

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO



Juliana Yumi Sakita

**Efeitos da atividade serotoninérgica colônica sobre o dano
de DNA indutor da carcinogênese de cólon**

Ribeirão Preto

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO



Efeitos da atividade serotoninérgica colônica sobre o dano de DNA indutor da carcinogênese de cólon

Juliana Yumi Sakita

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco, e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.
Área de concentração: Oncologia.
Opção: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica

Orientador: Dr. Vinicius Kannen Cardoso

Ribeirão Preto

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Sakita, Juliana Yumi

Efeitos da atividade serotoninérgica colônica sobre o dano de DNA indutor da carcinogênese de cólon, 2018

82p. : il.; 30cm

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco, e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Oncologia. Opção: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

FOLHA DE APROVAÇÃO



Janus

Universidade de São Paulo

ATA DE DEFESA

Aluno: 17154 - 10132285 - 1 / Página 1 de 1

Ata de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Juliana Yumi Sakita no Programa: Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular, do(a) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos 20 dias do mês de agosto de 2018, no(a) FMRP-USP realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Juliana Yumi Sakita, apresentada para a obtenção do título de Mestra intitulada:

"Efeitos da atividade serotoninérgica colônica sobre o dano de DNA indutor da carcinogênese de cólon"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Vinicius Kannen Cardoso	Presidente	FMRP(FMRP)	Não Votante
Cláudia Helena Pellizzon	Titular	UNESP - Externo	<u>Aprovado</u>
Wilson Araújo da Silva Junior	Titular	FMRP - USP	<u>APROVADA</u>
Jeremy Andrew Squire	Titular	FMRP - USP	<u>APROVADO</u>

Resultado Final: APROVADA

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Marcia Rita Pessini Marcia Rita Pessini, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Ribeirão Preto, aos 20 dias do mês de agosto de 2018.

Cláudia Helena Pellizzon

Wilson Araújo da Silva Junior

Jeremy Andrew Squire

Vinicius Kannen Cardoso
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o arquivamento da prova é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 21/08/18 e, portanto, o(a) aluno(a) Janus jus ao título de Mestra em Ciências obtido no Programa Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular. Área de concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Prof. Dr. Leonardo de Carvalho Cordeiro
Presidente da CPG-FMRP

FOLHA DE APROVAÇÃO

Eu, Dr. Vinícius Krause Cardoso, declaro
que a Profa. Cláudia M. Pellizzon participou
por video-conferência e considerou a mesma
aprovada.

20/08/18

Assinatura
Data
Assinatura



Assinatura
Data

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a meus pais, Edgar e Edna, ao meu irmão Henrique, e
à Karim, que são meu alicerce e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao Dr. Vinicius Kannen, pela oportunidade concedida, por acreditar em meu potencial, ensinamentos, ajuda e conselhos, que contribuíram para o meu desenvolvimento científico.

Ao Professor Sérgio Akira Uyemura, por ceder seu laboratório para que meus experimentos fossem realizados, por cada conselho, oportunidade concedida e discussões pertinentes.

Ao Departamento de Oncologia clínica, Células Tronco e Terapia celular, pela disponibilidade, prontidão e incentivo acadêmico e científico;

Ao André Ozawa, que sempre teve paciência de me escutar, por todo carinho, compreensão e companheirismo, o meu eterno obrigado.

Aos técnicos do meu laboratório, Emerson de Souza Santos, Lucas Oliveira e João Franco, por compartilharem seu conhecimento, por toda ajuda, paciência e prontidão.

Aos amigos que fiz durante a pós-graduação, Aline Bernardi, Regina Rafael, Allysson Cunha, Letícia Mayra, por todas as vezes que compartilhamos conhecimento, risadas e conselhos. Em especial às amigas Laís Bállico e Stefânia Minto que conviveram diariamente e tornaram tudo mais fluido. Sem vocês, este trabalho não seria o mesmo!

À FAPESP, pela bolsa e pela reserva técnica concedida durante o desenvolvimento deste trabalho (2017/01260-7).

Muito obrigada!

“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

RESUMO

A atividade da serotonina (5-HT) pode estar envolvida no desenvolvimento do câncer colorretal, embora detalhes desse processo permaneçam desconhecidos. Camundongos knockout (KO) para triptofano hidroxilase 1 (Tph1) falham em sintetizar 5-HT e fornecem um sistema modelo apropriado para estudar o papel deste neuro-hormônio na carcinogênese colorretal. Animais Tph1KO apresentaram um desenvolvimento reduzido de tumores alográficos e tumores colorretais induzidos por colite. No entanto, o tratamento carcinogênico colorretal promoveu um aumento do número de tumores induzidos pela exposição à um carcinógeno. Também se observou uma alta intensidade de dano de DNA no nicho de células-tronco do cólon, bem como uma redução na populações de células enteroendócrinas e aumento daquelas unidades calciformes. Antes da ativação da ataxia telangiectasia relacionada a Rad 3 (ATR) e proteína 53 relacionada à transformação (Trp53), a síntese de 5-HT promoveu a atividade da O-6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) em resposta à exposição carcinogênica. O resgata da síntese de 5-HT através do tratamento com 5-hidroxitriptofano reduziu o dano de DNA induzido pela radiação. O papel protetor da 5-HT foi confirmado em camundongos transgênicos com perda específica da expressão de Tph1 nos intestinos. Esta investigação demonstra um papel protetor da síntese de 5-HT contra o desenvolvimento da carcinogênese colorretal.

Palavras chave: Carcinoma colorretal; dano de DNA; serotonina; sistema de reparo.

Abstract

Serotonin (5-HT) activity may impact on the development of colorectal cancer. However, details of this process remain unknown. Tryptophan hydroxylase 1 knockout (Tph1KO) mice fail to synthesize 5-HT and provide an appropriate model system to study the role of this neurohormone in colorectal carcinogenesis. Tph1KO mice have a decreased development of allograft tumors and colitis-induced colorectal tumors. However, colorectal carcinogen treatment led to increased tumor numbers, with high DNA damage intensity in the colonic stem cell niche. It was related to decreased numbers of enteroendocrine cells but an increase in the goblet cell population. Indeed, 5-HT synthesis promoted O-6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in response to azoxymethane before activating ataxia telangiectasia and Rad3 related (ATR) and transformation related protein 53 (Trp53) expression. Radiation-induced DNA damage could be rescued by 5-hydroxytryptophan. The protective role of 5-HT was confirmed in transgenic mice with intestine-specific loss of Tph1 expression. This investigation reveals a protective role of 5-HT synthesis against the development of colorectal carcinogenesis.

Keywords: Colorectal cancer; damage DNA; serotonin; pathways DNA repair.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeitos da síntese de serotonina nos tumores colorretais I.....	50
Figura 2: Efeitos da síntese de serotonina nos tumores colorretais II.....	51
Figura 3: Perda de Tph1 promove o desenvolvimento de tumores colorretais associados ao dano de DNA.....	52
Figura 4: Tumores de animais Tph1KO possuem redução de pATR.....	52
Figura 5: A síntese de serotonina modula os eventos antecedentes da carcinogênese colorretal e reparo de dano de DNA.....	53
Figura 6: A síntese de serotonina modula os eventos antecedentes da carcinogênese colorretal.....	54
Figura 7: A síntese de serotonina modula os eventos de dano de DNA antecedentes à carcinogênese colônica.....	55
Figura 8: A síntese de 5-HT protege o cólon do dano de DNA induzido pelo carcinógeno.....	56
Figura 9: A reposição com 5-HT exógena não possui papel de proteção ao dano de DNA.....	57
Figura 10: Serotonina colônica fornece proteção ao dano de DNA causado pelo AOM.....	58
Figura 11: A síntese de 5-HT protege o cólon contra o dano de DNA induzido por radiação ionizante I.....	60

Figura 12: A síntese de 5-HT protege o cólon contra o dano de DNA induzido por radiação ionizante II.....61

Figura 13: A síntese de serotonina protege o cólon dos eventos iniciais da carcinogênese.....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Desenho experimental IX.....	39
Tabela 2 a: Desenho dos primers Tph1 e parâmetros de ciclagem.....	42
Tabela 2 b: Desenho dos primers Tph1 e parâmetros de ciclagem.....	43
Tabela 3 a: Desenho dos primers e ciclagem para PCR Tph1 ^{flx/flx} e Tph1 ^{flx/Villin} cre	43
Tabela 3 b: Desenho dos primers e ciclagem para PCR Tph1 ^{flx/flx} e Tph1 ^{flx/Villin} cre	44
Tabela 4 a: Sondas Taqman usadas neste trabalho.....	45
Tabela 4 b: Sondas Taqman usadas neste trabalho.....	46
Tabela 5: Reação de conversão de bissulfito.....	47
Tabela 6: Desenho dos primers MGMT modificado metilado e não metilado...	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

N°	Símbolo	Nome	N°	Símbolo	Nome
1	5-HT	Serotonina	22	GC	Células globulares
2	5-HTP	5-hidroxitriptofano	23	gDNA	DNA genômico
3	AOM	Azoximetano	24	KO	Knock-out
4	ATM	Ataxia telangiectasia mutada	25	H.E.	Hematoxilina e Eosina
5	ATR	Ataxia telangiectasia relacionada à Rad3	26	i.p.	Intraperitoneal
6	B-cat	B-catenina	27	Lgr5	Repetições ricas em leucinas contendo receptor acoplado à proteína G
7	Bm1	B lymphoma Mo-MVL insertion region I homolog	28	MAM	Metilazoximetanol
8	CA	Cripta aberrante	29	MGMT	O ⁶ -metil-transferase
9	CCR	Carcinoma colorretal	30	O ⁶ -EG	O ⁶ etilguanina
10	cDNA	DNA complementa de fita simples	31	PCPA	4-Cloro-DL-fenilalanina
11	CgA	Cromogranina A	32	PCR	Reação em cadeia da polimerase
12	CHK1	Checkpoint kinase 1	33	qPCR	PCR quantitativa em tempo real
13	CHK2	Checkpoint kinase 2	34	SNC	Sistema nervoso central
14	DDC	Descarboxilase de aminoácidos L-aromáticos	35	TAE	Tris-Acetato-EDTA
15	DNA	Acido dextrorribonucleico	36	TBE	Tribromoetanol
16	DSB	Double strand brake	37	Tph1	Triptofano hidroxilase tipo 1
17	DSS	Dextran sulfato de sódio	38	Tph2	Triptofano hidroxilase tipo 2
18	FC	Fissão criptal	39	UV	Ultravioleta
19	FCA	Focos de criptas aberrantes	40	WB	Western blotting
20	Gamma-H2AX	Histona gamma 2AX	41	WT	Wild type
21	GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase			

SUMÁRIO

1. Introdução.....	19
1.1 Estrutura e fisiologia do cólon.....	20
1.2 Estrutura e função das glândulas colônicas.....	21
1.3 Função fisiológica da serotonina nos intestinos.....	21
1.4 Efeitos da serotonina sobre a carcinogênese de cólon.....	23
1.5 Carcinoma colorretal: incidência e fatores de risco.....	24
1.6 Características histológicas da carcinogênese de cólon.....	25
1.7 Modelo experimental de carcinogênese.....	26
1.8 Carcinogênese colorretal e dano de DNA.....	27
2. Objetivos.....	30
2.1 Objetivos gerais.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3. Material e métodos.....	32
3.1 Animais.....	33
3.1.1 Manutenção e expansão de colônias.....	33
3.1.2 Preparo e aplicação do carcinógeno.....	33
3.1.3 Irradiação dos camundongos.....	34
3.1.4 Eutanásia.....	34
3.2 Processamento de tecido.....	35
3.2.1 Inclusão em parafina.....	36
3.3 Experimentos.....	36
3.3.1 Experimento I.....	36
3.3.2 Experimento II.....	36
3.3.3 Experimento III.....	37

3.3.4	Experimento IV.....	37
3.3.5	Experimento V.....	37
3.3.6	Experimento VI.....	38
3.3.7	Experimento VII.....	38
3.3.8	Experimento VIII.....	38
3.3.9	Experimento IX.....	38
3.3.10	Experimento X.....	39
3.3.11	Experimento XI.....	39
3.3.12	Experimento XII.....	40
3.4	Imunohistoquímica (IHC-P).....	40
3.5	Análises genéticas.....	40
3.5.1	Extração de DNA de amostras auriculares.....	41
3.5.2	Quantificação do DNA por NanoDrop.....	41
3.5.3	PCR convencional.....	42
3.5.3.1	Genotipagem Tph1.....	43
3.5.3.2	Genotipagem Tph1 ^{Flx-Villin cre}	43
3.6	Reverse transcription PCR (RT-PCR).....	44
3.7	Western blotting (WB).....	46
3.8	Análise de DNA metilado.....	47
3.8.1	Conversão de bissulfito.....	47
3.8.2	qPCR.....	47
3.9	Análise estatística.....	48
4.	Resultados.....	49
4.1	Serotonina altera o desenvolvimento de diferentes modelos de tumores colorretais.....	50

4.2 Efeitos da serotonina no desenvolvimento de tumores colorretais relacionados ao dano de DNA.....	51
4.3 A serotonina altera o desenvolvimento de lesões preneoplásicas....	53
4.4 A síntese de 5-HT modula a intensidade do dano de DNA no cólon intestinal.....	54
4.5 Efeitos da síntese de 5-HT sobre mecanismos de reparo ao dano de DNA induzida por irradiação.....	58
4.6 Efeito do AOM sob o dano de DNA no cólon intestinal.....	62
5. Discussão de resultados.....	66
5.1 Ação da síntese de 5-HT sobre o dano e DNA.....	67
5.2 Efeitos da síntese de 5-HT sobre o reparo genômico quando alterado pelo carcinógeno AOM.....	68
5.3 Efeitos da síntese de 5-HT sobre o reparo genômico quando alterado pela radiação ionizante.....	69
5.4 Efeitos da síntese de 5-HT sobre a diferenciação celular no nicho colônico de células tronco sob indução carcinogênica.....	71
6. Conclusão.....	73
7. Referências bibliográficas.....	75
8. Anexo.....	82

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estrutura e fisiologia do cólon

O intestino grosso é composto pelo cécum e apêndice, cólon, reto e canal anal. O cólon pode ser subdividido em regiões ascendente, transversal, descendente e sigmoide. A região sigmóide atravessa a borda pélvica para entrar na cavidade pélvica, onde se conecta com o reto (ELLIS *et al.*; 2013). O cólon é diferenciado macroscopicamente do intestino delgado pela presença das bandas musculares longitudinais externas, ou *taenia coli* (ELLIS *et al.*; 2013).

Tanto o intestino delgado quanto o intestino grosso são formados por uma única camada de células epiteliais colunares (ELLIS *et al.*; 2013). Entretanto, existem diferenças microscópicas na composição destes órgãos. As células epiteliais do intestino delgado têm um importante papel na absorção de nutrientes. Como característica principal, este epitélio possui projeções que formam vilosidades, maximizando a superfície de absorção de nutrientes. Em contrapartida, o intestino grosso não possui essas vilosidades, já que sua principal função é absorção de água e eletrólitos (BOWCULTT R. *et al.* 2014). O tecido colônico é composto por quatro camadas denominadas mucosa, submucosa, muscular própria e a camada serosa. A camada mucosa é composta por múltiplas glândulas ou criptas paralelamente alinhadas. Cada uma destas invaginações na mucosa é considerada uma unidade funcional do cólon, ou organoide (BOOTH C.; 2000).

