

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a),
o texto completo desta dissertação será disponibilizado
somente a partir de 31/07/2020.



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**



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) (VDOVIAKOVÁ et al.,2016; ALLEN-VERCOE, 2017).

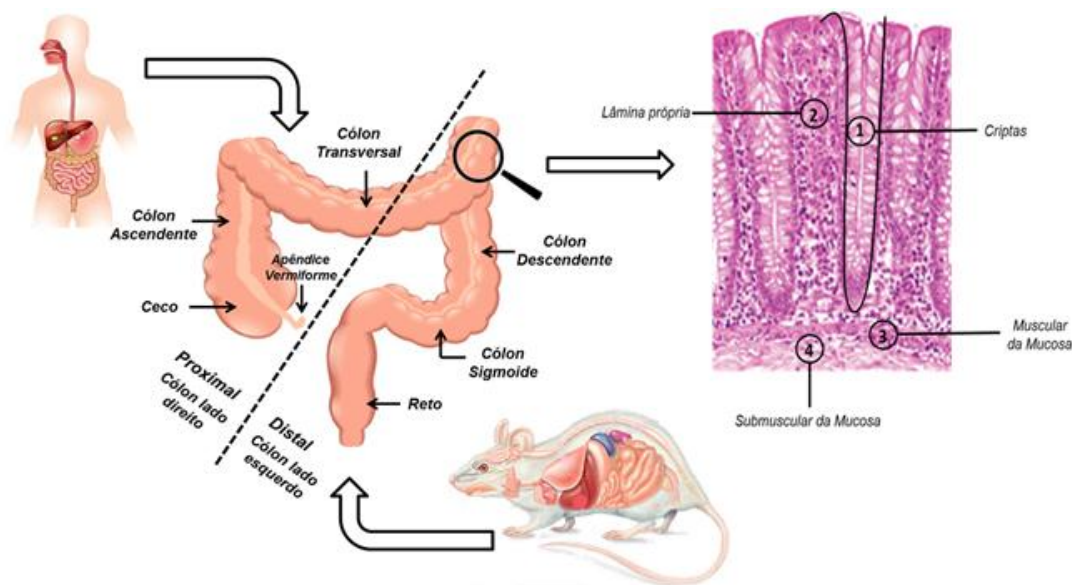


Figura 1| Imagem demonstrativa da anatomia do trato gastrointestinal e histologia básica do cólon. Adaptado de PONZ DE LEON; DI GREGORIO (2001), VAN RAAY; ALLEN-VERCOE (2017).

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 cólon 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 intestinais, 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 luminas, 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).

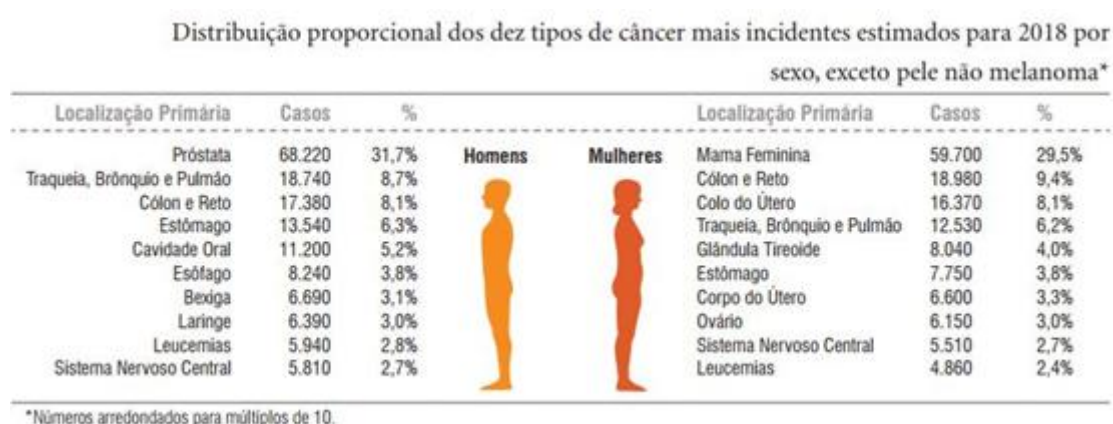


Figura2| Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018-2019 no Brasil (INCA 2018).

