UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**Efeitos de diferentes doses de geraniol quando administrado durante a fase de pós-iniciação
tardia da carcinogênese experimental de cólon**

Alessandra Vieira

Tese para obtenção do grau de
DOCTOR

Orientador:
Prof. Titular Fernando Salvador Moreno

São Paulo
2011

Alessandra Vieira

Efeitos de diferentes doses de geraniol quando administrado durante a fase de pós-iniciação tardia da carcinogênese experimental de cólon

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno
orientador/presidente

Prof. Luis Fernando Barbisan
Co-orientador

Heidge Fukumasu
1º. examinador

Sérgio Britto Garcia
2º. examinador

Maria Lúcia Zaidan Dagli
3º. examinador

Thomas Prates Ong
4º. examinador

São Paulo, 11 de outubro de 2011

*Dedico esse trabalho à minha família e a todos os meus amigos de verdade,
especialmente neste momento no qual estou aprendendo a conviver junto à
saudades constante...*

*"Você pode dizer adeus a sua família e a seus amigos e afastar-se milhas e
milhas e, ao mesmo tempo, carregá-los em seu coração, em sua mente, em seu
estômago, pois você não apenas vive no mundo, mas o mundo vive em você."
(Frederick Buechner)*

Agradecimentos

Dedico meus agradecimentos àquelas pessoas responsáveis pela realização desse trabalho, que participaram dele, direta ou indiretamente e que também sempre fizeram parte da minha vida.

Primeiramente agradeço a Deus, por ter Seu amor presente em minha vida e em meu caminho, pela alegria de viver e por tudo que tenho e conquistei até hoje;

Ao meu orientador, professor Fernando Salvador Moreno, pela oportunidade, confiança e ensinamentos; um profissional que considero admirável pelo amor com que se dedica à sua carreira e pelo dom de ensinar que carrega consigo. Nunca me esquecerei do primeiro dia em que estive com ele quando me disse que sempre gostou muito de biólogos porque os considera “idealistas”. Escrevi em minha dissertação de mestrado e escrevo novamente agora: professor, você é bem mais idealista que qualquer um deles!

Sempre soube que o “menino dos olhos” do professor é o fígado, afinal são anos de experiência, e também sabia que, com isso, sentiria algumas consequências quando decidi estudar a carcinogênese de cólon, um modelo ainda não totalmente dominado pelo grupo. Sabia que seria um caminho mais demorado e difícil, mas quero que ele saiba que a minha intenção sempre foi crescer, aprender mais e contribuir para o nosso laboratório.

Também gostaria de aproveitar essa oportunidade para agradecer pela sua compreensão com os imprevistos que enfrentei devido a questões pessoais e que, infelizmente, acabaram interferindo na fase final do meu doutorado (onde tivemos que encurtá-lo devido à minha mudança para a Venezuela). Obrigada de verdade por ter me ajudado e ter realizado as correções, com rapidez e eficiência! Além de sempre ter demonstrado a sua preocupação em valorizar a família e me permitir estar ao lado do meu marido lá.

Ao meu co-orientador, professor Luis Fernando Barbisan, principalmente pela ajuda na parte prática da montagem de lâminas com cortes histológicos colônicos (a parte na qual tive mais dificuldade quando eu estava no mestrado), imunistoquímica e análise de apoptose, fundamentais para esse estudo. Fiquei muito feliz em poder contar com essa parceria! Deveríamos seguir cada vez mais essa tendência, de interações entre diferentes pesquisadores, para obtermos trabalhos mais enriquecedores;

Ao professor Thomas Prates Ong, sempre com ótimas contribuições em todos os trabalhos do nosso laboratório e fundamental também na publicação do artigo do meu mestrado;

Aos amigos do laboratório, pessoas maravilhosas que deixavam a nossa rotina de trabalho muito mais alegre e que se tornaram minhas amigas para a vida toda! Nunca me esquecerei dos momentos tão especiais que passamos juntos... Espero manter contato mesmo à distância! À 1ª geração: Aline, Mônica, Aderuza, Joice, Giuliana, Bruna, Clarissa, Douglas, Juliana Ortega, Fábila, Leticia e à 2ª geração: Adriana, Juliana Miranda, Aline, Kelly, Eduardo, Laura, Sandra, Camile, e Mariane.

Ao Renato Heidor, amigo e técnico do laboratório, pelo convívio tão alegre no dia-a-dia, ajudas e, principalmente, pela parceria na padronização inicial do modelo de carcinogênese de cólon onde trocamos opiniões, idéias e nos ajudamos bastante;

A todos os funcionários, tanto do biotério quanto do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, que proporcionaram as condições necessárias para a concretização desse trabalho;

Às agências de fomento, pelo apoio financeiro à nossa pesquisa;

À base de tudo: minha família, começando pela minha mãe, um exemplo de mulher corajosa e batalhadora, que simplesmente dedicou a sua vida pelos seus filhos. Hoje me considero uma pessoa de caráter e de princípios fortes e corretos... E isso é graças a ela... Só tenho que lhe agradecer, mãe... Palavras não existem para expressar a minha gratidão... Te amo muito;

Ao meu pai, que infelizmente não está mais entre nós, mas que sei que está participando de tudo junto comigo, dentro do meu coração... Te amo muito também!

Aos maiores tesouros que tenho e guardo debaixo de sete chaves: meus irmãos queridos! A mais velha: Cristiane, o do meio: Marcelo e o gêmeo: Rodrigo, pela grande amizade que temos um pelo outro, pelo carinho e por esse amor incondicional que nos une! Vocês são tudo para mim e sou eternamente grata a Deus por ter colocado essas jóias raras e tão especiais em meu caminho e que vieram iluminar e fortalecer a minha vida;

Aos meus sobrinhos lindos: Sophia e Tiago, pela pureza da infância que traz a esperança para os nossos dias! Amo muito vocês dois, meus lindos;

À minha Avó Áurea e toda a minha família de Rio Claro que amo muito! Tenho também ótimas recordações dessa cidade onde passei momentos maravilhosos, tanto na minha infância quanto na minha graduação de Biologia na Unesp;

À minha família paterna, tio Tuca, tia Cristina, Carol e Claudinha, pelo carinho e tantos anos de convivência e participações em cada fase importante de minha vida;

Ao meu marido, Henrique, pelo amor, companheirismo, dedicação e apoio de sempre. Durante essa fase final do doutorado e devido a sua transferência de trabalho, mudamos de país e passamos juntos por períodos de transformações, desafios e adaptações que não foram fáceis. Tudo isso está nos provando que nosso amor é

mesmo de verdade e forte o suficiente para suportar as dificuldades que enfrentamos como as diferenças culturais, de idioma e, principalmente, a distância e a saudade das nossas raízes;

À minha segunda família, Lelete, Jaquinho, Chris, Marcelo, Daniel, Luzia, Arthur, Eduarda e Dona Ormy, por todo amor, carinho e pelos momentos sempre alegres quando nos reunimos e fazemos aquele churrasquinho lá no sítio;

Às minhas queridas amigas: Samira, Elaine, Juliana (SP), Bruna, Vanessa, Betina, Juliana (RC), Babi; Morro de saudades de todas...

Aos novos amigos que fiz na Venezuela, pela maravilhosa receptividade, carinho, atenção com que me receberam e por terem feito meus dias lá muito mais alegres; “Ustedes son personas muy amables y están dentro de mi corazón... Muchas Gracias!”. Assim que cheguei aprendi uma expressão venezuelana que consegue resumir tudo: “Chedere !!!!!!!”

Obrigada!

