise histológica e classificação de tumores. As amostras congeladas foram utilizadas para análise de expressão gênica pela técnica *Taqman® Low Density Array* (TLDA). Os níveis séricos de ALT ( $p=0,346$ ) e creatinina ( $p=0,854$ ) foram semelhantes entre os grupos, mostrando que as doses de capsaicina utilizadas não apresentaram ação citotóxica para o fígado e rins. Na análise estereoscópica de FCA, observou-se diminuição significativa de lesões no cólon do grupo que recebeu a maior dose de capsaicina (G3) em relação ao grupo G1 ( $p < 0,05$ ). Redução nos níveis de proliferação celular nos tumores colônicos ( $p=0,0002$ ), nas criptas colônicas normais ( $p= 0,0071$ ) e na incidência de adenocarcinoma tubulares foram menores no grupo G3 em relação ao grupo G1. Na análise de expressão gênica dos tumores foi observada menor expressão dos genes *Cebpd* e *Faslg* responsáveis pela diferenciação celular, crescimento tumoral, invasividade e proliferação celular no grupo G3 em relação ao G1. Concluímos que este estudo aponta para efeitos supressores da capsaicina no desenvolvimento de lesões colônicas pré e neoplásicas.

**Palavras-Chave:** capsaicina; carcinogênese de cólon; quimioprevenção.

## **Abstract**

Capsaicin (8-Methyl-N-vanillyl-(trans)-6-nonenamide) is a lipophilic alkaloid, responsible for the pungency in pepper. Its antiinflammatory, antimicrobial and antioxidant properties are well described in the scientific literature. Thus, the objective of this study was to investigate whether capsaicin exerts a chemoprotective effect when administered during 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis promotion/progression in rats. Male Wistar rats were allocated into six groups of 10-15 animals each. Groups 1-3 received 4 subcutaneous injections of DMH (40 mg/kg bw, 2 doses/week), while groups 4-6 received EDTA solution (DMH vehicle, 2 doses/week), followed by intragastric 5mg/kg bw capsaicin diluted in corn oil (G2, G4) or 50mg/kg bw (G3, G5) for 24 weeks (3 doses/week). After sacrifice, blood samples were drawn by heart puncture for the assessment of serum alanine aminotransferase (ALT) and creatinine levels, and the colon was removed. A segment of distal colon and colon tumor samples were frozen in liquid nitrogen at -80°C. Distal, medial and proximal colon samples were stained with 2% methylene blue for the detection of aberrant crypt foci (ACF). After ACF analysis, colon tumors were processed for histological analysis and tumor classification. The frozen samples were used for the analysis of gene expression by *Taqman*® *Low Density Array (TLDA)*. Serum ALT ( $p=0.346$ ) and creatinine ( $p=0.854$ ) levels were similar among groups, indicating that the capsaicin doses used had no cytotoxic effect on the liver and kidneys. ACF analysis showed that the number of colon lesions was significantly lower in the group given the higher capsaicin dose (G3) than in G1 ( $p<0,05$ ). Cell proliferation in colon tumors ( $p=0.0002$ ), the number of normal colonic crypts ( $p= 0.0071$ ), and the incidence of tubular adenocarcinoma were lower in G3 than in G1. Gene expression of *Cebpd* and *Faslg* genes; responsible for cell differentiation, tumor growth, invasiveness, and cell proliferation; was decreased in tumor from G3. We conclude that this study points to the suppressive effects of capsaicin in the development of pre and neoplastic colonic lesions.

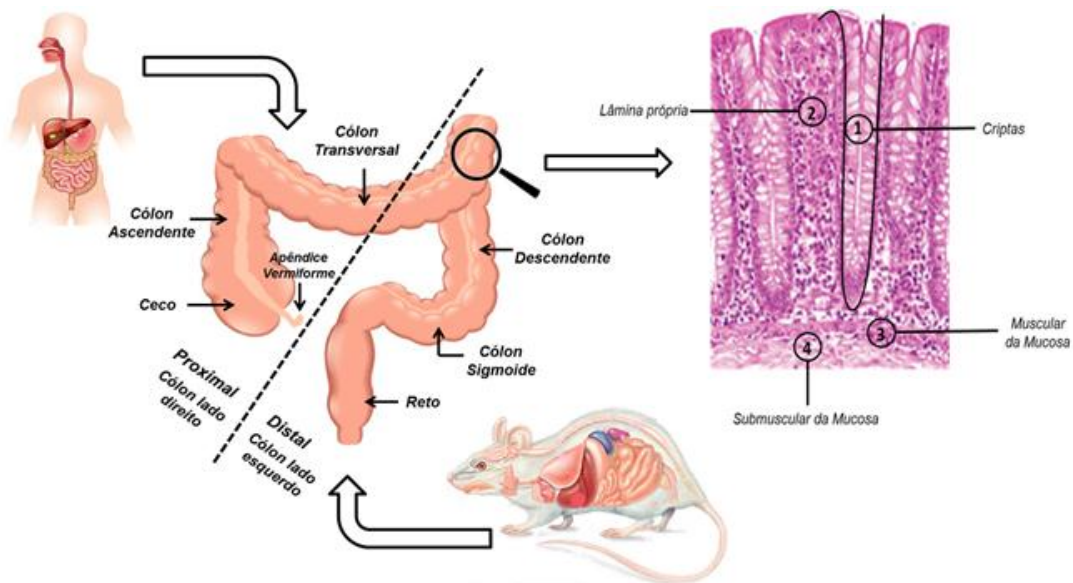
**Key words:** capsaicin; colon carcinogenesis; chemoprevention.

## 1.0 Revisão de Literatura

### 1.1 Cólon: Anatomia, Função e Histologia

O trato gastrointestinal (TGI) é constituído por diferentes regiões conectadas e diferenciadas uma das outras através da sua anatomia, fisiologia, função (digestão e absorção), motilidade, (tempo de trânsito), pH, oxigênio, força de estiramento e defesa imunológica. Todos esses atributos atuam como linha de frente na defesa contra microorganismos presentes no meio ambiente (YAMAMOTO; MATSUMOTO, 2016, VAN RAAY; ALLEN-VERCOE, 2017).

Dentre as partes do TGI, o intestino grosso ou cólon tem a função de absorção de água, fermentação, formação da massa fecal e produção de muco. Ele é constituído pelo ceco, cólon ascendente, cólon transversal, cólon descendente, cólon sigmoide, reto e ânus em humanos, podendo ser classificados em ratos como cólon proximal, medial e distal (Figura1) (VDOVIÁKOVÁ et al.,2016; ALLEN-VERCOE, 2017).



**Figura 1** | Imagem demonstrativa da anatomia do trato gastrointestinal e histologia básica do cólon. Adaptado de PONZ DE LEON; DI GREGORIO (2001), VAN RAAY; ALLEN-VERCOE (2017).

O comprimento do cólon em humanos pode chegar a 150 cm e em roedores 100 mm. O reto continuação da parte pélvica do cólon termina logo abaixo da raiz do ânus, em roedores chega a medir 75 mm e em humanos 15 cm a 18 cm no total somado

com a extensão anal. O cólon é coberto pelo peritônio, exceto a parte mais distal do reto (TANAKA, 2009; VDOVIAKOVÁ et al.,2016).

A mucosa do colón apresenta criptas de Lieberkühn constituídas por epitélio cilíndrico simples, com grande quantidade de células caliciformes (responsáveis pela produção de muco) intercaladas com as células absortivas e células endócrinas e rica em diversos tipos celulares incluindo células de defesa, envolvidas por um tecido conjuntivo frouxo composto por fibras colágenas e elásticas, denominada lâmina própria (Figura1) (MIRAMS et al.,2012).

As células de defesa ou imunológicas se estendem até a submucosa e a camada muscular externa (camadas circulares e longitudinais). Na região anal (distal), a camada da mucosa forma uma série de dobras longitudinais chamada de colunas retais e 2 cm acima da abertura anal a mucosa intestinal é recoberta por epitélio pavimentoso estratificado (PONZ DE LEON ; DI GREGORIO, 2001).

O epitélio intestinal em mamíferos é um dos tecidos que mais se renova, com rotação completa a cada 3 a 5 dias em humanos e 2 a 3 dias em roedores. Esta renovação celular inicia-se nas células presente na base das criptas (*stem cells*) que se proliferam e elevam-se nas paredes da cripta, diferenciando em células absortivas ou enterócitos ou outros tipos de células especializadas e no topo da cripta as células diferenciadas sofrem apoptose e são lançadas no lumen intestinal (MIRAMS et al.,2012).

Devido à geometria e padrão de proliferação celular dentro de uma cripta, as células tronco em sua base geralmente dão origem a toda a população celular das criptas inestinais, elas se dividem e geram linhagens de células filhas. A desregulação do processo de proliferação/ diferenciação, através de mutações genéticas pode alterar toda a população celular da cripta intestinal (MIRAMS et al.,2012).

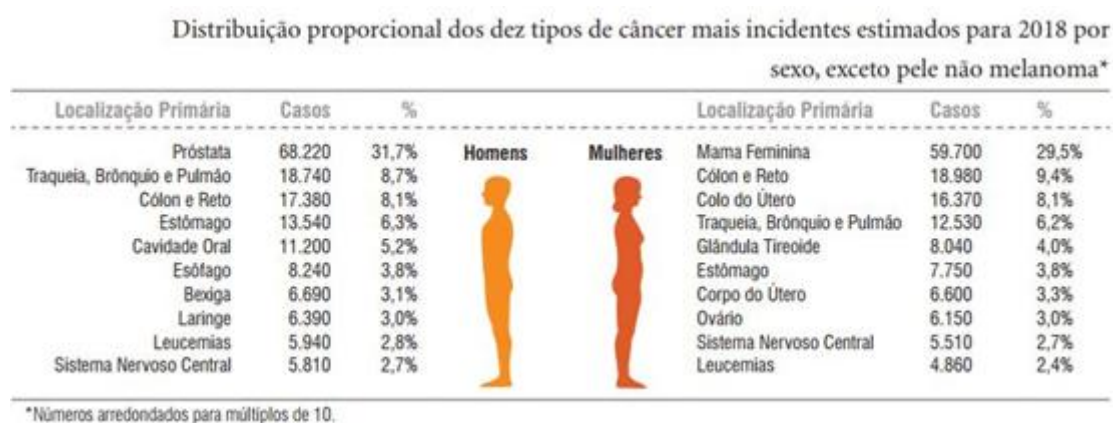
O intestino grosso também apresenta uma vasta população de bactérias luminiais, esta microbiota desempenha papel fundamental na manutenção homeostática do sistema imunológico da mucosa. O desequilíbrio da microbiota intestinal, a chamada disbiose, decorrente de maus hábitos alimentares podem afetar o sistema imunológico, levando ao desenvolvimento de diversas patologias, dentre elas o câncer de cólon esporádico (YAMAMOTO; MATSUMOTO, 2016).

## 1.2 Epidemiologia e fatores de risco para o Câncer Colorretal (CCR)

Em 1950 o câncer de cólon e reto (CCR) era considerado um câncer raro. Mais recentemente a incidência mundial de CCR vem aumentando em decorrência do envelhecimento populacional, a ingestão de dietas baseadas em gorduras de origem animal, consumo de açúcares simples, baixa ingestão de frutas, vegetais e cereais, associados ou não ao consumo excessivo de álcool, tabagismo e ao sedentarismo, seguido da obesidade, configurando principais fatores para esta neoplasia (CONG et al., 2014; NORAT et al., 2014; KUIPERS et al., 2015, LEE et al., 2015).

Atualmente o CCR é uma das principais neoplasias malignas responsáveis pelas mortes nos países ocidentais. É o terceiro tipo de câncer mais comum no mundo, tanto em homens quanto em mulheres (COOPER et al., 2010; NOLFO et al., 2013). Em 2012 foram mais de 1,4 milhões de novos casos e 608.700 mortes por câncer de cólon no mundo (GLOBOCAN, 2012). Nos Estados Unidos estimou-se em 2017 13.430 novos casos de CCR e 50.260 de mortes e em 2018 são atualmente 140.250 novos casos de CCR e 50.630 mortes (ZHANG et al., 2017; AMERICA CANCER SOCIETY, 2018).

No Brasil, esta neoplasia ocupa o terceiro lugar em homens e segundo em mulheres. Para o biênio de 2018-2019, a incidência estimada é de 36.360 novos casos de CCR, sendo 17.380 em homens e 19.980 em mulheres e 15.415 de morte (Figura 2) (INCA 2018).



**Figura2|** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018-2019 no Brasil (INCA 2018).

A maioria dos casos de CCR é denominada de tumores esporádicos, aproximadamente 95% dos pacientes não apresentam predisposição familiar, pois ela representa apenas 5% dos casos de CCR (CONG et al., 2014; KUIPERS et al., 2015). O risco de CCR duplica quando se tem um membro da família de primeiro grau acima de 50 anos de idade com CCR e o risco triplica com a presença de um familiar com menos de 50 anos de idade. A Síndrome de Lynch ou Câncer Colorretal Hereditário não Polipoide (HNPCC) é uma doença autossômico dominante que confere elevado risco para o CCR precoce observado em pacientes com menos de 40 anos e freqüentemente apresenta padrão de crescimento viloso com displasia de grau moderado a alto (YU et al., 2017, BHATTACHARYA; MCHUGH., 2017). Os adenomas em indivíduos com a Síndrome de Lynch tendem a se transformar em neoplasias malignas mais rapidamente e aumenta a predisposição para outros tipos de cânceres, como o de cérebro, endométrio, estômago, intestino delgado, sistema hepatobiliar, rim, ureter e ovário (YU et al., 2017, BHATTACHARYA; MCHUGH., 2017). A Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) é também um tipo de câncer autossômico dominante caracterizado pela presença de numerosos pólipos ao longo do revestimento interior do colon e reto, a maioria são pólipos benignos podendo progredir para lesões malignas (HALF et al., 2009; ESHGHIFAR et al., 2017; RONCUCCI et al., 2017).

Além dos fatores de herança familiar, existem doenças inflamatórias intestinais crônicas (DIIs), que são condições imunitárias associadas ao dano progressivo do tecido intestinal inflamado e tem impacto considerável na qualidade de vida do paciente (ARGOLLO et al., 2017). A patogênese permanece incerta, mas é claro que estão envolvidos mecanismos complexos associados à composição da microbiota intestinal, levando ao desequilíbrio entre a sinalização pró e anti-inflamatória, a hiperplasia, displasia do epitélio normal e desenvolvimento de adenocarcinoma (SUNTAEK HONG et al., 2010; MATKOWSKYJ et al., 2013; ARGOLLO et al., 2017).

Os sintomas das DIIs são diversos, incluindo dor abdominal, sinais de desnutrição e complicações como abscessos, fístulas, manifestações extraintestinais e neoplasias, levando a uma destruição progressiva da integridade intestinal (FISCHER; NEURATH et al., 2017).

Dentre as principais DIIs temos a colite ulcerativa e doença de Crohn, que quando não tratadas podem levar a um risco aumentado para o CCR (KUIPERS et al., 2015).

As principais características da colite ulcerativa (CU) incluem inflamação difusa da mucosa que se estende até ao reto em um grau variável (XAVIER; PODOLSKY et al., 2007). Geralmente tem um curso clínico de repetida exacerbação e remissão, e apresenta um curso incontrolável e fulminante (FISCHER; NEURATH et al., 2017).

A doença de Crohn pode envolver qualquer parte do trato gastrointestinal caracterizada por inflamação, ulceração e influxo de neutrófilos nos epitélios intestinais. Os sintomas relacionam-se ao local de envolvimento, como perda de peso, dor abdominal e deficiências nutricionais (QIAN et al., 2017).

Dentre os fatores de risco hereditário e as DIIs, o CCR esporádico representa a maior incidência, pois, os padrões geográficos mundiais e nacionais revelam que a incidência deste tipo de neoplasia está intimamente relacionada com a industrialização e com o atual hábito alimentar da população (KUIPERS et al., 2015).

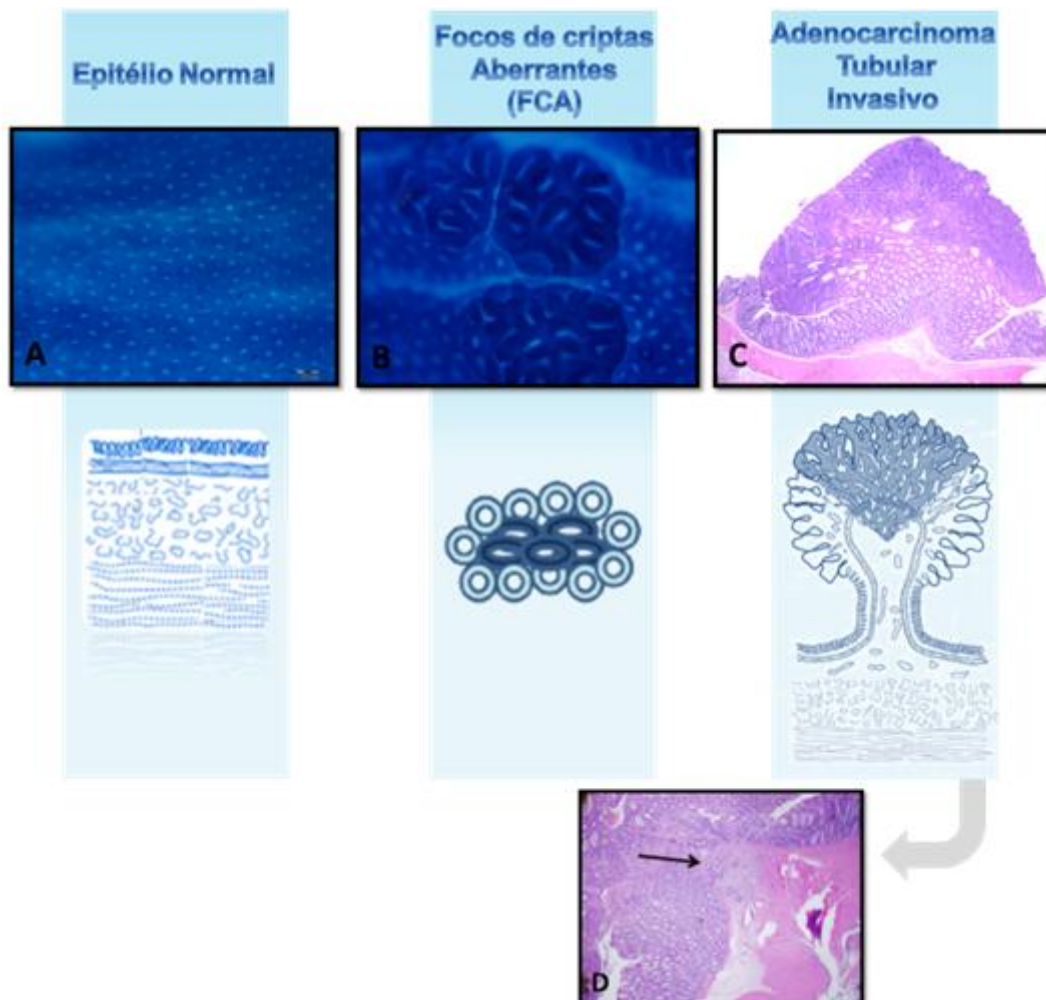
Estudos epidemiológicos sugerem que a incidência da DII continuará aumentando, e tem sido considerado um problema de saúde global, levando a uma proporção crescente de pacientes com DII e crescentes desafios para seu tratamento (ZHANG; LI et al., 2014; FISCHER; NEURATH et al., 2017).

O CCR tem sido fortemente associado com o estilo de vida ocidental (CHAN; GIOVANNUCCI, 2010; KUIPERS et al., 2015). Estudos de migração demonstram um aumento da incidência para o CCR nos imigrantes em comparação aos nativos que mantiveram seu estilo de vida habitual. Em conjunto, esses dados destacam a importância das influências ambientais sobre a carcinogênese colorretal (CHAN; GIOVANNUCCI, 2010).