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).

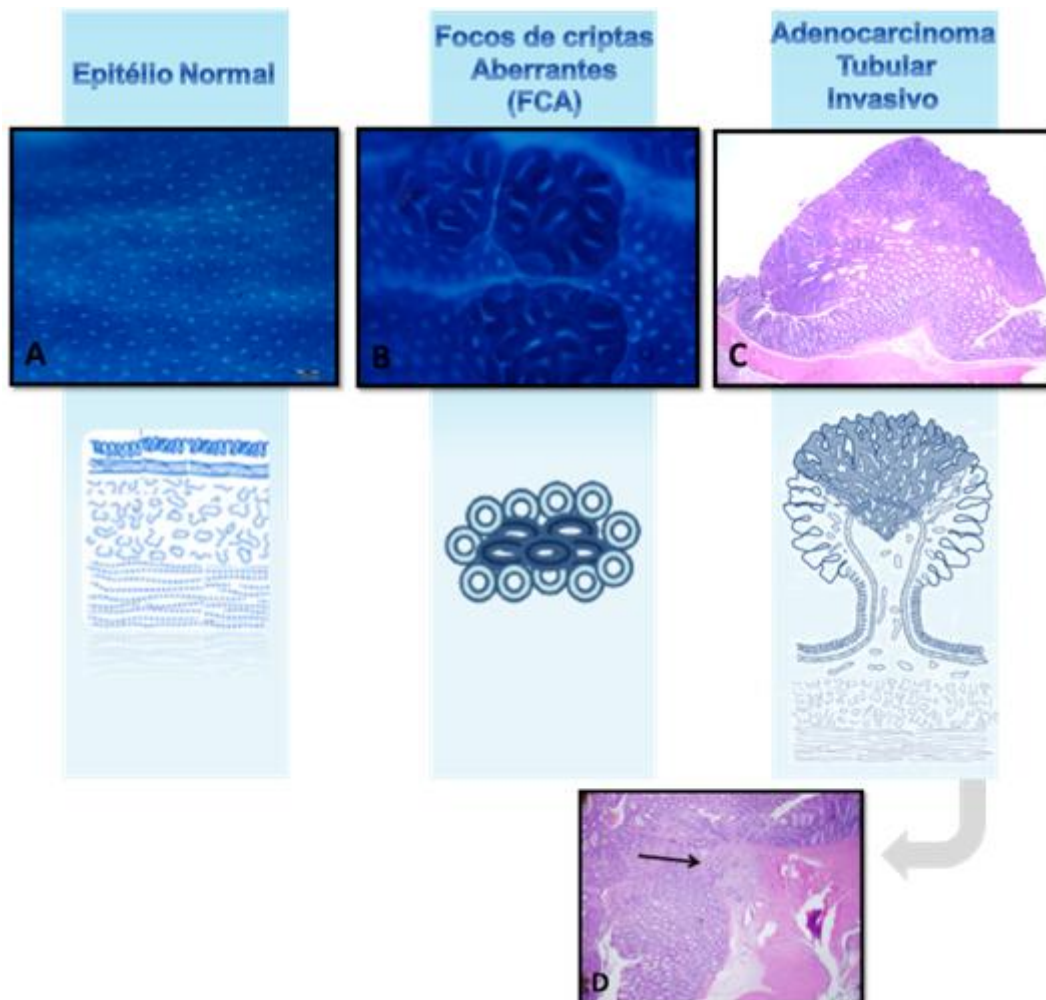


Figura 3 | Desenvolvimento do câncer de cólon e reto. **A:** Fotomicrografia de cólon normal corado com azul de metileno (4x), **B:** Cólon tratado com DMH exibindo focos de FCA com >10 (4x) , **C:** Adenocarcinoma Tubular Invasivo corado em H&E (4x) e **D:** Imagem ampliada 100x

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 β -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 microsatélites 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 írio 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 cycasina, 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 sadios 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).