*“Quando você deseja muito alguma coisa, todo o Universo
conspira para que possa realizá-la”.
(O Alquimista)*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Tipos de cânceres mais incidentes estimados para 2011, exceto o de pele não melanoma, na população brasileira.....	25
Figura 2.	Via resumida do mevalonato (Adaptada de PANAGIOTIS et al, 2007).....	28
Figura 3.	Estrutura química do monotерpeno geraniol (SHOFF et al., 1991).....	30
Figura 4.	Diagrama representando as zonas de uma cripta no cólon (JOHNSON, 2002).....	33
Figura 5.	Seqüência Adenoma-Adenocarcinoma na carcinogênese de cólon (GIL, ROWLAND, 2002).....	34
Figura 6.	Representação pictórica da dinâmica de FCAs durante a carcinogênese do cólon induzida em ratos.....	36
Figura 7.	Via de sinalização da BC (MORI et al., 2004).....	37
Figura 8.	Expressão alterada de <i>c-myc</i> na carcinogênese de cólon (FEARON, 2011).....	38
Figura 9.	Esquema do metabolismo da DMH (Modificado de SOHN et al., 2001).....	40
Figura 10.	Protocolo experimental.....	44
Figura 11.	Foto do equipamento de microdissecção.....	50
Figura 12.	Evolução do peso corpóreo de ratos Wistar durante a administração de DMH.....	55

Figura 13.	Evolução do peso corpóreo de ratos Wistar normais, tratados com OM ou diferentes doses GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.....	56
Figura 14.	Concentração plasmática de colesterol total de animais normais, tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.....	58
Figura 15.	FCAs contendo 2 (seta superior) e 5 (seta inferior) criptas aberrantes, respectivamente, de cólon de rato Wistar submetido ao modelo de carcinogênese induzida por DMH quando corado com azul de metileno (Objetiva 100X).....	59
Figura 16.	Número de FCAs < 4 criptas/cm ² presentes no cólon médio de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.....	59
Figura 17.	Número de FCAs ≥ 4 criptas/cm ² presentes no cólon médio de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.....	60
Figura 18.	Número de FCAs < 4 criptas/cm ² presentes no cólon distal de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.....	60
Figura 19.	Número de FCAs ≥ 4 criptas/cm ² presentes no cólon distal de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.....	61
Figura 20.	Frequência de FCAs ≥ 4 criptas no cólon distal de animais tratados com OM e diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.....	62

Figura 21.	FDM (objetiva 20X-fotomicrografia à esquerda) e FPM (objetiva 10X-fotomicrografia à direita) de cólon de rato Wistar submetido ao modelo de carcinogênese induzida por DMH quando corado com azul de toluidina.....	63
Figura 22.	Número de FPMs e FDMs/cm ² presentes no cólon médio de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.....	63
Figura 23.	Número de FPMs e FDMs/cm ² presentes no cólon distal de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.....	64
Figura 24.	Frequência de FDMs no cólon distal de animais tratados com OM e diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.....	65
Figura 25.	FCA displásico (A) e convencional (B), respectivamente, de cólon de rato Wistar submetido ao modelo de carcinogênese induzida por DMH em cortes histológicos corados em HE (Objetiva 20X).....	66
Figura 26.	Número de FCAs convencionais e/ou displásicos/mm ² presentes no cólon médio de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.....	66
Figura 27.	Número de FCAs convencionais e/ou displásicos/mm ² presentes no cólon distal de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.....	67
Figura 28.	Número de FCAs ≥ 4 criptas convencionais e/ou displásicos/mm ² presentes no cólon médio de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon....	68

Figura 29.	Número de FCAs ≥ 4 criptas convencionais e/ou displásicos/mm ² presentes no cólon distal de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon....	68
Figura 30.	FCA positivo para BC citoplasmática/nuclear (aumento 20X).....	69
Figura 31.	Número de FCAs/mm ² positivos e negativos para BC presentes no cólon médio de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.....	69
Figura 32.	Número de FCAs/mm ² positivos e negativos para BC presentes no cólon distal de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.....	70
Figura 33.	Número de FCAs ≥ 4 /mm ² positivos e negativos para BC presentes no cólon médio de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.....	71
Figura 34.	Número de FCAs ≥ 4 /mm ² positivos e negativos para BC presentes no cólon distal de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.....	71
Figura 35.	Foto Fotomicrografias de FCAs convencional (A) e displásicos (B) em cortes histológicos transversais às criptas corados com HE (objetiva de 20 X, setas); Figuras de apoptose em FCAs convencional (C) e displásicos (D) (objetiva de 100x, cabeças de seta).....	72
Figura 36.	Número médio do índice apoptótico por área (mm ²) presentes em FCAs ≥ 4 do cólon distal de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.....	73

Figura 37.	(A) Expressão dos genes <i>HMGCoA-redutase</i> e <i>BA</i> na mucosa colônica de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon. (B) Quantificação da expressão <i>HMGCoA-redutase</i> normalizada pela expressão do gene <i>BA</i> nos ratos dos grupos N, OM e GO. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão da média de 5 animais.....	74
Figura 38.	Cortes da mucosa colônica de 10 μ m feitos em criostato e corados com azul de metileno para a microdissecção de FCAs (aumento 40X).....	75
Figura 39.	(A) Expressão dos genes <i>K-Ras</i> e <i>BA</i> em FCAs microdissecados da mucosa colônica de animais tratados com OM e diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon. (B) Quantificação da expressão <i>K-Ras</i> normalizada pela expressão do gene <i>BA</i> nos ratos dos grupos N, OM e GO. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão da média de 3 animais.....	76
Figura 40.	(A) Expressão dos genes <i>c-myc</i> e <i>BA</i> em FCAs microdissecados da mucosa colônica de animais tratados com OM e diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon. (B) Quantificação da expressão <i>c-myc</i> normalizada pela expressão do gene <i>BA</i> nos ratos dos grupos N, OM e GO. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão da média de 3 animais.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores dos transcritos dos genes alvo, tamanho do produto e temperatura de anelamento, utilizados para análise de transcriptase reversa RT-PCR.....	53
Tabela 2.	Pesos corpóreos médios de ratos Wistar antes e após a administração de DMH..	55
Tabela 3.	Pesos corpóreos médios de ratos Wistar normais, tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.....	56
Tabela 4.	Concentração plasmática de colesterol total de ratos Wistar normais, tratados com OM ou diferentes doses GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.....	57

LISTA DE ABREVIACÕES

AOM = Azoximetano

BA = beta-actina

BC = beta-catenina

CBAs = compostos bioativos

CO = Controle

DMH = Dimetilhidrazina

FCAs = Focos de Criptas Aberrantes

FDMs = Focos Depletados de Mucina

FPMs = Focos Positivos para Mucina

FNBCs = Focos Negativos para Beta-Catenina

FPBCs = Focos Positivos para Beta-Catenina

GAPDH = Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GO = Geraniol

HMGCoA-redutase = 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA-redutase

INCA = Instituto Nacional do Câncer

LPNs = Lesões pré-neoplásicas

N = Normal

OM = Óleo de Milho

OMS = Organização Mundial da Saúde

p.c. = peso corpóreo

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE ABREVIACÕES.....	XII
I – INTRODUÇÃO.....	23
II. REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 Aspectos epidemiológicos do câncer.....	24
2.2 Carcinogênese	25
2.3 Quimioprevenção do câncer com isoprenóides.....	27
2.4 Carcinogênese de cólon.....	32
2.5 Modelo experimental de carcinogênese de cólon.....	39
2.6 Diferentes doses de GO e eventuais efeitos sobre as categorias de LPNs presentes na carcinogênese de cólon.....	41
III. OBJETIVOS.....	42
IV. METODOLOGIA.....	43
4.1 Animais.....	43
4.2 Protocolo Experimental.....	43
4.3 Eutanásia dos animais e coleta do material.....	45
4.4 Determinação das concentrações de colesterol plasmático total.....	45