1.2 Estrutura e função das glândulas colônicas

Devemos considerar que o epitélio do cólon intestinal humano tem a capacidade de se auto-renovar completamente a cada três dias (AFAHA S., *et al.* 2015). As células intestinais presentes na superfície do epitélio são

rapidamente substituídas por descamação, devido o atrito desta superfície com o bolo fecal. Esta perda celular é substituída pela atividade de diferenciação de células tronco alocadas na base da cripta (BARKER et al.; 2007). Essas células são pequenas e indiferenciadas, bem como possuem a capacidade de se dividir assimetricamente. Assim, suas células filhas idênticas podem proliferar e se diferenciar em células neuroendócrinas e globulares e, finalmente, em colonócitos (AFAHA S. *et al.* 2015).

Acredita-se que haja dois grupos de células tronco. Aquelas que se duplicam rapidamente (estas células expressam Lgr5 [repetições ricas em leucinas contendo o receptor acoplado à proteína G]), e aquelas que apresentam um ciclo celular mais lento (estas células expressam BMI-1 [B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog]) (BARKER *et al.*, 2007). As células Lgr5 são as mais estudadas. Estas células estão localizadas na base da cripta e possuem alta capacidade de renovação e diferenciação (AFASHA *et al.*, 2015). Recentemente sugeriu-se que células tronco BMI-1 residam no intestino delgado, mas não no cólon (AFASHA *et al.*, 2015).

1.3 Função fisiológica da serotonina nos intestinos

A serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) é uma indolamina oriunda da hidroxilação e carboxilação do L-Triptofano. Este neuro-hormônio está geralmente associado a funções fisiológicas e patológicas do sistema nervoso central (SNC). Entre suas inúmeras funções, vale apenas nomear os seus efeitos na regulação do humor, consumo de alimentos, sono, sexo e dor (GERSHON, 2013). Entretanto, a 5-HT do SNC compõem apenas uma pequena parte (cerca de 5%) do total do volume de 5-HT circulante. Já por várias décadas sabe-se

que a síntese de 5-HT ocorre principalmente a nível intestinal (ERSPAMER,1937). A 5-HT tem uma ação central para a manutenção da homeostasia intestinal (MANOCHA & KHAN, 2012). A atividade serotoninérgica parece não apenas controlar o peristaltismo intestinal (HEREDIA et al., 2013), mas também modular a atividade de células epiteliais e imunes (KHAN & GHIA 2010).

O conceito de que a 5-HT presente no SNC e periférico possuem diferentes fontes é sustentada pelo conhecimento de que a barreira hematoencefálica é impermeável para 5-HT circulante. Também, as enzimas que iniciam a conversão do L-Triptofano (Trp) em 5-HT são distintas (COTE, F. *et al.*, 2003). Se a enzima triptofano hidroxilase tipo II (Tph2) é responsável pela conversão de Trp em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) em neurônios residentes no SNC, esta função é coordenada nos intestinos pela Tph1 em células enteroendócrinas (Walther & Bader 2003). Vale a pena ressaltar que o 5-HTP é convertido em 5-HT pela descarboxilase de aminoácidos L aromáticos (DDC) (WALTHER & BADER; 2003).

Evidências indicam que dentro da camada mucosa, a 5-HT pode tanto atuar como uma molécula pró-inflamatória quanto anti-inflamatória. Khan et al. (2011) demonstrou que as células dendríticas são mediadores chave na resposta pró-inflamatória da 5-HT (LI N. *et al.*, 2011). De acordo com Gershon (2012), a 5-HT tanto promove quanto protege as células intestinais de dano (GERSHON, 2012). Além da resposta pró-inflamatória, a 5-HT pode exercer um efeito anti-inflamatório na mucosa intestinal via ativação de receptores 5-HT₄ (SPOHN *et al.*; 2016). Segundo Spohn (2017), a ação anti-inflamatória da 5-HT predomina em condições normais, enquanto a ação pró-inflamatória mediada

por receptores 5-HT₇ predominam em condições patológicas (SPOHN *et al.*, 2017). A inibição do receptor 5-HT₇, que é expresso em células dendríticas, inibiu o processo de colite em animais (KIM J. *et al.*, 2013).

1.4 Efeitos da serotonina sobre a carcinogênese de cólon

De acordo com as descobertas de Tutton e Barkla, a 5-HT promove o desenvolvimento do carcinoma colorretal (CCR) (TUTTON; BARKLA, 1981). Esses dados corroboram com as descobertas de Younes *et al.* que demonstraram um aumento da síntese de 5-HT em tumores de intestino delgado, apêndice e ceco (YOUNES *et al.*, 2009). Nocito (2008), também demonstrou que camundongos com deficiência na síntese de 5-HT, apresentaram menor crescimento e proliferação de tumores alográficos (NOCITO *et al.*; 2008). Todavia, estudos do nosso grupo de pesquisa revelaram que o aumento nos níveis de 5-HT no cólon intestinal induzidos por um inibidor da receptação de serotonina ocorreu em conjunto com uma redução no desenvolvimento de lesões preneoplásicas (KANNEN *et al.*, 2011). Também relatamos que uma dieta rica em gordura não apenas promoveu o desenvolvimento de lesões preneoplásicas, como também reduziu os níveis de 5-HT no cólon intestinal (KANNEN *et al.*, 2012). Em outro estudo, observamos que a restrição dietética também aumenta o risco de CCR, bem como suprimiu a síntese e liberação de 5-HT no cólon (KANNEN *et al.*, 2013).

1.5 Carcinoma colorretal: incidência e fatores de risco

O CCR é a terceira neoplasia maligna mais comum na população mundial, sem contabilizar os casos de melanoma (ARNOLD M. *et al.* 2016). Em 2012, foram diagnosticados cerca de 1.4 milhões de novos casos e cerca de 700.000 pacientes morreram em todo o mundo (ARNOLD M. *et. al.* 2016). Também no Brasil, o CCR é o terceiro câncer mais comum, sendo que em 2018 foi estimado a ocorrência de ~36.360 novos casos, sendo que ~17.380 serão homens e ~18.980 mulheres (INCA, 2018). Estes dados demonstram que um melhor entendimento desta doença é necessário.

Existem vários fatores de risco para o desenvolvimento do CCR. Os principais são idade, alimentação, obesidade, consumo de álcool, consumo de carne vermelha e carnes processadas, bem como baixa ingestão de frutas e vegetais (SREEVALSAN S., 2013). Center *et al.* (2009) demonstrou que os riscos para o desenvolvimento da doença diminuem com o aumento da ingestão de carnes brancas, proteínas de fontes vegetais, substituição de gorduras saturadas pelas insaturadas e utilização dos grãos como fonte principal de carboidratos. Sabe-se também, que o ferro presente em quantidades significativas na carne vermelha promove o crescimento de células transformadas e aumenta o dano de DNA por agir como um pró-oxidante e gerador de estresse oxidativo nas células (BIRD *et al.* 1996; SREEVALSAN S., 2013).

A maior incidência dos casos de CCR é de casos esporádicos, que são doenças predominantemente induzidos pela aquisição dos hábitos de vida não saudáveis descritos acima (SAKITA *et al.* 2016). Vale salientar que embora a

colite seja um dos fatores de risco para o desenvolvimento do CCR, menos de 2% de todos os casos estão relacionados a esta doença (MUNKHOLM P.; 2003).

1.6 Características histológicas da carcinogênese colorretal

Uma possível hipótese para o entendimento da tumorigênese intestinal, incluindo malignidades do intestino delgado e cólon, sugere que somente células tronco possuem longevidade suficiente para acumular mutações. Aqui, devemos considerar que tanto o processo de renovação tecidual quanto aquele tumorigênico dependem da proliferação celular (BARKER et al, 2009).

As lesões preneoplásicas do cólon ou criptas aberrantes (CA) foram inicialmente observadas em 1991 em pacientes diagnosticados com câncer de cólon (PRETLOW, TP. *et al.*; 1991). Devido à rápida renovação celular em condições normais, era esperado que as criptas aberrantes se replicassem na mesma taxa ou em menor período de tempo (WARGOVICH *et al.*; 2010). Em humanos, porém, existem evidências conflitantes sobre este aumento replicativo (RENEHAN *et al.*; 2002).

O processo de replicação de uma CA é similar ao processo das criptas normais, ou seja, tem início no botão da cripta, empurrando as células para cima e para fora para dar origem a novas criptas colônicas, além de reabastecer as células na cripta original (FUJIMITSU Y. *et al.*; 1996). Esse processo de brotamento e ramificação é chamado de fissão criptal (FC). Este evento tem sido sugerido participar da expansão de lesões preneoplásicas colônicas (MCLELLAN EA *et al.*; 1991).

Os focos de criptas aberrantes (FCA) estão caracterizadas como lesões preneoplásicas do cólon, e foram inicialmente descritas por Bird em 1987 (BIRD,

RP; 1987). O tamanho e número de FCAs variam conforme o risco para o desenvolvimento do carcinoma colorretal (RONCUCCI L. *et al.*; 2000). Quando tratados com o carcinógeno azoximetano (AOM), observou-se que as criptas de camundongos eram maiores, mais espessas e mais escuras do que as glândulas no epitélio normal (BIRD RP; 1987). Além disso, as CAs tinham um perfil distorcido e fendas com aberturas luminiais (BIRD RP, *et al.* 1989).

1.7 Modelo experimental de carcinogênese

A exposição ao carcinógeno AOM é um modelo experimental que melhor mimetiza em camundongos o processo carcinogênico que ocorre no cólon de humanos. O AOM requer ativação metabólica para formar produtos reativos que reagem com DNA. O seu metabólito mais ativo é o metilazoximetanol (MAM), uma vez que este pode alquilar macromoléculas no cólon e no fígado por meio da adição de grupamentos metil na posição O⁶ ou N⁷ da guanina (ROSENBERG D.W., GIARDINA C., TANAKA T. 2009). Caso tais adutos de DNA não sejam removidos por meio da via das metiltransferases (MGMT), ocorrerá um desapareamento de bases nitrogenadas por erros no processo de reparo a oxidação do DNA. Se estes eventos promovem altas taxas de morte celular, eles também induzem a iniciação carcinogênica de colonócitos (KONDO N. *et al.*; 2010). Por outro lado, a radiação ionizante é considerada um excelente modelo experimental para indução de quebras à dupla fita de DNA (DSB), o que pode promover senescência e autofagia (KIM E., *et al.*, 2016).

1.8 Carcinogênese colorretal e dano de DNA

Sabe-se que as alterações genéticas e epigenéticas em proto-oncogenes, permitem que as células adquiram uma vantagem de crescimento sobre as células ao seu redor. Segundo Vogelstein, os tumores evoluem em três amplas fases: iniciação, promoção e progressão (VOLGELSTEIN, 1996). Na iniciação, as células sofrem uma mutação que transforma proto-oncogenes em oncogenes, ou mesmo a perda de um gene supressor tumoral (BERENBLUN; SHUBIK., 1948). Assim, células tronco Lgr5 que sofrem mutação no gene *APC*, agem como células malignas iniciadores de tumores de cólon (CLEVERS H., 2014).

Também, as DSBs que não são reparadas podem interromper gravemente a replicação do DNA em células proliferativas. Isto pode induzir a apoptose, ou a ativação de mecanismos de adaptação. Isto permite que mutações se acumulem. No caso de exposições consecutivas à carcinógenos químicos, o acúmulo de mutações pode resultar em aberrações cromossômicas, o que induz um ciclo de alterações genômicas que resultará na formação de tumores malignos (SHILOH Y, ZIV Y; 2013). A resposta ao dano de DNA é iniciada através de vias de sinalização que facilitam a comunicação entre as proteínas de reconhecimento do dano e a maquinaria de reparo. Tais eventos bloqueiam a progressão do ciclo celular para que o reparo ocorra antes da duplicação celular. Alterações na resposta ao dano de DNA facilitam a fase de iniciação carcinogênica e, conseqüentemente, a ocorrência da instabilidade genômica (LOBRICH M; JEFFO PA; 2007).

De fato, a instabilidade genômica permite que células mutadas acumulem novos danos de DNA, o que permite a aquisição de novas mutações, e uma maior desdiferenciação celular. Aqui, devemos lembrar que a descaracterização

de uma célula a partir de seu fenótipo original se deve ao fato de mutações genômicas alterarem funções proteicas, o que indubitavelmente alterará atividades celulares fisiológicas (ARNOLD M. et. al. 2016).

O reparo dos adutos de DNA causados ou por agentes exógenos ou por mutágenos endógenos, é feito pela proteína O⁶-metilguanina-metiltransferase (MGMT) (SHARMA; 2009). O substrato primário de MGMT é O⁶- metilguanina (O⁶-MG), porém, MGMT também é capaz de reparar adutos de maior tamanho, como os O⁶-etilguanina (O⁶-EG) (SHARMA; 2009). A perda da expressão de MGMT tem sido relatado diversos tipos de tumores, tais como gliomas, linfomas, carcinomas de próstata e de mama (BUGNI, J.M.; 2007). O silenciamento de sua expressão gênica é causado por metilação de seu promotor, fazendo com que fatores transcricionais não consigam se ligar e iniciar a replicação gênica (DAY R.S. 1980). Como MGMT protege contra adutos de DNA mutagênicos, parece plausível que a perda de expressão desta proteína seja considerada um mecanismo pre-tumorigênico (SHEN L.; 2005).

Em células de mamíferos, a ataxia telangiectasia mutada (ATM) é uma proteína quinase relacionada à via PI-3K, e responsável pela resposta à eventos de DSBs. A proteína ATR pode ser ativada por quebras em apenas uma das duas fitas de DNA, erros no reparo de excisão de nucleotídeos, ou colapso de forquilhas replicativas que induzam DSBs. Uma vez ativada, ATR fosforila diversos alvos envolvidos no reparo de DNA por recombinação homóloga, e reinicia a forquilha de replicação. Através da fosforilação de CHK1, ATR inicia a cascata de checkpoint entre a fase S e G2M do ciclo celular (MIDDLETON, F. K. et al; 2015).

Essa proteína também age como sensor secundário de DSB, bem como reforça a fosforilação da histona H2A pertencente à família X (γ -H2AX), ativando assim a maquinaria de reparo (KURZ et al.; 2004). Assim, células que adquirem a capacidade de acumular mutações por evasão do sistema de reparo, progredirão no processo carcinogênico, o que finalmente permitirá a característica de um potencial proliferativo quase ilimitado (LOBRICH M; JEFFO PA; 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho se propõe a investigar o potencial da síntese intestinal de 5-HT de modular eventos carcinogênicos relacionados ao dano de DNA no segmento colorretal.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Verificar a ação da síntese de 5-HT em diferentes modelos experimentais de carcinoma colorretal;
- 2- Avaliar o efeito da síntese de 5-HT no desenvolvimento da carcinogênese colorretal espontânea induzida pelo carcinógeno AOM;
- 3- Avaliar o potencial da síntese serotoninérgica sobre os eventos de dano de DNA;
- 4- Determinar se a síntese de 5-HT modula mecanismos centrais de reparo gênico que estão envolvidos em diferentes fases da carcinogênese colorretal espontânea;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

3.1.1 Manutenção e expansão de colônias

Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (15.1.229.60.8). A linhagem de camundongos *Tph1 knockout* (Tph1KO) foi doada pelo Prof. Dr. Michael Bader (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch, Alemanha); e a linhagem de camundongos transgênicos *Tph1^{fl-fl}Villin^{Cre}* foi doada pelo Prof. Dr. Gerard Karsenty (Departament of Genetics and Development at Columbia University Medical center, Nova York). Colônias foram estabelecidas e expandidas no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP). As salas de cruzamento e experimentação foram mantidas com temperatura ambiente constante e ciclo noite-dia 12/12h. Os animais seguiram um regime ad libitum que é baseado no livre acesso ao alimento e água 24 horas por dia, com consumo médio de 5g de ração e 6ml de água por animal adulto.