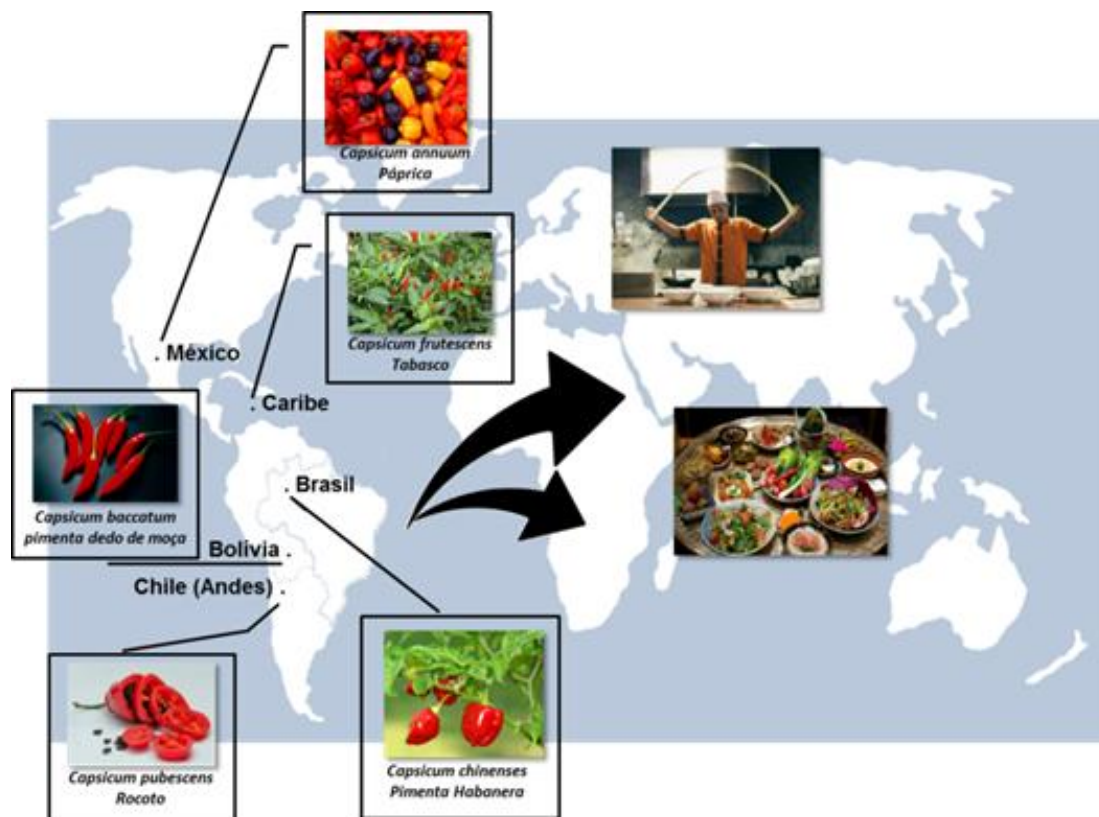


Figura 5 | Mapa demonstrativo da origem e domesticação das pimentas na América do Sul e sua dispersão para outros continentes. Adaptado de GUZMÁN, BOSLAND (2017), PERRY et al.(2007).

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 capsaicina e suas características moleculares

A capsaicina (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 capsaicina 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).