4.5 Análise e contagem de FCAs.....	46
4.6 Análise e contagem de focos depletados de mucina(FDMs) e positivos para mucina (FPMs).....	46
4.7 Contagem e classificação histopatológica dos FCAs.....	46
4.8 Imunoistoquímica para BC.....	47
4.9 Análise da apoptose no cólon distal.....	47
4.10 Análise da expressão de <i>HMGCoA-redutase</i> na mucosa colônica por meio da Reação em Cadeia de Polimerase - Transcriptase Reversa (RT-PCR).....	48
4.11 Microdissecção de FCAs.....	49
4.12 Análise da expressão de <i>K-Ras</i> e <i>c-myc</i> em FCAs microdissecados.....	50
4.13 Análise Estatística.....	53
V. RESULTADOS.....	54
5.1 Peso corpóreo médio dos animais tratados com diferentes doses de GO durante a etapa de pós-iniciação de modelo de carcinogênese de cólon.....	54
5.2 Concentração plasmática de colesterol total de animais tratados com diferentes doses de GO durante a etapa de pós-iniciação de modelo de carcinogênese de cólon.....	57
5.3 Pesquisa FCAs.....	58
5.4 Pesquisa de FDMs e FPMs.....	62

5.5 Pesquisa de FCAs convencionais e displásicos.....	66
5.6 Pesquisa de FPBCs e FNBCs citoplasmática e/ou nuclear.....	69
5.7 Análise da apoptose em FCAs ≥ 4 do cólon distal de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.....	72
5.8 Análise da expressão de <i>HMGCoA-redutase</i> na mucosa colônica de animais tratados com diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação de modelo de carcinogênese de cólon.....	73
5.9 Microdissecção de FCAs.....	75
5.10 Análise da expressão de <i>K-Ras</i> e <i>c-myc</i> em FCAs microdissecados.....	75
VI. DISCUSSÃO.....	78
VII. CONCLUSÕES.....	88
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
IX. ANEXOS.....	108

Resumo

Vieira, A. **Efeitos de diferentes doses de geraniol em categorias de lesões pré-neoplásicas induzidas durante a fase de pós-iniciação tardia da carcinogênese experimental de cólon.** 2011. 122 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O isoprenóide geraniol (GO) apresentou atividade quimiopreventiva quando administrado continuamente durante as fases de iniciação e pós-iniciação em modelo de carcinogênese experimental de cólon por meio da redução do número de focos de criptas aberrantes (FCAs) totais e FCAs ≥ 4 criptas e aumento de apoptose no cólon distal. Dessa forma, optou-se por avaliar os eventuais efeitos de três doses de GO (GO1: 25mg/100g de peso corpóreo [p.c.], GO2: 50 mg/100g de p.c. e GO3: 100 mg/100g de p.c.) em categorias de lesões pré-neoplásicas (LPNs) induzidas por dimetilhidrazina (DMH) durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese experimental de cólon, caracterizada por apresentar lesões mais avançadas e com alto grau de alterações celulares morfológicas, bioquímicas e moleculares denominadas de displasia. Para isso, analisamos diferentes biomarcadores como: FCAs totais e FCAs $<$ ou ≥ 4 criptas em cólons corados com azul de metileno; focos depletados ou positivos de mucina (FPMs ou FDMs) em cólons corados com azul de toluidina; FCAs convencionais ou displásicos por meio de análise histopatológica em cortes corados com hematoxilina e eosina (HE) e focos positivos ou negativos para beta-catenina (FPBCs ou FNBCs) citoplasmática e/ou nuclear por meio de imunistoquímica. Além disso, células apoptóticas foram identificadas utilizando-se critérios morfológicos clássicos em FCAs ≥ 4 no cólon distal e a expressão de genes envolvidos na carcinogênese de cólon foi avaliada por meio de RT-PCR: *HMGC*o*A-reductase* na mucosa colônica e *K-Ras* e *c-myc* em FCAs microdissecados. Em relação ao grupo controle, foi possível observar que o grupo tratado com a maior dose de GO (GO3) reduziu a frequência de FCAs ≥ 4 criptas e FDMs, além de aumentar a apoptose em FCAs ≥ 4 displásicos no cólon distal ($p \leq 0,05$). Já, em relação aos outros biomarcadores e às expressões de *HMGC*o*A-reductase*, *K-Ras* e *c-myc* não observamos diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p > 0,05$). A partir desses resultados, podemos concluir que a dose de 100 mg/100 g de p.c. de GO mostrou ser mais interessante do ponto de vista quimiopreventivo com efeitos observados principalmente no cólon distal, onde há maiores relatos de incidência de adenocarcinomas colônicos, tanto em animais quanto em humanos. Assim, a indução da morte celular programada em FCAs ≥ 4 preferencialmente

displásicos poderia representar um mecanismo importante de atuação de GO3 na redução da frequência de FCAs ≥ 4 criptas e de FDMs (também utilizado como marcador de displasia) durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese experimental de cólon.

Palavras-chaves: geraniol, carcinogênese de cólon, quimioprevenção, lesões pré-neoplásicas.

Abstract

Vieira, A. **Effects of different doses of geraniol on preneoplastic lesions induced during late post-initiation in an experimental model of colon carcinogenesis**. 2011. 122 f. Tese (Ph.D.) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The isoprenoid geraniol (GO) showed chemopreventive activity when administered continuously during the initiation and post-initiation phases in an experimental model of colon carcinogenesis by reducing the number of total aberrant crypt foci (ACF) and ACFs ≥ 4 crypts, as well as increasing apoptosis in the distal colon. We therefore chose to evaluate the effects of three different doses of GO (GO1: 25 mg/100 g body weight [b.w.], GO2: 50 mg/100 g b.w. and GO3: 100 mg/100 g of b.w.) on preneoplastic lesions (PNLs) induced by dimethylhydrazine (DMH) during late post-initiation in an experimental model of colon carcinogenesis that is characterized by more advanced lesions and a higher degree of cellular alterations morphological, biochemical and molecular (dysplasia) than previous models. For this study, we analyzed the following biomarkers: total ACFs, ACFs < 4 crypts, and ACFs ≥ 4 crypts in colons stained with methylene blue; mucin-depleted or mucin-positive foci (MDFs or MPFs) in colons stained with toluidine blue; ACFs, through conventional or dysplastic histopathological analysis of sections stained with hematoxylin and eosin (HE); and cytoplasmic vs. nuclear foci reactivity for beta-catenin (foci positive for beta-catenin (FPBC) or foci negative for beta catenin (FNBC)) using immunohistochemistry. Additionally, apoptotic cells were identified using classical morphologic criteria in ACFs ≥ 4 crypts in the distal colon, and the expression of several genes involved in colon carcinogenesis was assessed by RT-PCR, including *HMG-CoA reductase* in the colonic mucosa and *K-Ras* and *c-myc* in microdissected ACFs. Relative to the control group, we observed that the group receiving the highest dose of GO (GO3 group) had a reduced frequency of both ACFs ≥ 4 crypts and MDFs and that apoptosis increased in dysplastic ACFs ≥ 4 crypts in the distal colon ($p < 0, 05$). Expression of *HMG-CoA reductase*, *K-Ras* and *c-myc* did not differ between treatments ($p > 0, 05$). Based on these results, we conclude that the 100 mg/100 g b.w. dose of GO is the most promising, as it shows evidence of chemopreventive effects mainly in the distal colon, which is a region that is reported to have a higher incidence of colonic adenocarcinomas, both in animals and in humans.

Induction of programmed cell death by GO3 in ACFs ≥ 4 specifically dysplastic could represent an important mechanism of action in reducing the frequency of both ACFs ≥ 4 crypts and MDFs during late post-initiation in this experimental model of colon carcinogenesis.

Keywords: geraniol, colon carcinogenesis, chemoprevention, preneoplastic lesions.

I – Introdução

O câncer de cólon configura-se como a terceira causa mais comum de câncer no mundo e pode ser considerado um importante problema de saúde pública (OMS, 2011).

O número de casos novos de câncer de cólon estimado para o Brasil no ano de 2011 será de 13.310 casos em homens e de 14.800 em mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 14 casos novos a cada 100 mil homens e 15 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2011).

Estudos epidemiológicos e experimentais têm sugerido que o consumo de frutas e hortaliças está inversamente associado ao risco de desenvolvimento de câncer, principalmente o de cólon (SURH, 2003, MATHEW, 2004; BARTH, 2005). Muitos dos efeitos protetores desses alimentos têm sido atribuídos aos metabólitos secundários biologicamente ativos de plantas (BARTH, 2005), com importante destaque aos derivados da via do mevalonato, também chamados isoprenóides (MO, ELSON, 2004).