### **1.3 Carcinogênese do cólon**

Dentre os métodos de diagnóstico da carcinogênese do cólon, os focos de criptas aberrantes (FCA) correspondem a alterações estruturais precoces da mucosa do cólon sendo assim considerados precursores do CCR (PRETLOW et al., 1990; BIRD, 1995; POLYAK et al., 1996; BIRD & GOOD, 2000; GUPTA et al., 2007, WARGOVICH et al., 2010). Em roedores, o câncer de cólon é precedido pelo desenvolvimento de FCA, lesão pré-neoplásica onde as criptas colônicas apresentam-se em diversos graus de hiperplasia e displasia, com abertura da fenda luminal e com epitélios visivelmente espessados e escuros, apresentando-se únicas ou na forma de

focos, que podem progredir para pólipos seguidos por adenomas (tumores benignos delimitado na mucosa) e adenocarcinomas (lesões malignas que penetram na mucosa muscular) (TUDEK et al., 1989; BIRD & GOOD, 2000; PERŠE & CERAR, 2010; SUZUI et al., 2013). Esta sequência de eventos hiperplásicos/displásicos é uma consequência do acúmulo de múltiplas alterações genéticas e epigenéticas no epitélio colônico que podem levar de 10 a 15 anos para progredir para um CCR. Entretanto o desenvolvimento do CCR pode ser mais acelerado na presença da predisposição familiar como na Síndrome de Lynch (ROSENBERG et al., 2009; SUZUI et al., 2013; KUIPERS et al., 2015). Embora nem todos os FCA progridam para uma lesão neoplásica, diversos estudos apontam que as neoplasias malignas do cólon surgem, em geral, a partir de um FCA displásico precursor (Figura 3) (HUMPHRIES; WRIGHT, 2008).



**Figura 3** | Desenvolvimento do câncer de cólon e reto. **A:** Fotomicrografia de cólon normal corado com azul de metileno (4x), **B:** Cólon tratado com DMH exibindo focos de FCA com >10 (4x) , **C:** Adenocarcinoma Tubular Invasivo corado em H&E (4x) e **D:** Imagem ampliada 100x

invasão na muscular da mucosa corado em H&E. Adaptado de PERŠE; CERAR (2010) e WARGOVICH, et al.(2010).

Os FCA apresentam índices de proliferação celular maiores que os da mucosa normal (POLYAK et al., 1996; SHPITZ et al., 1997). Além disso, apresentam mudanças no padrão de atividade enzimática, na redução de expressão das hexosaminidases (BARROW et al., 1990; PRETLOW et al., 1990) e da produção de mucinas, com aumento de sialomucinas, fenômeno geralmente associado ao grau de displasia e multiplicidade das criptas aberrantes (UCHIDA et al., 1997; FEMIA et al., 2004; YOSHIMI et al., 2004). São ainda relatadas alterações genéticas nos genes K-ras (*adenomatous polyposis coli*) APC e o gene p53 e alterações em genes associados à inflamação tais como o óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e ciclo oxigenase -2 (COX-2) responsável por promover a angiogênese e a produção indireta de radicais livres (JEN et al., 1994; HEINEN et al., 1996; NUCCI et al., 1997, TAKAHASHI; WAKABAYASHI, 2004; SENDA et al., 2005; SUZUI et al., 2013; WATSON et al., 2016). Em alguns FCA com maior displasia há acúmulo citoplasmático e nuclear de  $\beta$ -catenina, um marcador potencial de progressão neoplásica (YAMADA et al., 2000; HATA et al., 2004).

Volgelstein 1988 e colaboradores descreveram a correlação entre o acúmulo de mutações genéticas e a sequência fenotípica no epitélio colônico rumo a malignidade (VOLGELSTEIN et al., 1988). Mutações devidas à perda da heterozigosidade, ou seja, inativação da segunda cópia dos genes supressores, tornando-se homozigóticos, essas mutações inativam o gene supressor levando a instabilidade cromossômica nos genes APC e p53 e nos genes de progressão tumoral como K-ras, têm sido correlacionados com cerca de 80% dos casos de CCR esporádico. A instabilidade de regiões microssatélites associadas com mutações de genes de reparo que resultam na replicação de erros no DNA através de deleções e inserções também tem sido sugerida como um fator desencadeador do desenvolvimento do câncer de colón e reto (BOLAND et al., 2010, CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012; LI et al., 2013). Outras anormalidades gênicas relevantes para a carcinogênese de colon incluem os reguladores do ciclo celular, migração celular, moléculas de adesão celular e diferenciação são outros eventos envolvidos na patogênese desta doença (BISHEHSARI et al., 2014).

#### 1.4 Carcinógeno 1,2- Dimetilhidrazina (DMH)

O estudo da carcinogênese experimental do cólon em roedores tem uma história notavelmente longa, datando de quase 80 anos. O primeiro estudo publicado de Lorenz (1941) demonstraram tumorigênese no estômago e no intestino de camundongos após a alimentação com hidrocarboneto aromático policíclico, metil-colantreno. Lisco e seus colaboradores (1947) relataram que a alimentação com ítrio radioativo em ratos induziu uma alta proporção de tumores do cólon e Walpole e seus colaboradores (1952) relataram que injeções de 4-aminodifenil e 3,2-dimetil-4-aminodifenil desenvolveram tumores no cólon em ratos (ROSENBERG et al.,2009).

Diversos agentes químicos têm sido utilizados para induzir tumores de cólon em roedores, como as nitrosaminas ou aminas heterocíclicas que são pouco utilizadas na carcinogênese de cólon. Os agentes que mais se destacam são 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e seu metabólito, o azoximetano (AOM) (PERŠE; CERAR, 2010; SUZUI et al 2013).

A identificação do carcinógeno DMH surgiu a partir de um estudo populacional de Laqueur em 1963 com uma farinha da espécie *Cycas circinalis* no qual as hidrazinas foram relatadas como sendo possíveis carcinógenos de cólon. Quando os roedores foram alimentados com grandes quantidades de farinha de cicadáceas, os adenocarcinomas no cólon surgiram em alguns animais. Descobriu-se posteriormente que o carcinógeno na farinha de cicadáceas era a cymasina, uma forma de metilazoximetanol (MAM) (ROSENBERG et al.,2009).

O DMH é metabolicamente ativado no fígado por uma série de reações através dos metabólitos intermediários, o azoximetano (AOM) e o metilazoximetanol (MAM), para o metabólito cancerígeno final o íon de metil diazônio altamente reativo. O MAM pode ser excretado na bile e transportado para o cólon ou entrar diretamente nas células epiteliais do cólon através da circulação sanguínea. O metabólito final é responsável pela metilação das bases do DNA que levam a lesões com diversas similaridades morfológicas e moleculares com o câncer de colón esporádico humano (Figura 4) (PERŠE; CERAR, 2010).



**Figura 4** | Agente químico 1,2 Dimetilhidrazina (DMH) e seus metabólitos intermediários (AOM/MAM) e metabólito final (Íon metildiazônio) responsável pela indução de câncer no cólon através da ativação da DMH no fígado seguida da excreção da MAM dentro da bile e transportada para o cólon. Adaptado de PERŠE; CERAR (2010) e SUZUI et al. (2013).

Este modelo é bem estabelecido e largamente empregado na carcinogênese experimental de cólon, que tem como finalidade identificar as vias da carcinogênese de cólon, para estudo de agentes ambientais, dietéticos e quimiopreventivos no processo de câncer de cólon e assim elucidar novos alvos para quimioprevenção a partir de um estudo de curto ou médio prazo (RODRIGUES et al., 1992; TANAKA, 2009; PERŠE; CERAR, 2010).

### 1.5 Quimioprevenção

A quimioprevenção é conceituada como o emprego de agentes naturais ou sintéticos capazes de prevenir o desenvolvimento de tumores benignos ou malignos (HAKAMA, 1998, BONOVAS et al., 2008, LANDIS-PIWOWAR; IYER, 2014) . Em termos mais específicos, envolve o uso ao longo prazo de uma variedade de compostos que podem retardar, impedir ou mesmo reverter o desenvolvimento de neoplasias,

mostrando-se de essencial importância para pacientes predispostos geneticamente e para aqueles que são sensíveis às causas ambientais associadas aos diversos tipos de neoplasias (TANAKA, 2009).

Diversos estudos têm sido conduzidos para elucidar a eficiência e ação de agentes quimiopreventivos, principalmente dos compostos bioativos presentes em alimentos (DAVIES, et al., 2005). A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas, consistindo das fases de iniciação, promoção e progressão, envolvendo gerações subsequentes de células que exibem contínuas perturbações celulares e moleculares. Por isso, a sequência de múltiplas etapas destes eventos exibem diversas fases de intervenção para inibição, reversão ou supressão dos processos da carcinogênese antes do desenvolvimento de neoplasias malignas (RAJAMANICKAM; AGARWAL, 2008).

Existem três níveis de prevenção, dependendo do alvo da intervenção: (a) prevenção primária – destinado a indivíduos saudáveis que podem apresentar características de alto risco com mutações genéticas, predispondo-os ao desenvolvimento do câncer; (b) prevenção secundária – tratar pacientes no estágio inicial da doença com lesões benignas (adenomas no cólon) objetivando a prevenção da progressão do câncer; (c) prevenção terciária – para evitar recidivas em pacientes terapeuticamente curados (DE FLORA; FERGUSON, 2005; BONOVAS et al., 2008). Na prevenção primária, o desenvolvimento de células neoplásicas é minimizado pela inibição de mutações nas células alvos, redução na formação de células iniciadas, incluindo também a inibição da fase de promoção do tumor com redução dos efeitos genotóxicos, pela ação dos antioxidantes e da atividade anti-inflamatória, agindo nas ciclooxigenases, proliferação celular, iNOS e interferindo em múltiplas vias de sinalização (DE FLORA; FERGUSON, 2005). A prevenção secundária explora uma série de mecanismos direcionados à inibição da progressão tumoral, modulando os sinais de transdução, atua no sistema imunológico e na inibição da angiogênese evitando que a malignidade se instale entre as células transformadas. A prevenção terciária deve levar em consideração os mecanismos tanto da prevenção primária quanto os da secundária e a inibição da invasão e metástase através da ativação dos genes anti-metastático (STEWART; BROWN, 2013; DE FLORA; FERGUSON, 2005).

Os agentes químicos com potencial para quimioprevenção podem ser enquadrados em duas categorias principais, de acordo com o estágio da carcinogênese em que atuam: agentes bloqueadores e agentes supressores (STEWART; BROWN, 2013). Os agentes bloqueadores influenciam os processos de ativação/absorção,

biotransformação, excreção e de ligação ao DNA por substâncias cancerígenas, impedindo a formação de células iniciadas. Os agentes supressores interferem em alguns eventos celulares críticos durante as etapas de promoção/progressão da carcinogênese e, conseqüentemente, previnem a evolução das células iniciadas à malignidade (STEWART; BROWN, 2013). Desta forma, os agentes quimiopreventivos podem ser classificados nessas duas categorias considerando-se o fato dos bloqueadores serem efetivos quando administrados antes ou simultaneamente ao cancerígeno, enquanto que os supressores, após a etapa de iniciação da carcinogênese (RAJAMANICKAM; AGARWAL, 2008).

Agentes capazes de suprimir estas múltiplas etapas possuem grande potencial para quimioprevenção. Um agente quimiopreventivo ideal deve exibir pouca ou nenhuma citotoxicidade, boa eficácia em múltiplos alvos, capacidade de consumo oral, mecanismos de ação conhecidos, baixo custo e boa aceitação humana (RAJAMANICKAM; AGARWAL, 2008). A prevenção primária através dos produtos naturais como grãos, nozes, cereais, especiarias (pimentas), frutas, vegetais, bebidas, plantas medicinais e ervas e seus vários constituintes fitoquímicos, incluindo fenólicos, flavonóides, carotenóides, alcalóides, nitrogênio e compostos com organossulfurados (alho e cebola) que conferem efeitos protetores têm recebido grande atenção na prevenção do câncer, devido aos seus vários benefícios para saúde, baixa toxicidade e baixos efeitos colaterais e as limitações encontradas nos agentes quimioterápicos convencionais (MANZANO; PÉREZ-SEGURA, 2012; JAGANATHAN et al., 2014).

Uma vez que a dieta tem um papel importante na etiologia do CCR, a quimioprevenção pela introdução de alimentos funcionais vem recebendo atenção da população para a prevenção do câncer de cólon. No entanto, a identificação de um agente com potencial quimiopreventivo requer vários estudos *in vitro* e estudos de toxicidade em modelos experimentais antes de iniciar ensaios clínicos em humanos (RAJAMANICKAM; AGARWAL, 2008). Atualmente muitos agentes naturais são estudados para elucidar suas vias e seus efeitos no organismo humano, dentre eles a capsaicina, encontrada em diversas pimentas e pimentões.

## **1.6 História da origem da Pimenta**

As pimentas da família solanácea e do gênero *Capsicum* são consumidas principalmente como condimentos alimentares em muitas regiões do mundo devido à

sua pungência, aroma e cor. De fato, um quarto da população do mundo consome pimentas de alguma forma diariamente (SURH, 2002; ARORA et al., 2011). Existe uma grande diversidade das pimentas do gênero *Capsicum* encontradas no Centro-Sul da América do Sul, sendo a maioria das espécies encontradas entre o Brasil e a Bolívia. Na Bolívia, são reconhecidas em torno de 20 a 27 espécies de pimentas do gênero *Capsicum* (ARORA et al., 2011). Evidências arqueológicas e análises genéticas levaram a uma distribuição mais precisa sobre a domesticação das pimentas sendo que a *C. annuum* foi inicialmente domesticado no México ou no Norte da América Central, *C. frutescens* no Caribe, *C. baccatum* na planície da Bolívia, *C. chinense* na planície do norte da Amazônia e *C. pubescens* no sul da Cordilheira dos Andes (PERRY et al., 2007, GUZMÁN & BOSLAND, 2017) (Figura 5). A arqueológica indica que as pimentas têm uma história de uso humano que remonta há quase 9000 anos, tornando *Capsicum* um dos gêneros mais antigos de plantas domesticadas e mais notáveis economicamente (STEWART et al., 2007, PERRY et al., 2007). Uma das possíveis razões para uma domesticação tão precoce é que as pimentas foram utilizadas como plantas medicinais pelos povos indígenas (GUZMÁN & BOSLAND, 2017).

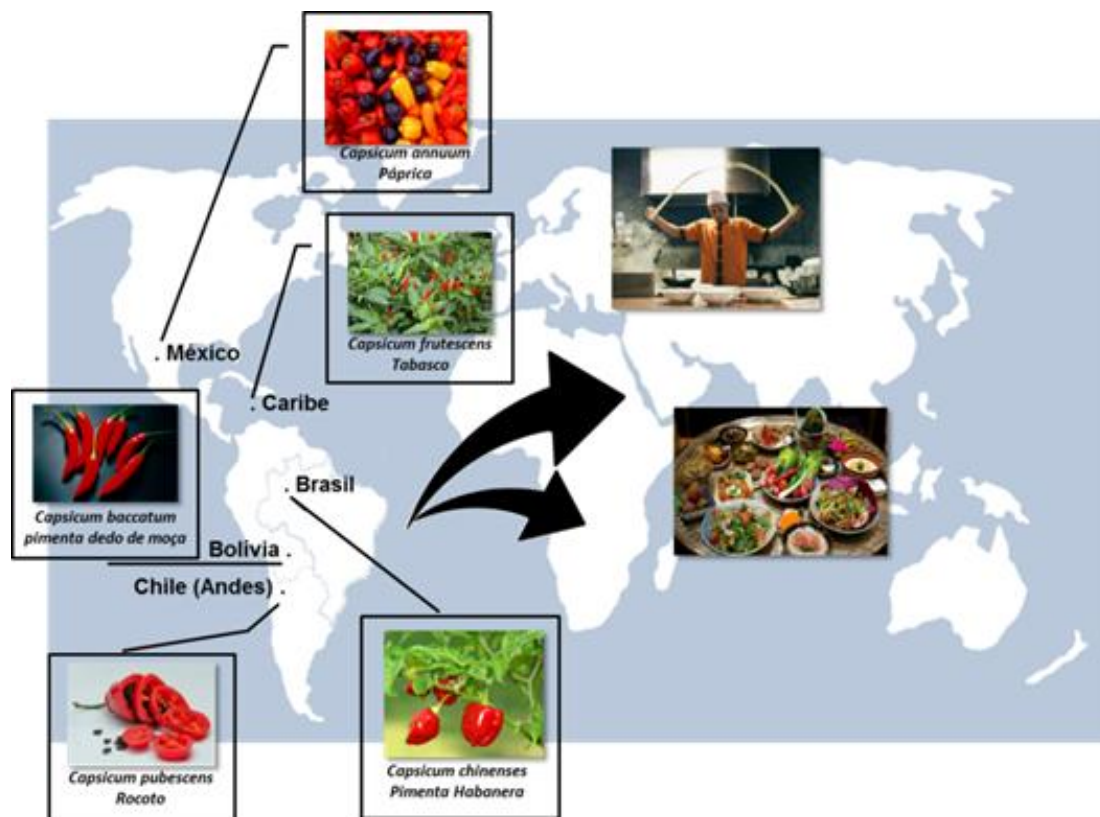


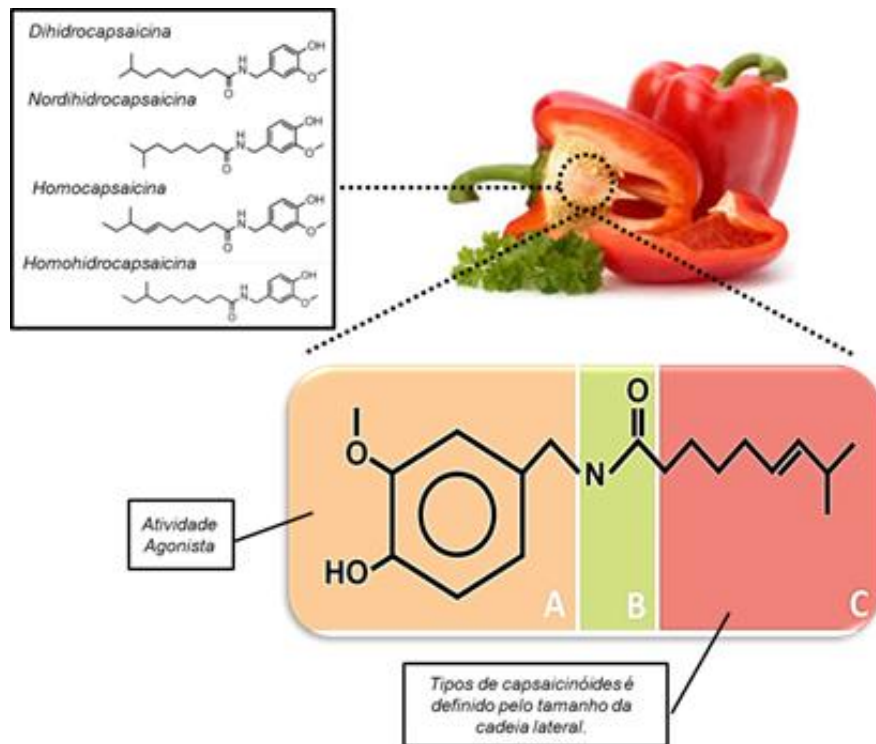
Figura 5 | Mapa demonstrativo da origem e domesticação das pimentas na América do Sul e sua dispersão para outros continentes. Adaptado de GUZMÁN, BOSLAND (2017), PERRY et al.(2007).

Atualmente existem em torno de 200 espécies de pimenta, entre elas as pimentas doces (não pungentes) como a páprica (*Capsicum annuum*) e as pimentas quentes (pungentes) da espécie *Capsicum chinense*, que inclui uma variedade de pimentas como Malagueta, pimenta Habanera, Trinidad Moruga Scorpion, *Capsicum baccatum* popularmente conhecida como pimenta-dedo-de-moça, Cambuci e Cumari, *C. Frutescens* a pimenta tabasco e a *C. pubescens* pimenta Rocoto (ARORA et al., 2011; HUANG et al., 2013; LILLYWHITE et al., 2013)

Os capsaicinóides que dão a sensação picante e de ardência são considerados um ingrediente alimentar muito popular na América Latina, na culinária Africana e Asiática, tornando-se cada vez mais importante para as indústrias alimentares Americanas e Européias (GUZMÁN; BOSLAND, 2017). Em 2011 o valor global de produção de pimentas arrecadou mais de 14.4 bilhões de dólares, sendo uma importância considerável para a economia global (CHAPA-OLIVER; MEJÍA-TENIENTE, 2016).