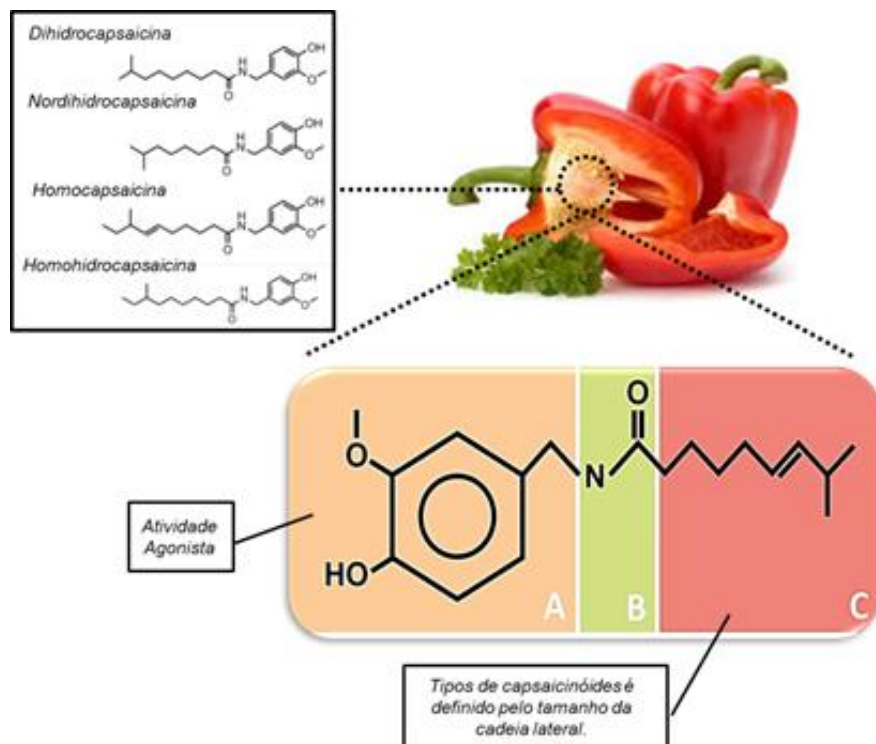


Figura 6 | Fórmula molecular da capsaicina. (A) anel aromático formado pela cadeia vanilil, responsável pela afinidade com os receptores da família TRPV, (B) ligação amida responsável pela pungência e manutenção da excitação dos neurônios sensoriais e (C) cadeia variável de ácidos graxos fornece máxima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