3.1.2 Preparo e aplicação do carcinógeno

O preparo do carcinógeno AOM (Sigma-Aldrich, EUA; A5486) foi realizado em capela com sistema de exaustão e sua diluição feita com soro fisiológico, sendo que alíquotas (100mg/ml) foram conservadas à -20°C. A solução de aplicação no camundongo foi preparada imediatamente antes do uso na dose de 10mg/kg (Neufert C. *et al.* 2007). Este carcinógeno foi aplicado através de uma injeção intraperitoneal (i.p.) no quadrante abdominal inferior direito. Durante toda a manipulação do AOM, o pesquisador estava equipado com itens de segurança obrigatórios (jaleco, máscara e luvas).

3.1.3 Irradiação dos camundongos

Os animais foram irradiados no Hemocentro do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e no Centro de Medicina Nuclear do Instituto de Radiologia do HCFMUSP. A grade de proteção contendo água e ração foi retirada da caixa dos camundongos antes da exposição à irradiação ionizantes (IR) no irradiador RS 2000 (Biological System-Rad Source, EUA). A dosagem à qual os animais foram expostos foi de 700cGy.

3.1.4 Eutanásia

O anestésico utilizado para a eutanásia foi o tribromoetanol (TBE). Este anestésico foi preparado previamente. Para isso, 5mL de álcool amino terciário (240486; Sigma-Aldrich, EUA) foi aquecido à 50°C para a dissolução do TBE (2,5g; T48402; Sigma-Aldrich, EUA). Em um Becker contendo 200mL de água milliQ sob agitação (vórtex) e a solução de TBE foi gotejada. O pH foi ajustado para 7,0 e a solução filtrada com o auxílio de um microfiltro de 0,22 µm. As alíquotas foram conservadas à -20°C.

Para a realização da eutanásia, os animais foram pesados individualmente para que a dose de TBE (250 mg/kg) fosse calculada e aplicada (i.p.). A responsividade do animal foi testada através da pressão digital na base da cauda e face plantar das patas traseiras. Quando não apresentava mais reação de dor ou fuga, o animal foi fixado à plataforma de eutanásia. Uma incisão foi realizada na porção abdominal para a exposição do diafragma. Este foi então rompido, induzindo o colapso pulmonar, e uma média de 800 ± 200µL de sangue foi retirado do ventrículo esquerdo com uma seringa heparinizada. A cavidade abdominal foi completamente aberta e o cólon dissecado do intestino

delgado e mesentério. Após a retirada do cólon, o mesmo foi aberto longitudinalmente e lavado com solução salina para a retirada do conteúdo luminal. O cólon foi seccionado em amostras de 1cm cada. As duas primeiras amostras distais foram fixadas em formol durante 24 horas para análises histopatológicas. As outras amostras foram armazenadas em criotubos devidamente identificados e armazenados em freezer -80°C para análises de biologia molecular.

3.2 Processamento de tecido

Logo após serem coletadas, as amostras destinadas à fins histopatológicos, foram fixadas em formol 10% por 24 horas. O formol 10% foi preparado a partir de 100 mL de formoldeído 37% (REF1.04003.1000; Merck, Alemanha), 4g de Fosfato de sódio monobásico (P0662; Merck, Alemanha), 6,5g de Fosfato de sódio dibásico (S0876; Merck, Alemanha) e 900 mL de água destilada. Após o período de fixação, foi realizada a desidratação do material para a remoção da água dos tecidos. Para isso, as amostras passaram por uma bateria crescente de álcoois (70%- 80% - 95% - 100% - 100% - 100%; A108701BJ; Synth, Brasil), no qual permaneceram por 1 hora em cada álcool. O processamento teve continuidade com a etapa de clarificação, que foi realizada com duas trocas de xilol (X100101BJ; Synth, Brasil). A impregnação foi realizada em estufa (EL1.1; Ondontobras, BR) a 60°C, com duas trocas de parafina (K93708209; Merck, Alemanha), para que todo o xilol fosse removido dos tecidos.

3.2.1 Inculsão em parafina

A inclusão das amostras processadas foi realizada com o auxílio de uma placa aquecedora (BH-14; O Patologista, BR) a 55°C para efetuar a inclusão do material. Uma placa refrigerada foi utilizada para resfriar os moldes com as amostras já incluídas. O molde de alumínio foi preenchido com parafina líquida. Com o auxílio de uma pinça, a amostra foi retirada do cassete e colocada no molde. A base do cassete identificado foi colocada sobre o molde de maneira que a parafina entrasse em contato com o cassete. Uma placa resfriada foi utilizada para solidificar a parafina. Quando a parafina estava solidificada, o bloco foi retirado do molde e levado à microtomia.

3.3 Experimentos

3.3.1 Experimento I

Um milhão de células de um adenocarcinoma de cólon de camundongo (MC-38) foram implantadas no subcutâneo de camundongos Tph1WT e Tph1KO. O desenvolvimento dos tumores foi avaliado após 16 dias da implantação. Os tumores foram pesados. O número de animais utilizados foi de 8.

3.3.2 Experimento II

Para investigação do papel da serotonina na carcinogênese colorretal associado à colite, nós utilizamos o modelo experimental do Dextran sulfato de sódio (DSS; 42867; MERCK; Alemanha). Assim, animais Tph1WT e Tph1KO receberam uma dose do carcinógeno AOM (10mg/kg) na primeira semana de experimento. O DSS foi preparado na concentração de 2,5% em água autoclavada e armazenada em frascos âmbar. A solução foi administrada aos

animais por três dias consecutivos (cerca de 5mL/ camundongo/ dia). No quarto dia de experimento, a solução de DSS foi trocada por uma nova e mantida por mais dois dias. O mesmo procedimento foi realizado no sexto dia de experimento. No oitavo dia, os animais encerraram o primeiro ciclo de DSS e receberam água autoclavada por duas semanas. No total, os animais receberam três ciclos de DSS e foram eutanasiados para avaliação do desenvolvimento tumoral. Vinte camundongos foram utilizados neste experimento.

3.3.3 Experimento III

Para investigar o papel da 5-HT no desenvolvimento de tumores colorretais relacionados ao dano de DNA, 27 camundongos Tph1WT (n= 16) e Tph1KO (n= 11) foram expostos à 6 doses de AOM e eutanasiados após 18 semana da última exposição carcinogênica.

3.3.4 Experimento IV

Camundongos Tph1 WT (n=8) e Tph1 KO (n=8) receberam 6 aplicações semanais do carcinógeno AOM (10mg/kg/semana) e foram eutanasiados após 6 semanas da última aplicação de carcinógeno para avaliação de lesões preneoplásicas.

3.3.5 Experimento V

Camundongos Tph1WT (n= 6) e Tph1KO (n= 6) foram expostos ou não à uma dose letal de radiação não ionizante – raios X (700cGy) e eutanasiados após 72 horas para avaliar o mecanismo de dano de DNA provocado.

3.3.6 Experimento VI

Camundongos Tph1KO receberam ou não 3 doses de 5-HTP (n=10) e foram expostos à 700cGy de raios X, sendo eutanasiados 72 horas após a exposição.

3.3.7 Experimento VII

Camundongos Tph1^{Flx-Flx} e Tph1^{Flx-Villin-cre} foram expostos à 700cGy de radiação não ionizante e foram eutanasiados 4 horas após a exposição. Foram utilizados o total de 10 animais para este experimento.

3.3.8 Experimento VIII

Camundongos Tph1 WT e Tph1 KO receberam 1 aplicação de AOM (10mg/kg) e foram eutanasiados 72 horas ou 1 semana após a exposição carcinogênica. Também foram incluídos na análise, o grupo controle, no qual foi administrado somente solução salina. Ao todo, foram utilizados 35 animais para o desenvolvimento deste experimento.

3.3.9 Experimento IX

Camundongos Tph1WT receberam ou não uma única aplicação intraperitoneal do carcinógeno AOM (10mg/kg/semana). Intervenções farmacológicas para a inibição da síntese de 5-HT foram realizadas com 4-cloro-

DL-fenilalanina (PCPA; inibidor de Tph1; 500mg/kg SIGMA ALDRICH C3635). O desenho experimental está descrito na tabela abaixo:

Tabela 1: Desenho experimental IX

Grupos	Descrição	Eutanásia	Nº animais/grupo
1	3 doses PCPA → AOM	72 horas	7
2	AOM → 3 doses PCPA	24 horas	5
3	AOM + PCPA 3 doses	72 horas	6
4	AOM	72 horas	5
5	3 doses PCPA	24 horas	6
6	Salina	72 horas	6

3.3.10 Experimento X

Camundongos Tph1KO receberam ou não (n=12), reposição exógena de serotonina (Sigma 0,33mg/kg) durante 72 horas e após este período, receberam uma aplicação de carcinógeno, sendo eutanasiados 72 horas após o mesmo.

3.3.11 Experimento XI

Camundongos transgênicos Tph1^{flx-flx} (n= 6) e Tph1^{flx-villin-cre} (n= 6) foram utilizados para restringir a deleção gênica de Tph1 aos intestinos. Camundongos receberam uma única aplicação de carcinógeno (10mg/kg), sendo eutanasiados 72 horas após a exposição.

3.3.12 Experimento XII

Camundongos Tph1 WT (n=8) e Tph1 KO (n=8) receberam 6 aplicações semanais do carcinógeno AOM (10mg/kg/semana) e foram eutanasiados 72 horas após a última aplicação.

3.4 Imunohistoquímica (IHC-P)

Lâminas de microscopia com amostras seccionadas a 4 μ m (RM2125 RTS; Leica, DE) foram marcadas com o anticorpo primário anti- γ H2Ax (ab81299; Abcam, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, as amostras foram desparafinizadas overnight em uma estufa (60°C). Posteriormente, as lâminas passaram por duas incubações com xilol para retirar a parafina residual e por uma bateria decrescente de álcoois (100%- 100%- 95% - 70%) para hidratarem. Amostras foram submetidas à recuperação antigênica em tampão citrato (2,101g de Ácido cítrico [C7129; Merck; Alemanha]/ litro pH=6,0) durante 30 minutos em panela de pressão. Em seguida, as amostras foram incubadas por 15 minutos com uma solução de H₂O₂ 3% (Merck, Alemanha) para o bloqueio da peroxidase endógena. Outro bloqueio com 3% de albumina de soro bovino (BSA – Sigma, EUA) foi realizado durante 30 minutos. As amostras foram então incubadas com o anticorpo primário durante 16 horas a 4°C. A reação foi revelada pelo Picture™-MAX Polymer Detection Kit (Thermo Fisher; EUA), conforme indicado nas instruções do fabricante. Finalmente, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris (Merck; Alemanha), desidratadas em bateria crescente de álcoois e xilol. Índice de dano de DNA foi determinado como o número de células positivas pelas negativas para γ -H2Ax por cripta.

3.5 Análises genéticas

3.5.1 Extração de DNA de amostras auriculares

Amostras auriculares (\pm 30mg) foram digeridas em 10 μ L de proteinase K (Sigma-Aldrich, EUA) e 500 μ L de solução de lise (SNET 20mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 400mM NaCl e 1% SDS) por 90 minutos à 56°C sob agitação de 1000 rpm (Thermomixer C; Eppendorf; Alemanha). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos (23°C; 12.000 rpm) para a precipitação dos restos celulares. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo. A precipitação do DNA foi feita com 700 μ L de 2-Propanol (Merck, EUA) e, em seguida, centrifugado (30 minutos à 23°C, 12.000rpm). O pellet de DNA foi lavado em álcool 70% (500 μ L), e centrifugado por 5 minutos (4°C; 12.000rpm). /O sobrenadante foi descartado e o DNA foi desidratado por 5 minutos sob vácuo (Speedvac Concentrator 5301, Eppendorf, Alemanha), e ressuspendido em 50 μ L de água livre de nuclease (10977023; UltraPure Distilled Water – Thermo Fisher; EUA).

3.5.2 Quantificação do DNA por NanoDrop

A quantificação das amostras de DNA e RNA foram quantificadas em um espectrofotômetro (NanoDrop). Este aparelho mede a absorbância a 260nm, que corresponde ao pico de absorção de UVs do DNA; a 280nm que corresponde ao pico de absorção de UVs de proteínas; e a 230nm, que corresponde ao pico de absorção de UVs de contaminantes orgânicos. A pureza das amostras foi verificada pelas razões da absorbância 260/280 e 260/230, indicando a quantidade de proteínas ou solventes orgânicos presentes na amostra.

3.5.3 PCR convencional

A metodologia básica para as reações em cadeia da polimerase (PCR) consiste na replicação *in vitro* de moléculas de DNA. Para isto utilizou-se amostras de DNA, dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos – SIGMA ALDRICH), primers (*Forward* [F] e *Reverse* [R]), e uma enzima Taq-polimerase em uma solução tampão (JUMP START P0982, Merck, Alemanha). Toda esta mistura foi colocada em um termociclador, onde esses primers flaquearam as regiões de interesse do DNA, sendo apenas estas amplificadas. As PCRs foram realizadas em um Termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, DE).

3.5.3.1 Genotipagem Tph1

A genotipagem de animais Tph1KO ou Tph1WT foi realizada com 3 oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) em uma única reação. Isto é possível porque o primer R (GTPH3) apresenta complementaridade tanto para a sequência alvo do gene KO (Neo52, 303bp) quanto para a do gene WT (GTPH5, 570bp).

Tabela 2 a: Desenho dos *primers* Tph1 e parâmetros de ciclagem.

<i>PRIMER</i>	<i>SEQUÊNCIA</i>	
GTPH5	5'-GCTTGCAGGAGTTGGTTCTC	
GTPH3	5'-CAGCTCTGTGATGGACGGTA	
NEO52	5'-CGTTGGCTACCCGTGATATT	
<i>Temperatura</i>	<i>Ciclagem</i>	<i>Tempo</i>
95°C	35 ciclos	5 minutos
95° C		30 segundos
55° C		30 segundos
72° C		30 segundos

Tabela 2 b: Desenho dos *primers* Tph1 e parâmetros de ciclagem.

Término da reação	
72° C	5 minutos
4° C	Forever

3.5.3.2 Genotipagem Tph1^{Flx-Villin cre}

Os camundongos Tph1 FLX/FLX apresentam o gene Tph1 flanqueada por cassetes de proteção que são desativados, o que induz a inativação de Tph1 na presença do mecanismo genético Cre. Vale salientar que a atividade de Cre sempre está presente em hemizigose. Considerando que o gene Villin é unicamente expresso por células intestinais, todo este mecanismo de deleção de Tph1 se restringe ao intestino. Assim, reações de PCR convencional são realizadas para ambos os marcadores, confirmando o genótipo.

Tabela 3a: Desenho dos primers e ciclagem para PCR Tph1 FLX e Villin-cre

PRIMER	SEQUÊNCIA
Tph1 FLOX F	GGATCCTAACCGAGTGTTC
Tph1 FLOX R	GCACACCACCAACTCTTTCC
Tph1 delta	CCTTGGAAGGTTTTGTATCACC
VIL CRE 5	CAAGCCTGGCTCGACGGCC
VIL CRE 3	CGCGAACATCTTCAGGTTCT

Tabela 3b: Desenho dos primers e ciclagem para PCR Tph1 FLX e Villin-cre

Tph1^{flx flx}		Tph1^{flx-villin cre}	
Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo
94°C	2 minutos	94°C	3 minutos
30 ciclos		35 ciclos	
94°C	45 segundos	94°C	30 segundos
60°C	45 segundos	60°C	30 segundos
72°C	1 minuto	72°C	30 segundos
Término da reação		Término da reação	

3.5.3.3 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,5% (2,25g de agarose – Invitrogen, EUA) + 150ml de Tris-Acetato-EDTA – TAE). Os produtos da reação de PCR foram preparados para análise adicionando-se 3µl de *gel red* (1:500 Merck; Alemanha), 3µl de *loading buffer* (Thermo Fisher, EUA) e 10µl da amostra. Um marcador de peso moléculas de 100bp DNA Ladder (Thermo Fisher, EUA) foi utilizado como padrão de tamanho dos amplicons. As amostras foram aplicadas no gel submerso em tampão TAE em uma cuba de eletroforese. A eletroforese foi realizada por 60 minutos em tensão de 90V. A visualização do gel foi realizada sob o sistema de foto-documentação ChemiDoc (BIO-RAD, EUA).