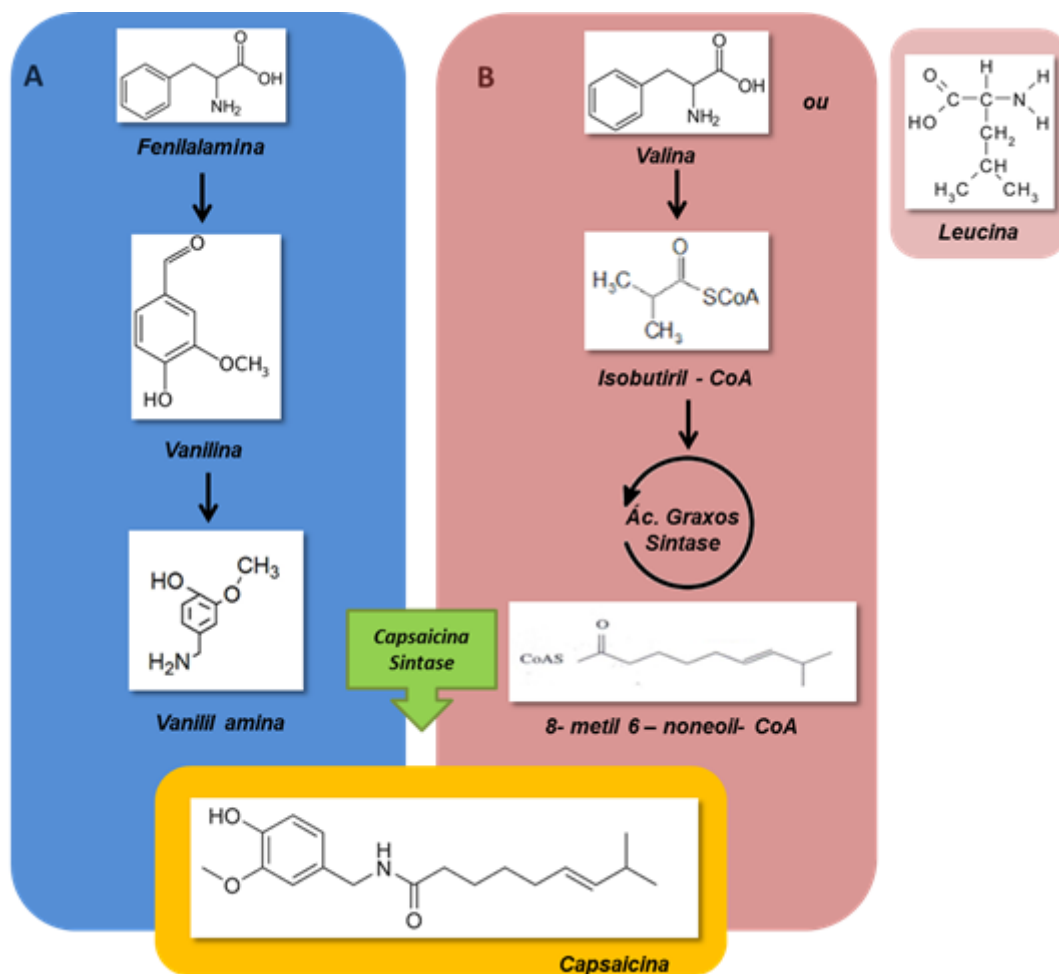
### **1.7 Biossíntese da capsacina e suas características moleculares**

A capsacina (8-metil-N-vanilil-trans-6-nonamida), principal componente das pimentas é uma substância alcaloide cristalina de natureza lipofílica, incolor e inodoro, com a fórmula molecular  $C_{18}H_{27}NO_3$ , responsável pela pungência de diversas espécies de pimentas e pimentões. Acumulada na epiderme secretora do septo dos frutos do gênero *Capsicum* (família Solanácea), a estrutura química da capsacina representa cerca de 90% dos capsaicinóides seguida de dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina e homocapsaicina. A biossíntese de todos estes compostos são formadas pela condensação da vanilil amina e ácidos graxos de diferentes comprimentos de cadeia (REYES - ESCOGIDO et al., 2011) ( Figura 6).



**Figura 6** |Fórmula molecular da capsaicina. (A) anel aromático formado pela cadeia vanilil, responsável pela afinidade com os receptores da família TRPV, (B) ligação amida responsável pela pungência e manutenção da excitação dos neurônios sensoriais e (C) cadeia variável de ácidos graxos fornece máxima potencia da molécula. Adaptado de BASITH et al, (2016).

A biossíntese de capsaicina especificamente é definida por duas vias: fenilpropanóide, que determina a estrutura fenólica e o metabolismo de ácidos graxos, que determina a cadeia dos ácidos graxos da molécula. A condensação de ambas as vias é promovida pela enzima capsaicina sintase (Pun1- AT3 gene responsável pela produção de capsaicinóides) que utilizam ATP e coenzima A (CoA) e vanilil amina para formação da molécula . A região A da molécula de capsaicina é responsável pela atividade agonista, ou seja, é a região onde a molécula se liga ao receptor da célula alvo, sendo a região mais potente da molécula (REYES - ESCOGIDO et al., 2011) (Figura 7).



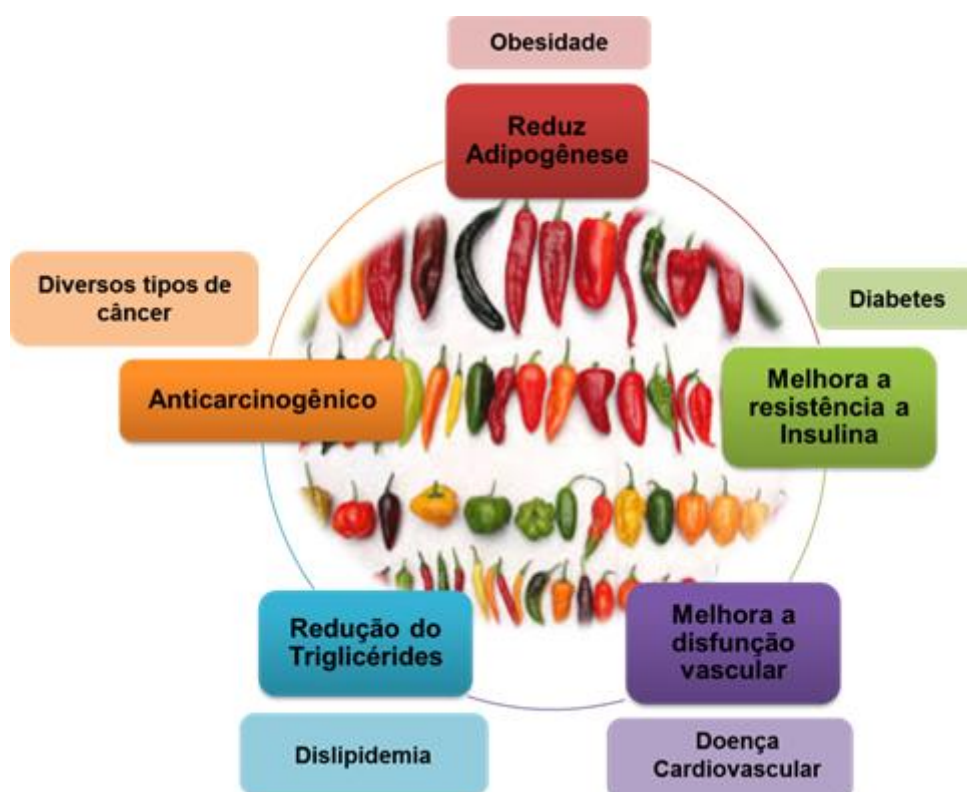
**Figura 7|** Resumo da Biossíntese da Capsaicina. (A) Via fenilpropanóide, produção do grupo fenólico.(B) Via dos ácidos Graxos produção da cadeia de ácidos graxos. A capsaicina sintase responsável pela formação da molécula capsaicina. Adaptado de STEWART, et al.(2007).

A concentração de capsaicina aumenta gradualmente durante o desenvolvimento da fruta, atingindo níveis máximos aos 40 a 50 dias. Após este período ocorre à degradação em compostos secundários devido à ação da peroxidase (STEWART, et al.,2007, REYES - ESCOGIDO et al., 2011).

Pesquisas destinadas a aumentar ou melhorar a produção de compostos pungentes revelaram que o estresse hídrico, aumenta os níveis de capsaicinóides, pois o déficit de água afeta a via da fenilpropanóide onde se concentra a pungência das pimentas (ESTRADA et al.,1999, STEWART et al., 2005, REYES - ESCOGIDO et al., 2011).

## 1.8 Ação da capsaicina e seus efeitos nutricionais e farmacológicos

A capsaicina é um ingrediente alimentar bioativo natural com propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica, termogênica e antioxidante auxiliando na proteção de diversas doenças como obesidade, hipertensão, dislipidemia, diabetes e aterosclerose (Figura 9) (HUANG et al., 2013; SUN et al., 2016). Além disso, estudos mais diversificados com a capsaicina são realizados com a intenção de investigar seus efeitos em diversos tipos de câncer como de estômago, mama, fígado, cólon e pulmão (CLARK; LE, 2016).



**Figura 9** | Imagem demonstrativa da ação da capsaicina em diversas doenças e seus efeitos fisiológicos. (SHARMA et al., 2013, CLARK; LEE, 2016).

Os efeitos farmacológicos da capsaicina são conhecidos desde a antiguidade. Extensas pesquisas foram realizadas para determinar aplicações específicas dessa molécula, inclusive para o trato gastrointestinal, para perda de peso e como analgésico (SRINIVASAN, 2016).

Seus análogos têm sido utilizados em forma de cremes tópicos para tratar síndromes de dores crônicas, como neuralgia pós-herpética (dores na pele), dor no musculo esquelético (tendões e articulações), neuropatia diabética (lesões nos nervos),

osteoartrite e artrite reumatóide. Também utilizado para tratar dor por erupção cutânea, psoríase, mastectomia, dores geradas pelo câncer e distúrbios da bexiga. (REYES-ESCOGIDO, et al.,2011, BASITH et al.,2016).

Um estudo de Armstrong e seus colaboradores (2011) observou que a aplicação tópica de 8% de capsaicina para tratar a neuralgia pós-herpética apresentou maior efetividade e apresentou menor custo que os demais remédios orais utilizados habitualmente para este tratamento (ARMSTRONG et al.,2011). Em outro estudo mais recente foi demonstrado a eficácia da aplicação tópica de 8% de capsaicina no tratamento do transtorno de articulação temporomandibular (CAMPBELL et al., 2017).

Além da aplicação tópica da capsaicina sua ação termogênica é bastante pesquisada. Um estudo em humanos demonstrou que a quantidade padronizada de 1 g de pimenta cayenne, que contém em sua composição 1995ug / g de capsaicina, 247 ug / g de nordihidrocapsaicina e 1350 ug / g de dihidrocapsaicina, por refeição apresentou aumento no gasto energético pós prandial e diminuição de apetite em adultos jovens (LUDY; MATTES, 2011).

Outro estudo randomizado duplo-cego de Zheng e colaboradores (2017), indicou que o peso corporal diminuiu a partir da segunda semana de suplementação em indivíduos entre 30 e 65 anos com índice de massa corpórea (IMC) acima de 23 kg / m<sup>2</sup> tratados com capsainóides (10 mg / kg por dia) por 4 semanas (ZHENG et al.,2017).

O efeito biológico da capsaicina depende da dose administrada e do tempo de exposição. A exposição a altas doses (acima de 100 mg de capsaicina por kg de peso corporal) durante um período prolongado pode causar úlceras pépticas, acelera o desenvolvimento de câncer de próstata, estômago, duodeno e fígado e metástase em câncer de mama (ROLLYSON et al., 2014). Em camundongos e ratos existe um valor máximo de ingestão de capsacina chamada de dose letal (DL50). Em camundongos machos a ingestão máxima é de 118,8 mg/ kg corpóreo e fêmea 97,4 mg/kg. Em ratos machos a DL50 chega a 161,2 mg/kg e em fêmeas 148,1mg/kg os sintomas são convulsão e dispnéia as causas de óbito estão relacionadas com a hipotensão e paralisia respiratória (SAITO;YAMAMOTO.,1996).

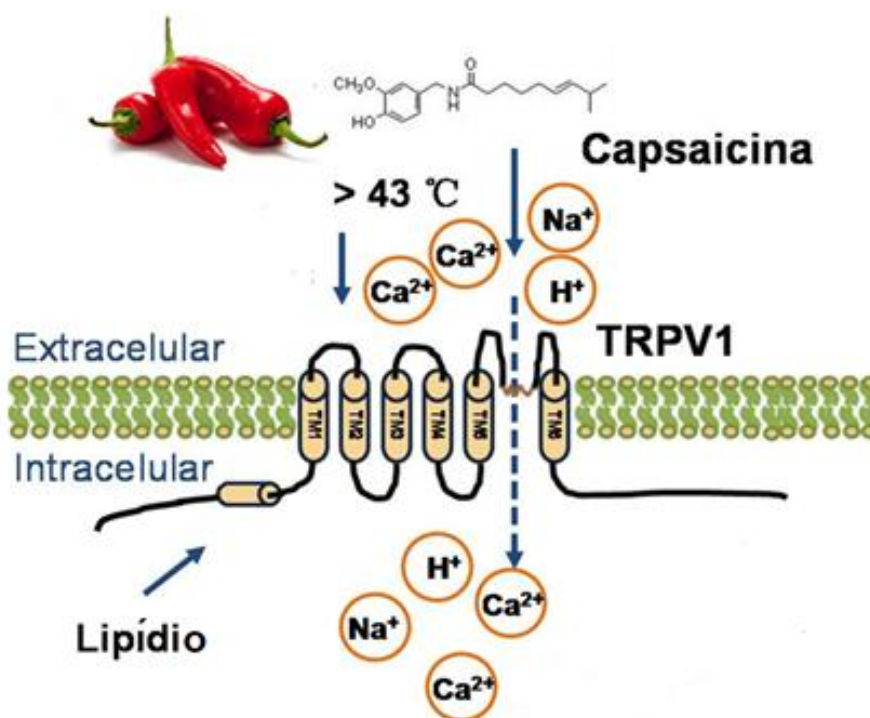
Os efeitos da capsaicina ocorre ao se ligar ao receptor de potencial transiente vanilóide do tipo 1 (TRPV1), expresso principalmente em neurônios sensoriais, porém distribuído amplamente em outros tecidos do corpo como rins, intestinos e fígado, além de diversas células como granulócitos, polimorfonucleares, mastócitos e macrófagos (GEES et al., 2010). O TRPV1 pertence à família TRP canais que participam das vias

de transdução da dor, visão, audição e sabor, participam também na regulação do crescimento celular, absorção de minerais, equilíbrio de fluido corporal, motilidade intestinal e função cardiovascular (SUN et al.,2016).

O TRPV1 é constituído por 838 aminoácidos e possui peso molecular de 95 kDa, consistindo de seis domínios transmembrana com uma pequena região de poro entre o quinto e o sexto domínio. O receptor regula os níveis intracelulares de íons através de um canal catiônico não específico permeável a sódio e cálcio, localizado na membrana plasmática e no retículo endoplasmático onde regula os níveis de cálcio intracelular (REYES - ESCOGIDO et al ., 2011). Ele é ativado através de múltiplos estímulos incluindo calor, baixo pH, moléculas de lípidos endógenas, e agonistas exógenos, como a capsaicina (Figura 8) (SUN et al.,2016).

Um estudo revelou que a ausência do receptor TRPV1 resultou num aumento da carcinogênese de pele em ratos (BODE et al.,2009).

Mesmo a TRVP1 sendo um dos principais receptores da capsaicina Jamie Lau (2014) e seus colaboradores identificaram que o TRPV6 também pertencente da família TRP apresentou atividade pro- apoptótica em modelo in vitro de células de câncer de pulmão em humanos (LAU et al., 2014).



**Figura 8** | Imagem adaptada da estrutura e função fisiológica do receptor TRVP1. A TRVP1 é composta por seis domínios de membrana. Apresenta um pequeno poro hidrofóbico entre o

quinto e o sexto domínio de transmembrana. O TRVP1 é ativado pelo calor (43°C) e pelo pH ácido (< 5.9) e por várias moléculas de lipídios. Além disso, a capsaicina ativa TRPV1 e desencadeia influxo de cátions e vários processos fisiológicos (SUN et al.,2016, BASITH et al.,2016).

### **1.9 Efeitos da Capsaicina na carcinogênese**

Embora muitos estudos sugiram diversos potenciais terapêuticos, a efetividade e segurança do consumo deste composto não foram ainda estabelecidos, sobretudo no contexto do processo de carcinogênese (BODE & DONG, 2011). Estudos conflitantes revelam que a capsaicina pode atuar na prevenção ou promoção do câncer, inibindo o crescimento de células tumorais leucêmicas, de hepatoma, de glioblastoma e do cólon através da parada do ciclo celular ou indução de apoptose (HUANG et al., 2013). Em contraste, alguns estudos demonstram o efeito co-carcinogênico e tumorigênico da capsaicina visto que extratos de pimenta promoveram o câncer de estômago e fígado em modelos murinos (DÍAZ BARRIGA ARCEO et al., 1995). Dados epidemiológicos também sugerem que o consumo de grandes quantidades de condimentos a base de pimenta pode estar correlacionado com o risco de câncer de estômago e bexiga (LÓPEZ-CARRILLO; HERNÁNDEZ AVILA, 1994).

No entanto, a avaliação do potencial cancerígeno da capsaicina produziu resultados variáveis em ensaios de genotoxicidade e carcinogenicidade *in vitro* e *in vivo*. A capsaicina testada em estudos mais antigos foi frequentemente de extratos de plantas de pimenta e incluiu outros capsaicinóides e diversas impurezas (BLEY et al., 2012) .

A capacidade da capsaicina em suprimir o crescimento tumoral de células neoplásicas é mediada primariamente pela indução de apoptose (HUANG et al., 2013). Adicionalmente, outras atividades associadas com os efeitos anticarcinogênicos da capsaicina inclui a inibição da proliferação celular, a parada do ciclo celular na fase G0/G1, regulação da expressão de fatores de transcrição e supressão dos sinais de crescimento, propriedades anti angiogênicas *in vitro* e *in vivo* e a supressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) responsável pela migração e formação de vasos (BOZOK CETINTAS et al., 2014; CLARK; LEE, 2016) (Figura 10).



**Figura 10** | Efeito anti-apoptótico, antiangiogênico, anti-metastático e anti- inflamatório da capsaicina nos marcadores do câncer.

A apoptose mediada pelo TRPV1 envolve as vias extrínseca e intrínseca. A via extrínseca da apoptose é iniciada pelo estímulo dos receptores de morte celular que induzem a formação do complexo DISC (*death-inducing signaling complex*) que, subsequentemente, promove a ativação da caspase 8 (LIN et al., 2013). Em um estudo utilizando-se células tumorais uroteliais, demonstraram que a utilização da capsaicina nestas, interage na mediação com o TRPV1 e induz a ativação da apoptose extrínseca (AMANTINI et al., 2009, ZAMAN et al.,2014).

A via intrínseca é iniciada por vários sinais intracelulares que causam injúria na célula (e.g. dano de DNA, estresse do retículo endoplasmático) e envolve a resposta mitocondrial. A ativação do receptor TRVP1 pela interação com a capsaicina promove a abertura do canal catiônico levando ao aumento do cálcio intracelular, alterando a permeabilidade da membrana mitocondrial e promovendo a liberação proteínas pró apoptóticas como o citocromo c e o fator indutor de apoptose (AIF) (LIN et al., 2013, ZAMAN et al.,2014). Consequentemente, há a ativação da procaspase-9 pelo complexo ativador denominado apoptossomo, resultante da interação entre o citocromo C e o AIF (HASSAN et al., 2014).

Em estudo anterior demonstramos que a capsaicina, administrada antes e durante a exposição do carcinógeno dimetilhidrazina (DMH), induziu resposta pro-

apoptótica e anti-proliferativa com expressão de genes envolvidos na apoptose, supressão do ciclo celular e diferenciação celular na mucosa colônica de ratos Wistar tratados agudamente com o cancerígeno (CAETANO et al., 2018).

Portanto, nossa hipótese baseia-se em dois principais pressupostos: (i) na propriedade pró apoptótica da capsaicina pela ativação das vias extrínseca e intrínseca pela família de receptores TRP e, (ii) propriedade anti-proliferativa da capsaicina na etapa de promoção do câncer. Sob a perspectiva da carcinogênese, este trabalho tem como proposição avaliar a atividade quimiopreventiva da capsaicina em modelo de carcinogênese de cólon induzido pela DMH.

## **2.0 Justificativa**

Considerando o aumento câncer de intestino grosso no Brasil e um aumento da produção e consumo de pimenta em algumas áreas do mundo e no Brasil, principalmente no norte, nordeste e sudeste, e o seu atual uso terapêutico, a análise da capsaicina constitui-se de grande relevância. Uma avaliação adequada de quaisquer efeitos nocivos e/ou benéficos é essencial do ponto de vista da saúde pública. Numerosas investigações têm sido conduzidas no sentido de determinar potenciais atividades mutagênica e carcinogênica da capsaicina, contudo os resultados são ainda muito conflitantes. Sobre esta problemática estabelecemos nossa investigação na perspectiva da carcinogênese de cólon experimental.