O geraniol (GO), um monoterpeno acíclico, encontrado naturalmente em óleos essenciais de plantas aromáticas, como a erva cidreira e o capim-limão, apresentou atividades quimiopreventivas em alguns modelos de carcinogênese (BURKE et al., 1997; CARNESECCHI et al., 2004). Em animais submetidos ao modelo do Hepatócito Resistente observou-se efeito protetor quando esse isoprenóide foi administrado continuamente durante as fases de iniciação e promoção ou apenas na promoção (ONG et al., 2006; CARDOZO et al., 2011) devido à inibição da proliferação celular e, principalmente, à indução da apoptose. Mais recentemente, a administração de GO durante as fases de iniciação e pós-iniciação de modelo de carcinogênese de cólon induzida por DMH resultou em inibição da formação de lesões pré-neoplásicas (LPNs) e aumento da apoptose no cólon distal, além da redução da expressão de *Bcl-2* e do grau de danos no DNA na mucosa colônica dos animais (VIEIRA et al., 2011).

Dessa forma, optou-se por avaliar eventuais efeitos de diferentes doses de GO em categorias de LPNs induzidas durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese experimental de cólon, além de possíveis mecanismos de ação envolvidos. Importante ressaltar que essa fase nos possibilita estudar a heterogeneidade das LPNs presentes nesse processo, com características variando de hiperplasia a diferentes graus de displasia, resultando, assim, em lesões com diferentes potências de progressão para o câncer.

II - Revisão da Literatura

2.1 Aspectos epidemiológicos do câncer

Sabe-se que diferentes fatores de risco, tanto genéticos quanto ambientais, existentes nas populações ao redor do mundo contribuem para a enorme variedade na incidência de neoplasias que acometem os seres humanos. Epidemiologistas têm estudado as taxas de cânceres em populações imigrantes e utilizado essas análises como uma ferramenta importante na comprovação dessa hipótese (KOLONEL et al., 2004).

Estudos de japoneses imigrantes no Havaí demonstraram que a taxa de incidência de câncer entre japoneses nativos e aqueles residentes no Havaí foram significativamente diferentes, e que a taxa em imigrantes japoneses tornou-se mais similar àquela de seus companheiros nascidos no próprio Havaí. Esses resultados suportam o conceito de que o risco de câncer é substancialmente influenciado por fatores ambientais, sendo que a dieta seria o mais importante deles (WALKER et al., 1976; KOLONEL et al., 2004). Uma análise posterior revelou ainda que a taxa de incidência de câncer na primeira geração de imigrantes foi menor quando comparada à segunda geração. Isso indica que os efeitos residuais de exposições durante a infância no risco de câncer na idade adulta também foram importantes e que as mudanças nos hábitos de vida e no meio ambiente não foram modificadas após a primeira geração (KOLONEL et al., 2004).

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2011), o câncer é a 2ª principal causa de morte no mundo. De um total de 58 milhões de mortes em 2005, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, ou seja, 13% delas. Desse total, mais de 70% ocorreram em países de média e baixa renda, ocasionados principalmente pelos cânceres de pulmão (mais de um milhão de mortes), estômago (cerca de 800 mil), cólon e reto (mais de 630 mil) e fígado (mais de 600 mil). Estima-se, ainda, que em 2015 o número total de óbitos pela doença atinja 9 milhões e mais de 11 milhões em 2030 (OMS, 2011).

O câncer também é importante causa de doença e morte no Brasil, sendo que a neoplasia maligna constitui-se na segunda causa de morte, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida e notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2011). As estimativas para o ano de 2010, válidas também para o ano de 2011, apontaram para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer na população brasileira. São esperados 236.240 casos novos para o sexo masculino e 253.030 para o feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma

(114 mil casos novos) tenha sido o mais incidente na população brasileira, seguido pelas neoplasias de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil) (**Figura 1**).

Figura 1. Tipos de cânceres mais incidentes estimados para 2011, exceto o de pele não melanoma, na população brasileira (INCA, 2010).

Devido a esses números crescentes, as políticas de prevenção do câncer são consideradas de fundamental importância, uma vez que 90-95% das causas são atribuídas ao estilo de vida e dieta, enquanto a outra parte menor é devida a fatores genéticos (PAUL et al., 2010).

2.2 Carcinogênese

Existem mais de 100 tipos e subtipos de neoplasias, que podem ser classificadas em benignas ou malignas. As primeiras apresentam uma proliferação celular localizada e circunscrita, exercendo pressão nos tecidos adjacentes, mas que não ultrapassam suas divisas. Em contraste, neoplasias malignas ou cânceres têm a capacidade de se multiplicar e invadir diferentes partes do organismo (HANAHA; WEINBERG, 2000). O desenvolvimento do câncer, ou seja, a carcinogênese, consiste em um processo longo, ainda não totalmente elucidado, envolvendo múltiplas etapas na transformação das células normais em células

neoplásicas (FARBER; SARMA, 1987; LOERB et al., 2003). O câncer pode ser considerado uma doença complexa que resulta de alterações simultâneas em genes geralmente relacionados à proliferação, diferenciação, reparo do DNA e morte celular (PARMIGIANI; CAMARGO, 2004). A perda do controle da proliferação e a aquisição de características associadas com a progressão neoplásica são consequências de alterações que ocorrem no conteúdo genético das células normais. A célula alterada, por adquirir maior capacidade de proliferação em relação às células vizinhas, sofre uma expansão clonal, transmitindo sua alteração a todas as células que, a partir dela, originam-se (LOERB et al., 2003; PARMIGIANI; CAMARGO, 2004).

A carcinogênese pode ser dividida em múltiplas etapas, que basicamente se classificam em: iniciação, promoção e progressão (PITOT, 2001; YOUNG; YANG e COLBURN, 2003). A iniciação é definida como uma fase com mudanças permanentes e irreversíveis nas células (PITOT et al., 1996), caracterizada por diversas modificações moleculares, incluindo danos no DNA (FARBER; SARMA, 1987) e mutações em genes específicos, como genes supressores de tumor e oncogenes. Essas mutações específicas diretas ou indiretas via formação de adutos no DNA, durante sua replicação ou durante o reparo de protooncogenes, seriam responsáveis pelo processo de iniciação, e um ciclo de proliferação celular fixaria tais mutações (FORMAN et al., 2004).

A etapa subsequente à iniciação é representada pela promoção que, por sua vez, apresenta longa duração (SING e GABY, 1991). Nessa etapa ocorre a expansão clonal seletiva das células iniciadas pela ação de um agente promotor formando, assim, lesões pré-neoplásicas (LPNs) (KLAUNIG et al., 2000; PITOT, 2001; YOUNG et al., 2003, FORMAN et al., 2004). Dessa forma, diferentemente da iniciação, a promoção é caracterizada pela sua reversibilidade que resulta da remoção do agente promotor (PITOT, 2001).

O último estágio, a progressão, é caracterizado por instabilidade cariotípica e metástase. Alterações na estrutura do genoma das células estão relacionadas, nesta etapa, com uma taxa de proliferação aumentada, com o caráter invasivo e alterações bioquímicas nas células (PITOT, et al., 1996; YOUNG et al., 2003). Além disso, considera-se ainda que eventos epigenéticos participem de todos os estágios da carcinogênese (JONES; BAYLIN, 2007).

2.3 Quimioprevenção do Câncer com Isoprenóides

Sabe-se que diversos compostos bioativos de alimentos (CBAs) são capazes de modular eventos biológicos distintos relacionados à carcinogênese e à quimioprevenção de neoplasias, como a proliferação celular e a apoptose (MO; ELSON, 2004); contudo, seus mecanismos de ação estão pouco compreendidos (AGGARWAL; SHISHODIA, 2006).