3.6 Reverse transcription PCR (RT-PCR)

Para a extração de DNA e RNA o Mini Kit AllPrep DNA/RNA (Ref. 80204; QIAGEN, EUA) foi utilizado segundo o protocolo do fabricante. A lise das

amostras foi realizada com o auxílio de um homogeneizador mecânico (3 ciclos de 10 segundos com intervalos de 3 segundos entre eles) em Buffer RLT Plux + β -mercaptoetanol à 4°C. A síntese de cDNA (DNA complementar) foi realizada com o kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher, EUA) de acordo as instruções do fabricante. As amostras são armazenadas à -20°C.

Esta técnica é uma variação da técnica de PCR convencional que permite o monitoramento da PCR em tempo real (qPCR). Isso possibilita a quantificação do número de cópias do alvo gênico ao término de cada ciclo. O sistema de sonda TaqMan foi utilizado.

Tabela 4 a: Sondas TaqMan usadas neste trabalho.

Sonda	Código
GAPDH	Mm99999915
Ki67	Mm01278617
ATM	Mm01177457
ATR	Mm01223626
B-catenina	Mm00483039
Cdc25c	Mm00486880
Chk1	Mm01176757
Chk2	Mm0044844

Tabela 4b: Sondas TaqMan usadas neste trabalho

Sonda	Código
Tp53	Mm01731290
Ciclina B	Mm03053893

3.7 Western blotting (WB)

A extração de proteínas foi realizada com 30mg de amostra congelada em tampão de lise RIPA (Sigma R0278), 60 μ L de inibidor de fosfatase (Sigma P0044) e 15 μ L de inibidor de protease (Sigma P2714). A quantificação das proteínas extraídas foi realizada com kit BCA (Pierce 23225) e comparadas com uma curva padrão de BSA. Para a eletroforese, foram utilizados géis de poliacrilamida 10%. Uma solução de Laemmli + 2- β mercaptoetanol (10 μ L) foi adicionada à 30 μ g de proteínas e desnaturadas durante 5 minutos à 98°C. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida para uma membrana de PVDF por meio do sistema sanduíche com tampão bicarbonato (0,84g de Bicarbonato de sódio e 0,318g de carbonato de sódio). Uma etapa de bloqueio foi realizada com uma solução de BSA 5% para evitar que ligações proteicas inespecíficas ocorressem. Os anticorpos primários utilizados foram γ H2AX (ab81299 – 1:5000), Lgr5 (ab75850 – 1:5000) e GAPDH (ab181602 1:10000). Todos os anticorpos primários foram ligados com seus respectivos secundários, para posterior revelação com ECL (enzima-substrato).

3.8 Análise de DNA metilado

3.8.1 Conversão de Bissulfito

A conversão do DNA por bissulfito foi realizada com o kit (ThermoFisher, EUA). Para isso, 100ng de gDNA foi adicionado à 150µL do reagente de conversão (fornecido pelo fabricante). As reações foram feitas em termociclador (Eppendorf, Alemanha) na seguinte ciclagem:

Tabela 5: Reação de conversão de bissulfito

Temperatura	Tempo
65°C	30 minutos
95°C	1,5 minutos
65°C	30 minutos
95°C	1,5 minutos
65°C	30 minutos
4°C	Por até 4 horas

A etapa de dessulfonação e eluição foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas e aliqüotadas para 50ng/µL para análise de metilação por qPCR.

3.8.2 qPCR

O DNA convertido (100ng) foi adicionado ao SYBR green (Power SYBR™ Green PCR Master Mix; #4367659; ThermoFisher Scientific, EUA) e aos primers

com a sequência para MGMT modificado metilado e não metilado (Tabela 6). As reações foram realizadas no Eppendorf Mastercycler® RealPlex2 system (Eppendorf, Alemanha). Os valores de CT adquiridos das reações modificadas metiladas e não metiladas foram calculadas usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabela 6: Desenho dos primers MGMT modificado metilado e não metilado

Primer	Sequência
MGMT modificado não metilado F	TTTGGTAGTTTTAGAGTTATGTTTTGTGT
MGMT modificado não metilado R	CCACAAACACATACACAAAATAAAAACAAAA
MGMT modificado metilado F	GGTAGTTTTTAGAGTTACGTTTCGCGT
MGMT modificado metilado R	CAAACGCGTACACGAAATAAAAACGAAA

3.9 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism 5.0 (Graph Pad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA). O teste de Mann Whitney foi aplicado para analisar experimentos com dois grupos distintos. A one-way ANOVA (pós-teste de Kruskal-Wallis) foi utilizada para analisar experimentos com mais de dois grupos. A two-way ANOVA (pós-teste de Bonferroni) foi aplicada para analisar diferentes parâmetro categóricos independentes em uma variável dependente. A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa. Todos os dados são apresentados com média \pm desvio padrão (STD).

4. RESULTADOS

4.1 Serotonina altera o desenvolvimento de diferentes modelos de tumores colorretais

Para verificar se a redução do nível de serotonina altera o desenvolvimento de tumores colorretais, nós utilizamos diferentes modelos experimentais. Primeiramente, nós induzimos a formação de tumores subcutâneos com células carcinogênicas de cólon (MC-38) em animais Tph1WT e animais Tph1KO. Desta forma, pudemos observar que os animais que possuíam serotonina desenvolveram tumores maiores, indicando uma ação da serotonina sobre o desenvolvimento de tumores alográficos (**Figura 1**).

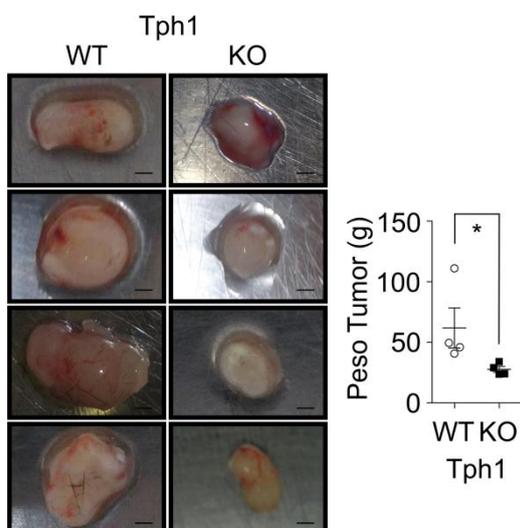


Figura 1 Efeitos da síntese de serotonina nos tumores colorretais I. Avaliação macroscópica dos tumores após 16 dias da injeção subcutânea de células MC-38 em animais Tph1WT e Tph1KO (n=8; p=0,028). Teste estatístico utilizado foi Mann Whitney.

Desde que a síntese de 5-HT tem sido relatada como promotora do processo de colite (KIM J. *et al.*, 2013), que é um fator de risco para o desenvolvimento do CCR (MUNKHOLM P.; 2003), nós investigamos se a redução dos níveis de 5-HT alteraria a incidência de tumores colorretais associados à colite. Os animais Tph1KO apresentaram uma quantidade reduzida de tumores em comparação aos animais controle (**Figura 2**).

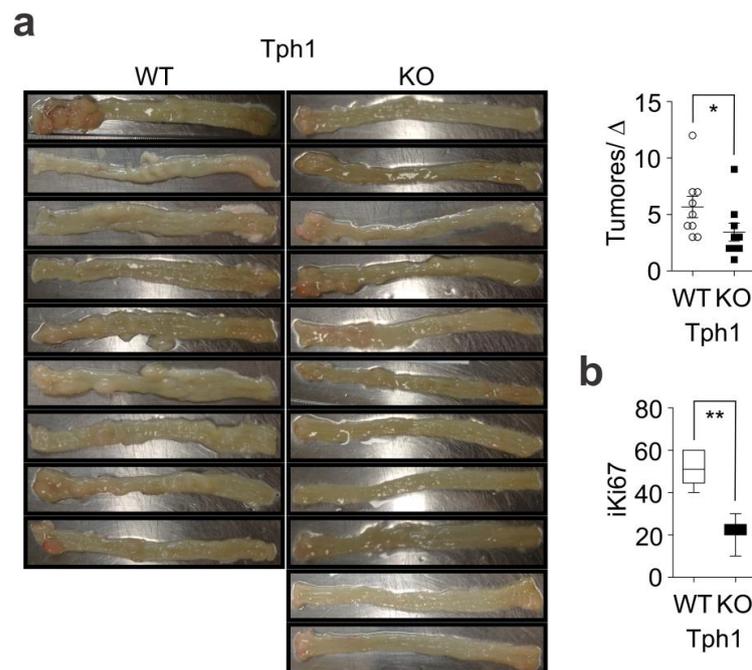


Figura 2 Efeitos da síntese de serotonina nos tumores colorretais II. **(a)** Avaliação macroscópica dos tumores relacionados à colite nos animais Tph1WT e Tph1KO (n=20; p=0,003). **(b)** Análise de proliferação celular (Ki67) dos tumores demonstram que houve uma redução do índice proliferativo nos animais Tph1KO. O teste estatístico utilizado foi Mann Whitney.

4.2 Efeitos da serotonina no desenvolvimento de tumores colorretais relacionados ao dano de DNA

Quando nós avaliamos o desenvolvimento tumoral relacionado ao dano de DNA, os animais Tph1KO apresentaram maior multiplicidade tumoral (**Figura 3**).

Também observamos que os tumores desenvolvidos nos animais Tph1KO não apresentaram uma diferença significativa na fosforilação da histona H2AX (γ -H2AX; biomarcador de dano de DNA) e da ataxia telangiectasia mutada (pATM) (**Figura 4a**), embora tenha ocorrido uma menor expressão de ataxia telangiectasia relacionada a Rad3 fosforilada (pATR) (**Figura 4b**)

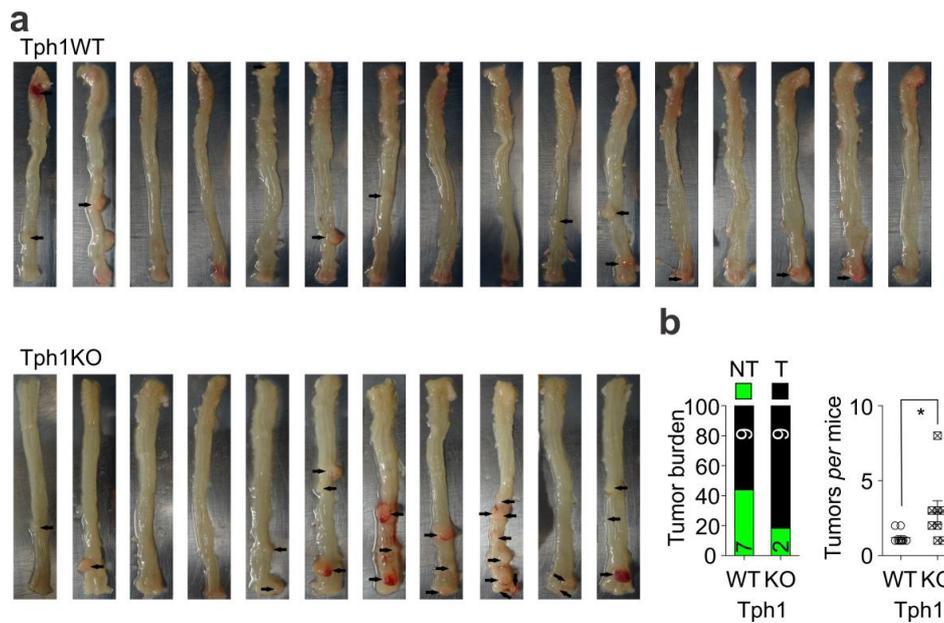


Figura 3: Perda de Tph1 promove o desenvolvimento de tumores colorretais associados ao dano de DNA. **(a,b)** Camundongos Tph1KO desenvolveram mais tumores em comparação com os animais Tph1 WT após 18 semanas das 6 exposições carcinogênicas (10mg/kg/semana) (n=27; p=0,012). O teste estatístico utilizado foi o Mann Whitney.

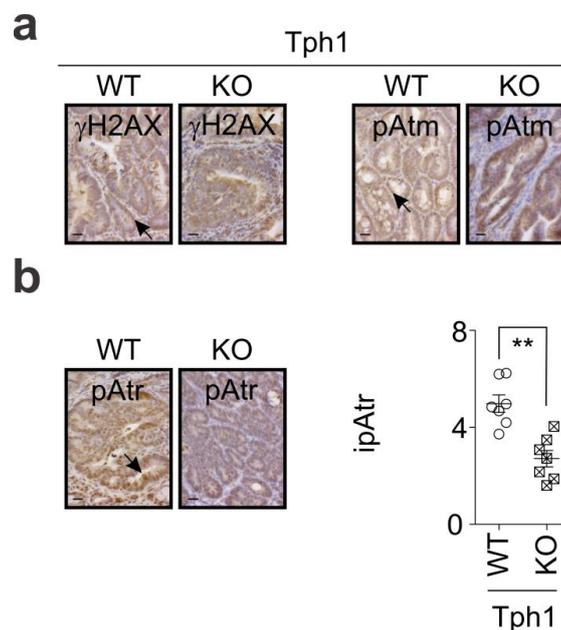


Figura 4: Tumores de animais Tph1KO possuem redução de pATR. **(a)** Imagens representativas de cortes histológicos de cólon IHC-P para anticorpos anti- γ -H2AX e anti-pATM (100x). **(b):** Imagens representativas de IHC-P para o anticorpo anti-pATR (ab178407) (100x). Os animais Tph1KO tiveram uma diminuição no número de células positivas para pATR (n=15; p=0,0012). Escala de bars = 20 μ m. Teste estatístico utilizado foi o Mann Whitney.

4.3 A serotonina altera o desenvolvimento de lesões preneoplásicas

A formação de focos de criptas aberrantes foi observada 6 semanas após a última exposição ao carcinógeno AOM. Ao se comparar a quantidade de lesões preneoplásicas formadas, os camundongos Tph1 KO apresentaram uma maior quantidade de lesões quando comparados ao grupo Tph1WT (**Figura 5a**). Para um melhor entendimento dessa diferença, nós buscamos avaliar a intensidade de dano de DNA presente no nicho epitelial de células tronco. Isto demonstrou que os animais que possuíam uma deficiência na síntese de 5-HT sofreram um dano de DNA mais intenso (**Figura 5b**).