## **3.0 Objetivo**

### **3.1. Objetivo Geral**

Investigar o efeito da capsaicina na etapa de promoção/progressão da carcinogênese de cólon induzida pela 1,2-dimetilhidrazina (DMH).

### **3.2. Objetivos Específicos**

Analisar o efeito da ingestão da capsaicina sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas (FCA) e tumores colônicos induzidos pela DMH.

Investigar o potencial efeito protetor da capsaicina sobre a expressão de genes que regulam as vias de proliferação celular, apoptose, invasão, metástase e inflamação pela técnica Taqman® Low Density Array (TLDA) em tumores.

## **4.0 Materiais e Métodos**

### **4.1 Animais e ambiente de experimentação**

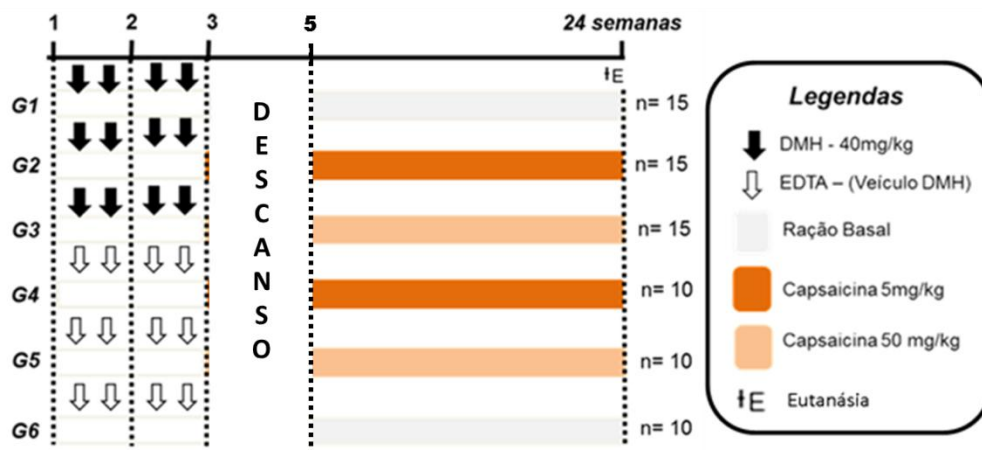
Foram utilizados 75 ratos da linhagem Wistar com seis semanas de idade e pesando em média 200 gramas. Todos os animais utilizados no presente projeto foram adquiridos em Paulínia-SP e mantidos no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, em gaiolas plásticas opacas, com tampa de aço inox na forma de grade, forradas com maravalha de pinho, contendo quatro animais cada com aprovação do Comitê de Ética 1153/ 2015-CEUA no uso dos animais.

O período de aclimação foi de uma semana. Durante a fase de experimentação foram controladas as condições ambientais do biotério como temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa do ar ( $55 \pm 10\%$ ) e período de 12/12 horas claro/escuro. Todos os animais tiveram livre acesso à água e ração e durante o experimento, os mesmos passaram por avaliação clínica semanal.

### **4.2 Delineamento experimental**

Após o período de aclimação, os animais foram iniciados por gavagem com a 1,2-dimetilhidrazina (DMH Sigma-Aldrich, EUA) durante a primeira e segunda semanas do experimento, sendo 3 doses por semana, em seguida tiveram 2 semanas de descanso e a partir da quinta semana receberam capsaicina (Sigma-Aldrich, EUA, 98% de pureza) ou veículo via intragástrica nas concentrações de 5mg/kg e 50mg/kg, diluída em óleo de milho.

A experimentação em biotério no modelo de carcinogênese de cólon pela DMH teve duração de 24 semanas. Após o período de iniciação da carcinogênese de cólon, os animais receberam a capsaicina via intragástrica durante 20 semanas. A eutanásia ocorreu ao final da 24ª semana do experimento (Figura 11).



**Figura 11** | Delineamento experimental utilizando o modelo de carcinogênese de cólon induzida pela DMH.

### - Grupo Controle Positivo

Grupo 1 – Os animais receberam quatro doses de 40 mg/kg de DMH, via subcutânea, durante a primeira e segunda semanas do experimento. Os animais foram alimentados com ração basal e água *ad libitum* durante todo o experimento.

### - Grupos Testes Positivos

Grupos 2 e 3 - Os animais receberão quatro doses de 40 mg/kg de DMH, via subcutânea, durante a primeira e segunda semanas do experimento. Após a iniciação os animais receberam a dose de 5mg/kg e 50mg/kg de capsaicina diluído em óleo de milho. Os animais foram alimentados com ração basal e água *ad libitum* durante todo o experimento.

### - Grupos Controles Negativos

Grupos 4 e 5 – Os animais receberam quatro injeções subcutâneas de EDTA (veículo de DMH), durante a primeira e segunda semanas do experimento. Após a iniciação os animais receberam a dose de 5mg/kg e 50mg/kg de capsaicina diluído em óleo de milho. Os animais foram alimentados com ração basal e água *ad libitum* durante todo o experimento.

## - Grupo Controle Duplo Negativo

Grupo 6 – Os animais receberam quatro injeções subcutâneas de EDTA (veículo de DMH), durante a primeira e segunda semana do experimento. Os animais foram alimentados com ração basal e água *ad libitum* durante todo o experimento.

### 4.3 Eutanásia dos animais

No final da vigésima quarta semana a eutanásia dos animais ocorreu por exsanguinação após administração de anestésico (75mg/kg de xilasina; 10mg/kg de ketamina). Foi realizada uma incisão na face ventral do animal ao longo da linha média até o final da cavidade abdominal para coleta do cólon. O colón foi aberto com incisão longitudinal na linha mesentérica, no sentido colón proximal-reto e as lesões tumorais foram registradas e medidas. Amostras de tumores colônicos foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em biofreezer à -80°C. O colón remanescente foi fixado e preso à prancha de isopor por 24 horas. Após 24 horas de fixação em formalina 10%, os cólons permaneceram em álcool 70% e no dia seguinte as amostras foram lavadas em água corrente. Essas amostras foram em seguida submetidas para análise de focos de criptas aberrantes (FCA).

### 4.4 Análises Macroscópica dos tumores

No momento da eutanásia foram feitas 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 a seguir (CHATTERJEE et al.,2010).

$$\frac{4}{3} \times 3,14 \times \left(\frac{\text{comprimento}}{2}\right) \times \left(\frac{\text{largura}}{2}\right) \times \left(\frac{\text{profundidade}}{2}\right)$$

Os tumores foram classificados em três categorias: pequeno: < 30 mm<sup>3</sup>, médio: 30-60 mm<sup>3</sup> e grande: > 60 mm<sup>3</sup>.

#### **4.5 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 campo em microscópio de luz convencional em objetiva de 20x (Axiostarplus, Zeiss). A identificação dos FCA foi baseada em seus aspectos morfológicos diferenciais segundo Bird, 1987 e 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). Os FCA foram quantificados e classificados em três grupos quanto ao número de criptas aberrantes (1-3, 4-9 e  $\geq 10$  criptas), além do número total de CA e FCA. Foram analisadas as porções proximal, medial e distal do cólon de todos os animais. Os fragmentos do cólon foram processados para inclusão em parafina para análise histopatológica. (YAMADA et al., 2000, YAMADA, MORI et al., 2003, HATA et al., 2004).

#### **4.6 Análise histopatológica de tumores**

A análise histopatológica foi feita em amostras obtidas das lesões macroscópicas, bem como das lesões (tumores) encontrados no cólon incluído em *swiss roll* no protocolo de promoção. As lesões neoplásicas foram classificadas de acordo com os critérios da “International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria for Lesions in Rats and Mice” (INHAND) (PETER et al., 2012).

#### **4.7 Análises imunoistoquímicas**

Foram feitas reações imunoistoquímicas para Ki-67 (Abcam16667, Reino Unido) e caspase-3 ativada (Abcam 179517, Reino Unido) na mucosa do cólon e nos tumores. A marcação imunoistoquímica para  $\beta$ -catenina (Abcam 32572, Reino Unido) foi efetuada nos tumores do cólon. Os cortes histológicos em lâminas silanizadas foram desparafinizados em xilol e hidratados em álcool absoluto, álcool 95%, álcool 70% e água destilada. As lâminas foram incubadas em tampão citrato 0,1M seguidas de

recuperação antigênica em panela de pressão Pascal (Dako Cytomation, Dinamarca). A seguir foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% em PBS, durante 10 minutos e posteriormente o bloqueio de ligações inespecíficas em leite desnatado a 7% em PBS por 1 hora. As lâminas foram incubadas com caspase-3 ativada, Ki-67 ou β-catenina em albumina bovina sérica 1% (ABS, Sigma Aldrich, EUA) nas respectivas diluições de 1:2000, 1:200 e 1:500, overnight à 4°C. Na etapa seguinte as lâminas foram incubadas por 15 minutos com Biotinylated-link Dako Universal e por 15 minutos com Streptoavidin – HRP. A revelação da peroxidase foi realizada com 3'3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro (DAB) (Sigma- Aldrich CO, MO, EUA) e a contra-coloração foi feita com hematoxilina de Harris. A desidratação das lâminas foi realizada em álcool e xilol. Posteriormente, foi feita montagem das lamínulas em resina sintética Permount (FISHER, EUA).

A contagem de células epiteliais com expressão de Caspase-3 ativada e Ki-67 nos fragmentos colônicos e tumores foi realizada em microscópio de luz convencional (Olympus BX 53). Os índices de apoptose (IA%) e o de proliferação celular (IP%) foram calculados dividindo-se o número de células caspase-3 ativada ou Ki-67 positivas pelo número total de células contadas multiplicando-se por 100. Para a mucosa do cólon, foram analisadas vinte criptas inteiras por animal, da base ao ápice, sendo escolhidas de forma aleatória nos três segmentos do cólon de cada animal (5 animais/grupo, totalizando 100 criptas por grupo). Para os tumores colônicos, foram analisadas 1000 células em 5 quadrantes distintos. A análise qualitativa da expressão de β-catenina foi efetuada classificando os tumores colônicos pela predominância de expressão de membrana (normal) ou nuclear (aberrante) (YAMADA et al., 2000, YAMADA, MORI et al., 2003, HATA et al., 2004).

#### **4.8 Extração, quantificação e análise da qualidade do RNA.**

Durante a eutanásia foram coletadas amostras de raspado da mucosa do cólon e fragmentos de tumores colônicos. As amostras foram acondicionadas em tubos criogênicos livres de RNase/DNase, imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em biofreezer à -80°C até o momento da extração do RNA total. O RNA total das amostras foi extraído utilizando-se o kit Rneasy (Qiagen, Hilden, Germany), seguindo as instruções do fabricante. As amostras tumorais foram quantificadas utilizando-se espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ,

EUA).A qualidade do RNA foi verificada em eletroforese capilar, utilizando-se Agilent 2100 Bioanalyser Nano Kit (Agilent Technologies, EUA) e expressa pelo número de integridade do RNA (RNA Integrity Number, RIN).O RIN foi obtido a partir da análise dos RNAs ribossomais pelo sistema 2100 Bioanalyzer (©Agilent Technologies, EUA). Os valores de RIN variam entre 10 (RNA intacto) a 1 (RNA degradado). Em experimentos que envolvam a extração de RNA de amostras de tecido animal, valores de RIN > 7 são considerados adequados para a quantificação em RT-qPCR enquanto que RINs < 7 são descartados (SCHROEDER et al, 2006).

#### **4.9 Reação de transcrição reversa**

A transcrição reversa do RNA total extraído de cada amostra foi realizada utilizando o SuperScript® IV cDNA Synthesis Kit (Invitrogen™ - Life Technologies, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Em uma primeira etapa, hexâmeros randômicos (50 ng/μL) e dNTPmix (10 mM) foram adicionados às amostras de RNA total e anelados à 65°C por 5 minutos. As amostras foram então incubadas em gelo por 1 minuto. Posteriormente, foi adicionado o mix para a reação de transcrição reversa (tampão SSIV, 100nM DTT, inibidor de ribonuclease e SuperScript IV transcriptase reversa). A reação de transcrição reversa foi incubada em três ciclos de dez minutos cada, nas temperaturas de 23°C, 53°C e 80°C, respectivamente. Após retirado do termociclador, o cDNA foi armazenado à temperatura de -20°C até o momento do uso para as reações de RT-qPCR.

#### **4.10 PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)**

O perfil de expressão dos 95 mRNAs pré-selecionados para os tumores colônicos foram analisados utilizando a plataforma Taqman Low Density Array (TLDA). Foram utilizadas 5 amostras de cDNA de cada grupo experimental. Para cada amostra, foram utilizados 100 μL de TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Life Technologies, EUA), 16 μL do produto da reação de transcrição reversa (cDNA) e o volume final foi ajustado para 200 μL com água; o preparo do cartão foi feito segundo as instruções do fabricante (Life Technologies, EUA). 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 glicosilase (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. Cada gene foi normalizado entre as amostras utilizando a média dos quatro genes endógenos que apresentaram maior estabilidade, sendo eles *β-Actin*, *Gapdh*, *Gusband* e *Hprt1*. A expressão relativa dos genes foi calculada pelo método de Ct comparativo utilizando o software Expression Suit (Life Technologies, EUA). A análise funcional de riqueza dos genes diferencialmente expressos foi conduzida utilizando a plataforma Gene Ontology (ASHBURNER et al. 2000).

## **5.0 Análises Estatísticas**

Os resultados dos diferentes parâmetros foram comparados entre os grupos utilizando o teste de ANOVA ou Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado será o de  $p < 0,05$ . Todos os dados de expressão gênica obtidos pela metodologia TLDA foram analisados com o software Real time StatMiner® 4.1 (Integromics, Espanha).

## **6.0 Resultados**

### **6.1 Dados do Experimento em Biotério**

A Tabela 1 apresenta os valores médios do peso inicial, final e ganho de peso dos animais nos diferentes grupos. Não foram observadas alterações significativas nesses parâmetros, mas foi observado no grupo controle (G6) tendência para aumento de ganho de peso corpóreo. Ao longo das intubações gástricas ocorreram falhas técnicas (G1= 1 animal, G2= 5 animais, G3= 2 animais, G4= 6 animais, G5= 9 animais).

**Tabela 1** - Peso corpóreo dos animais dos diferentes grupos experimentais tratados até 24 horas depois da última aplicação da DMH.<sup>1</sup>

Tratamentos <sup>2</sup>	No. de ratos	Peso Corpóreo (g)		
		Peso Inicial	Peso Final	Ganho de Peso
(G1) DMH	14	240.53 ± 20.96	479.07 ± 54.51	236.57 ± 41.03
(G2) DMH + CAP 5	10	238.93 ± 17.92	466.00 ± 59.44	233.50 ± 52.61
(G3) DMH + CAP 50	13	229.56 ± 18.30	447.69 ± 47.47	218.23 ± 36.83
(G4) EDTA + CAP 5	9	233.40 ± 16.87	477.22 ± 64.11	246.44 ± 52.22
(G5) EDTA + CAP 50	6	232.20 ± 17.74	483.66 ± 81.73	250.16 ± 65.11
(G6) EDTA	10	238.60 ± 27.63	509.00 ± 52.27	270.40 ± 37.11

<sup>1</sup>Dados expressos como média ± desvio padrão.<sup>2</sup> G1= DMH + veículo; G2= DMH + CAP 5mg; G3= DMH + CAP 50mg ;G4= CAP 5mg; G5 = 50mg; G6 = EDTA. Médias comparadas pelo teste de ANOVA seguida por Tukey. Sem diferença estatística no ganho de peso (p=0,1740).

A Tabela 2 apresenta os valores médios de consumo de ração e água no decorrer do experimento. Não foram observadas alterações significativas entre os diferentes grupos experimentais.

**Tabela 2** - Consumo de ração e água dos animais dos diferentes grupos ao longo do experimento.<sup>1</sup>

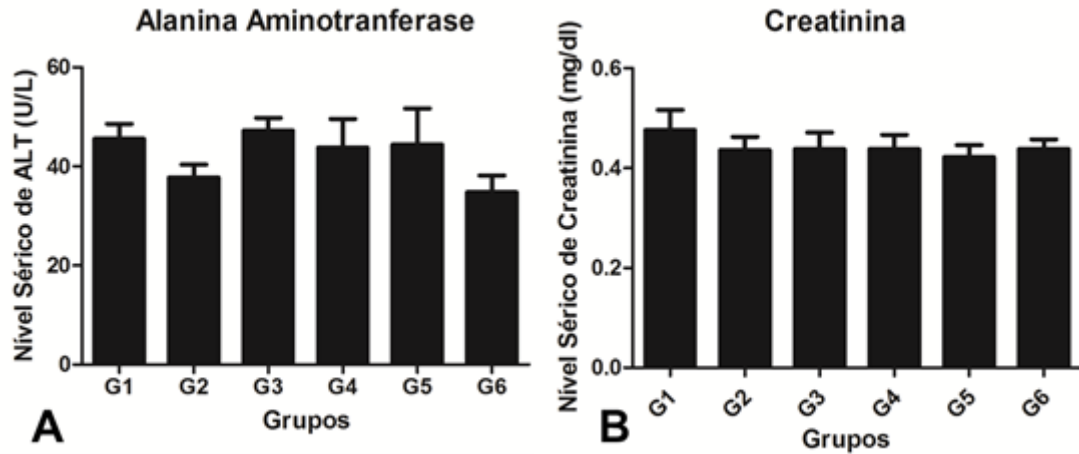
Tratamentos <sup>2</sup>	*No. de ratos	Consumo (rato/dia)	
		Ração (g/rato/dia)	Água (g/rato/dia)
(G1) DMH	14	21.51 ± 1.51	28.58 ± 1.36
(G2) DMH + CAP 5	10	21.44 ± 1.35	30.81 ± 1.86
(G3) DMH + CAP 50	13	21.23 ± 1.32	30.06 ± 2.25
(G4) EDTA + CAP 5	9	22.07 ± 1.54	30.01 ± 2.59
(G5) EDTA + CAP 50	6	22.11 ± 1.73	29.67 ± 3.81
(G6) EDTA	10	23.03 ± 1.41	30.17 ± 2.77

<sup>1</sup>Dados expressos na forma de média ± desvio padrão. G1= DMH + veículo; G2= DMH + CAP 5mg; G3= DMH + CAP 50mg ;G4= CAP 5mg; G5 = 50mg; G6 = EDTA. Médias comparadas pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

## 6.2 Determinação da transaminase e Creatinina

A Figura 12 apresenta os valores médios dos níveis séricos de creatinina e transaminase (ALT) nos diferentes grupos experimentais. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos iniciados e não-iniciados.

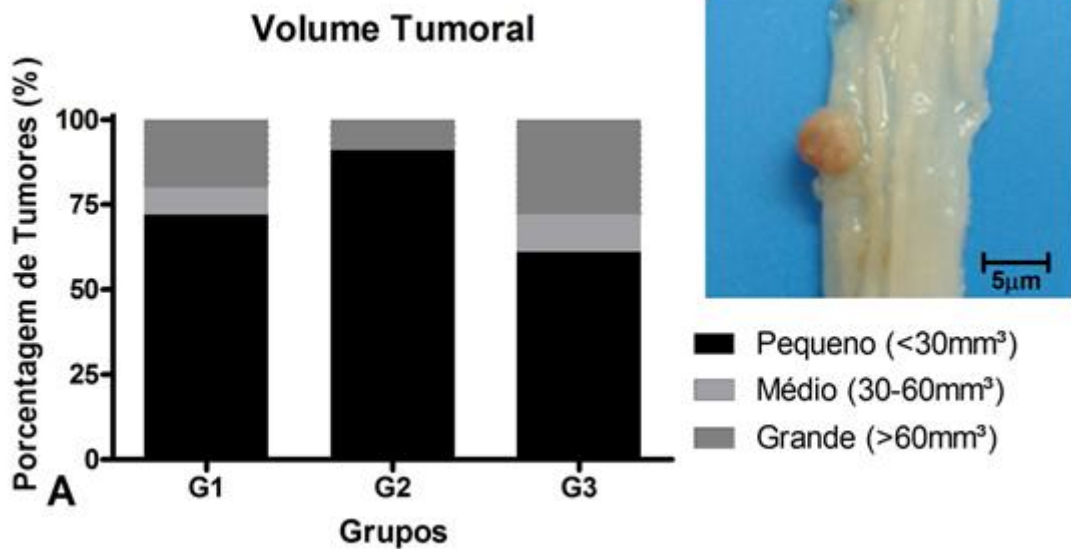
Nos dados de peso absoluto e relativo hepático e renal não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (ANEXO Tabela 1 e 2).