O termo quimioprevenção foi utilizado pela primeira vez por Michael Sporn, em 1976, como uma forma de se prevenir a doença por meio da administração de um ou mais compostos químicos durante as etapas iniciais pré-neoplásicas da carcinogênese, ou seja, na fase de iniciação/pós-iniciação ou promoção, e antes do estabelecimento da etapa de progressão, ou seja, do aparecimento de neoplasias (SPORN et al., 1976; LEE, PARK, 2003; RAJAMANICKAM, AGARWAL, 2008).

Segundo RAJAMANICKAM e AGARWAL (2008) um agente quimiopreventivo ideal deve apresentar:

1. Pouca ou nenhuma toxicidade;
2. Alta eficácia em múltiplos sítios;
3. Capacidade de ser consumido oralmente;
4. Mecanismo de ação conhecido;
5. Custo reduzido e;
6. Boa aceitação

Atualmente, produtos naturais têm recebido atenção especial na prevenção do câncer devido aos vários benefícios à saúde, pequena toxicidade, poucos efeitos colaterais e às limitações dos fármacos quimioterápicos (RAJAMANICKAM, AGARWAL, 2008). Dessa forma, a quimioprevenção é considerada mais apropriada para diminuir o risco ou até mesmo evitar o desenvolvimento do câncer (THIERY-VUILLEMIN et al., 2005, PAN, HO, 2008).

Dentre os inibidores da carcinogênese até agora identificados, podemos citar uma classe de compostos secundários derivados do metabolismo do mevalonato em plantas, os assim denominados isoprenóides, em função de sua ação promissora relatada na quimioprevenção e quimioterapia do câncer (ELSON, YU, 1994; MORENO et al., 1995; ELSON et al., 1999; RAO et al., 2002; LIU et al., 2004; PAN, HO, 2008).

A via do mevalonato é responsável pela formação do colesterol em mamíferos e de diversos isoprenóides no metabolismo secundário de plantas (MO; ELSON, 2004) (**Figura 2**).

Figura 2. Via resumida do mevalonato (Adaptada de PANAGIOTIS et al., 2007).

O colesterol é um dos principais componentes da membrana plasmática e é essencial para a proliferação e divisão celular. Desempenha papel vital na manutenção da integridade celular e na regulação da fluidez da membrana (BARKOVICH; LIAO, 2001; SUÁREZ et al., 2005).

Isoprenóides (ou terpenos) derivam seu nome do isopreno, uma molécula composta de cinco carbonos chamada também de unidade isoprênica (C5). A primeira etapa da via do mevalonato é a formação de acetil-CoA que se transforma em 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA e que, a seguir, é reduzida a mevalonato pela HMGCōA-redutase. Posteriormente, o mevalonato é convertido em pirofosfato de isopentenila (C5) e adições sucessivas de unidades isoprênicas vão formando os diversos isoprenóides. Assim, terpenos são classificados baseando-se no número de unidades isoprênicas presentes em sua estrutura: monoterpênos

(possuem dez carbonos e, assim, duas unidades isoprênicas), sesquiterpenos (3 unidades), diterpenos (4 unidades), sesterterpenos (5 unidades), triterpenos (6 unidades) e tetraterpenos (8 unidades) (BARKOVICH; LIAO, 2001).

A etapa crítica dessa via consiste justamente na formação do mevalonato que é catalisada por uma das enzimas mais reguladas da natureza: a 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima-A-redutase (HMGCoA-redutase) (MO; ELSON, 2004). Em animais de experimentação foi verificado que a HMGCoA-redutase é modulada por um controle multivalente, sendo reprimida por produtos esteróis como o colesterol em níveis transcricionais, e não esteróis, como os isoprenóides derivados do metabolismo do mevalonato, em níveis pós-transcricionais (GOLDSTEIN; BROWN, 1990).

Na carcinogênese, a HMGCoA-redutase apresenta uma atividade elevada e desregulada e, ainda, perda do mecanismo de retro-regulação inibitória do colesterol. Por outro lado, em LPNs e neoplásicas, essa enzima apresenta maior sensibilidade à regulação mediada pelos isoprenóides (GOLDSTEIN; BROWN, 1990). Em consequência de tal inibição, limitar-se-ia a disponibilidade de intermediários derivados da via do mevalonato, necessários à modificação pós-traducional de proteínas relacionadas com a proliferação celular, como as da família Ras, também envolvidas na carcinogênese de cólon em ratos e humanos (ELSON, 1995; ELSON et al., 1999; TATMAN; MO, 2002; MO; ELSON, 2004; PRETLOW, 2005). Esta poderia ser uma eventual explicação para a atividade inibitória do desenvolvimento de neoplasias, constatada após administração de isoprenóides (ELSON, 1995; MORENO et al., 1995; ELSON et al., 1999).

Esta modificação pós-traducional, também chamada de isoprenilação, consiste na incorporação covalente de isoprenóides a proteínas específicas resultando na correta localização dessas proteínas na membrana celular e na sua conseqüente ativação (EDWARDS; ERICSSON, 1999). Sendo assim, a prenilação de proteínas tem um papel crucial em processos celulares, como na transdução de sinais e em vias de tráfego intracelular (CASEY; SEABRA, 1996).

Foram observados efeitos benéficos de diferentes ácidos graxos poliinsaturados introduzidos na ração de animais submetidos a modelo de carcinogênese de cólon induzido pelo azoximetano (AOM) na ativação e localização de Ras na membrana celular, ou seja, alterações na isoprenilação dessa proteína (DAVIDSON et al., 1999). Além disso, a análise dos níveis de Ras no compartimento citoplasmático e na membrana celular demonstrou que dieta contendo maiores quantidades de óleo de peixe resultou em acúmulo dessa proteína no citoplasma e, conseqüentemente, menor ligação à membrana plasmática (ou seja, redução da

ativação) em ratos eutanasiados 12 e 36 semanas após a administração de AOM. Já ração com maiores quantidades de óleo de milho apresentou efeito contrário na modificação pós-traducional de Ras (SINGH et al., 1997). Os eventos associados aos resultados desses estudos podem estar relacionados com alterações na via do mevalonato e com a atividade de HMGC_oA-redutase resultando na diminuição de Ras prenilado para sua localização na membrana (SINGH et al., 1997; DAVIDSON et al., 1999).

Assim, de uma forma geral, as ações anticarcinogênicas de isoprenóides têm sido relacionadas à inibição da proliferação celular e estímulo da apoptose, decorrentes da supressão da via do mevalonato em LPNs e neoplásicas (ELSON, 1995; HE et al., 1997; MO; ELSON, 1999; LIU et al., 2004).

Crowell (1999) discutiu a relação entre monoterpenos e câncer, ressaltando como atributos quimiopreventivos ideais desses agentes, uma ação anti-neoplásica eficaz em animais de experimentação, disponibilidade comercial, baixo custo, biodisponibilidade oral e reduzida toxicidade, o que os tornaria candidatos potenciais para estudos de quimioprevenção contra o câncer em seres humanos.

Estudos *in vitro* demonstraram que monoterpenos podem inibir a isoprenilação pós-traducional de pequenas proteínas G tais como oncoproteínas da família Rás, envolvidas com vias de sinalização de proliferação celular (BARDON et al., 2002).

O geraniol (GO) (**Figura 3**), um monoterpeno acíclico encontrado naturalmente em óleos essenciais de plantas aromáticas, como a erva cidreira e o capim-limão, apresentou atividades quimiopreventivas em alguns modelos de carcinogênese (BURKE et al., 1997; CARNESECCHI et al., 2004). Além disso, é um conhecido regulador do metabolismo do mevalonato inibindo a enzima chave dessa via, a HMGC_oA-redutase, o que contribui para sua atividade antineoplásica (ELSON; YU, 1994).

Figura 3. Estrutura química do monoterpeno geraniol (SHOFF et al., 1991).

Esse isoprenóide causou inibição da proliferação celular da linhagem de adenocarcinoma humano CACO-2, com acúmulo de células na transição G1/S de transição do ciclo celular e, simultaneamente, inibição da síntese de DNA (CARNESECCHI et al., 2002).