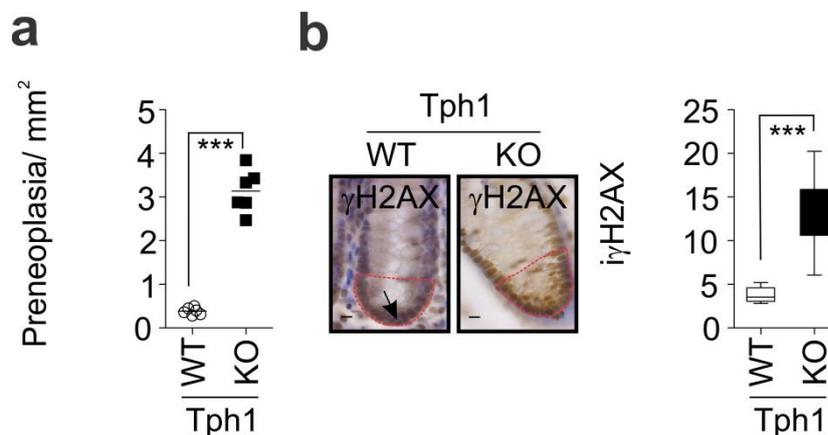


Figura 5: A síntese de 5-HT modula os eventos antecedentes da carcinogênese colorretal e reparo do dano de DNA. **(a):** Gráfico demonstrando o aumento do desenvolvimento de lesões preneoplásicas nos animais Tph1KO (n=16; p=0,0009). **(b):** Imagem representativa de IHC-P para o anticorpo γ H2AX. As linhas vermelhas delimitam o nicho de células tronco analisado (n=16; p=0,0003). O teste estatístico utilizado foi o Mann Whitney.

Visto que a deficiência na síntese de 5-HT facilitou a ocorrência de danos carcinogênicos ao DNA, nós avaliamos a ativação do sistema de reparo. Esta análise revelou que os animais Tph1KO apresentaram uma significativa redução na expressão gênica de Atr, Chk1 e Trp53. Por outro lado, não houve alterações para Atm, Chk2 e Cdc25c (**Figura 6**).

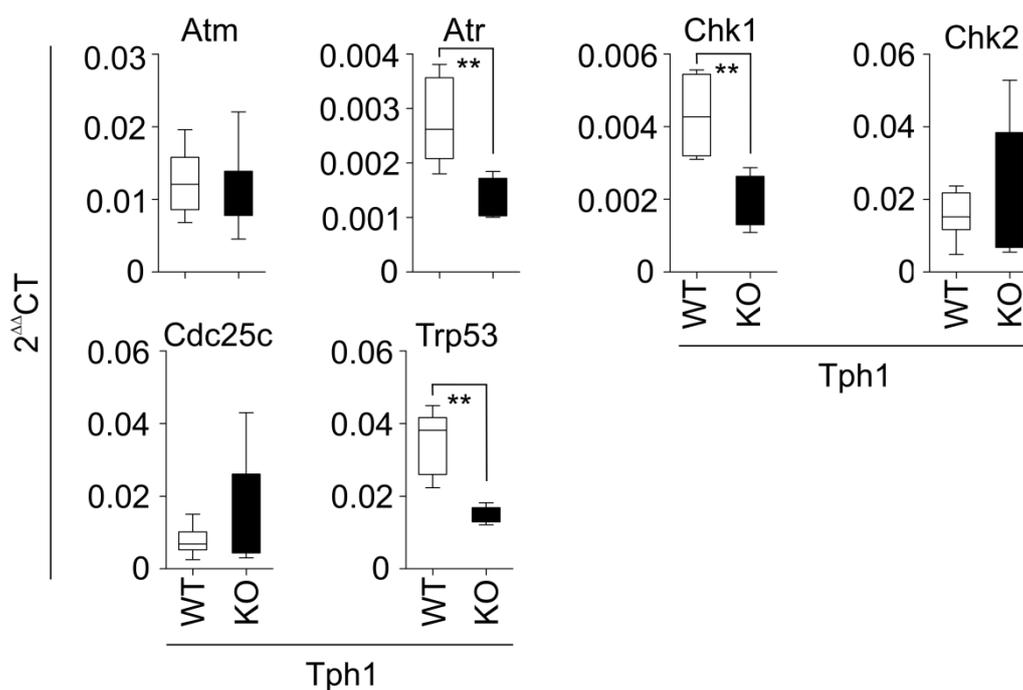


Figura 6: A síntese de 5-HT modula os eventos antecedentes da carcinogênese colorretal e reparo do dano de DNA. Animais Tph1KO não apresentaram alteração na expressão gênica de Atm (Mm01177457), Chk2 (Mm00443844), Cdc25c (Mm00486880), enquanto Atr (Mm01223626) (n=12; p=0,0087), Chk1 (Mm01176757) (n=12; p=0,0079), e Trp53 (Mm01731290) (n=12; p=0,0079) apresentaram expressão gênica reduzida. O teste estatístico utilizado foi o Mann Whitney.

4.4 A síntese de 5-HT modula a intensidade do dano de DNA no cólon intestinal

Uma vez que a deleção gênica da enzima controladora da síntese de 5-HT aumentou o dano de DNA no nicho de células tronco colônicas após 6 exposições carcinogênicas consecutivas, procuramos entender se tais danos poderiam ocorrer desde a 1ª aplicação de AOM. Ao compararmos a intensidade de dano ao DNA entre camundongos Tph1KO e Tph1WT após uma única exposição ao AOM, detectamos um aumento desses eventos 72 horas após a indução carcinogênica (**Figura 7**).

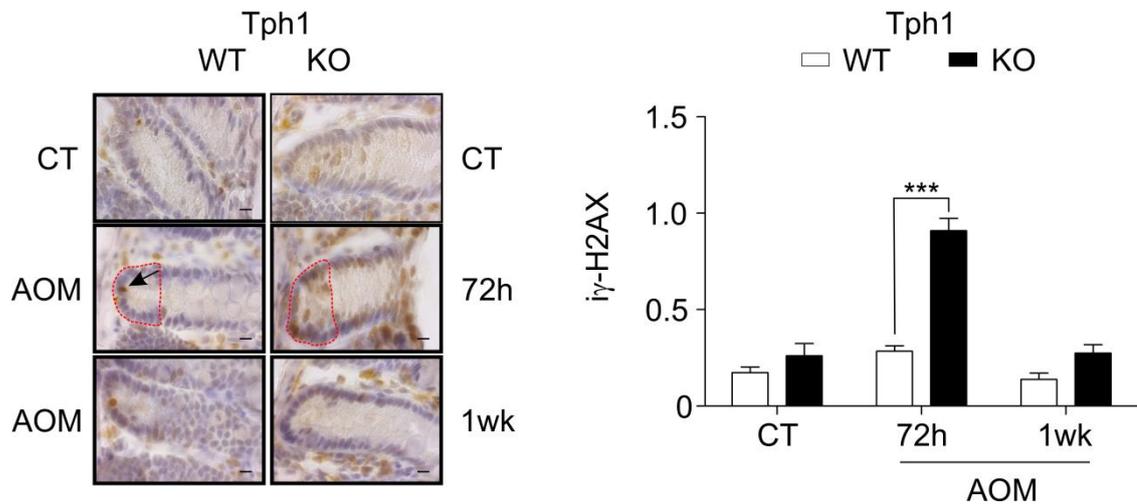


Figura 7: A síntese de serotonina modula os eventos de dano de DNA antecedentes à carcinogênese colônica. Imagens representativas de IHC para γ H2AX em cortes histológicos de cólon de animais Tph1 WT e KO. As micrografias [40x] demonstram células positivas para o anticorpo γ H2AX em IHC-P 72 horas e 1 semana após a exposição ao AOM. O gráfico demonstra o índice de dano de DNA de animais WT e KO expostos à uma dose de AOM ($n=35$; $p<0,0001$). O teste estatístico de Mann Whitney foi aplicado.

Em seguida, procuramos entender se este dano ao DNA ocorreria em maior intensidade caso a síntese de 5-HT fosse inibida antes, durante, ou após a exposição ao AOM. Inibindo a síntese de 5-HT antes da exposição carcinogênica, o dano ao DNA ocorreu em maior intensidade (**Figura 8**). Isso demonstra que a síntese de 5-HT protege as células intestinais de potenciais indutores de dano genômico.

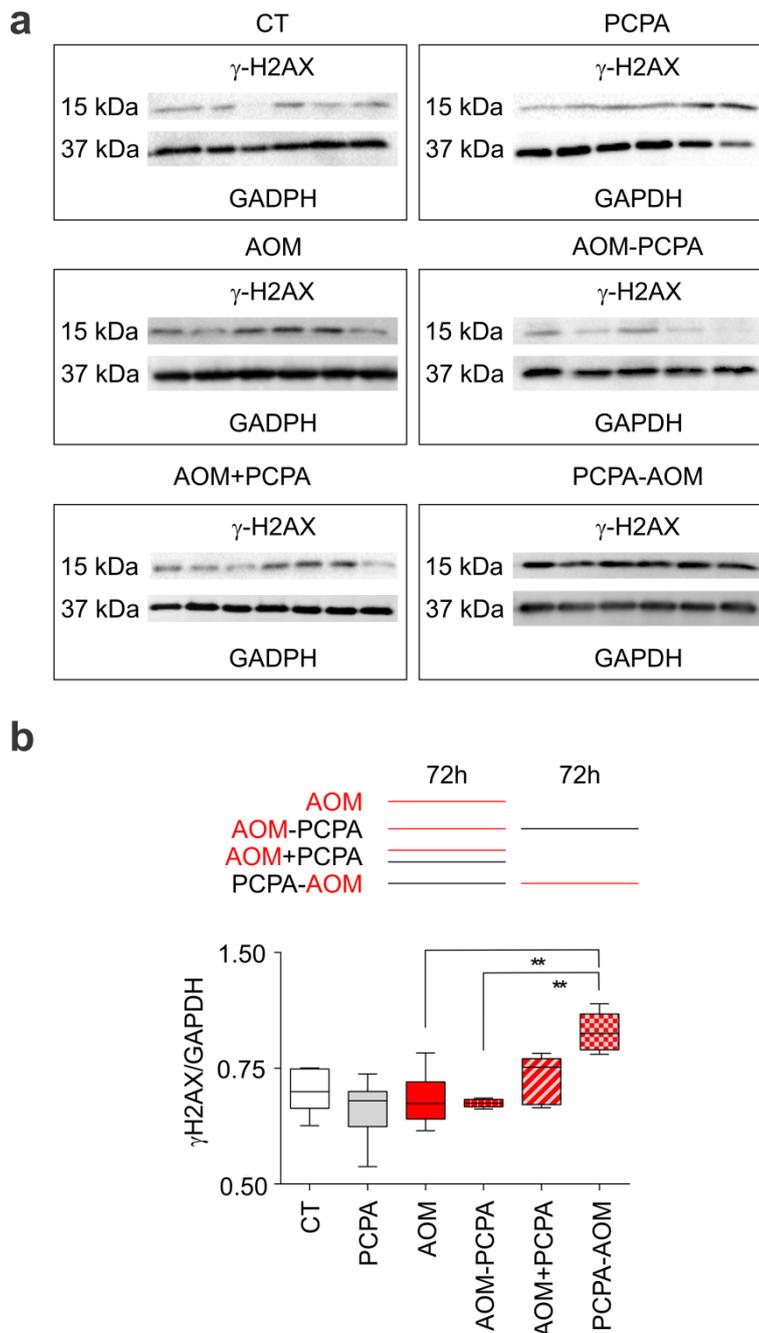


Figura 8: A síntese de 5-HT protege o cólon do dano de DNA induzido pelo carcinógeno. Análise de WB para γ H2AX (15kDa) nos grupos controle (CT), controle do fármaco (PCPA), controle do carcinógeno (AOM), PCPA concomitante ao AOM (AOM+PCPA), PCPA antecedente ao AOM (PCPA-AOM) e posteriormente ao AOM (AOM-PCPA), respectivamente. O controle constitutivo endógeno utilizado foi o GAPDH. Os gráficos mostram que inibindo a síntese de 5-HT antes da indução carcinogênica há um aumento no dano de DNA no cólon (n=37; AOM e AOM-PCPA vs PCPA-AOM, $p < 0,01$). O teste estatístico One-way ANOVA com pós teste Kruskal-Wallis foi aplicado.

Então, investigamos se a reposição exógena de 5-HT poderia ter um papel protetor contra o dano de DNA. Isto revelou que a reposição de 5-HT por si só não protege contra a indução de dano ao DNA pelo carcinógeno AOM (**Figura 9**).

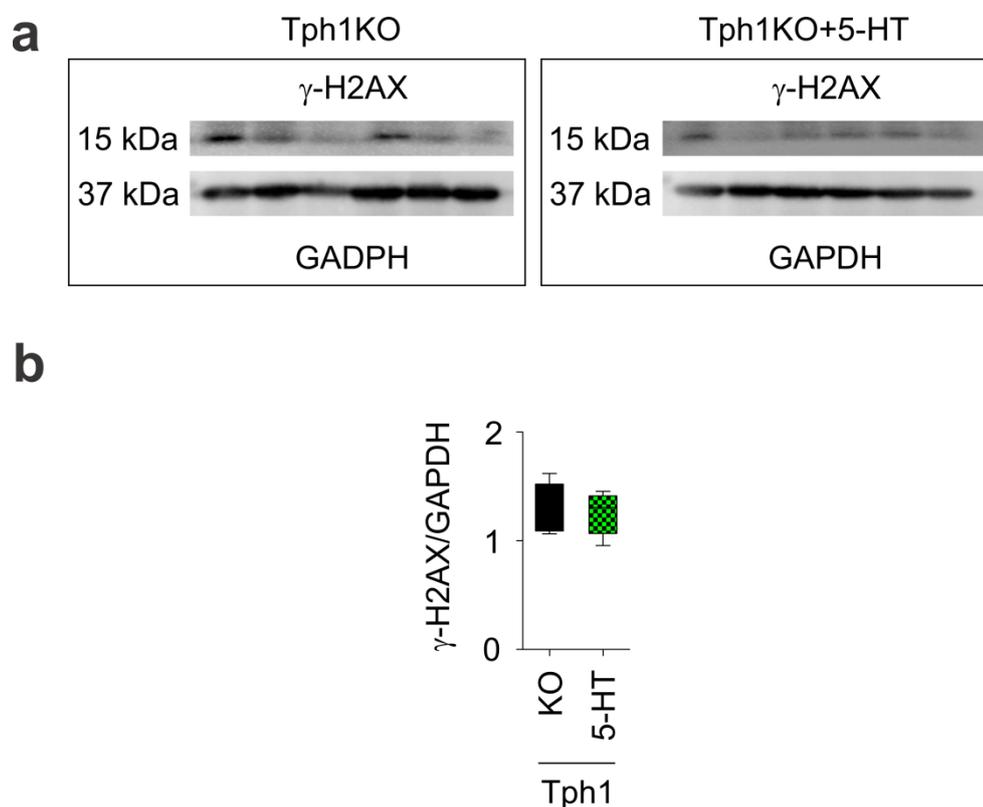


Figura 9: A reposição com serotonina exógena não possui papel de proteção ao dano de DNA. **(a):** Análise de WB para γ H2AX (15kDa) nos grupos Tph1 WT e Tph1KO. O controle constitutivo endógeno utilizado foi o GAPDH (37kDa). **(b):** Gráfico demonstrando a diferença da taxa de dano de DNA entre o grupo controle e o tratado. O teste estatístico de Mann Whitney foi aplicado (n=12).

Para se validar a ação protetora da síntese de 5-HT contra o dano genômico, restringimos a deleção de Tph1 para o seguimento intestinal em animais transgênicos. Animais Tph1^{fl/flVillinCre} apresentaram uma maior intensidade de dano ao DNA que seus controles (**Figura 10**). Isto reforça a ideia de que a síntese de 5-HT é um elemento de proteção contra o dano de DNA em células intestinais.