**Figura 12|** Análise dos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) e creatinina de 5 animais dos diferentes grupos experimentais. <sup>1</sup>Determinação da atividade sérica de **A:** ALT e **B:** Creatinina: <sup>1</sup>Dados expressos como média ± desvio-padrão. Teste de ANOVA seguido de Tukey  $p=0.854$  e  $p=0.3463$ . Sem diferença estatística. G1 = DMH + veículo; G2 = DMH + CAP 5mg; G3 = DMH + CAP 50mg; G4 = CAP 5mg; G5 =CAP 50mg; G6 = EDTA.

### 6.3 Análise de volume tumoral e incidência

A Figura 13 mostra dados de volume tumoral classificando os tumores colônicos macroscópicos como pequenos  $< 30 \text{ mm}^3$ , médios  $30\text{-}60 \text{ mm}^3$  e grandes  $> 60 \text{ mm}^3$  nos diferentes grupos experimentais. Os animais iniciados e com capsaicina na menor dose (5 mg/kg, G2) apresentaram maior percentual de tumores pequenos ( $<30 \text{ mm}^3$ ) quando comparados ao grupo iniciado que não recebeu capsaicina (G1), no grupo que recebeu a maior dose (50 mg/kg, G3) apresentou menor percentual de tumores pequenos e maior percentual de tumores médios e grandes quando comparados ao grupo iniciado que não recebeu capsaicina (G1), mas sem diferenças estatísticas significativas entre os grupos.



**Figura 13 | A:** Dados do volume tumoral (mm<sup>3</sup>) no cólon dos animais dos diferentes grupos experimentais. **B:** Aspecto macroscópico de tumores na região medial do cólon. G1= DMH; G2 = DMH + CAP 5mg/kg; G3 = DMH + CAP 50mg/kg. (G1 Pequeno: 18, Médio: 2, Grande: 5, G2 Pequeno 10, Médio:0 , Grande 2, G3 Pequeno: 11, Médio:2 , Grande: 5)

As lesões tumorais foram identificadas predominantemente nas regiões média e distal do colón dos animais. A incidência e multiplicidade de tumores foi similar entre os diferentes grupos tratados com DMH (Tabela 3).

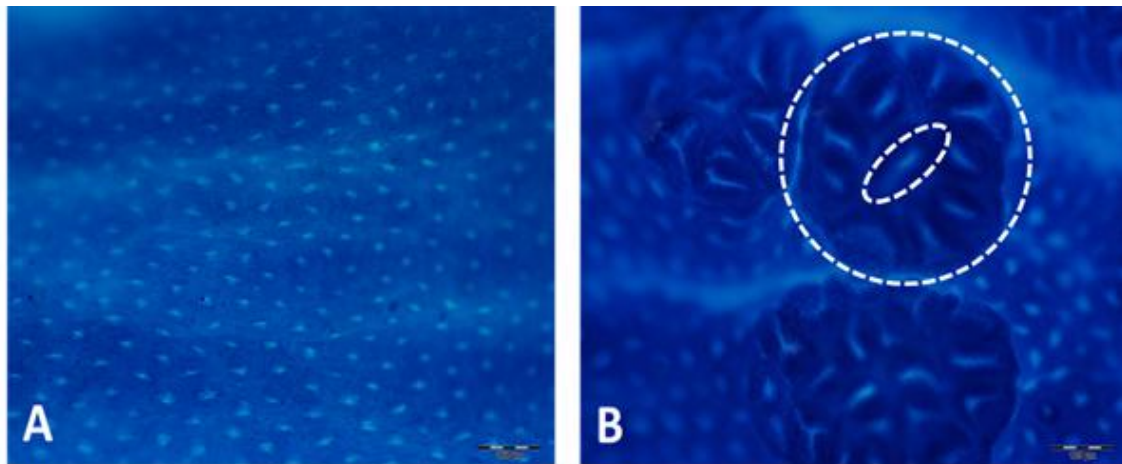
**Tabela 3-** Incidência dos tumores colônicos induzidos pela DMH nos diferentes grupos experimentais.<sup>1</sup>

Grupos/Tratamentos <sup>2</sup>		Número de ratos	Incidência	Multiplicidade
(G1)	DMH	14	11 (78,57%)	2.47±2.00
(G2)	DMH + CAP 5	10	8 (77,77%)	1.13±1.25
(G3)	DMH + CAP 50	13	11 (84,62%)	1.73±1.91

<sup>1</sup>Dados expressos em porcentagem, comparados entre si pelo teste exato de Fisher (p=0,20) e multiplicidade pelo teste de ANOVA (p=0,196). <sup>2</sup>DMH= 1,2-dimetilhidrazina (4 x 40mg/kg, sc); CAP 5 = capsaicina 5 mg/kg; CAP 50 = capsaicina 50 mg/kg.

## 6.4 Análise de FCA

A Tabela 3 apresenta os resultados referentes à análise quantitativa de FCA. Observamos no grupo tratado com capsaicina na maior dose (50mg/kg, G3) redução significativa do número total de FCA, bem como número de FCA com 1-3 e 4-9 criptas, quando comparados com o respectivo grupo controle tratado com DMH (G1). A Figura 14 mostra imagens do cólon corado com azul de metileno exibindo FCA.



**Figura 14**|A: Fotomicrografia de cólon normal corado com azul de metileno (G6). B: Cólon tratado com DMH exibindo focos de FCA com >10 criptas (G1). Barra = 100 $\mu$ m.

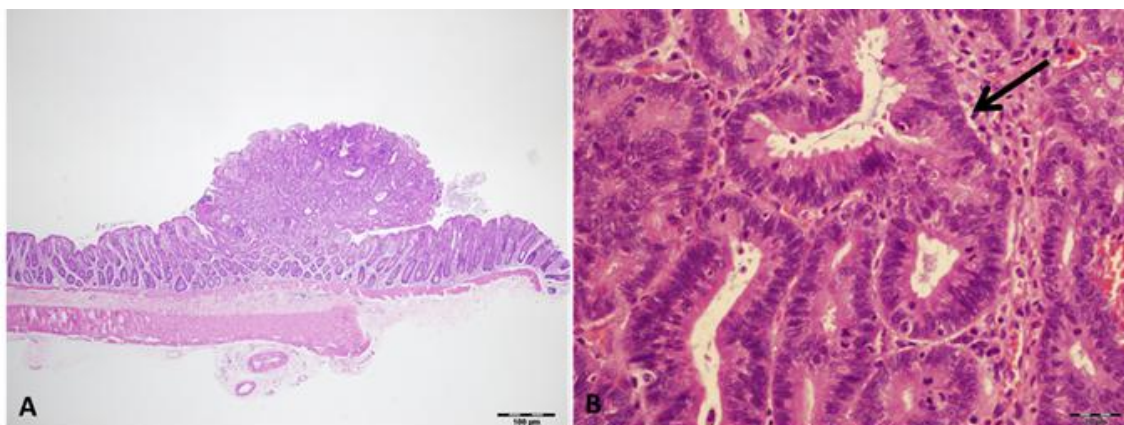
**Tabela 3** - Efeito da capsaicina no desenvolvimento de focos de criptas aberrantes (FCA).<sup>1</sup>

Grupos/Tratamentos <sup>2</sup>	Nº de animais	Número de FCA			Número Total		
		1-3 criptas	4-9 criptas	≥ 10 criptas	CA <sup>3</sup>	FCA	CA/FCA
(G1) DMH	14	162.40 ± 64.02	153.25 ± 36.05	30.30 ± 18.54	1627.50 ± 502.41	350.40 ± 93.17	4.69 ± 0.83
(G2) DMH + CAP 5	10	120.40 ± 26.76	120.80 ± 46.40	26.00 ± 15.38	1295.10 ± 467.24	267.20 ± 75.48	4.74 ± 0.75
(G3) DMH + CAP 50	14	97.50 ± 41.60 <sup>a</sup>	79.20 ± 49.42 <sup>a</sup>	17.90 ± 11.30	884.20 ± 464.61 <sup>a</sup>	194.60 ± 92.18 <sup>a</sup>	4.46 ± 1.06
(G4) CAP 5	9	0.33±0.50	0.11±0.33	0	1.67±3.04	0.44±0.73	1.17±1.80
(G5) CAP 50	6	0.33±0.52	0	0	1.00±1.55	0.33±0.52	1.00±1.55
(G6) Controle	10	0	0	0	0	0	0

<sup>1</sup>Dados expressos na forma de média ± desvio padrão. <sup>2</sup>DMH= 1,2-dimetilhidrazina (4 x 40mg/kg, s.c.); CAP 5 = capsaicina 5 mg/kg; CAP 50 = capsaicina 50 mg/kg. Médias comparadas pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey. <sup>3</sup>AC = Criptas Aberrantes. <sup>a</sup>Diferente de G1 p < 0,049.

## 6.5 Análise histopatológica de tumores

No protocolo de promoção, adenocarcinomas tubulares bem diferenciados (Figura 15A e 15B) foram os padrões histológicos de neoplásias malignas mais frequentes entre os grupos tratados com DMH (G1-G3).



**Figura 15** | Corte histológico de tumor de cólon induzido pela DMH corados em H&E (G1). **A:** adenocarcinoma tubular. **B:** Displasia de Alto grau. Barra= 100  $\mu$ m (A) e 20 $\mu$ m (B).

A Tabela 4 demonstra redução significativa na incidência de adenocarcinomas tubulares invasivos com consequente aumento de carcinomas *in situ* no grupo que recebeu a maior dose de capsaicina (50 mg/kg, G3) em relação ao grupo controle tratado com DMH (G1).

**Tabela 4** – Características dos tumores colônicos induzidos pela DMH nos diferentes grupos experimentais.<sup>1</sup>

Grupos/Tratamentos		Nº de animais	Adenocarcinoma Tubular Invasivo	Carcinoma <i>in situ</i>	Adenocarcinoma Mucinoso	Total
(G1)	DMH	14	32 (86,48%)	4 (10,81%)	1(2,70%)	37
(G2)	DMH + CAP 5	10	12 (75%)	4 (23,53%)	1 (6,25%)	17
(G3)	DMH + CAP 50	14	14 (56%)*	11 (42,3%)**	1(4%)	26

<sup>1</sup>Dados expressos em porcentagem, comparados entre si pelo teste exato de Fisher, \*\*\*Diferente do grupo G1(p=0,0161) e (p= 0,0120).

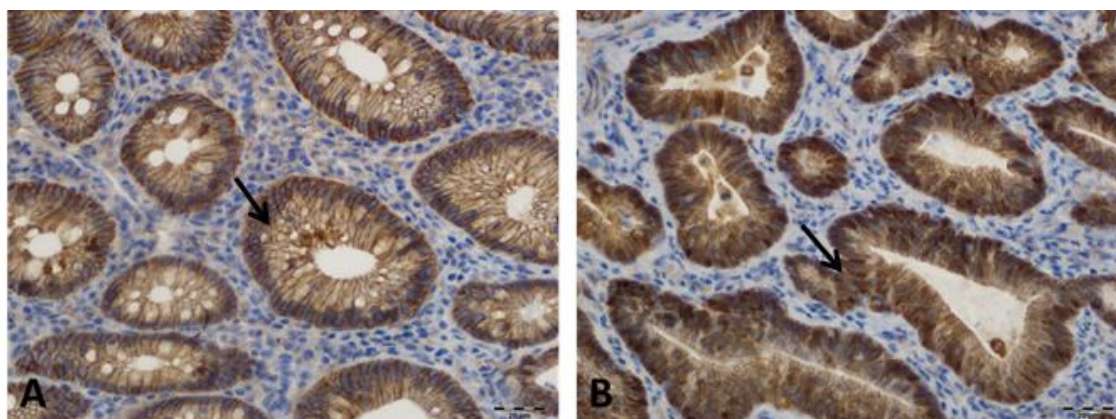
## 6.6 Análises imunoistoquímicas

Na análise de expressão da  $\beta$ -catenina em tumores observamos redução da marcação nuclear no grupo tratado com capsaicina na maior dose (50mg/kg, G3) em comparação com o respectivo grupo controle tratado com a DMH (G1) como demonstrado na Tabela 5 e ilustrado na Figura 16.

**Tabela 5-** Classificação da expressão imunoistoquímica de  $\beta$ -catenina nos tumores dos grupos tratados com DMH.

	Grupos/Tratamentos <sup>2</sup>	Membrana	Núcleo	Total
(G1)	DMH	2( 20,00%)	8 (80,00%)	10
(G2)	DMH + CAP 5	5 (62,50%)	3( 37,50%)	8
(G3)	DMH + CAP 50	6 (85,71%)*	1(14,28%)*	7*

<sup>1</sup>Dados expressos em porcentagem, comparados entre si pelo teste Qui- quadrado, \*Diferente do grupo G1(  $p= 0,0152$ ). <sup>2</sup>DMH= 1,2-dimetilhidrazina (4 x 40mg/kg, sc); CAP 5 = capsaicina 5 mg/kg; CAP 50 = capsaicina 50 mg/kg.

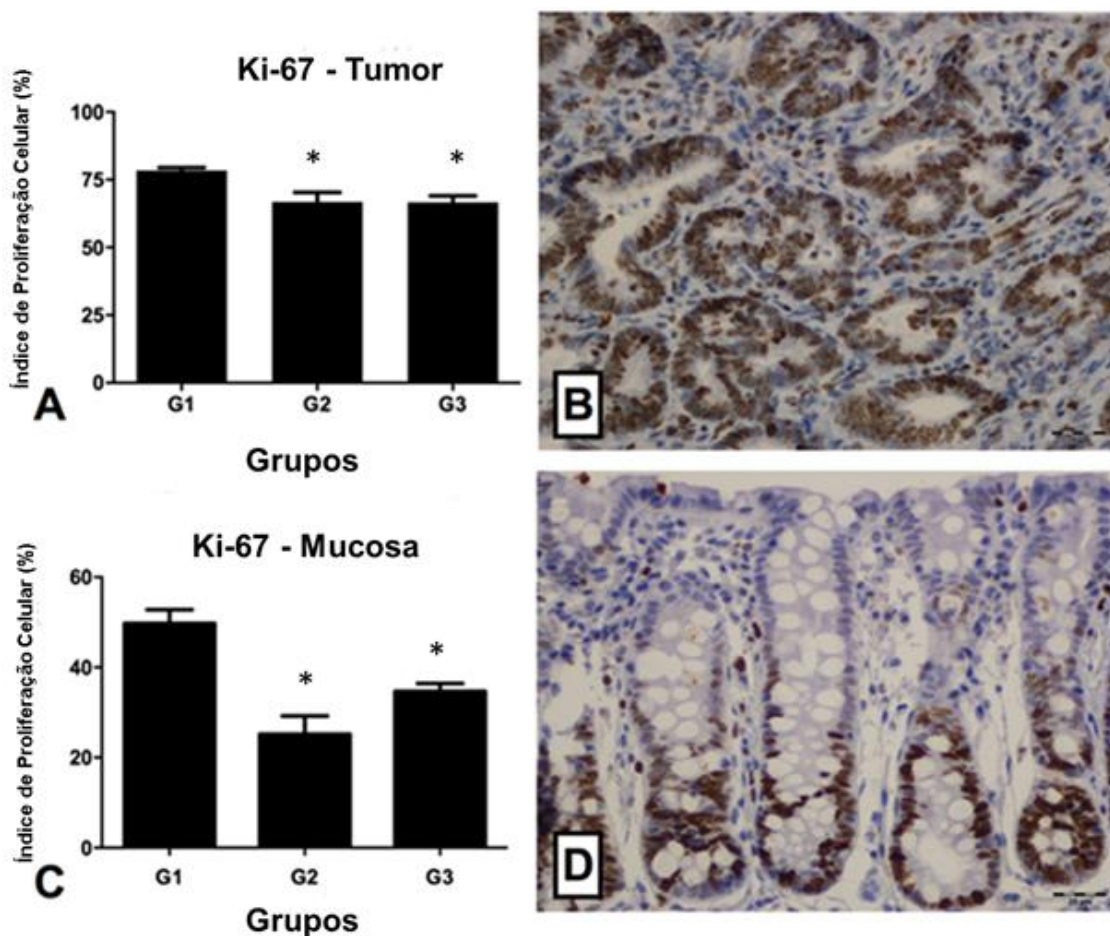


**Figura 16** |Expressão imunoistoquímica de  $\beta$ -catenina em tumores colônicos induzidos pela DMH. **A:** Marcação de membrana. **B:** Marcação nuclear. Barra= 20 $\mu$ m.

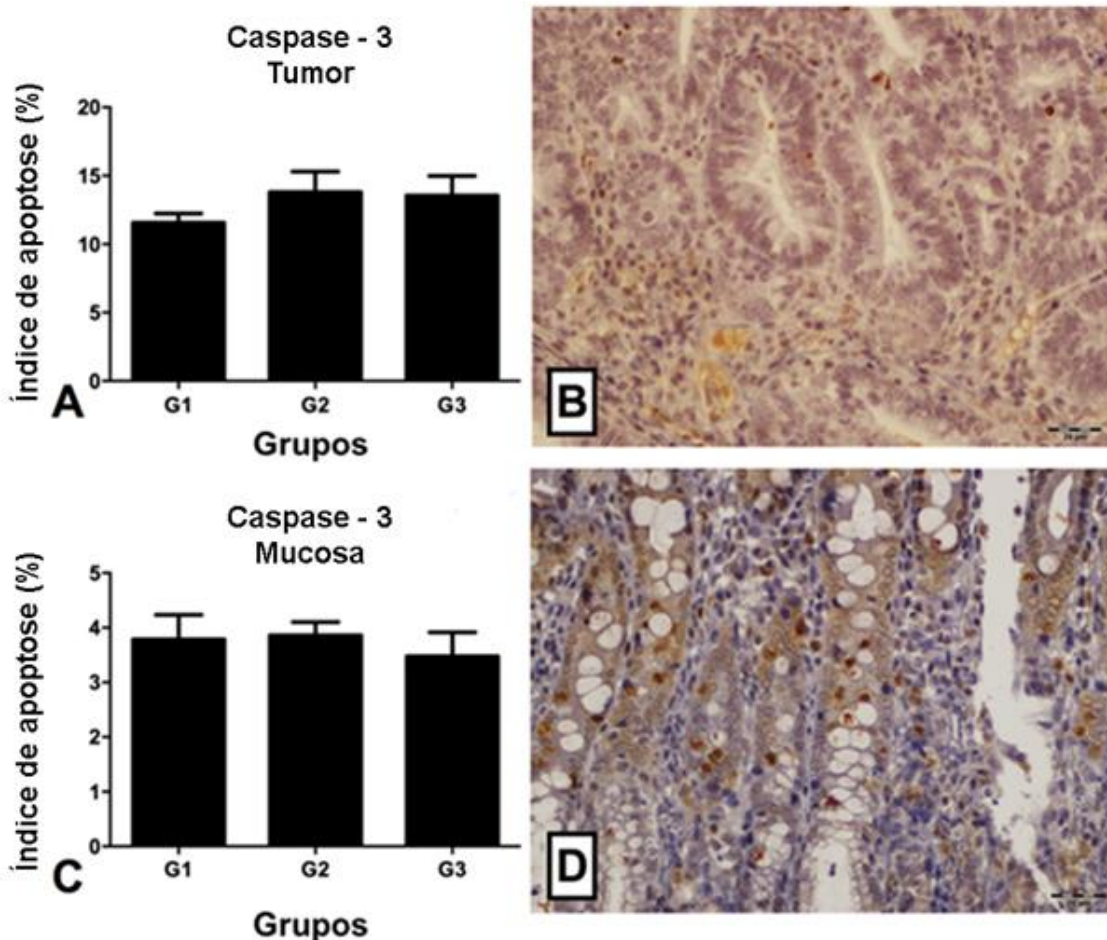
Na análise de proliferação celular pelo Ki-67, a administração de capsaicina nas doses de 5 e 50mg/kg (G2 e G3) reduziu significativamente os índices de proliferação celular em tumores ( $p=0,0002$ ) e no tecido colônico ( $p= 0,0071$ ) em relação

ao grupo controle tratado com DMH (G1). A Figura 17 apresenta dados da análise imunoistoquímica da expressão de Ki-67.

Os índices médios de apoptose avaliados pela expressão de caspase-3 não diferiram entre os grupos experimentais. A Figura 18 demonstra os dados referentes a apoptose obtidos pela expressão imunoistoquímica de caspase-3 ativada em tumores e no tecido colônico dos diferentes grupos experimentais.