Em outro estudo, foi investigada a eficácia anti-neoplásica do GO e do 5-fluorouracil (utilizado na quimioterapia do câncer de cólon) em culturas de células neoplásicas de cólon (CACO-2 e SW 620) quando administrados isoladamente ou em associação. Ambas as substâncias também foram avaliadas em neoplasias malignas humanas TC-118 transplantadas em camundongos. O GO causou aumento da tolerância ao 5-fluorouracil nas células neoplásicas. Em camundongos, a administração combinada de 5-fluorouracil e GO causou 53% de redução no volume da neoplasia, sendo que 26% desta redução foi observada com o GO isoladamente. Por outro lado, 5-fluorouracil isolado não mostrou efeito quimioterapêutico (CARNESECCHI et al., 2004).

Os efeitos do GO e da β -ionona na atividade da enzima HMG-CoA-redutase foram analisados em células MCF-7 de câncer de mama. GO inibiu a atividade da HMG-CoA-redutase nessas células, sendo que este efeito esteve estreitamente relacionado com a inibição da proliferação celular. Mevalonato exógeno, no entanto, não restaurou a proliferação das células inibidas pelo GO, indicando que essa relação não era causal. Já a β -ionona não inibiu a atividade da HMG-CoA-redutase, embora tenha inibido a proliferação celular de maneira dose-dependente (DUNCAN et al., 2004). Ainda que a depleção de mevalonato não tenha sido responsável pela inibição da proliferação celular por parte do GO e da β -ionona, ambos compostos produziram efeitos na regulação do ciclo celular que são, contudo, similares àqueles já previamente relatados em células na ausência de mevalonato. Esses resultados indicam que a compreensão dos efeitos inibitórios no ciclo celular pelos isoprenóides requer mais investigações a respeito dos mecanismos independentes do mevalonato (DUNCAN et al., 2004).

Burke et al. (1997) avaliaram a ação anticarcinogênica do GO e do farnesol em adenocarcinomas pancreáticos PC-1 transplantados em hamsters (BURKE et al., 1997) e os efeitos do álcool perilílico e do farnesol em biomarcadores de apoptose no câncer pancreático induzido em hamsters por N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BURKE et al., 2002). O GO e farnesol inibiram completamente a proliferação celular em neoplasias e tanto o farnesol quanto o álcool perilílico aumentaram o índice apoptótico nas mesmas. Estes efeitos ocorreram sem o desenvolvimento de toxicidade aparente nos animais e alteração na concentração plasmática de colesterol total. De acordo com os autores isto poderia indicar que o mecanismo de ação dessas substâncias possivelmente não se deu devido a inibição da

atividade da enzima HMGC_oA-redutase, mas sim, a um estímulo da apoptose. Os autores sugeriram, ainda, que isoprenóides da ração podem eventualmente representar potenciais agentes quimiopreventivos ou quimioterápicos, para a profilaxia e tratamento do câncer pancreático humano (BURKE et al., 1997, 2002).

Em trabalhos anteriores de nosso grupo, observou-se atividade quimiopreventiva do GO (na dose de 25 mg/100g de peso corpóreo [p.c.]) quando administrado continuamente durante a fase de iniciação e promoção ou apenas na promoção da hepatocarcinogênese em ratos submetidos ao modelo do Hepatócito Resistente (ONG et al., 2006; CARDOZO et al., 2011). Mais recentemente, o GO (na mesma dose utilizada nos estudos de hepatocarcinogênese, ou seja, 25 mg/100g p.c.) mostrou-se eficaz na quimioprevenção da carcinogênese de cólon experimental (VIEIRA et al., 2011).

Contudo, outros autores optaram por utilizar doses mais elevadas desse isoprenóide em células neoplásicas transplantadas em modelo murino. Shoff et al. verificaram que a dose de 50 mg/100 g p. c. reduziu os níveis de proliferação celular em células P388 de leucemia e de B16 de melanoma murínicos transplantadas em camundongos (SHOFF et al., 1991). Yu et al. (1995) observaram o mesmo efeito na dose de 100 mg/ 100 p. c. de GO em células B16 de melanoma transplantadas em camundongos (YU et al., 1995).

2.4 Carcinogênese de cólon

Evidências sugerem que a causa primária da origem do câncer de cólon esporádico seja a dieta. Quando analisamos, por exemplo, os dados epidemiológicos de imigrantes japoneses para o Havaí, observamos que estes apresentaram aumento significativo do desenvolvimento de neoplasias colônicas quando comparados aos japoneses que permaneceram no Japão, devido principalmente ao maior consumo de carne vermelha e menor ingestão de fibras (WALKER et al., 1976; KOLONEL et al., 2004).

Cerca de 95% dos câncers de cólon originam-se do tecido epitelial glandular. O epitélio intestinal é um tecido que apresenta proliferação celular elevada, sendo sua homeostase regulada por um balanço entre a proliferação, a apoptose e a diferenciação celular. Os tipos celulares diferenciados do intestino são derivados de uma célula progenitora pluripotente comum, a *stem cell* ou célula-tronco, localizada na base da cripta do cólon. No intestino grosso, a proliferação celular ocorre na região basal (zona proliferativa) das criptas intestinais onde a taxa de apoptose é muito reduzida. Células-tronco pluripotentes dividem-se e, quando diferenciadas, migram em direção à superfície da mucosa. Nas regiões superiores, o

processo de divisão celular cessa, sendo que na superfície epitelial da cripta as células senescentes são perdidas por uma forma de morte celular programada, chamada de *anoikis* (do grego: “sem lar”), em que a esfoliação precede a apoptose. Dessa forma, as células perdem sua propriedade de adesão o que, em contrapartida, induz a apoptose (RONCUCCI et al., 2000; JOHNSON, 2002; WONG, GIBSON, 2003).

A capacidade da célula de sofrer apoptose é determinada pela sua posição (ou hierarquia) na cripta e de possíveis mudanças às quais essas células são submetidas no meio extracelular à medida que alcançam o topo da cripta (POTTEN et al., 1997) (**Figura 4**).

Figura 4. Diagrama representando as zonas de uma cripta no cólon (JOHNSON, 2002).

A zona proliferativa da cripta também é responsável pela ocorrência de apoptoses espontâneas que atuam como um mecanismo de controle da expansão da população de células-tronco nas criptas, embora tal mecanismo ocorra em uma proporção significativamente menor no cólon, em comparação ao intestino delgado (POTTEN et al., 1997; JOHNSON, 2002). Considerando-se que o cólon apresenta uma menor capacidade de remover sua população adicional de células-tronco, o maior número dessas células resultaria em um aumento da quantidade de criptas susceptíveis ao desenvolvimento de mutações e, dessa forma, na expansão clonal das células iniciadas (POTTEN et al., 1997; WONG, GIBSON, 2003).

Assim, o cólon é uma das sedes mais frequentes de neoplasias primárias no organismo, sendo que o evento mais precoce em sua carcinogênese envolve o desequilíbrio da homeostase do epitélio colônico (POTTEN *et al.*, 1997; WONG, GIBSON, 2003).

Dados clínicos e histopatológicos confirmam que neoplasias colônicas malignas (adenocarcinomas) originam-se de neoplasias benignas (adenomas) preexistentes (FEARON, VOGELSTEIN, 1990). Dessa forma, uma associação entre carcinomas e pólipos de cólon foi descrita baseada em observações epidemiológicas e patológicas, sendo conhecida hoje como a clássica sequência ADENOMA – ADENOCARCINOMA (**Figura 5**). De uma forma geral, pode-se dizer que a carcinogênese de cólon é um processo que envolve múltiplas etapas, levando uma mucosa normal ao desenvolvimento do adenocarcinoma, através de uma série de alterações genéticas e epigenéticas (FEARON, VOGELSTEIN, 1990).

Figura 5. Sequência Adenoma-Adenocarcinoma na carcinogênese de cólon (GIL, ROWLAND, 2002).