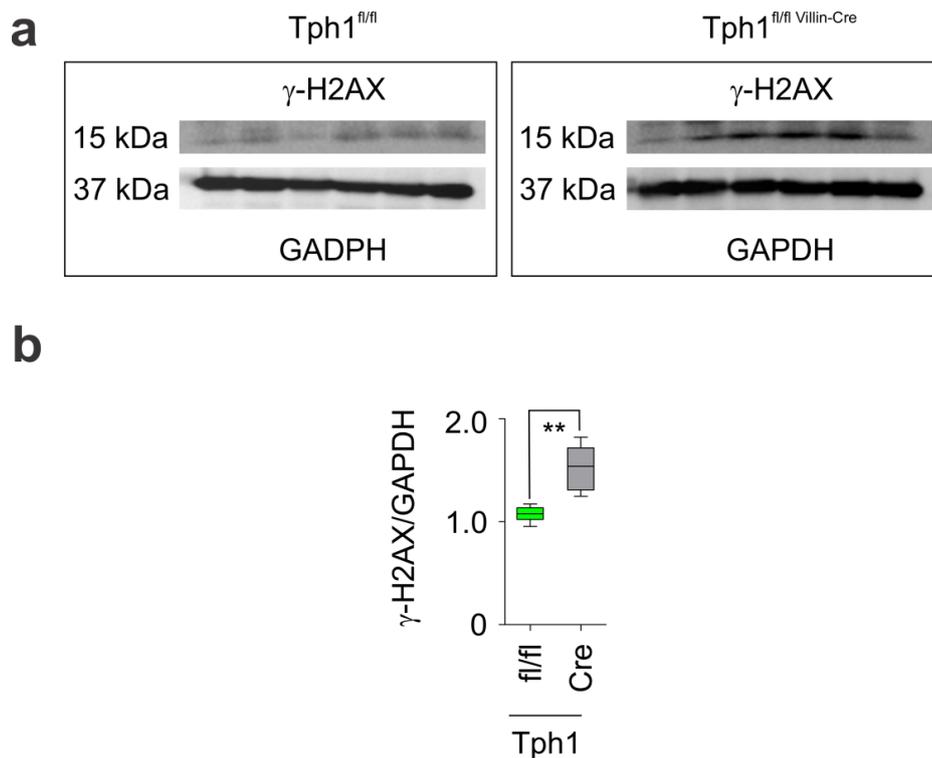


Figura 10: Serotonina colônica fornece proteção ao dano de DNA causado pelo AOM. **(a):** Análise de WB para γ H2AX (15kDa) os animais $Tph1^{fl/fl}$ e $Tph1^{fl/fl}Villin-Cre$. O controle constitutivo endógeno utilizado foi o GAPDH (37kDa). **(b):** Gráfico demonstrando a diferença de dano de DNA entre o grupo controle e o grupo com restrição intestinal da deleção de 5-HT. O teste estatístico de Mann Whitney foi aplicado ($n=12$; $p<0,05$).

4.5 Efeitos da síntese de 5-HT sobre mecanismos de reparo ao dano de DNA induzida por irradiação

Buscando esclarecer um possível controle da atividade serotoninérgica sobre mecanismos de reparo ao DNA, animais $Tph1$ WT e $Tph1$ KO foram expostos à IR (700 cGy) e eutanasiados após 72 horas. Mais uma vez os animais $Tph1$ KO apresentaram um dano de DNA mais intenso no nicho de células tronco do que seu grupo controle (**Figura 11A**). Também, a deleção genética da síntese de 5-HT reduziu a expressão de ATR (**Figura 11B**). Estes achados foram validados através da reativação da síntese de 5-HT com 5-HTP. Esta reativação da síntese de 5-HT reduziu significativamente o dano de DNA no nicho de células

tronco (**Figura 11C**). Com relação à ativação do sistema de reparo ao dano de DNA, nós pudemos observar que os animais com resgate endógeno apresentaram um aumento significativo na expressão gênica de *Atm*, *Atr*, e *Trp53* (**Figura 11D, e F**). Não houve diferença na expressão de *Chk1* e *Chk2* (**Figura 11E**).

De acordo com resultados prévios que demonstram que a radiação ionizante reduz a população de células neuroendócrinas (Ropenga *et al.*, 2004), nós encontramos que o resgate endógeno da síntese de serotonina aumentou o número de células positivas para cromogranina A (CgA) nos animais *Tph1KO* (**Figura 11G**). Também observamos que não houve diferença na quantidade de células positivas para *Lgr5* dentro do nicho de células tronco (**Figura 11H**). Isto parece sugerir que a síntese de 5-HT modula o dano de DNA e reparo no nicho de células tronco colônicas, o que poderia alterar a população de células neuroendócrinas e o desenvolvimento da carcinogênese colorretal.

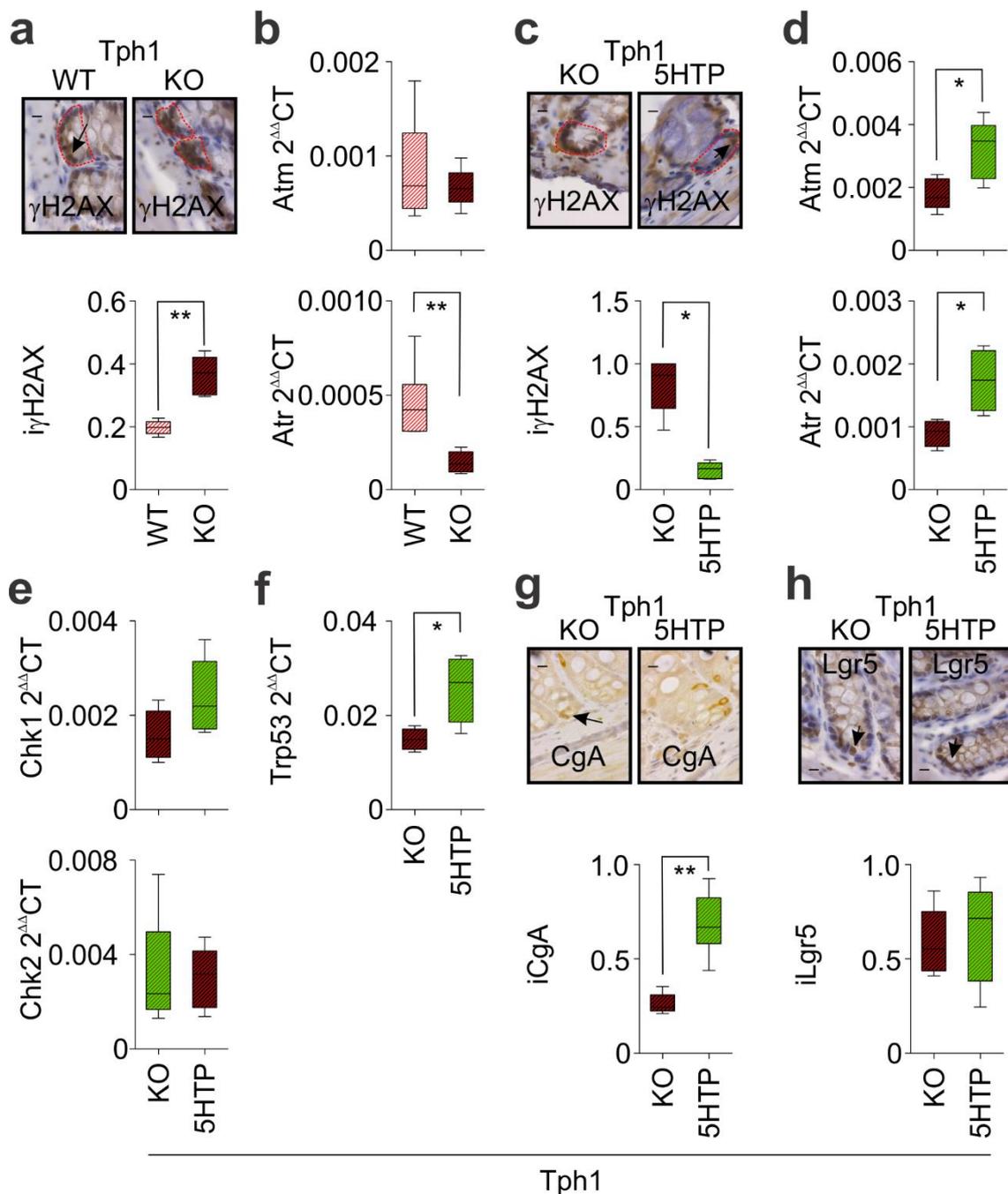


Figura 11: A síntese de 5-HT protege o cólon contra o dano de DNA induzido por radiação ionizante. **(a):** Imagem representativa de IHC-P por γ H2AX (ab81299) em animais Tph1WT e Tph1KO irradiados. A linha vermelha tracejada indica o nicho de células tronco). Gráfico demonstrando que animais Tph1KO apresentaram menores índices de dano de DNA ($n=11$; $p=0,0043$). **(b):** O silenciamento genético da síntese de 5-HT não alterou a expressão gênica de ATM ($p>0,05$), mas diminuiu a expressão gênica de ATR ($n=12$; $p=0,0043$). **(c):** O resgate endógeno da síntese de 5-HT reduziu o dano de DNA ($n=10$; $p=0,0119$). **(d)** a **(f):** Ativando a síntese de serotonina com tratamento de 5-HTP ocorreu um aumento nos níveis de ATM ($n=10$; $p=0,0317$), ATR ($n=10$; $p=0,0286$) e Trp53 ($n=10$; $p=0,0317$) respectivamente. **(g):** Imagens representativas de IHC-P para CgA). Os animais Tph1KO apresentaram uma redução na população de células neuroendócrinas ($n=10$; $p=0,0043$). **(h):** Imagens representativas de IHC-P para

Lgr5. Não houve diferença de população de células Lgr5 entre os grupos analisados (n=10; p>0,05). O teste estatístico de Mann Whitney foi aplicado.

Para esclarecer qual seria o alvo primário de modulação da síntese de 5-HT durante o dano de DNA, nós avaliamos camundongos transgênicos que haviam sido expostos à irradiação após um período de quatro horas. Isso revelou que a expressão gênica de Atr e ciclina B foi significativamente reduzida na ausência da síntese de 5-HT (**Figura 12C, D**), o que não ocorreu com Trp53 e Atm (**Figura 12A e B**).

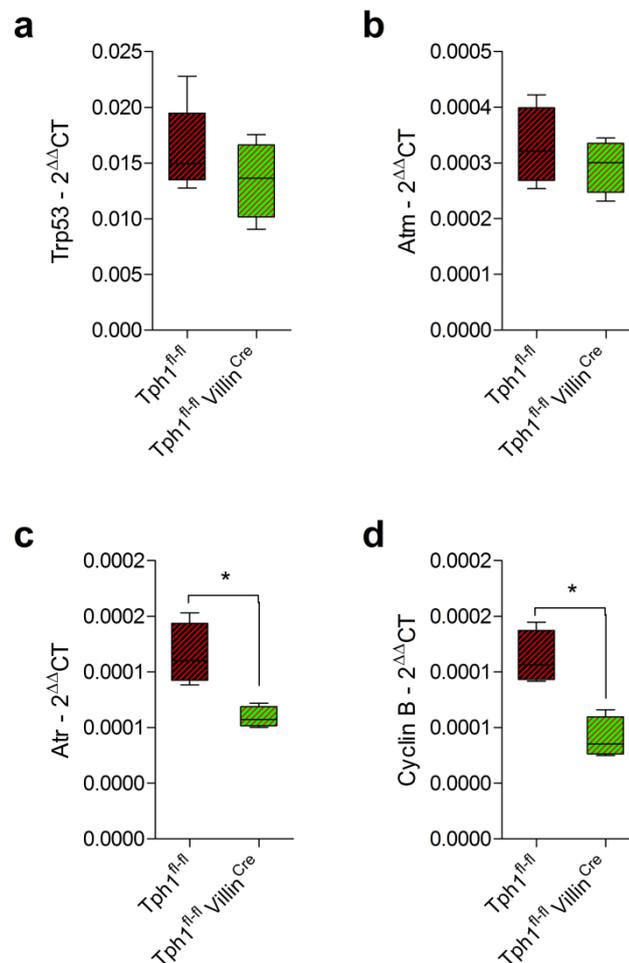


Figura 12 A: Expressão gênica de Tp53 (Mm01731290) nos animais Tph1 FLX-FLX e Tph1 FLX-Villin cre. Não houve diferença estatísticas entre os grupos analisados. **B:** Expressão gênica de ATM (Mm01177457) entre os grupos. Também não houve diferença estatística entre os grupos. **C:** Expressão gênica de ATR (Mm01223626) revela que a restrição de serotonina prejudica a

sinalização de Atr. **D**: Expressão gênica de Ciclina B (Mm03053893) estava reduzida nos animais com perda de Tph1 no intestino. O teste de Mann Whitney foi aplicado para análise dos dados.

4.6 Efeito do AOM sob o dano de DNA no cólon intestinal

Partindo do pressuposto de que a síntese de 5-HT tem um papel importante nos mecanismos de reparo de DNA durante o desenvolvimento dos tumores de cólon após indução carcinogênica com AOM, nós analisamos a intensidade de dano de DNA 72 horas após a última exposição ao AOM. Isto demonstrou que, os animais Tph1KO apresentaram maior intensidade de dano ao DNA (**Figura 13A**). Visto que esses eventos antecedem o desenvolvimento de lesões preneoplásicas, nós novamente avaliamos o sistema de reparo através da ativação de Atm e Atr. Surpreendentemente, não houve alteração significativa nos genes analisados (**Figura 13B**).

Então, avaliamos a expressão gênica de *Mgmt*, uma vez ser um biomarcador responsável pela retirada dos adutos de DNA induzidos pelo AOM (SHARMA S., 2009). Os animais Tph1 KO apresentaram uma menor expressão gênica de *Mgmt* (**Figura 13C**). Então, realizamos a análise da metilação das ilhas CpG deste gene. A deleção da síntese de 5-HT promoveu a metilação da região promotora de *Mgmt* após a exposição carcinogênica (**Figura 13C**).

Então, verificamos a ocorrência de dano de DNA no botão criptal. Isto demonstrou que animais com deficiência na síntese de 5-HT sofreram um maior dano de DNA no nicho de células tronco (**Figura 13D**). Também, esta deficiência de 5-HT promoveu um aumento no número de fissões criptais (**Figura 13E**). Isto nos levou a considerar a hipótese de que aumento na fissão criptal estaria relacionado a alterações na população de células tronco no botão da cripta (JIN *et al.*, 2017). Embora não tenha ocorrido uma diferença significativa na

expressão da proteína Lgr5 entre os grupos analisados, foi possível observar que o botão criptal nos animais Tph1KO apresentava um aumento de tamanho, fenômeno conhecido como brotamento criptal (**Figura 13F**). Além disto, observou-se que os animais Tph1KO apresentaram uma redução na população de células neuroendócrinas CgA (**Figura 13G, H**). As células globulares (CG) são, também, derivadas da diferenciação de células tronco Lgr5. De acordo com as análises histológicas, os animais Tph1KO apresentaram um aumento nessa população de células CG após as 6 exposições carcinogênicas (**Figura 13I**). Nossos resultados sugerem a ideia de que a síntese de 5-HT pode ter um efeito protetor no nicho de células tronco durante as etapas iniciais da carcinogênese colorretal.