**Figura 17** | Índices de proliferação celular pelo Ki-67 em tumores do cólon (A) e na mucosa colônica (C) nos grupos tratados com DMH. Marcação imunoistoquímica de Ki-67 nos tumores (B) e na mucosa do cólon (D). <sup>1</sup>Dados expressos como média ± desvio-padrão. G1 = DMH + veículo; G2 = DMH + CAP 5mg/kg; G3 = DMH + CAP 50mg/kg; G4 = CAP 5mg/kg; G5 = CAP 50mg/kg; G6 = SHAM. \*Diferete de G2 e G3 (p=0,0002) e (p= 0,0071) pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey. .(A) Contagem de células em proliferação celular em 5 tumores por grupo.(C) Contagem de células em proliferação celular na mucosa em 6 animais por grupo sendo 20 criptas inteiras por animal.



**Figura 18** Índice de apoptose pela expressão imunoistoquímica de caspase-3 ativada em tumores do cólon (A) e na mucosa colônica (C) nos grupos tratados com DMH. Marcação imunoistoquímica de caspase-3 ativada nos tumores (B) e na mucosa do cólon (D). <sup>1</sup>Dados expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. G1 = DMH + veículo; G2 = DMH + CAP 5mg/kg; G3 = DMH + CAP 50mg/kg; G4 = CAP 5mg/kg; G5 = CAP 50mg/kg; G6 = SHAM. Sem diferença estatística ( $p=0,7652$ ) e ( $p = 0.4083$ ) pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey.(A) Contagem de células em apoptose em 10 tumores por grupo. (C) Contagem de células em apoptose na mucosa em 10 animais por grupo sendo 20 criptas inteiras por animal.

## 6.7 Quantificação e análise de qualidade do RNA total

Os valores da concentração de RNA e absorbância, obtidas pelo NanoVue, bem como os valores de RIN (*RNA Integrity Number*) obtidas pelo bioanalyzer das amostras de tumores colônicos são apresentados na Tabela 6. As amostras selecionadas para serem utilizadas para síntese de cDNA foram as que apresentaram valores de RIN  $\geq$  a 7.0. O valor médio de RIN das amostras tumorais foi  $8,21 \pm 0,57$ .

**Tabela 6** – Dados quantitativos e qualitativos das amostras de RNA total cólon.

Grupos	Amostras	230/260	260/280	[ng/uL]	RIN <sup>1</sup>
G1	CAPP01	2.038	1.629	149.2	7.6
	CAPP02	2.031	1.518	156.0	8.0
	CAPP09	2.011	1.882	572.8	8.0
	CAPP10	1.982	1.475	486.0	8.8
	CAPP15	1.987	1.525	631.2	8.4
G2	CAPP20	2.032	1.596	401.6	9.1
	CAPP24	2.019	1.502	290.8	8.3
	CAPP26	2.003	0.467	230.0	8.3
	CAPP28	1.969	1.601	126.8	8.7
	CAPP29	2.03	2.105	119.0	7.1
G3	CAPP32	1.973	1.296	208.4	7.1
	CAPP35	2.012	1.771	278.4	8.5
	CAPP36	2.039	2.061	393.2	8.5
	CAPP40	1.992	1.831	316.4	8.3
	CAPP44	2.016	2.027	569.2	8.5
	<b>Média</b>	2.009	1.619	328.6	8.213
	<b>± DP</b>	0.024	0.398	172.847	0.574

G1 = DMH + veículo; G2 = DMH + CAP 5mg/kg; G3 = DMH + CAP 50mg/kg.

<sup>1</sup>Número da integridade do RNA.

## 6.8 Expressão Gênica

A Tabela 6 apresenta os genes diferencialmente expressos em tumores de cólon do grupo tratado com a maior dose de capsaicina (50mg/kg, G3) em comparação com o grupo controle tratado com DMH (G1). Identificamos três genes diferencialmente expressos no grupo G3 em comparação com o grupo controle (G1). Observamos aumento da expressão do gene *Jag1* e diminuição da expressão dos genes *Cebpd* e *Faslg*. Não identificamos diferenças na expressão gênica nos demais grupos.

**Tabela 7-** Expressão diferencial de genes em tumores do cólon de animais tratados com 50mg/kg de capsaicina (G3)<sup>1</sup>.

Comparação	Gene	ID	Processo Celular	Fold Change	Valor de P
G3 vs G1	<i>CEBPD</i>	ENSG00000221869	Envolvido na regulação das respostas imunes e inflamatórias.	0.428	0.045
	<i>FASLG</i>	ENSG00000117560	Regulação do sistema imunológico e na progressão tumoral.	0.292	0.004
	<i>JAG1</i>	ENSG00000101384	Envolvido na sinalização do receptor <i>Notch</i> (Progressão Tumoral).	1.960	0.050

<sup>1</sup> Os níveis relativos de expressão foram determinados por normalização com os genes 3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*), beta-glucuronidase (*Gusb*) e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (*Hprt1*). Os grupos experimentais foram comparados usando o Student's t-test. Fold Change (1.5) e o valor de  $p < 0,05$ . G1 = DMH + veículo; G2 = DMH + CAP 5mg/kg; G3 = DMH + CAP 50mg/kg.

## 7.0 Discussão

No presente estudo, avaliamos o potencial quimiopreventivo e alvos moleculares envolvidos nos efeitos anti-proliferativos e pró-apoptóticos da capsaicina em modelo de promoção da carcinogênese de cólon induzida pela DMH. Nossos resultados revelaram um potencial papel supressor da capsaicina, quando esta substância natural foi administrada na etapa de promoção da carcinogênese de cólon.

A administração da capsaicina na dose de 50mg/kg após o tratamento com a DMH reduziu o desenvolvimento de focos de criptas aberrantes (FCA), os índices de proliferação celular em tumores e na mucosa colônica, reduziu expressão aberrante (nuclear) de  $\beta$ -catenina e o grau de invasividade dos tumores. Esta dose de capsaicina também mostrou efeito protetor de danos na mucosa induzidas pela administração aguda da DMH (Caetano et al., 2018)

As doses de capsaicina utilizadas (5 e 50mg/kg p.c) não apresentaram efeito tóxico para o fígado e rins conforme as análises bioquímicas das enzimas ALT e creatinina e pesos hepáticos e dos rins, indicando que as doses administradas foram seguras. Estes dados corroboram com os trabalhos de Hassan (2012) e de Yoshitani (2001) que mostram que o tratamento com capsaicina na dose de 40mg/kg e 500ppm na

ração não alterou o perfil de enzimas hepáticas e renal em modelo de hepatotoxicidade induzida pelo tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) e também em modelo de carcinogênese de cólon induzida pela 1,2- Dimetilhidrazina (DMH) (YOSHITANI et al.,2001; HASSAN et al., 2012).

Os focos de criptas aberrantes (FCA) têm sido adotados como marcadores para estudos de agentes quimiopreventivos em diferentes modelos de carcinogênese de cólon (WARGOVICH, et al., 2010). Em nosso estudo, a administração de capsaicina nas doses de 5mg/kg e 50mg/kg resultou em diminuição no desenvolvimento de FCA. Os números totais de FCA, criptas aberrantes e multiplicidade de FCA foram significativamente reduzidos nos grupos que receberam capsaicina. No estudo de Yoshitani e seus colaboradores em 2001 observaram uma diminuição significativa de FCA em animais que receberam em sua dieta 500 ppm de capsaicina durante 12 semanas de experimento (YOSHITANI et al., 2001). Outros estudos mostram que uma redução de FCA com grande número em ACs possuem maior potencial para progredir para adenomas e adenocarcinomas (YOSHIMI et al.,2004 ;ORLANDO et al. 2008).

Nesta perspectiva, a administração de capsaicina na dose de 50mg/kg reduziu o número de FCA 4-9 e reduziu a incidência de tumores invasivos e pouco diferenciados. O número de carcinomas *in situ* foi maior no grupo tratado com 50mg/kg de capsaicina quando comparado com o grupo tratado com DMH. Estes achados indicam o potencial efeito quimioprotetor da capsaicina em retardar e suprimir o desenvolvimento tumoral. Nossos resultados corroboram com estudos *in vitro* que sugerem redução da capacidade invasiva da capsaicina em células tumorais humanas e estudo *in vivo* que mostra redução de adenocarcinoma em animais que receberam 500 ppm de capsaicina na dieta (YOSHITANI et al., 2001, NOLAN et al., 2016; HURLEY et al., 2017).

As análises imunoistoquímicas demonstram redução dos índices de proliferação celular no grupo que recebeu a dose de 50mg/kg de capsaicina, tanto em tumores quanto na mucosa do cólon. Estes achados estão de acordo com estudos *in vitro* que demonstram atividade anti-proliferativa da capsaicina em diversos modelos e linhagens tumorais (BROWN et al. 2010; PARK et al. 2014; QIAN et al. 2016).

O tratamento com capsaicina na dose de 50mg/kg diminuiu a incidência de tumores com expressão nuclear aberrante da proteína  $\beta$ -catenina, quando comparada com os demais grupos. A via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina é altamente conservada em invertebrados e vertebrados, responsável pelo controle da proliferação, polaridade e

destino celular durante a embriogênese e na homeostase tecidual (CLEVERS; NUSSE., 2012). A mutação na via Wnt está relacionada a eventos importantes como desenvolvimento de neoplasias malignas, incluindo o câncer do cólon (ANASTAS; MOON 2013). Em nosso estudo a capsaicina apresentou ação supressora, reduzindo a translocação da  $\beta$ -catenina para o núcleo e, portanto, suprimindo a interação com os fatores de transcrição que culminam na proliferação celular (LEE et al.,2012). Este resultado é consistente com nossos achados de proliferação celular pela expressão imunohistoquímica de Ki-67 e diminuição do número de FCA (ROH et al. 2001; MACDONALD et al.,2009 ).

A análise da expressão gênica de tumores demonstrou aumento da expressão do gene *Jag1* e redução da expressão dos genes *Cebpd* e *Faslg* no grupo tratado com capsaicina na dose de 50mg/kg comparado com grupo controle tratado com DMH. O gene *Jag1* codifica uma proteína transmembrana do tipo I (*Jagged1*) que se acopla a receptores *Notch* expressos em células de mamíferos. A *Jagged1* é super expressa em muitos tipos de câncer, desempenhando papel importante em vários aspectos da biologia dos tumores (LI et al. 2014). A ativação de *Notch* estimulada por *Jag1* está diretamente implicada no crescimento de tumores através da manutenção de populações de células neoplásicas, promovendo a sobrevivência celular, inibindo a apoptose e conduzindo a proliferação celular e metástase (GUILMEAU et al.,2012; SUMAN et al. 2014). Além disso, a *Jag1* pode influenciar indiretamente os componentes do microambiente tumoral, aumentando a vascularização e a infiltração de células imunológicas (DAI et al. 2014). Estes achados não foram positivos para o estudo, no entanto este gene serve como biomarcador para detecção precoce de recorrência, metástase e prognóstico do CCR (ZHENG et al.,2015).

O gene *Cebpd* (*CCAAT-enhancer binding protein delta*) codifica uma proteína que atua como fator de transcrição, envolvida no desenvolvimento embrionário, regulação da diferenciação celular, da motilidade e apoptose (RASK et al. 2000; BALAMURUGAN; STERNECK 2013). A expressão aumentada do gene *Cebpd* foi detectada em vários tipos de tumores malignos, sendo correlacionada com mecanismos chave no processo de progressão neoplásica (STAIGER et al. 2009). A diminuição da expressão deste gene identificada em nosso estudo está de acordo com os achados de proliferação celular em que diminuição da expressão imunohistoquímica de Ki-67 foi observada no grupo que recebeu maior dose de capsaicina (50 mg/kg).

O gene *Faslg* ou CD95L codifica uma proteína transmembrana do tipo II pertencente à família do fator de necrose tumoral (TNF). Sua ligação com o receptor *Fas* (*Fasr* ou CD95) induz apoptose através da ativação da caspase-8 e caspase-3, desempenhando importante papel na regulação do sistema imunológico e na progressão tumoral (PRYCZYNICZ et al., 2010; PETER et al. 2015). O aumento da expressão de *Faslg* é encontrado em câncer do esôfago, estômago, pâncreas, colorretal e no carcinoma hepatocelular (ZHANG et al., 2005). Estudos demonstram que pacientes com câncer de cólon avançado ou com metástase linfática ou hepática apresentam maior expressão de *Fas/ Faslg*. A expressão de *Faslg* em células neoplásicas implica na resistência a apoptose, supressão da resposta imune, crescimento tumoral e invasividade (CHEN et al. 2010; BREMER 2013; XU et al. 2013). O aumento da taxa de proliferação celular e resistência a quimioterápicos também são promovidos pela expressão de *Faslg*, sendo considerado importante alvo no tratamento do câncer (PETER et al. 2015). A descoberta de novas moléculas que inibem a expressão de *Faslg* pode resultar na redução da progressão tumoral e o desenvolvimento de metástases (CHEN et al. 2010).

Com isso, no nosso protocolo de promoção, a administração de capsaicina, na dose de 50mg/kg suprimiu a expressão de *Faslg*, regulando o crescimento e invasividade tumoral. Este achado está de acordo com os dados histopatológicos que demonstraram redução do número de adenocarcinomas invasivos no grupo tratado com 50 mg/kg de capsaicina. Este resultado também é consistente com os achados imunoistoquímicos para  $\beta$ -catenina, onde observamos redução da expressão aberrante (nuclear) de  $\beta$ -catenina nos tumores dos animais tratados com capsaicina na dose de 50mg/kg.

A análise conjunta dos dados morfológicos e moleculares do presente estudo documenta o potencial papel supressor da capsaicina na etapa de promoção da carcinogênese de cólon induzidas quimicamente. Este resultado corrobora com o estudo de Caetano e colaboradores (2018) no qual, foi observado que a administração da capsaicina na etapa de iniciação da carcinogênese de cólon, não apresentou alteração a nível de tumores, porém quando administramos a capsaicina após a iniciação foi observado uma redução de tumores invasivos.

Sendo assim, a capacidade dos metabolitos da capsaicina em danificar o DNA e promover a carcinogênese permanece sem suporte.

Embora, alguns estudos *in vitro* demonstrem ação anticarcinogênica da capsaicina em células de tumores de estômago e pulmão (LAU et al., 2014, CLARK et al.,2015), os potenciais efeitos inibitórios da capsaicina no desenvolvimento de tumores colônicos devem ser ainda melhor investigados visto que o consumo de capsaicina via alimentação tem grande alcance em atuar como preventiva em doenças humanas (BLEY et al.,2012).

## 8.0 Conclusão

A capsaicina na dose de 50mg/kg apresentou efeitos quimiopreventivos na carcinogênese de cólon em ratos induzidos pela DMH.

A utilização da capsaicina de alta pureza e protocolos padronizados fornecem evidências de que o potencial genotóxico e cancerígeno da capsaicina é baixo e que a pureza da capsaicina testada é importante. Em virtude da falta de estudos epidemiológicos indicando o consumo médio de capsaicina na população mundial, os resultados observados com a dose de 50 mg/kg devem ser avaliados quanto a plausabilidade de efeitos similares no ser humano.

## REFERÊNCIAS

AMANTINI, C. et al. Triggering of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) by capsaicin induces Fas/CD95-mediated apoptosis of urothelial cancer cells in an ATM-dependent manner. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 8, p. 1320–1329, ago. 2009.

AMERICA CANCER SOCIETY. Key Statistics for Colorectal Cancer < <https://www.cancer.org/> > (Acesso em: 27/06/2018)

ANASTAS, J. N.; MOON, R. T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v. 13, n. 1, p. 11–26, jan. 2013.

ARGOLLO, M. et al. Novel therapeutic targets for inflammatory bowel disease. **Journal of Autoimmunity**, 12 jul. 2017.

ARMSTRONG, E. P. et al. Cost-effectiveness analysis of a new 8% capsaicin patch compared to existing therapies for postherpetic neuralgia. **Current Medical Research and Opinion**, v. 27, n. 5, p. 939–950, maio 2011.

ARORA, R. et al. An Overview about Versatile Molecule Capsaicin. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 3, n. 4, p. 280 - 286, dez. 2011.

ASHBURNER, M. et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. **Nature Genetics**, v. 25, n.1, p. 25-9 may. 2000.

BALAMURUGAN, K.; STERNECK E. The many faces of C/EBP $\delta$  and their relevance for inflammation and cancer. **Int J Biol Sci**, v. 9, n.9, p.917–33, 2013.

BARROW, B. J. et al. Enzyme-altered foci in colons of carcinogen-treated rats. **Cancer Research**, v. 50, n. 6, p. 1911–1916, 15 mar. 1990.

BASITH, S. et al. Harnessing the Therapeutic Potential of Capsaicin and Its Analogues in Pain and Other Diseases. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 21, n. 8, 23 jul. 2016.

BHATTACHARYA, P.; MCHUGH, T. Lynch Syndrome. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2017.

BISHEHSARI, F. et al. Epidemiological transition of colorectal cancer in developing countries: Environmental factors, molecular pathways, and opportunities for prevention. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 20, p. 6055–6072, 28 maio 2014.

BIRD, R. P.; GOOD, C. K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Toxicology Letters**, v. 112-113, p. 395–402, 15 mar. 2000.

BIRD, R. P. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Cancer Letters**, v. 93, n. 1, p. 55–71, 29 jun. 1995.

BLEY, K. et al. A comprehensive review of the carcinogenic and anticarcinogenic potential of capsaicin. **Toxicologic Pathology**, v. 40, n. 6, p. 847–873, ago. 2012.

BODE, A. M. et al. Transient receptor potential type vanilloid 1 suppresses skin carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 69, n. 3, p. 905–913, 1 fev. 2009.

BODE, A. M.; DONG, Z. The two faces of capsaicin. **Cancer Research**, v. 71, n. 8, p. 2809–2814, 15 abr. 2011.

BOLAND, C. R.; GOEL, A. Microsatellite instability in colorectal cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2073–2087.e3, jun. 2010.

BONOVAS, S. et al. Cancer chemoprevention: a summary of the current evidence. **Anticancer Research**, v. 28, n. 3B, p. 1857–1866, jun. 2008.

BOZOK CETINTAS, V. et al. Capsaicin induced apoptosis and gene expression dysregulation of human acute lymphoblastic leukemia CCRF-CEM cells. **Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 19, n. 1, p. 183–190, mar. 2014.

- BREMER, E. Targeting of the tumor necrosis factor receptor superfamily for cancer immunotherapy. **ISRN oncology**, v. 2013, p. 371854, 2013.
- BROWN, et al. Capsaicin Displays Anti-Proliferative Activity against Human Small Cell Lung Cancer in Cell Culture and Nude Mice Models via the E2F Pathway. **PLoS ONE**, v.5 Apr. 2010 20;5(4).
- CAETANO, B. F. R. et al. Capsaicin reduces genotoxicity, colonic cell proliferation and preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 338, p. 93–102, 16 nov. 2017.
- CAMPBELL, B. K. et al. Effects of High-Dose Capsaicin on TMD Subjects: A Randomized Clinical Study. **JDR clinical and translational research**, v. 2, n. 1, p. 58–65, jan. 2017.
- CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature**, v. 487, n. 7407, p. 330–337, 19 jul. 2012.
- CHAN, A. T.; GIOVANNUCCI, E. L. Primary Prevention of Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2029–2043.e10, jun. 2010.
- CHAPA-OLIVER, A. M.; MEJÍA-TENIENTE, L. Capsaicin: From Plants to a Cancer-Suppressing Agent. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 21, n. 8, 27 jul. 2016.
- CHATTERJEE, M. et al. Combinatorial effect of fish oil (Maxepa) and 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) in the chemoprevention of DMBA-induced mammary carcinogenesis in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 1, p. 102–110, 6 out. 2010.
- CHEN, L. et al. CD95 promotes tumour growth. **Nature**, v. 465, n. 7297, p. 492–496, 27 maio 2010.
- CLARK, R.; LEE, S.-H. Anticancer Properties of Capsaicin Against Human Cancer. **Anticancer Research**, v. 36, n. 3, p. 837–843, mar. 2016.
- CLEVERS, H.; NUSSE, R. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. **Cell**, v. 149, n. 6, p. 1192–1205, 8 jun. 2012.
- CONG, Y. J. et al. Association of sedentary behaviour with colon and rectal cancer: a meta-analysis of observational studies. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 3, p. 817–826, 4 fev. 2014.
- COOPER, K. et al. Chemoprevention of colorectal cancer: systematic review and economic evaluation. **Health Technology Assessment (Winchester, England)**, v. 14, n. 32, p. 1–206, jun. 2010.
- DAI, Y. et al. Silencing of Jagged1 inhibits cell growth and invasion in colorectal cancer. **Cell Death & Disease**, v. 5, p. e1170, 10 abr. 2014.