Nos anos 1980, Ranjana Bird, examinando a superfície da mucosa de cólons corados com azul de metileno de ratos tratados com o carcinógeno específico de cólon AOM observou, sob microscópio de luz, a presença de criptas que apresentavam maior tamanho e espessura, e que se coravam mais intensamente quando comparadas às criptas ao redor (BIRD, 1987). Essas criptas foram denominadas de aberrantes e consideradas prováveis precursoras do câncer de cólon experimental. Essas lesões tendiam a se agrupar em

aglomerados sendo, por isso, chamadas de focos de criptas aberrantes (FCAs), os quais aumentavam de tamanho com o tempo. Esses focos foram posteriormente descritos na mucosa do cólon de seres humanos (PRETLOW et al., 1991) e amplamente associados com o risco de desenvolvimento de câncer.

A indução, especificidade, crescimento, alterações morfológicas, genéticas e epigenéticas dos FCAs confirmam a noção de que são LPNs. Características chaves sustentam essa hipótese: vários FCAs exibem atipias proliferativas e moleculares em comum com aquelas encontradas no câncer de cólon. Com isso, nota-se a importância desses biomarcadores na compreensão da patogênese desse tipo de câncer (MECLELLAN; MEDLINE; BIRD, 1991; BIRD; GOOD, 2000).

Por outro lado, somente um determinado grupo de FCAs desenvolve-se em adenomas, alguns dos quais, subseqüentemente, em adenocarcinomas. Esse fato inclui o conceito de que essas lesões precursoras podem regredir ou apenas deixarem de progredir (BIRD, 1995). Além disso, há indícios de que FCAs podem se originar de eventos de iniciação independentes e, quando examinados histologicamente, podem mostrar características morfológicas distintas, variando de hiperplasia a diferentes graus de displasia (atipia celular envolvida com a progressão da carcinogênese) (CHENG; LAI, 2003).

Levando-se em consideração a origem dos FCAs, dois pontos devem ser destacados: o primeiro é que os FCAs são dinâmicos por natureza, passíveis de crescimento e expansão, podendo diferir quanto ao número e características; o segundo é que, no decorrer dessa dinâmica, os FCAs podem sofrer várias alterações genéticas e epigenéticas, adquirir novos fenótipos favoráveis a sua progressão e rejeitar aqueles que o tornariam susceptíveis à regressão (RAJU, 2008).

Assim, de acordo com Raju (2008), basicamente dois tipos de FCAs podem ser reconhecidos, tanto em roedores quanto em humanos: convencionais (ou hiperplásicos) e displásicos. FCA convencional/hiperplásico é a variedade mais comum no qual geralmente predomina a mutação ou hipometilação em *K-Ras*, mas evidências sugerem menor probabilidade de que progrida para o câncer. Menos comum, porém mais agressivo, é o FCA displásico, uma provável lesão precursora e mais relacionada à progressão neoplásica. Os dois tipos podem apresentar aumento de proliferação celular, mas somente FCAs displásicos apresentam uma predominância de mutações no gene *APC* (*Polipose Adenomatosa Coli*) ou no gene *Cttnb1* (que codifica para a proteína beta-catenina [BC]) e podem ser considerados precursores de adenomas e adenocarcinomas (**Figura 6**) (RENEHAN et al., 2001; RAJU, 2008).

Figura 6. Representação pictórica da dinâmica de FCAs durante a carcinogênese do cólon induzida em ratos. (A): criptas normais antes das injeções do carcinógeno; (B): FCAs hiperplásicos com cerca de 8 semanas após as injeções; (C): FCAs hiperplásicos e displásicos com cerca de 12 semanas após as injeções; (D): FCAs hiperplásicos, displásicos e neoplasias com aproximadamente 24 semanas após as injeções do carcinógeno (RAJU, 2008).

Atualmente, diferentes biomarcadores têm sido descritos na carcinogênese de cólon, todos relacionados à presença ou ausência de displasia. Mori et al. (2004) identificaram FCAs positivos para BC (FPBCs) citoplasmática e/ou nuclear por métodos imunoistoquímicos e Caderni et al. (2003) observaram focos depletados de mucina (FDMs) em cólons não seccionados corados com azul de alcian também descritos posteriormente em humanos (FEMIA et al., 2008). Paulsen et al. (2005) identificaram os chamados “FCAs planos”, caracterizados por abertura luminal comprimida, coloração azul brilhante e por criptas não elevadas em relação à mucosa ao redor. Essas últimas lesões podiam ser vistas em cólons não seccionados corados com azul de metileno e analisados por transluminação em microscópio de luz invertida (PAULSEN et al., 2005). Todas as lesões citadas apresentam graus variados de displasia, redução na produção de mucina e controle alterado da via de sinalização de BC, o que não é observado nos FCAs convencionais, caracterizados por hiperplasia, expressão normal de BC e crescimento lento das criptas, o que não estaria diretamente relacionado ao desenvolvimento de neoplasias malignas.

Na maioria dos cânceres de cólon esporádicos (assim também como no caso da síndrome de Polipose Adenomatosa Familiar) uma consequência da mutação do gene *APC* ou *BC* é justamente o acúmulo de BC citoplasmática e/ou nuclear (MORI et al., 2004). Normalmente, a proteína APC forma um complexo com BC, axina e glicogênio sintase-3-beta quinase (GSK3 β). A axina promove fosforilação de BC e, assim, direciona a sua degradação no proteassomo. A mutação de *APC* (ou do gene *Ctnnb1*) impede a formação desse complexo e permite o acúmulo de BC no citoplasma onde esta se associa ao fator de transcrição Tcf4. Ambos translocam-se para o núcleo com consequente ativação da transcrição de oncogenes como o *c-myc* (CORPET; PIERRE, 2005) (**Figura 7**).

Figura 7. Via de sinalização da BC (MORI et al., 2004).

Sabe-se que a proteína *c-myc* é um fator de transcrição que regula outros genes relacionados com a progressão do ciclo celular, sobrevivência e metabolismo de células normais e neoplásicas. Assim, conforme mencionado, ele é um dos principais genes-alvos regulados pela via da BC e a desregulação de sua expressão, já aumentada em fases iniciais da carcinogênese de cólon, pode ser atribuída à inativação de *APC* ou à alteração de *BC* (**Figura 8**) (FEARON, 2011).

Figura 8. Expressão alterada de *c-myc* na carcinogênese de cólon (FEARON, 2011).

O uso de um determinado biomarcador depende fundamentalmente do estágio da carcinogênese de cólon em que está sendo estudado. FCAs displásicos, FDMs e FPBCs, todos LPNs com natureza displásica têm sido mais relevantes para o desenvolvimento de câncer de cólon em fases mais tardias, enquanto os FCAs convencionais formam a grande maioria das LPNs induzidas em fases mais iniciais e precoces da carcinogênese de cólon (RAJU, 2008; XIAO et al., 2008). Também há uma discussão na literatura sobre qual seria o biomarcador ideal a ser utilizado em estudos de quimioprevenção, já que pesquisas vêm demonstrando resultados contraditórios, como a falta de correlação entre FCAs convencionais e a incidência de adenocarcinomas ou relacionando dificuldades técnicas de obtenção de cortes histológicos em cólons para marcação imunoistoquímica de BC (FEMIA et al., 2004; MORI et al., 2004; PAULSEN et al., 2005; FEMIA et al., 2008; RAJU, 2008).

Além disso, não podemos excluir a possibilidade de que FCAs convencionais sejam também precursores de subgrupos de cânceres de cólon. Isso é suportado por linhas de evidência como: 1) FCAs convencionais são clonais; 2) apresentam algumas alterações moleculares comuns às encontradas no câncer de cólon; 3) apresentam distribuições anatômicas semelhantes aos locais de aparecimento dos cânceres de cólon e 4) têm sido descrito FCAs mistos, com criptas convencionais (não-displásicas) e displásicas presentes no mesmo foco. Assim, uma alteração no gene *K-Ras* pode preceder a de *APC* ou *BC* (SUEHIRO, HINODA, 2008), sugerindo que alguns FCAs convencionais possam representar

estágios mais precoces dos FCAS displásicos e, com isso, transformarem-se em lesões com displasia grave e ativação aberrante da via de sinalização da BC. Isso pode ocorrer levando-se em conta que várias alterações genéticas e epigenéticas estão presentes durante a carcinogênese e que altas e múltiplas doses de carcinógeno são administradas em modelos experimentais (PAULSEN et al., 2005).