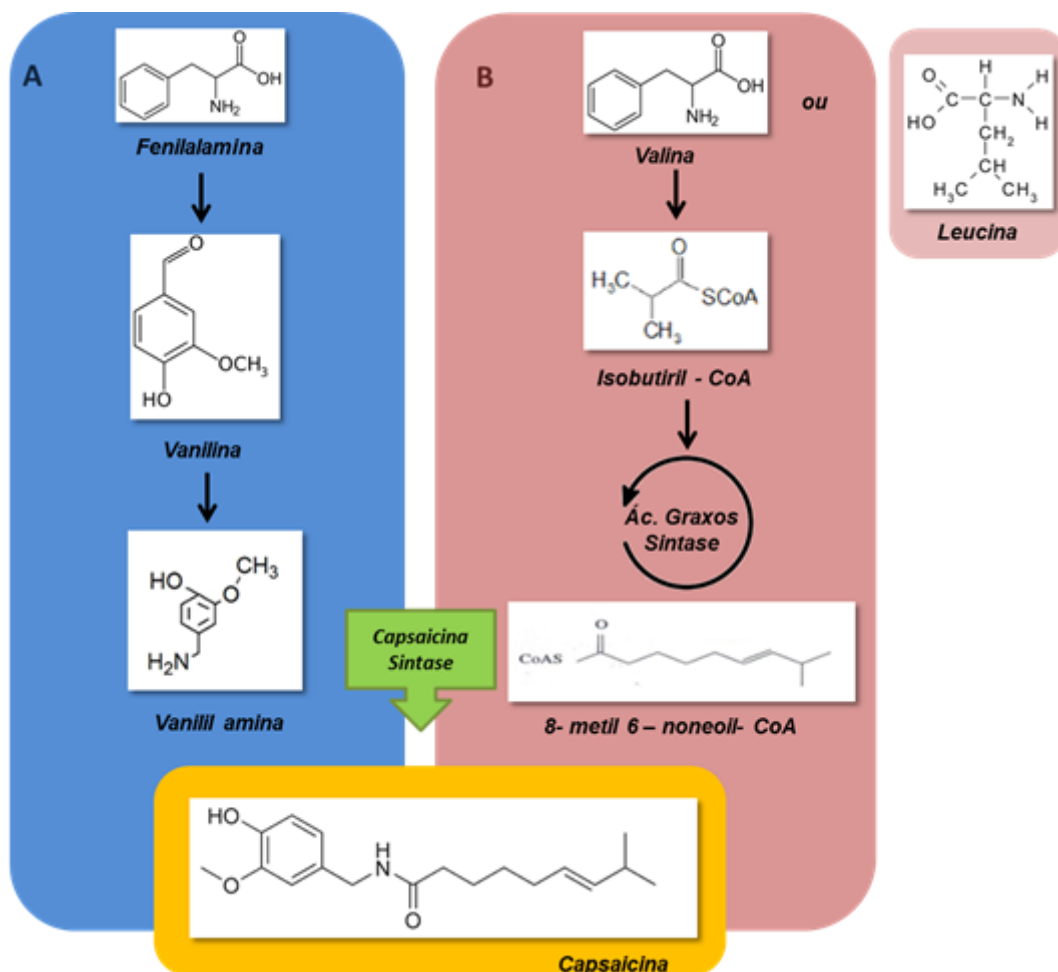


Figura 7| Resumo da Biossíntese da Capsaicina. (A) Via fenilpropanóide, produção do grupo fenólico.(B) Via dos ácidos Graxos produção da cadeia de ácidos graxos. A capsaicina sintase responsável pela formação da molécula capsaicina. Adaptado de STEWART, et al.(2007).

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).

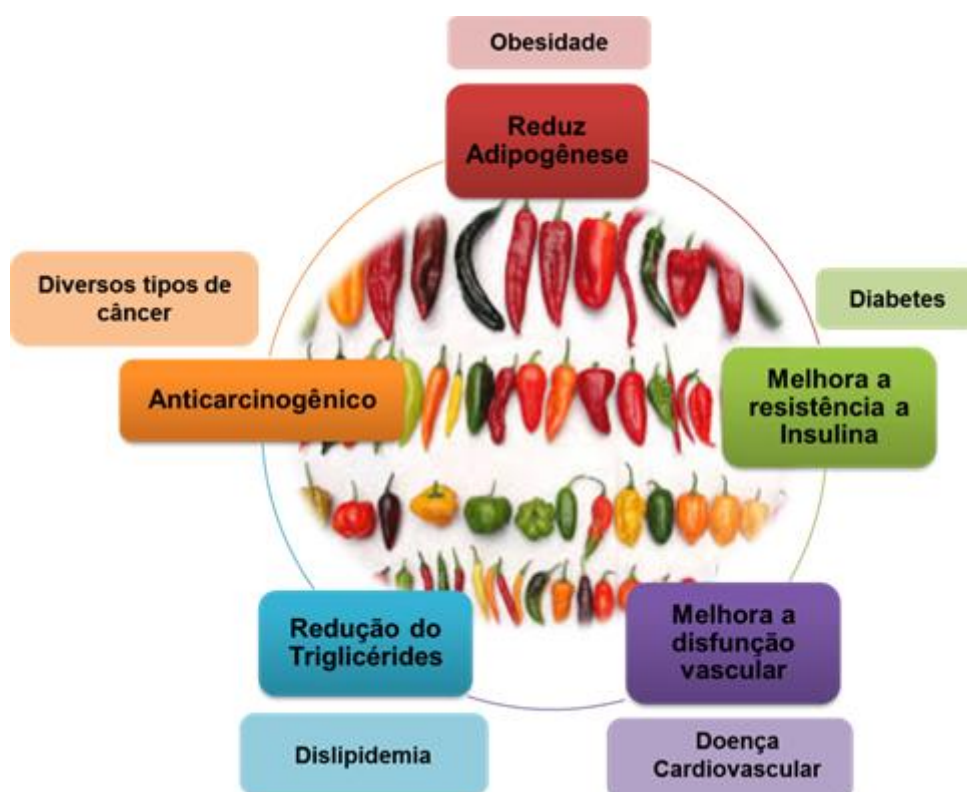


Figura 9 | Imagem demonstrativa da ação da capsaicina em diversas doenças e seus efeitos fisiológicos. (SHARMA et al., 2013, CLARK; LEE, 2016).

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 claboradores (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 / m² 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

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

Grupos	Amostras	230/260	260/280	[ng/uL]	RIN ¹
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
Média		2.009	1.619	328.6	8.213
± DP		0.024	0.398	172.847	0.574

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

¹Número 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)¹.

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

¹ 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 β -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_4) 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 β -catenina, quando comparada com os demais grupos. A via de sinalização Wnt/ β -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 β -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 imunoistoquímica 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 imunoistoquímica 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 β -catenina, onde observamos redução da expressão aberrante (nuclear) de β -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 metabólitos 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 δ 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 α ,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/ β -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 Ca²⁺ 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/ β -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/EBB β) and C/EB ζ (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- β 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 RAAIJ, 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 Ca²⁺ 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- κ 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.