DAVIES, R. J.; MILLER, R.; COLEMAN, N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. **Nature Reviews. Cancer**, v. 5, n. 3, p. 199–209, mar. 2005.

DE FLORA S, FERGUSON LR Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**, v. 591, p. 8–15. 2005.

DÍAZ BARRIGA ARCEO, S. et al. Genotoxic effects produced by capsaicin in mouse during subchronic treatment. **Mutation Research**, v. 345, n. 3-4, p. 105–109, dez. 1995.

ESHGHIFAR, N. et al. Tumor suppressor genes in familial adenomatous polyposis. **Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench**, v. 10, n. 1, p. 3–13, 2017.

FISCHER, S.; NEURATH, M. F. Precision Medicine in Inflammatory Bowel Diseases. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, 12 jul. 2017.

ESTRADA, B. et al. Pungency level in fruits of the Padrón pepper with different water supply. *Scientia Horticulturae*, v. 81, n. 4, p. 385-396, oct. 1999.

FEMIA, A. P.; CADERNI, G. Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. **Planta Medica**, v. 74, n. 13, p. 1602–1607, out. 2008.

FEMIA, A. P.; DOLARA, P.; CADERNI, G. Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoxymethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 2, p. 277–281, fev. 2004.

GEES, M.; COLSOUL, B.; NILIUS, B. The role of transient receptor potential cation channels in Ca<sup>2+</sup> signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 10, p. a003962, out. 2010.

GLOBOCAN. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. **International Agency for Research on Cancer**, 2012.

GUILMEAU, S. Notch signaling and intestinal cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 727, p. 272–288, 2012.

GUPTA, A. K.; PRETLOW, T. P.; SCHOEN, R. E. Aberrant crypt foci: what we know and what we need to know. **Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association**, v. 5, n. 5, p. 526–533, maio 2007.

GUZMÁN, I.; BOSLAND, P. W. Sensory properties of chile pepper heat - and its importance to food quality and cultural preference. **Appetite**, v. 117, p. 186–190, 1 out. 2017.

HAKAMA, M. Chemoprevention of cancer. **Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)**, v. 37, n. 3, p. 227–230, 1998.

HALF, E.; BERCOVICH, D.; ROZEN, P. Familial adenomatous polyposis. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 4, p. 22, 12 out. 2009.

HASSAN, M. H. et al. Antioxidant and antiapoptotic effects of capsaicin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 28, n. 5, p. 428–438, jun. 2012.

HASSAN, M. et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 150845, 2014.

HATA, K. et al. Tumor formation is correlated with expression of beta-catenin-accumulated crypts in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. **Cancer Science**, v. 95, n. 4, p. 316–320, abr. 2004.

HEINEN, C. D. et al. Microsatellite instability in aberrant crypt foci from human colons. **Cancer Research**, v. 56, n. 23, p. 5339–5341, 1 dez. 1996.

HUANG, X.-F. et al. Capsaicin and its analogues: structure-activity relationship study. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 21, p. 2661–2672, 2013.

HUMPHRIES, A.; WRIGHT, N. A. Colonic crypt organization and tumorigenesis. **Nature Reviews. Cancer**, v. 8, n. 6, p. 415–424, jun. 2008.

HURLEY, J. D. et al. Non-pungent long chain capsaicin-analogs arvanil and olvanil display better anti-invasive activity than capsaicin in human small cell lung cancers. **Cell Adhesion & Migration**, p. 1–18, 19 maio 2016.

INCA. **Instituto Nacional do Câncer**: Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Ministério da Saúde.

JAGANATHAN, S. K. et al. Role of pomegranate and citrus fruit juices in colon cancer prevention. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 16, p. 4618–4625, 28 abr. 2014.

JEN, J. et al. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. **Cancer Research**, v. 54, n. 21, p. 5523–5526, 1 nov. 1994.

JHANG, J. et al. Effectiveness of Screening Modalities in Colorectal Cancer: A Network Meta-Analysis. **Clinical Colorectal Cancer**, apr. 2017

KUIPERS, E. J. et al. COLORECTAL CANCER. **Nature reviews. Disease primers**, v. 1, p. 15065, 5 nov. 2015.

LANDIS-PIWOWAR, K. R.; IYER, N. R. Cancer chemoprevention: current state of the art. **Cancer Growth and Metastasis**, v. 7, p. 19–25, 2014.

LAU, J. K. et al. Capsaicin induces apoptosis in human small cell lung cancer via the TRPV6 receptor and the calpain pathway. **Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death**, v. 19, n. 8, p. 1190–1201, ago. 2014.

LEE, J.; JEON, J.; MEYERHARDT, J. A. Diet and Lifestyle in Colorectal Cancer Survivors. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 29, n. 1, p. 1–27, fev. 2015.

LEE, S.H, RICHARDSON RL, DASHWOOD RH AND BAEK SJ. Capsaicin represses transcriptional activity of B-catenin in human colorectal cancer cells. **J Nutr Biochem**, v.23, p.646-655, 2012.

LILLYWHITE, J. M. et al. Pepper Consumption and Preferences in the United States. **Horttecnology**, v.23, n.6, p. 868 - 876, 2013

LIN, C.-H. et al. Capsaicin induces cell cycle arrest and apoptosis in human KB cancer cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, p. 46, 2013.

LÓPEZ-CARRILLO, L.; HERNÁNDEZ AVILA, M.; DUBROW, R. Chili pepper consumption and gastric cancer in Mexico: a case-control study. **American Journal of Epidemiology**, v. 139, n. 3, p. 263–271, fev. 1994.

LUDY, M.-J.; MATTES, R. D. The effects of hedonically acceptable red pepper doses on thermogenesis and appetite. **Physiology & Behavior**, v. 102, n. 3–4, p. 251–258, 1 mar. 2011.

MACDONALD, BRYAN T., KEIKO TAMAI, AND XI HE. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. **Developmental Cell Press**, v. 17, n.1, p. 9–26, Jul. 2009.

MANZANO, A.; PÉREZ-SEGURA, P. Colorectal cancer chemoprevention: is this the future of colorectal cancer prevention? **TheScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 327341, 2012.

MATKOWSKYJ, K. A. et al. Dysplastic lesions in inflammatory bowel disease: molecular pathogenesis to morphology. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 137, n. 3, p. 338–350, mar. 2013.

MIRAMS, G. R. et al. A theoretical investigation of the effect of proliferation and adhesion on monoclonal conversion in the colonic crypt. **Journal of Theoretical Biology**, v. 312, p. 143–156, 7 nov. 2012.

NOLAN, N.A. et al. Anti-invasive activity of capsaicin and natural capsaicin-like compounds in human NSCLC. **The FASEB Journal**, 2016 30:1 1193.8.

NOLFO, F. et al. Pharmacological and dietary prevention for colorectal cancer. **BMC surgery**, v. 13 Suppl 2, p. S16, 2013.

NORAT, T. et al. Fruits and vegetables: updating the epidemiologic evidence for the WCRF/AICR lifestyle recommendations for cancer prevention. **Cancer Treatment and Research**, v. 159, p. 35–50, 2014.

- NUCCI, M. R. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. **Human Pathology**, v. 28, n. 12, p. 1396–1407, dez. 1997.
- ORLANDO, F. A. et al. Aberrant crypt foci as precursors in colorectal cancer progression. **Journal of Surgical Oncology**, v. 98, n. 3, p. 207–213, 1 set. 2008.
- PARK et al., 2014. Capsaicin Induces Apoptosis and Modulates MAPK Signaling in Human Gastric Cancer Cells. **Molecular Medicine Reports**, v.9, n.2, p.499–502, feb. 2014.
- PERRY, L. et al. Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. **Science (New York, N.Y.)**, v. 315, n. 5814, p. 986–988, 16 fev. 2007.
- PERŠE, M.; CERAR, A. Morphological and Molecular Alterations in 1,2 Dimethylhydrazine and Azoxymethane Induced Colon Carcinogenesis in Rats. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, 2011.
- PETER, C. et al. International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria for Lesions in Rats and Mice (INHAND). **Toxicology Pathology**, p. 7S-13S, may .2012.
- PETER, M. E. et al. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 5, p. 885–886, maio 2015.
- POLYAK, K. et al. Early alteration of cell-cycle-regulated gene expression in colorectal neoplasia. **The American Journal of Pathology**, v. 149, n. 2, p. 381–387, ago. 1996.
- PONZ DE LEON, M.; DI GREGORIO, C. Pathology of colorectal cancer. **Digestive and Liver Disease**, v. 33, n. 4, p. 372–388, 1 maio 2001.
- PRETLOW, T. P. et al. Colonic aberrant crypts in azoxymethane-treated F344 rats have decreased hexosaminidase activity. **The American Journal of Pathology**, v. 136, n. 1, p. 13–16, jan. 1990.
- PRYCZYNICZ, A.; GUZIŃSKA-USTYMOWICZ, K.; KEMONA, A. Fas/FasL expression in colorectal cancer. An immunohistochemical study. **Folia Histochemica Et Cytobiologica**, v. 48, n. 3, p. 425–429, 30 set. 2010.
- QIAN, et al. Capsaicin Suppresses Cell Proliferation, Induces Cell Cycle Arrest and ROS Production in Bladder Cancer Cells through FOXO3a-Mediated Pathways. **Molecules**, v. 21, n.10, p. e1406, oct.2016.
- QIAN, M.; FANG, X.; WANG, X. Autophagy and inflammation. **Clinical and Translational Medicine**, v. 6, p. 24, 26 jul. 2017.
- RAJAMANICKAM, S.; AGARWAL, R. Natural products and colon cancer: current status and future prospects. **Drug Development Research**, v. 69, n. 7, p. 460–471, nov. 2008.

RASK . K. et al. Increased expression of the transcription factors CCAAT-enhancer binding protein-beta (C/EBBeta) and C/EBzeta (CHOP) correlate with invasiveness of human colorectal cancer. **Int J Cancer**, v. 86, n. 3, p.337–43, may.2000.

REYES-ESCOGIDO, M. DE L.; GONZALEZ-MONDRAGON, E. G.; VAZQUEZ-TZOMPANTZI, E. Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 16, n. 2, p. 1253–1270, 2011.

RODRIGUES, M. A. M. et al. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et AL.]**, v. 35, n. 3, p. 351–355, mar. 2002.

ROH, H. et al. Suppression of beta-catenin inhibits the neoplastic growth of APC-mutant colon cancer cells. **Cancer Research**, v. 61, n. 17, p. 6563–6568, 1 set. 2001.

ROLLYSON, W. D. et al. Bioavailability of capsaicin and its implications for drug delivery. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 0, p. 96–105, 28 dez. 2014.

RONCUCCI, L.; PEDRONI, M.; MARIANI, F. Attenuated adenomatous polyposis of the large bowel: Present and future. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 23, p. 4135–4139, 21 jun. 2017.

ROSENBERG, D. W.; GIARDINA, C.; TANAKA, T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 2, p. 183–196, fev. 2009.

SAITO, A.; YAMAMOTO, M. Acute oral toxicity of capsaicin in mice and rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 21, n. 3, p. 195–200, ago. 1996.

SCHROEDER, K. L. et al. Identification and Quantification of Pathogenic Pythium spp. from Soils in Eastern Washington Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. **Phytopathology**, v. 96, n. 6, p. 637–647, jun. 2006.

SENDA, T.; SHIMOMURA, A.; IIZUKA-KOGO, A. Adenomatous polyposis coli (Apc) tumor suppressor gene as a multifunctional gene. **Anatomical Science International**, v. 80, n. 3, p. 121–131, set. 2005.

SHARMA, S. K.; VIJ, A. S.; SHARMA, M. Mechanisms and clinical uses of capsaicin. **European Journal of Pharmacology**, v. 720, n. 1–3, p. 55–62, 15 nov. 2013.

SHPITZ, B. et al. Proliferating cell nuclear antigen as a marker of cell kinetics in aberrant crypt foci, hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas of the human colon. **American Journal of Surgery**, v. 174, n. 4, p. 425–430, out. 1997.

SRINIVASAN, K. Biological Activities of Red Pepper (Capsicum annum) and Its Pungent Principle Capsaicin: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 9, p. 1488–1500, 3 jul. 2016.

STAIGER, J. et al. C/EBPbeta regulates body composition, energy balance-related hormones and tumor growth. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 5, p. 832–840, maio 2009.

STEWART, W.P.; BROWN K. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. **Br Journal of Cancer**, v.109(1), p.1-7, 2013.

STEWART, C. et al. Genetic control of pungency in *C. chinense* via the Pun1 locus. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 5, p. 979–991, 2007.

STEWART, C. et al. The Pun1 gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. **The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology**, v. 42, n. 5, p. 675–688, jun. 2005.

SUMAN, TRINATH P. DAS, MURALI K. ANKEM, AND CHENDIL DAMODARAN. Targeting Notch Signaling in Colorectal Cancer. **Current Colorectal Cancer Reports**, v.10, n. 4, p. 411–16, dec. 2014.

SUN, F.; XIONG, S.; ZHU, Z. Dietary Capsaicin Protects Cardiometabolic Organs from Dysfunction. **Nutrients**, v. 8, n. 5, 25 abr. 2016.

SUNTAEK HONG, HO-JAE LEE, SEONG JIN KIM, KI-BAIK HAHM .Connection between inflammation and carcinogenesis in gastrointestinal tract: Focus on TGF- $\beta$  Signaling. **World Journal Gastroenterology**, v.16, n.17, p.2080-2093, maio. 2010.

SURH, Y.-J. More than spice: capsaicin in hot chili peppers makes tumor cells commit suicide. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 17, p. 1263–1265, 4 set. 2002.

SUZUI, M.; MORIOKA, T.; YOSHIMI, N. Colon preneoplastic lesions in animal models. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 26, n. 4, p. 335–341, dez. 2013.

TAKAHASHI, M.; WAKABAYASHI, K. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. **Cancer Science**, v. 95, n. 6, p. 475–480, jun. 2004.

TANAKA, A.; HONMA, K.; KONDO, H. [A case of cerebellum metastasis from colon cancer]. **Gan to Kagaku Ryoho. Cancer & Chemotherapy**, v. 36, n. 12, p. 2242–2244, nov. 2009.

TANAKA, T. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. **Journal of Carcinogenesis**, v. 8, 26 mar. 2009.

TUDEK, B.; BIRD, R. P.; BRUCE, W. R. Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. **Cancer Research**, v. 49, n. 5, p. 1236–1240, 1 mar. 1989.

UCHIDA, K. et al. Relationship between the nature of mucus and crypt multiplicity in aberrant crypt foci in the rat colon. **Japanese Journal of Cancer Research: Gann**, v. 88, n. 9, p. 807–814, set. 1997.

VAN RAAJ, T.; ALLEN-VERCOE, E. Microbial Interactions and Interventions in Colorectal Cancer. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 3, jun. 2017.

VDOVIÁKOVÁ, K. et al. Surgical Anatomy of the Gastrointestinal Tract and Its Vasculature in the Laboratory Rat. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2016, 2016.

WARGOVICH, M. J.; BROWN, V. R.; MORRIS, J. Aberrant Crypt Foci: The Case for Inclusion as a Biomarker for Colon Cancer. **Cancers**, v. 2, n. 3, p. 1705–1716, 16 set. 2010.

WATSON, M. M. et al. Elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotides in early-stage colorectal cancers with and without high-frequency microsatellite instability: same, same but different? **Cancer Medicine**, v. 5, n. 7, p. 1580–1587, 6 abr. 2016.

WU CC, LIN JP, YANG JS, CHOU ST, CHEN SC, LIN YT, LIN HL AND CHUNG JG. Capsaicin induced cell cycle arrest and apoptosis in human esophagus epidermoid carcinoma CE 81T/VGH cells through the elevation of intracellular reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> productions and caspase-3 activation. **Mutat Res**, v. 601, n1-2, p.71-82, oct.2006.

XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 427–434, jul. 2007.

XU, LEI, XIN ZHOU, FENG JIANG, MAN-TANG QIU, ZHI ZHANG, RONG YIN, AND LIN XU. FASL rs763110 Polymorphism Contributes to Cancer Risk: An Updated Meta-Analysis Involving 43,295 Subjects. **PloS One**, n. 8, n. 9, p. e74543, sep. 2013.

YAMADA, Y. et al. Frequent beta-catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 60, n. 13, p. 3323–3327, jul. 2000.

YAMADA, Y.; MORI, H. Pre-cancerous lesions for colorectal cancers in rodents: a new concept. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 6, p. 1015–1019, jun. 2003.

YAMAMOTO, M.; MATSUMOTO, S. Gut microbiota and colorectal cancer. **Genes and Environment: The Official Journal of the Japanese Environmental Mutagen Society**, v. 38, p. 11, 2016.

YOSHIMI, N. et al. Histological and immunohistochemical observations of mucin-depleted foci (MDF) stained with Alcian blue, in rat colon carcinogenesis induced with 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride. **Cancer Science**, v. 95, n. 10, p. 792–797, out. 2004.

YOSHITANI, S. I. et al. Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by dietary capsaicin and rotenone. **International Journal of Oncology**, v. 19, n. 5, p. 929–939, nov. 2001.

YU, H. et al. Familial Associations of Colorectal Cancer with Other Cancers. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5243, 12 jul. 2017.

ZAMAN, S.; WANG, R.; GANDHI, V. Targeting the Apoptosis Pathway in Hematologic Malignancies. **Leukemia & lymphoma**, v. 55, n. 9, p. 1980–1992, set. 2014.

ZHANG, J. et al. Effectiveness of Screening Modalities in Colorectal Cancer: A Network Meta-Analysis. **Clinical Colorectal Cancer**, 4 abr. 2017.

ZHANG, Y.-Z.; LI, Y.-Y. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 1, p. 91–99, 7 jan. 2014.

ZHANG, W. et al. Fas ligand expression in colon cancer: a possible mechanism of tumor immune privilege. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 23, p. 3632–3635, 21 jun. 2005.

ZHENG, J. et al. Dietary capsaicin and its anti-obesity potency: from mechanism to clinical implications. **Bioscience Reports**, v. 37, n. 3, 30 jun. 2017.

ZHENG, C.-G. et al. Immunohistochemical expression of Notch1, Jagged1, NF- $\kappa$ B and MMP-9 in colorectal cancer patients and the relationship to clinicopathological parameters. **Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers**, v. 15, n. 6, p. 889–897, 2015.

## ANEXOS

**Tabela 1** - Peso Relativo hepático dos animais dos diferentes grupos experimentais tratados até 24 horas depois da última aplicação da DMH.<sup>1</sup>

Tratamentos <sup>2</sup>	No. de animais	Peso Hepático	Peso Relativo <sup>3</sup> Hepatico (%)
DMH	14	10.10 ± 1.01	2.12 ± 0.17
DMH + CAP 5	10	9.61 ± 1.18	2.12 ± 0.08
DMH + CAP 50	13	9.51 ± 1.16	2.12 ± 0.13
EDTA + CAP 5	9	10.10 ± 1.38	2.12 ± 0.15
EDTA + CAP 50	6	10.35 ± 1.89	2.14 ± 0.10
EDTA	10	11.31 ± 1.37	2.24 ± 0.31

<sup>1</sup>Dados expressos como média ± desvio padrão.<sup>2</sup> G1= DMH + veículo; G2= DMH + CAP 5mg; G3= DMH + CAP 50mg ;G4= CAP 5mg; G5 = 50mg; G6 = EDTA. Médias comparadas pelo teste de ANOVA seguida por Tukey. <sup>3</sup> Peso relativo hepático= peso absoluto do órgão/ peso do animal x 100. Sem diferença estatística no peso hepático e peso relativo hepático (p=0,140) e (p=0,388).

**Tabela 2** - Peso Relativo Renal dos animais dos diferentes grupos experimentais tratados até 24 horas depois da última aplicação da DMH.<sup>1</sup>

Tratamentos <sup>2</sup>	No. de animais	Peso Renal <sup>3</sup>	Peso Relativo Renal <sup>4</sup> (%)
DMH	14	2.55 ± 0.21	0.54 ± 0.06
DMH + CAP 5	10	2.41 ± 0.20	0.53 ± 0.05
DMH + CAP 50	13	2.35 ± 0.31	0.52 ± 0.05
EDTA + CAP 5	9	2.38 ± 0.69	0.51 ± 0.14
EDTA + CAP 50	6	2.45 ± 0.30	0.51 ± 0.04
EDTA	10	2.77 ± 0.40	0.54 ± 0.08

<sup>1</sup>Dados expressos como média ± desvio padrão.<sup>2</sup> G1= DMH + veículo; G2= DMH + CAP 5mg; G3= DMH + CAP 50mg ;G4= CAP 5mg; G5 = 50mg; G6 = EDTA. Médias comparadas pelo teste de ANOVA seguida por Tukey. <sup>3</sup> Somatória do rim direito e esquerdo.<sup>4</sup> Peso relativo Renal = peso absoluto do órgão/ peso do animal x 100. Sem diferença estatística no peso renal e peso relativo renal (p=0,482) e (p=0,176).