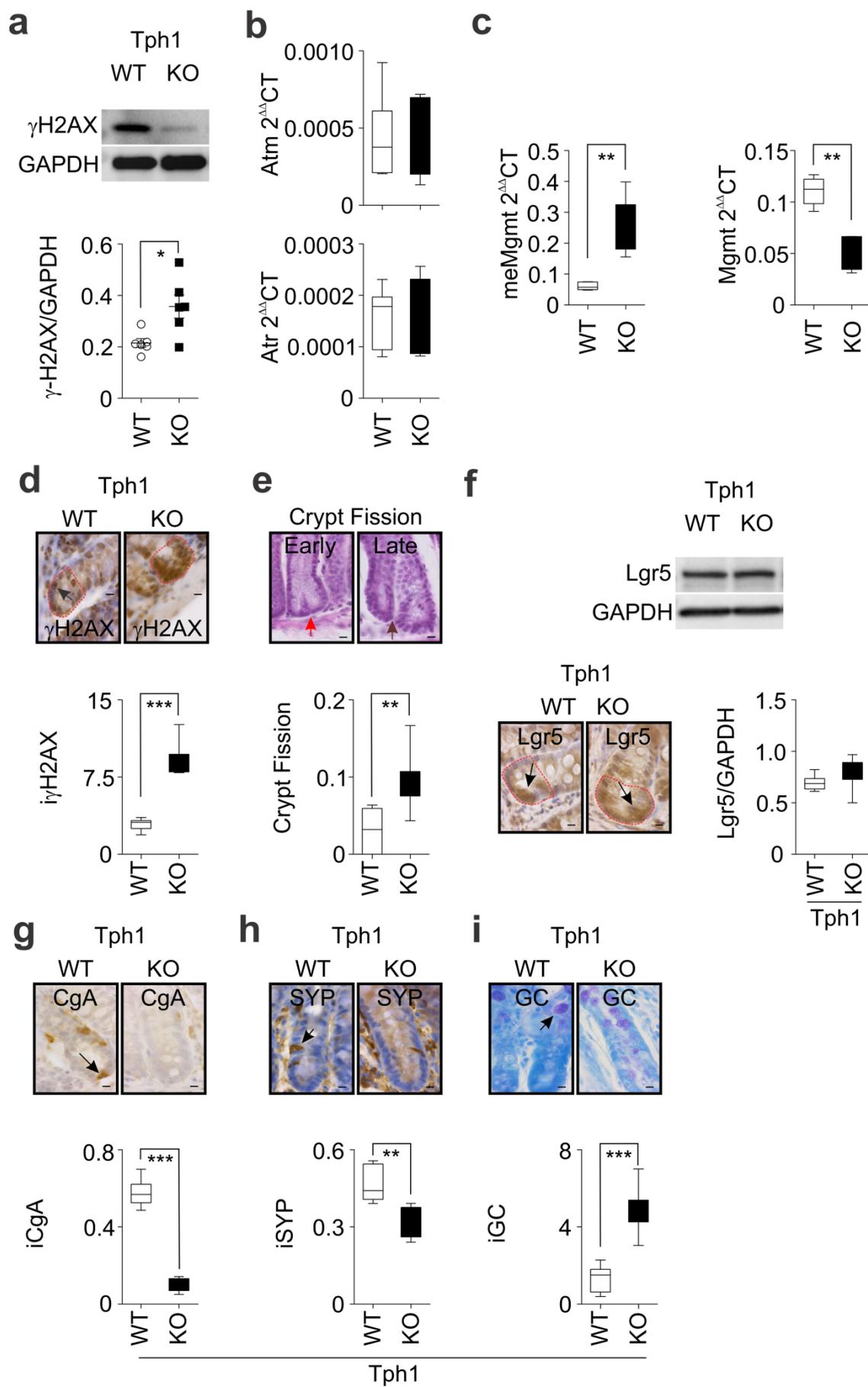


Figura 13: A síntese de 5-HT protege o cólon dos eventos iniciais da carcinogênese. **(a)** Imagens representativas da expressão proteica de γ H2AX (15kDa) e GAPDH (37kDa) que revelam que o dano de DNA estava aumentado nos animais Tph1KO ($n=12$, $p=0,041$). **(b)**: Expressão gênica de *Atm* e *Atr* em animais Tph1WT e Tph1KO. **(c)**: Animais Tph1KO apresentaram um aumento na metilação nas regiões CpG de *Mgmt* ($n=12$; $p=0,0022$), mas redução nos níveis de *Mgmt* ($n=12$; $p=0,0043$), *AlkB1* ($n=12$; $p=0,0022$) e *Trp53* ($n=12$; $p=0,0152$). **(d)**: Imagens representativas de IHC-P para γ H2AX em animais Tph1WT e Tph1KO. O gráfico demonstra que os animais Tph1KO apresentaram índice de dano de DNA aumentado no pótio criptal ($n=16$; $p=0,0006$). **(e)**: Imagens representativas da fissão criptal (seta vermelha indica um estágio antecedente da fissão criptal, enquanto a seta marrom indica o evento posterior). Os animais Tph1KO desenvolveram mais fissão criptal após a exposição ao carcinógeno ($n=16$; $p=0,0038$). **(f)**: Imagens representativas da expressão proteica de *Lgr5* (100kDa) e *Gapdh* (37kDa). Imagens representativas de IHC-P para *Lgr5* (ab75732). As setas indicam um aumento da base da cripta com brotamento. As linhas vermelhas delimitam o nicho de células tronco. Não houve diferença de marcação entre os grupos analisados ($n=16$; $p>0,05$). **(g,h)**: Imagens representativas de IHC-P para *CgA* (g) e *SYP* (h). Animais Tph1KO apresentaram uma redução da população de células neuroendócrinas ($n=16$; $p<0,001$). **(i)**: Imagens representativas de células globulares coradas com azul de toluidina. A perda de *Tph1* aumentou a população de CG ($n=16$; $p=0,0006$). O teste de Mann Whitney foi aplicado para a análise dos dados.

5. DISCUSSÃO

5.1 Ação da síntese de 5-HT sobre o dano e DNA

Previamente já se demonstrou que a 5-HT promove o desenvolvimento de tumores colônicos através de seus receptores (TUTTON P.J.; BARKLA D.H., 1978; NOCITO A. *et al.*, 2008; SUI H. 2015). Entretanto, existem poucos dados sobre como a síntese de 5-HT está envolvida nas etapas de desenvolvimento da carcinogênese colorretal. De acordo com os nossos resultados anteriores, a 5-HT no cólon intestinal tem o potencial de modular o desenvolvimento de lesões preneoplásicas (KANNEN *et al.* 2011, KANNEN *et al.* 2012, KANNEN *et al.* 2013). Embora a 5-HT tenha sido relacionada com a promoção de câncer de cólon em ratos (TUTTON P.J.; BARKLA D.H., 1978; AMINI-KHOEI *et al.*, 2016), não estava claro a razão da diminuição no desenvolvimento de lesões preneoplásicas após o aumento dos níveis colônicos de 5-HT através da inibição da recaptção serotoninérgica (KANNEN *et al.*, 2011). Observações similares a esta foram relatados em humanos (LEE HK *et al.* 2012). Também, devemos observar que Tutton e Barkla relataram que a 5-HT promove a proliferação de tumores colônicos ao invés dos colonócitos normais (TUTTON P.J.; BARKLA D.H., 1978). Além disso, devemos considerar a hipótese de que o sistema serotoninérgico pode ser a primeira linha de reação em caso de agressão ao colón (GERSHON 2012).

Outros estudos demonstraram que a liberação de 5-HT e 5-HTP promovem a radiorresistencia em células de mamífero (NAKAYAMA T.; NAKAMURA W.; 1978). Também devemos considerar que a 5-HT é precursora do neurohormônio melatonina, que possui propriedades antioxidantes que protegem a célula do dano de DNA induzido pelo estresse oxidativo de carcinógenos. Seu potencial antioxidante se deve à sua capacidade de eliminar

radicais livres, ao estimular a atividade da glutathione peroxidase e inibir a síntese de óxido nítrico (NODA YM, et al. 1999). Também é fato que a 5-HT parece bloquear a peroxidação de lipídios e fosfolipídios em membranas celulares (MIURA et al, 1996). Na verdade, as propriedades antioxidantes da serotonina se devem a sua capacidade de doar prótons a compostos como radicais peroxil, ácido hipocloroso, e óxido nítrico (GALISTEO & HERRAIZ, 2004; NODA *et al.*, 1999). Esses resultados corroboram com os do nosso grupo de pesquisa, que indicam que a redução nos níveis de 5-HT promoveu o desenvolvimento de lesões preneoplásicas (KANNEN et al; 2012).

5.2 Efeitos da síntese de 5-HT sobre o reparo genômico quando alterado pelo carcinógeno AOM

Os nossos resultados demonstram que a síntese de 5-HT tem um potencial de modular os mecanismos de reparo aos adutos de DNA. O AOM requer transformações metabólicas antes que a sua hidroxilação libere o carcinógeno ativo metiloximetanol (MAM) (ROSENBERG *et al* 2009). Este, produz um íon de metildiazônio que metila principalmente o O⁶ da guanina, originando a O⁶-metilguanina (O⁶MeG) (ROSENBERG *et al.*; 2009). As proteínas AlkB e Mgmt são responsáveis por reparar estequiometricamente os adutos de DNA, inativando-os. A Mgmt funciona como uma transferase e como um acceptor de um grupo alquila. Após o reconhecimento de um aduto de DNA ou O⁶MeG, a Mgmt transfere o grupo alquil para o enxofre do seu sítio acceptor interno (SHARMA *et al.* 2009). Por outro lado, a reação de AlkB com um O⁶MeG libera formaldeído e a base de DNA não modificada, e então, um intermediário hidroxilado é gerado (FAHRER J., KAINA B., 2013). Além disso, Trp53 foi

relacionada com a regulação da atividade de Mgmt (GROMBACHER T, EICHOHORN U, KAINA B., 1998). Nossos resultados demonstram que os animais TPH1KO apresentaram uma redução na expressão gênica de Mgmt, fazendo com que esses animais tenham um defeito no sistema de reparo do seu DNA, aumentando a susceptibilidade ao erro.

Por outro lado, a metilação do DNA é uma das principais modificações epigenéticas que podem regular a expressão gênica (OKUGAWA *et al.* 2015). O primeiro fenótipo de hipermetilação de ilhas CpG descrito no câncer colorretal foi em 1999, e demonstrou uma alta frequência de dinucleotídeos CpG hipermetilados nestes tumores (TOYOTA M. *et al.*, 1999). Nossos dados demonstram que a redução da expressão do gene *MGMT* está diretamente relacionada com um aumento na metilação do mesmo, possivelmente causando o seu silenciamento. Esse resultado condiz com aqueles encontrados por Colussi (2013), que descreveu que a transição entre a mucosa normal para um pólipó adenomatoso era marcada por alterações genéticas e epigenéticas, e incluíam a hipermetilação de uma variedade de genes, tais como *SLC5A8*, *ITGA4*, e *MGMT* (COLUSSI D. *et al.*, 2013).

5.3 Efeitos da síntese de 5-HT sobre o reparo genômico quando alterado pela radiação ionizante

A resposta ao dano de DNA é essencial para a manutenção da estabilidade genômica. As moléculas ATM e ATR pertencem à família das PI3-quinases, e são responsáveis por recrutar proteínas de reparo ao DNA e ativar os sistemas de checagem (checkpoints) do ciclo celular em resposta à tais lesões (LOBRICH M, JEGGO PA; 2007). Fahrer *et al.* (2015) sugere que

alterações no reparo genético relacionado ao AOM também pode alterar a sinalização da via Atr-Chk1-p53 e modificar os níveis de dano de DNA na população de células tronco colônicas (FAHRER J.; *et al.*; 2015). É possível que células altamente proliferativas sofram uma parada na replicação promovendo o dano de DNA e ativação do eixo Atr-Chk1-Trp53, o que, conseqüentemente, pode induzir uma parada do ciclo celular na fase S/G2 (CURTIN NJ, 2012). Nossos dados sugerem que a atividade de síntese de 5-HT apresenta um efeito mais significativo sobre a fase G2 do ciclo celular.

Myers e Cortez relataram que a ativação de Chk1 induzida por IR depende da sinalização de Atm/Atr (MYERS J.S.. 2006). De acordo com Lobrich e Jeggo, a Atm está relacionada com a ativação de Chk2 em casos de quebra na dupla fita de DNA durante a fase G1 do ciclo celular, enquanto que Atr induz a atividade de Chk1 e Trp53 quando o dano ocorre na fase G2 (LOBRICH M, JEGGO PA; 2007). Assim, os animais que possuíam deficiência na síntese de 5-HT apresentaram uma redução nos níveis de expressão gênica de Atr e maior dano de DNA. Isso demonstra que a síntese de 5-HT pode influenciar o funcionamento do sistema de reparo genético, já que os animais que receberam reposição endógena apresentaram uma maior expressão gênica de ATR. A síntese de 5-HT pode estar modulando o mecanismo de reparo por alterar a sinalização de forma com que haja uma ativação de Atr, e conseqüentemente, o reparo ao DNA é feito de forma mais rápida.

Por outro lado, o aumento da expressão gênica de Atr pode estar relacionado com o aumento da proliferação celular, que é uma forma do organismo de substituir o tecido danificado. Atm é primariamente ativada por quebras na dupla fita de DNA (LOBRICH M, JEGGO PA; 2007). Porém, apesar

de ter ocorrido um aumento de sua expressão aumentada nos animais com resgate endógeno da síntese de 5-HT, não houve um aumento na expressão de Chk2, que é a sua molécula efetora.

5.4 Efeitos da síntese de 5-HT sobre a diferenciação celular no nicho colônico de células tronco sob indução carcinogênica

Nossos resultados sugerem que a atividade serotoninérgica pode proteger o nicho de células tronco de ser geneticamente danificados. Também é válido ressaltar que o nicho criptal de células tronco, provavelmente melhorou os mecanismos de reparo que protegem as células tronco do acúmulo de dano de DNA e a transmissão de mutações genéticas para células progenitoras (VITALE I.; 2017). Outra consideração é que a proliferação nas células tronco colônicas pode acarretar o desenvolvimento de CCR, já que mais mutações somáticas serão adquiridas como um resultado dos níveis aumentados de dano de DNA (FAHRER *et al.*, 2015; BARKER N *et al.*, 2009). De fato, essas células tronco geneticamente danificadas têm sido relacionadas com a promoção da fissão criptal, que coordena o surgimento de criptas aberrantes e o desenvolvimento de tumores colorretais (LEEDHAM *et al.*, 2005).

Karp *et al.* observaram que a inibição da via de sinalização Wnt promoveu a diferenciação das células Lgr5⁺ em células globulares (YIN *et al.*, 2014). Essas observações sugerem que a inibição da síntese de 5-HT induziu a erros de diferenciação celular no nicho de células tronco e promoveu a carcinogênese colorretal por aumentar os níveis de dano de DNA. Assim, os tumores de cólon esporádicos se desenvolvem após mutações no nicho criptal de células tronco, inicialmente como um adenoma unicriptal, que se expande em um tumor através

de múltiplas fissões criptais, embora padrões de mutações em células plenamente diferenciadas também possa promover o crescimento desses tumores posteriormente (FAHRER *et al.*, 2015; BARKER *et al.*, 2009; PRESTON *et al.*, 2003).

6. CONCLUSÃO

Em resumo, nossos resultados demonstram que ao contrário dos seus efeitos promotores sobre crescimento de tumores colorretais já estabelecidos, a síntese de 5-HT poder proteger o nicho de células tronco do dano de DNA, reduzindo o desenvolvimento de eventos carcinogênicos iniciais. Além disso, nossos dados sugerem que os efeitos da síntese de 5-HT no sistema de reparo ao dano de DNA podem ser dependentes do estágio de desenvolvimento da carcinogênese colorretal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMINI-KHOEI, H. et al. Tropisetron suppresses colitis-associated cancer in a mouse model in the remission stage. **Int Immunopharmacol**, v. 36, p. 9-16, Jul 2016. ISSN 1878-1705. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27104313> >.