**Tabela 3** – Resultado da análise de expressão do mRNA usando *TaqMan Low Density Arrays*.

<b>(G3) DMH+ CAP50 X DMH (G1)</b>				
Genes Alvos	Média de Ct	Média de $\Delta$ Ct	Fold Change	Valor de P
Xrcc6-Rn00594589_m1	28,026	9,618	0,906	0,512
18S-Hs99999901_s1	7,918			
Actb-Rn00667869_m1	17,752			
Aifm1-Rn00442540_m1	25,457	7,048	1,145	0,631
Akt1-Rn00583646_m1	23,986	5,577	1,425	0,196
Akt2-Rn00690900_m1	24,573	6,165	1,254	0,155
Atm-Rn01421973_m1	31,070	12,661	1,019	0,658
Bax-Rn01480161_g1	25,992	7,584	1,245	0,349
Bcl2-Rn99999125_m1	28,999	10,591	0,621	0,077
Bid-Rn01459517_m1	23,577	5,168	1,002	0,900
Casp3-Rn00563902_m1	25,806	7,397	0,762	0,402
Casp4-Rn00586960_m1	27,274	8,865	0,522	0,176
Casp8-Rn00574069_m1	25,137	6,728	1,327	0,691
Casr-Rn00566496_m1	33,242	14,833	0,300	0,173
Ccna1-Rn01761354_g1	33,518	14,973	0,371	0,321
Ccnd1-Rn00432359_m1	23,106	4,697	1,168	0,825
Ccs-Rn00584772_m1	26,617	8,208	0,879	0,393
Cd44-Rn00681157_m1	22,929	4,520	1,558	0,363
Cdkn1a-Rn00589996_m1	23,902	5,493	0,878	0,463
Cdkn1b-Rn00582195_m1	27,495	9,086	0,736	0,096
<b>Cebpd-Rn02532069_s1</b>	<b>28,993</b>	<b>10,585</b>	<b>0,428</b>	<b>0,045</b>
Chd1-Rn01438365_m1	25,334	6,925	1,414	0,268
Chek1-Rn00589669_m1	28,130	9,721	0,922	0,555
Chek2-Rn00586616_m1	28,395	9,986	0,919	0,653
Cstb-Rn00754988_g1	24,093	5,685	0,792	0,378
Ctnnb1-Rn00584431_g1	22,286	3,878	1,252	0,374
Cyp2e1-Rn00580624_m1	34,236	16,074	0,187	
Dcc-Rn00514509_m1	35,374	17,060	0,741	
Ddit3-Rn00492098_g1	27,776	9,367	1,246	0,449
Dffb-Rn00584462_m1	27,560	9,152	1,345	0,388
Egfr-Rn00696193_m1	25,713	7,305	1,006	0,798
Epcam-Rn01473202_m1	20,780	2,372	1,333	0,384
<b>Faslg-Rn00563754_m1</b>	<b>32,143</b>	<b>13,717</b>	<b>0,292</b>	<b>0,004</b>
Fas-Rn00685720_m1	27,062	8,653	1,104	0,881
Fbln5-Rn00569712_m1	32,939	14,531	0,676	0,147
Fn1-Rn00569575_m1	25,583	7,175	0,791	0,945
Fn1-Rn00569575_m1	25,583	7,175	0,791	0,945
Gadd45aRn01425130_g1	26,195	7,786	0,948	0,837

Gapdh-Rn01775763_g1	19,608			
Gdf15-Rn00570083_m1	28,926	10,518	1,110	0,794
Grb2-Rn01471333_g1	25,422	7,013	1,030	0,825
Gsk3b-Rn00583429_m1	24,893	6,484	0,921	0,501
Gusb-Rn00566655_m1	28,356			
Hdac1-Rn01519308_g1	24,037	5,628	0,844	0,433
Hdac2-Rn01193634_g1	25,572	7,163	0,826	0,278
Hgf-Rn00566673_m1	29,286	10,878	1,211	0,920
Hprt1-Rn01527840_m1	24,595	6,186	3,716	0,181
Igf1r-Rn00583837_m1	26,452	8,044	0,933	0,739
Ikbkg-Rn01640116_m1	26,202	7,793	1,377	0,036
Il10-Rn01483988_g1	30,641	12,233	0,679	0,615
Il18-Rn01422083_m1	27,474	9,066	0,885	0,977
<b>Jag1-Rn00569647_m1</b>	<b>25,255</b>	<b>6,847</b>	<b>1,960</b>	<b>0,050</b>
Jun-Rn99999045_s1	26,284	7,875	0,712	0,395
Kras-Rn00580460_m1	25,318	6,909	1,135	0,493
Lama5-Rn01415947_m1	25,323	6,914	1,169	0,692
Lef1-Rn01639120_m1	31,399	12,990	0,271	0,253
Mapk14Rn00578842_m1	27,190	8,781	1,005	0,870
Mapk1-Rn00671828_m1	24,589	6,180	1,164	0,426
Mapk3-Rn00820922_g1	23,831	5,422	0,880	0,546
Mgmt-Rn00563462_m1	30,345	11,936	0,591	0,053
Mki67-Rn01451446_m1	24,392	5,983	1,255	0,749
Mlh1-Rn00579159_m1	27,724	9,315	0,729	0,319
Mmp2-Rn01538170_m1	28,453	10,044	0,635	0,274
Mmp3-Rn00591740_m1	32,673	14,265	0,366	0,332
Mmp9-Rn00579162_m1	28,751	10,343	0,736	0,188
Msh2-Rn00579198_m1	27,419	9,011	0,890	0,577
Mutyh-Rn00591196_m1	29,946	11,537	0,792	0,361
Nfkb1-Rn01399572_m1	23,821	5,413	0,969	0,765
Notch1-Rn01758633_m1	27,138	8,729	1,022	0,736
Notch2-Rn01534371_m1	26,498	8,089	0,984	0,888
Nox1-Rn00586652_m1	26,459	8,050	1,762	0,745
Nox4-Rn00585380_m1	34,485	16,077	0,291	0,261
Nthl1-Rn01496565_m1	28,948	10,539	1,408	0,185
Ogg1-Rn00578409_m1	29,623	11,214	0,960	0,768
Pa2g4-Rn01529389_g1	23,336	4,927	1,168	0,975
Parp1-Rn00565018_m1	24,782	6,374	0,911	0,580
Pms1-Rn01437268_m1	28,435	10,027	0,683	0,141
Prkcz-Rn01520438_m1	25,515	7,106	1,392	0,249
Raf1-Rn00466507_m1	25,233	6,824	0,894	0,327
Smad2-Rn00569900_m1	27,038	8,630	1,047	0,987
Smad4-Rn00570593_m1	23,698	5,290	1,219	0,422
Smc1a-Rn00490624_m1	25,327	6,919	1,223	0,523
Sod1-Rn00566938_m1	22,966	4,558	1,159	0,282
Sp1-Rn00561953_m1	24,973	6,565	1,064	0,769

Stat3-Rn00680715_m1	25,022	6,613	0,738	0,176
Stat5b-Rn00574281_m1	26,391	7,983	0,918	0,506
Tcf4-Rn00584481_m1	26,139	7,731	0,819	0,329
Tgfb1-Rn00572010_m1	25,157	6,748	1,225	0,700
Tp53-Rn00755717_m1	23,674	5,265	0,767	0,180
Trpv1-Rn00583117_m1	34,143	15,009	0,459	0,194
Tspan8-Rn00591756_m1	23,602	5,193	0,937	0,710
Ubc-Rn01789812_g1	23,904	5,495	0,907	0,616
Vegfa-Rn01511602_m1	25,610	7,202	0,858	0,728
Wee1-Rn01279391_m1	27,897	9,489	0,910	0,740
Wnt2-Rn01500736_m1	33,364	15,159	0,650	0,286
Xiap-Rn01457299_m1	25,267	6,859	1,151	0,463

Cckbr-Rn00565867\_m1= Indeterminado. mRNA= RNA Mensageiro .Ct = Limiar do Ciclo

**Tabela 4** | Genes presentes no *made for order* TaqMan® Array Micro Fluidic Card para análise da etapa de promoção/progresão da carcinogênese de cólon e os processos com os quais eles estão relacionados.

	Unigene	GeneBank	Símbolo	Descrição	Processo*
01	Rn.220465	NM_053683.1	Nox1	involved in superoxide generation and serum-stimulated growth	1
02	Rn.14744	NM_053524.1	Nox4	enzyme involved in the production of reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells	1
03	Rn.214048	NM_001106821.1	Atm	serine/threonine protein kinase; critical regulator of the cellular DNA damage response	1,2
04	Rn.33267	NM_080400.1	Chek1	protein kinase that can bind to single-stranded DNA; function in DNA replication and repair	2,3
05	Rn.163213	NM_053677.1	Chek2	kinase involved in ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway	2,3
06	Rn.11763	NM_031683.1	Smc1a	structural maintenance of chromosomes (SMC) protein	2
07	Rn.11327	NM_013063.2	Parp1	plays a role in DNA repair and genome stability	2
08	Rn.161996	NM_139080.2	Xrcc6	DNA targeting component which plays a role in DNA double strand break repair	2
09	Rn.10250	NM_024127.2	Gadd45a	may mediate a delay in G2 to M cell cycle progression; may induce DNA repair	2
10	Rn.208255	NM_001012742.1	Wee1	G2 checkpoint kinase	2,4

11	Rn.22279	NM_171992.4	Ccnd1	regulatory subunit of CDK4 or CDK6; regulation of the G1/S transition of the cell cycle	2,4
12	Rn.3174	NM_031058.1	Msh2	mismatch repair protein	2
13	Rn.91239	NM_022231.2	Xiap	involved in directly inhibiting key apoptotic proteases, caspase 3 and 7	3
14	Rn.54443	NM_030989.3	Tp53	regulates cell cycle arrest, apoptosis, senescence and DNA repair	2,3,4
15	Rn.9996	NM_016993.1	Bcl2	an anti-apoptotic protein; involved in inhibiting cell death in many different cell types	3,4
16	Rn.10668	NM_017059.2	Bax	Bcl2-related gene; involved in the regulation of apoptotic cell death	3
17	Rn.31142	NM_022684.1	Bid	involved in inducing Bax oligomerization in isolated mitochondrial outer membranes	3
18	Rn.10426	NM_032080.1	Gsk3b	mediates Par6-atypical protein kinase C (aPKC) complex regulation; may induce apoptosis	3
19	Rn.162521	NM_139194.2	Fas	Tnfsf6/FasI receptor – cleaved caspase pathway	3
20	Rn.10562	NM_012922.2	Casp3	apoptotic protease that may play a role in cell death regulation and other apoptotic processes	3
21	Rn.54474	NM_022277.1	Casp8	mediates the final stage of apoptosis involved in apoptosis induced by Fas and other stimuli	3
22	Rn.67077	NM_053362.1	Dffb	endonuclease; mediates caspase-3-dependent internucleosomal DNA degradation	3
23	Rn.11183	NM_001109986.1	Ddit3	plays a role in the ER stress response	3
24	Rn.34914	NM_053842.1	Mapk1	kinase involved in intracellular signaling; component of Mapk signaling pathway	4
25	Rn.2592	NM_017347.2	Mapk3	kinase involved in intracellular signalling; component of Mapk signalling pathway	3,4
26	Rn.88085	NM_031020.2	Mapk14	involved in intracellular signalling, inhibition of apoptosis and gene activation	2,3
27	Rn.203165	NM_031356.1	Aifm1	mitochondrion-associated; may facilitate chromatin condensation and DNA degradation	2,3
28	Rn.24554	NM_031515.3	Kras	oncogene and member of the small GTPase superfamily	4
29	Rn.10089	NM_080782.3	Cdkn1a	a Cdk inhibitor; involved in negative regulation of the cell cycle	4
30	Rn.29897	NM_031762.3	Cdkn1b	inhibits the activity of cyclin-CDK complexes and plays a role in cell cycle control	4
31	Rn.112601	NM_053357.2	Ctnnb1	involved in mediating the interaction between	4,6

				cadherins and the actin cytoskeleton	
32	Rn.1303	NM_031334.1	Cdh1	cell-cell adhesion molecule; may play a role in axonal growth and synapse formation	4
33	Rn.40136	NM_021578.2	Tgfb1	binds the TGFbeta receptor; plays a role in regulation of cell growth and proliferation	4
34	Rn.44228	NM_019216.2	Gdf15	member of the TGF-beta superfamily of growth factors	4
35	Rn.13094	NM_053702.3	Ccna1	human homolog plays a role in regulation of DNA synthesis and of mitosis	4
36	Rn.233802	NM_001271366.1	Mki67	Marker of cell proliferation Ki-67	4
37	Rn.9485	NM_001004206.1	Pa2g4	may be involved in coordinating ribosome biosynthesis and cell proliferation	4
38	Rn.37227	NM_031507.1	Egfr	promotes cell proliferation and differentiation; mediates GPCR induction of protein synthesis	4
39	Rn.33262	NM_012639.2	Raf1	acts as a mitogenic protein kinase; mutant forms may play a role in transformation	4
40	Rn.3360	NM_030846.	Grb2	acts as a link between tyrosine kinase receptors and Ras signaling	4
41	Rn.11422	NM_033230.2	Akt1	inhibits JUN kinase activation and mediates inhibition of apoptosis	3,4
42	Rn.87066	NM_017093.1	Akt2	may be involved in phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) mediated signaling	3,4
43	Rn.88057	NM_012499.1	Apc	binds microtubules; may play a role in the regulation of cell polarity	7
44	Rn.10666	NM_012841.1	Dcc	Deleted in colorectal cancer; play dual roles as receptor e other signaling pathways	4,7
45	Rn.2755	NM_001277450.1	Smad2	transcriptional mediator for both activin and TGF-beta	4
46	Rn.9774	NM_019275.2	Smad4	transduces signal from TGF-beta; deletion of is associated with pancreatic carcinomas	4
47	Rn.29980	NM_030858.1	Smad7	negative regulator of TGF-beta and activin	4
48	Rn.223092	XM_001059030.4	Wnt2	play a role in regulation of cell growth, differentiation, and tumorigenesis	4
49	Rn.23354	NM_053369.1	Tcf4	transcription factor that acts as an enhancer of the rat tyrosine hydroxylase gene	4
50	Rn.228611	NM_130429.1	Lef1	Enhancer binding factor has 98% amino acid homology with mouse Lef-1	4
51	Rn.10247	NM_012747.2	Stat3	plays a role in induction of gene expression during acute phase response	4

52	Rn.10957	NM_052807.2	Igf1r	receptor for Igf-1; involved in induction of cell cycle progression and survival in many cell types	4
53	Rn.10617	NM_031517.2	Met	hepatocyte growth factor receptor; functions as a heterodimeric tyrosine kinase	4
54	Rn.10468	NM_017017.2	Hgf	plays a role in positive regulation of cell proliferation; may promote the cell cycle	4
55	Rn.2411	NM_001276711.1	Nfkb	protein-specific transcription inhibitor and binding subunit of NFKB complex	6
56	Rn.214715	NM_199103.1	Ikbkg	regulatory subunit of the I kappa B kinase complex, which phosphorylates and activates	6
57	Rn.1109	NM_022507.1	Prkcz	key process in tumor invasion, through NFKB	6,4
58	Rn.10019	NM_016996.1	Casr	involved in regulating the secretion of parathyroid hormone, bile and intestinal fluid	4
59	Rn.6975	NM_013154.2	Cebpd	transcriptional activator and may be involved in glucose-mediated regulation of iNOS	1
60	Rn.44462	NM_017095.1	Cebpe	transcriptional activator; may mediate cytokine gene expression in mature cells	1
61	Rn.10332	NM_012831.1	Cebpg	binds to the promoter and enhancer of the alpha 1-fetoprotein gene; regulate transcription	4
62	Rn.93714	NM_021835.3	Jun	transcription factor; acts as a protooncogene	4
63	Rn.90997	NM_013165.2	Cckbr	stimulating phosphatidylinositol turnover and intracellular calcium mobilization.	4
64	Rn.25046	NM_001105721.1	Notch1	involved in cell-cell interactions important for development and pattern formation	4
65	Rn.65930	NM_024358.1	Notch2	transmembrane protein that may be involved in cellular interactions that specify cell fate	4
66	Rn.88804	NM_019147.1	Jag1	ligand responsible for activating Notch1	4
67	Rn.1923	NM_001110333.2	Vgfa	Induces angiogenesis, vasculogenesis, endothelial cell growth, promotes cell migration	5
68	Rn.10852	NM_024359.1	Hif1a	regulates transcription in response to low oxygen; may play a role in vascular biology	5
69	Rn.6422	NM_031054.2	Mmp2	plays important roles in angiogenesis, platelet aggregation, and tumor metastasis	5,6
70	Rn.32086	NM_133523.2	Mmp3	endopeptidase that degrades extracellular matrix proteins	6
71	Rn.10282	NM_012864.2	Mmp7	enzyme that cleaves the alpha 2(I) chain of rat gelatin	6
72	Rn.10209	NM_031055.1	Mmp9	metalloproteinase involved in extracellular matrix remodeling	6

73	Rn.10371	NM_031056.1	Mmp14	enzyme which is an activator of progelatinase A	6
74	Rn.1699	NM_019153.3	Fbln5	vascular growth and maturation during development and in lesions of injured vessels	5,6
75	Rn.88869	NM_013062.1	Kdr	receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF)	5,6
76	Rn.9159	NM_001105737.1	Tek	mediates development of embryonic vasculature; plays a role in tumors wounds	5,6
77	Rn.5840	NM_022588.1	Mta1	high expression of this protein correlates with the metastatic potential of cells	6
78	Rn.38434	NM_021759.1	Lypd3	GPI anchored protein; has a role in metastasis formation and matrix remodeling	6
79	Rn.1604	NM_019143.2	Fn1	extracellular matrix component; may play a role in fibrosis and tumor metastasis	6
80	Rn.62616	NM_001191609.1	Lama5	an extracellular matrix glycoprotein involved in cell migration and differentiation	6
81	Rn.106481	NM_138541.1	Epcam	involved in metastasis formation and tumor progression	4,6
82	Rn.1120	NM_012924.2	Cd44	adhesion molecule involved in migration that also plays a role in cellular metastasis	6
83	Rn.81938	NM_001191775.1	Macc1	metastasis-associated in colon cancer, key regulator of the HGF/MET pathway	6
84	Rn.9868	NM_012854.2	IL10	factor involved in the inhibition of cytokine synthesis	7
85	Rn.11118	NM_019165.1	IL18	a pro-inflammatory cytokine; acts as a modulator of immune functions	7
86	Rn.10795	NM_138880.2	Ifng	an immune molecule produced by T lymphocytes in response to mitogens	7
87	Rn.3160	NM_012580.2	Hmox1	catalyzes the oxidative cleavage of heme to biliverdin	7
88	Rn.11423	NM_001278475.1	Ptger1	binds prostaglandin E2; plays a role in G-protein receptor signaling and Ca2+ mobilization	7
89	Rn.10264	NM_031088.1	Ptger2	binds prostaglandin E2 and induces increased cAMP	7
90	Rn.1923	NM_001110333.2	Vgfa	Induces angiogenesis, vasculogenesis, endothelial cell growth, promotes cell migration	4,5,6
91	Rn.90085	NM_001033955.1	Calca	an inhibitor of lactotroph function and a potent vasodilator	8
92	Rn.22168	NM_001277055.1	Ngfb	Nerve growth factor	4,8
93	Rn.44609	NM_012655.2	Sp1	transcription factor; plays a role in transcriptional regulation of many genes	8

94	Rn.9989	NM_012761.1	Sp4	C2H2 zinc finger protein that binds the AT-rich HF-1b/MEF-2 site; transcriptional activator	8
95	Rn.3073	NM_031982.1	Trpv1	ion channel that demonstrates heat-evoked membrane currents	8

\*<sup>1</sup>Dano de DNA; <sup>2</sup>Reparo de DNA; <sup>3</sup>Apoptose; <sup>4</sup>Proliferação e Ciclo Celular; <sup>5</sup>Angiogênese; <sup>6</sup>Invasão e Metástase; <sup>7</sup>Inflamação; <sup>8</sup>Via da Capsaicina