ARNOLD, M. et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**, v. 66, n. 4, p. 683-691, 04 2017. ISSN 1468-3288. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26818619> >.

ASFAHA, S. et al. Krt19(+)/Lgr5(-) Cells Are Radioresistant Cancer-Initiating Stem Cells in the Colon and Intestine. **Cell Stem Cell**, v. 16, n. 6, p. 627-38, Jun 2015. ISSN 1875-9777. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26046762> >.

BARKER, N. et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. **Nature**, v. 457, n. 7229, p. 608-11, Jan 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19092804> >.

BARKER, N. et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. **Nature**, v. 449, n. 7165, p. 1003-7, Oct 2007. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17934449> >.

BARKLA, D. H.; TUTTON, P. J. Influence of histamine and serotonin antagonists on the growth of xenografted human colorectal tumors. **J Natl Cancer Inst**, v. 67, n. 6, p. 1207-11, Dec 1981. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6947106> >.

BIRD, C. L. et al. Plasma ferritin, iron intake, and the risk of colorectal polyps. **Am J Epidemiol**, v. 144, n. 1, p. 34-41, Jul 1996. ISSN 0002-9262. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8659483> >.

BIRD, R. P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Lett**, v. 37, n. 2, p. 147-51, Oct 1987. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3677050> >.

BIRD, R. P.; MCLELLAN, E. A.; BRUCE, W. R. Aberrant crypts, putative precancerous lesions, in the study of the role of diet in the aetiology of colon cancer. **Cancer Surv**, v. 8, n. 1, p. 189-200, 1989. ISSN 0261-2429. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2680070> >.

BOWCUTT, R. et al. Heterogeneity across the murine small and large intestine. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 41, p. 15216-32, Nov 2014. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25386070> >.

BUGNI, J. M. et al. Genetic association and functional studies of major polymorphic variants of MGMT. **DNA Repair (Amst)**, v. 6, n. 8, p. 1116-26, Aug 2007. ISSN 1568-7864. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17569599> >.

CENTER, M. M.; JEMAL, A.; WARD, E. International trends in colorectal cancer incidence rates. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 18, n. 6, p. 1688-94, Jun 2009. ISSN 1538-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19505900> >.

CLEVERS, H.; LOH, K. M.; NUSSE, R. Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. **Science**, v. 346, n. 6205, p. 1248012, Oct 2014. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278615> >.

COLUSSI, D. et al. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 8, p. 16365-85, Aug 2013. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23965959> >.

CURTIN, N. J. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 12, p. 801-17, Dec 2012. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23175119> >.

CÔTÉ, F. et al. Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 23, p. 13525-30, Nov 2003. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14597720> >.

DAY, R. S. et al. Human tumor cell strains defective in the repair of alkylation damage. **Carcinogenesis**, v. 1, n. 1, p. 21-32, Jan 1980. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22282976> >.

Ellis H, Mahadevan V, eds. Clinical anatomy. 13th edn, vols. 86e88. Wiley Blackwell, 2013; 94e8.

FAHRER, J. et al. DNA repair by MGMT, but not AAG, causes a threshold in alkylation-induced colorectal carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 10, p. 1235-44, Oct 2015. ISSN 1460-2180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26243310> >.

FAHRER, J.; KAINA, B. O6-methylguanine-DNA methyltransferase in the defense against N-nitroso compounds and colorectal cancer. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 11, p. 2435-42, Nov 2013. ISSN 1460-2180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23929436> >.

FUJIMITSU, Y. et al. Development of aberrant crypt foci involves a fission mechanism as revealed by isolation of aberrant crypts. **Jpn J Cancer Res**, v. 87, n. 12, p. 1199-203, Dec 1996. ISSN 0910-5050. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9045953> >.

GERSHON, M. D. Serotonin is a sword and a shield of the bowel: serotonin plays offense and defense. **Trans Am Clin Climatol Assoc**, v. 123, p. 268-80; discussion 280, 2012. ISSN 0065-7778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23303993> >.

GERSHON, M. D. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 20, n. 1, p. 14-21, Feb 2013. ISSN 1752-2978. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23222853> >.

GROMBACHER, T.; EICHHORN, U.; KAINA, B. p53 is involved in regulation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) by DNA damaging agents. **Oncogene**, v. 17, n. 7, p. 845-51, Aug 1998. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9780001> >.

HEREDIA, D. J. et al. Important role of mucosal serotonin in colonic propulsion and peristaltic reflexes: in vitro analyses in mice lacking tryptophan hydroxylase 1. **J Physiol**, v. 591, n. 23, p. 5939-57, Dec 2013. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24127620>>.

HERRAIZ, T.; GALISTEO, J. Endogenous and dietary indoles: a class of antioxidants and radical scavengers in the ABTS assay. **Free Radic Res**, v. 38, n. 3, p. 323-31, Mar 2004. ISSN 1071-5762. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15129740> >.

JIN, G. et al. The G-protein coupled receptor 56, expressed in colonic stem and cancer cells, binds progastrin to promote proliferation and carcinogenesis. **Oncotarget**, v. 8, n. 25, p. 40606-40619, Jun 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28380450> >.

KANNEN, V. et al. Colon preneoplasia after carcinogen exposure is enhanced and colonic serotonergic system is suppressed by food deprivation. **Toxicology**, v. 312, p. 123-31, Oct 2013. ISSN 1879-3185. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23978458> >.

KANNEN, V. et al. Fluoxetine induces preventive and complex effects against colon cancer development in epithelial and stromal areas in rats. **Toxicol Lett**, v. 204, n. 2-3, p. 134-40, Jul 2011. ISSN 1879-3169. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21554931> >.

KANNEN, V. et al. High-fat diet causes an imbalance in the colonic serotonergic system promoting adipose tissue enlargement and dysplasia in rats. **Toxicol Lett**, v. 213, n. 2, p. 135-41, Sep 2012. ISSN 1879-3169. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22750881> >.

KHAN, W. I.; GHIA, J. E. Gut hormones: emerging role in immune activation and inflammation. **Clin Exp Immunol**, v. 161, n. 1, p. 19-27, Jul 2010. ISSN 1365-2249. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20408856> >.

KIM, E. et al. Homeostatic responses of colonic LGR5+ stem cells following acute in vivo exposure to a genotoxic carcinogen. **Carcinogenesis**, v. 37, n. 2, p. 206-14, Feb 2016. ISSN 1460-2180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26717997> >.

KIM, J. J. et al. Targeted inhibition of serotonin type 7 (5-HT7) receptor function modulates immune responses and reduces the severity of intestinal inflammation. **J Immunol**, v. 190, n. 9, p. 4795-804, May 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23554310> >.

KONDO, N. et al. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. **J Nucleic Acids**, v. 2010, p. 543531, Nov 2010. ISSN 2090-021X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21113301> >.

KURZ, E. U.; LEES-MILLER, S. P. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. **DNA Repair (Amst)**, v. 3, n. 8-9, p. 889-900, 2004 Aug-Sep 2004. ISSN 1568-7864. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15279774> >.

LEE, H. K. et al. Meta-analysis: selective serotonin reuptake inhibitors and colon cancer. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 24, n. 10, p. 1153-7, Oct 2012. ISSN 1473-5687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22735609> >.

LEEDHAM, S. J. et al. From gene mutations to tumours--stem cells in gastrointestinal carcinogenesis. **Cell Prolif**, v. 38, n. 6, p. 387-405, Dec 2005. ISSN 0960-7722. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16300652> >.

LI, N. et al. Serotonin activates dendritic cell function in the context of gut inflammation. **Am J Pathol**, v. 178, n. 2, p. 662-71, Feb 2011. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21281798> >.

LÖBRICH, M.; JEGGO, P. A. The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 11, p. 861-9, 11 2007. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17943134> >.

MANOCHA, M.; KHAN, W. I. Serotonin and GI Disorders: An Update on Clinical and Experimental Studies. **Clin Transl Gastroenterol**, v. 3, p. e13, Apr 2012. ISSN 2155-384X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23238212> >.

MCLELLAN, E. A.; MEDLINE, A.; BIRD, R. P. Sequential analyses of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions. **Cancer Res**, v. 51, n. 19, p. 5270-4, Oct 1991. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1913650> >.

MIDDLETON, F. K. et al. Common cancer-associated imbalances in the DNA damage response confer sensitivity to single agent ATR

inhibition. **Oncotarget**, v. 6, n. 32, p. 32396-409, Oct 2015. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26486089> >.

MIURA, T.; MURAOKA, S.; OGISO, T. Lipid peroxidation inhibited by monoamines. **Res Commun Mol Pathol Pharmacol**, v. 93, n. 1, p. 57-67, Jul 1996. ISSN 1078-0297. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8865370> >.

MUNKHOLM, P. Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 18 Suppl 2, p. 1-5, Sep 2003. ISSN 0269-2813. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12950413> >.

MYERS, J. S.; CORTEZ, D. Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11. **J Biol Chem**, v. 281, n. 14, p. 9346-50, Apr 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16431910> >.

NAKAYAMA, T.; NAKAMURA, W. Radioprotective effect of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan on mammalian cells irradiated in vitro. **Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med**, v. 34, n. 1, p. 81-09, Jul 1978. ISSN 0020-7616. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/309445> >.

NEUFERT, C.; BECKER, C.; NEURATH, M. F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. **Nat Protoc**, v. 2, n. 8, p. 1998-2004, 2007. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17703211> >.

NOCITO, A. et al. Serotonin regulates macrophage-mediated angiogenesis in a mouse model of colon cancer allografts. **Cancer Res**, v. 68, n. 13, p. 5152-8, Jul 2008. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18593914> >.

NODA, Y. et al. Melatonin and its precursors scavenge nitric oxide. **J Pineal Res**, v. 27, n. 3, p. 159-63, Oct 1999. ISSN 0742-3098. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10535765> >.

OKUGAWA, Y.; GRADY, W. M.; GOEL, A. Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers. **Gastroenterology**, v. 149, n. 5, p. 1204-1225.e12, Oct 2015. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26216839> >.

PRESTON, S. L. et al. Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. **Cancer Res**, v. 63, n. 13, p. 3819-25, Jul 2003. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12839979> >.

PRETLOW, T. P. et al. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. **Cancer Res**, v. 51, n. 5, p. 1564-7, Mar 1991. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1997197> >.

RENEHAN, A. G. et al. Early cellular events in colorectal carcinogenesis. **Colorectal Dis**, v. 4, n. 2, p. 76-89, Mar 2002. ISSN 1463-1318. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12780627> >.

RONCUCCI, L. et al. Aberrant crypt foci in colorectal carcinogenesis. Cell and crypt dynamics. **Cell Prolif**, v. 33, n. 1, p. 1-18, Feb 2000. ISSN 0960-7722. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10741640> >.

ROSENBERG, D. W.; GIARDINA, C.; TANAKA, T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 2, p. 183-96, Feb 2009. ISSN 1460-2180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19037092> >.

SAKITA, J. Y. et al. A critical discussion on diet, genomic mutations and repair mechanisms in colon carcinogenesis. **Toxicol Lett**, v. 265, p. 106-116, Jan 2017. ISSN 1879-3169. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27908614> >.

SHARMA, S. et al. Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis. **Anticancer Res**, v. 29, n. 10, p. 3759-68, Oct 2009. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19846906> >.

SHEN, L. et al. MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 97, n. 18, p. 1330-8, Sep 2005. ISSN 1460-2105. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16174854> >.

SHILOH, Y.; ZIV, Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 4, p. 197-210, Apr 2013. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23847781> >.

SPOHN, S. N. et al. Protective Actions of Epithelial 5-Hydroxytryptamine 4 Receptors in Normal and Inflamed Colon. **Gastroenterology**, v. 151, n. 5, p. 933-944.e3, 11 2016. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27480173> >.

SPOHN, S. N.; MAWE, G. M. Non-conventional features of peripheral serotonin signalling - the gut and beyond. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 14, n. 7, p. 412-420, Jul 2017. ISSN 1759-5053. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28487547> >.

SREEVALSAN, S.; SAFE, S. REACTIVE OXYGEN SPECIES AND COLORECTAL CANCER. **Curr Colorectal Cancer Rep**, v. 9, n. 4, p. 350-357,

Dec 2013. ISSN 1556-3790. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25584043> >.

SUI, H. et al. 5-hydroxytryptamine receptor (5-HT1DR) promotes colorectal cancer metastasis by regulating Axin1/ β -catenin/MMP-7 signaling pathway. **Oncotarget**, v. 6, n. 28, p. 25975-87, Sep 2015. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26214021> >.

TOYOTA, M.; ISSA, J. P. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. **Semin Cancer Biol**, v. 9, n. 5, p. 349-57, Oct 1999. ISSN 1044-579X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10547343> >.

VITALE, I. et al. DNA Damage in Stem Cells. **Mol Cell**, v. 66, n. 3, p. 306-319, May 2017. ISSN 1097-4164. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28475867> >.

WALTHER, D. J. et al. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. **Science**, v. 299, n. 5603, p. 76, Jan 2003. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12511643> >.

WARGOVICH, M. J.; BROWN, V. R.; MORRIS, J. Aberrant crypt foci: the case for inclusion as a biomarker for colon cancer. **Cancers (Basel)**, v. 2, n. 3, p. 1705-16, Sep 2010. ISSN 2072-6694. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24281183> >.

YIN, X. et al. Niche-independent high-purity cultures of Lgr5+ intestinal stem cells and their progeny. **Nat Methods**, v. 11, n. 1, p. 106-12, Jan 2014. ISSN 1548-7105. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24292484> >.

YOUNES, R. N.; BADRA, C. Os tumores neuroendócrinos (carcinoides): aspectos gerais. Rev. Oncologia, prática hospitalar. Ano XI. 2009.

ANEXO



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Como a sinalização serotoninérgica epitelial difere dos efeitos de sua síntese neural durante a carcinogênese de cólon”, protocolo nº 15.1.229.60.8, sob a responsabilidade de Vinicius Kannen Cardoso e Sérgio Akira Uyemura que envolve manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP) em reunião de 31/03/2016.

Vigência do Projeto	16/05/2016 a 31/01/2019			
Espécie/Linhagem	Camundongo isogênico C57BL/6	Camundongo knockout Tph1 ^{ko}	Camundongo knockout IL10 ^{ko} e IL6 ^{ko}	Camundongo Knockout Rag1 ^{ko}
Nº de animais	20	20	40	20
Peso/Idade	21 g/ 8sem	21 g/ 8sem	21 g/ 8sem	21 g/ 8sem
Sexo	Macho	Macho	Macho	Macho
Origem	Biotério Central da PUSP-RP	Biotério do Hemocentro	Biotério FMRP	Biotério ICB-USP

Vigência do Projeto	16/05/2016 a 31/01/2019			
Espécie/Linhagem	Camundongo knockout Tph1 ^{ko} IL10 ^{ko} , Tph1 ^{ko} IL6 ^{ko} e Tph1 ^{ko} Rag1 ^{ko}	Camundongo transgênico Tph1 ^{fllox/flox}	Camundongo transgênico Villin-Cre-ERT2	Camundongo transgênico Tph1 ^{Cre-ERT2}
Nº de animais	60	20	20	20
Peso/Idade	21 g/ 8sem	21 g/ 8sem	21 g/ 8sem	21 g/ 8sem
Sexo	Macho	Macho	Macho	Macho
Origem	Biotério da FCFRP	Columbia University	IRB Barcelona	Biotério da FCFRP

Ribeirão Preto, 31 de março de 2016.


Prof. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Presidente da CEUA-FCFRP