Portanto, a heterogeneidade dos FCAs deve ser considerada nesse tipo de pesquisa, realizando-se, para isso, a análise dos biomarcadores existentes na carcinogênese experimental de cólon, já que as categorias de LPNs podem apresentar diferentes potenciais de crescimento e reagir de formas distintas a um determinado composto quimiopreventivo.

2.5 Modelo experimental de carcinogênese de cólon

Visto que o padrão de desenvolvimento de neoplasias de cólon em ratos é semelhante ao observado em humanos (PRETLOW, 1991), modelos experimentais de carcinogênese de cólon vêm sendo considerados dentre os melhores para o estudo de neoplasias *in vivo* (BANERJEE; QUIRKE, 1998).

DMH é um carcinógeno completo e indireto que precisa ser metabolizada pelas enzimas do tecido hepático (CYP2E1) e colônico ou, possivelmente, pela ação da flora bacteriana em conjunto com sistemas de ativação no cólon (DIAS et al., 2006).

Esse potente carcinógeno é muito utilizado em estudos de efeitos da dieta em diferentes etapas da carcinogênese de cólon. Tratamentos com substâncias presentes na alimentação podem ser iniciados antes da exposição à DMH, durante a fase de iniciação, durante a fase de pós-iniciação precoce e/ou tardia ou ainda na fase de progressão. Agentes quimiopreventivos podem ser classificados em dois principais grupos: aqueles que afetam a iniciação bloqueando ou reparando o efeito genotóxico do carcinógeno (agentes bloqueadores) e aqueles que afetam os eventos de pós-iniciação atuando, por exemplo, na proliferação de células iniciadas (agentes supressores) (BIRD, 1995; GREENWALD et al., 1995; WARGOVICH et al., 2000). Com isso nota-se a importância da escolha do protocolo experimental, visto que o agente testado pode inibir, bem como promover, o desenvolvimento de câncer dependendo de qual fase da carcinogênese esteja ocorrendo a sua intervenção.

Além disso, a DMH é altamente específica para o cólon. Neoplasias induzidas por esse composto são de origem epitelial com histologia, morfologia e anatomia similares às neoplasias humanas, o que torna esse modelo excelente para estudos (NEWELL; HEDDLE, 2004).

Esse carcinógeno é metabolicamente ativado em vários compostos que apresentam a capacidade de metilar o DNA. Primeiramente a DMH é oxidada no fígado transformando-se em azometano e este é oxidado novamente a AOM. Posteriormente, por n-hidroxilação, AOM é convertido a metilazoximetanol que será conjugado com o ácido glicurônico e secretado pela bile. Ao atingir o intestino é hidrolisado por beta-glicuronidases produzidas pelas bactérias intestinais e, portanto, desconjugado novamente a metilazoximetanol. Este último é oxidado a metilazoxiformaldeído, transformando-se em metildiazônio que forma o íon carbônio, que, por sua vez, pode causar metilação do material genético das células epiteliais do cólon (**Figura 9**) (SOHN et al., 2001).

Figura 9. Esquema do metabolismo da DMH (Modificado de SOHN et al., 2001).

Dessa forma, o modelo que utiliza o carcinógeno DMH induz mudanças histológicas e moleculares na mucosa intestinal de roedores que se assemelham à sequência adenoma-adenocarcinoma observada em humanos (GUSTIN; BRENNER, 2002), onde a primeira, menor e mais precoce evidência histopatológica reconhecida em ambos os casos é a formação de FCAs.

2.6 Diferentes doses de GO e eventuais efeitos sobre as categorias de LPNs existentes na carcinogênese de cólon

A constatação de que o GO foi capaz de exercer atividade quimiopreventiva no modelo de carcinogênese de cólon induzido pela DMH (VIEIRA et al., 2011) sugere a importância de uma avaliação mais aprofundada do efeito de outras doses desse isoprenóide na carcinogênese de cólon durante uma fase mais tardia à administração do carcinógeno, na qual ocorre o desenvolvimento de LPNs heterogêneas, com características variando de hiperplasia a diferentes graus de displasia.

Sendo assim, optou-se por avaliar eventuais efeitos de diferentes doses de GO em categorias de LPNs induzidas durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon, além de possíveis mecanismos de ação envolvidos. Apesar da existência de alguns estudos demonstrando a atividade anti-neoplásica do GO, não há relatos da ação desse monoterpene isolado na carcinogênese de cólon *in vivo* envolvendo diferentes biomarcadores.

III- Objetivos

1. Geral

Avaliar os eventuais efeitos quimiopreventivos de diferentes doses de GO em categorias de LPNs induzidas durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

2. Específicos

2.1 – Verificar os eventuais efeitos de diferentes doses do GO em relação:

2.1a: à análise de FCAs;

2.1b: à presença de mucina em FCAs;

2.1c: aos critérios histopatológicos dos FCAs;

2.1d: à localização da proteína beta-catenina (BC) em FCAs

2.2 - Verificar possíveis mecanismos de ação envolvidos por meio da:

2.2a: determinação da concentração plasmática de colesterol total

2.2b: análise de apoptose em FCAs;

2.2c: análise da expressão de *HMGCoA-redutase* na mucosa colônica;

2.2d: análise da expressão de *K-Ras* e *c-myc* em FCAs microdissecados.

IV- Metodologia

4.1 Animais

Foram utilizados neste estudo 86 ratos albinos da linhagem Wistar, com pesos iniciais compreendidos entre 40 e 50 g e obtidos da colônia do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Estes permaneceram durante todo o experimento em sala desse mesmo biotério nas seguintes condições: temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo de iluminação claro (7 hs às 19 hs) e escuro (19 hs às 7 hs) e receberam *ad libitum* durante todo o experimento, água destilada e ração comercial peletizada comum para roedores de laboratório (Purina Nutrimentos Ltda., Brasil). Os pesos corpóreos foram avaliados diariamente.

Os ensaios biológicos foram realizados nas dependências do biotério da FCF/IQ-USP, após a devida aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais de Experimentação em ambiente apropriado para condução de estudos de carcinogênese (Protocolo nº 239).

4.2 Protocolo Experimental

Após um período de aclimação de 7 dias, 80 animais foram submetidos a modelo de carcinogênese de cólon (**Figura 10**) (WARGOVICH et al., 2000; DIAS et al., 2006). Além desses, 6 animais constituíram um grupo “normal” (N), que não foram submetidos a qualquer procedimento experimental durante todo o estudo, mas que permaneceram nas mesmas dependências em que os demais até serem eutanasiados. O modelo consistiu na administração intraperitoneal de 4 doses de dimetilhidrazina (DMH 40mg/Kg de p.c.), dissolvidas em solução de EDTA (37 mg/100 mL de água destilada, pH=6.0) distribuídas na primeira e segunda semana de experimento (2 doses em cada semana). Todos os animais começaram a receber GO cinco semanas após a última dose de DMH (correspondendo à fase de pós-iniciação do modelo) e foram eutanasiados ao final da 16ª semana (DIAS et al., 2006 com modificações).

Considerando-se que o GO foi dissolvido em óleo de milho (OM) antes de ser administrado aos animais, e que este pode interferir na carcinogênese de cólon (WU et al., 2004), os efeitos desse veículo foram controlados. Para tanto, todos os animais que não receberam o tratamento com GO, receberam OM.

Dessa forma, os grupos experimentais, além do grupo N, foram os seguintes:

Grupo OM: este grupo foi composto por 20 animais tratados diariamente via entubação intragástrica com óleo de milho (Mazola[®]; 0,25 mL/100 g p.c./dia);

Grupo GO1: este grupo foi composto por 20 animais tratados diariamente via entubação intragástrica com geraniol (98%; Sigma, EUA; 25 mg/100 g p.c./dia) dissolvido em OM (Mazola[®]; 0,25 mL/100 g p.c./dia);

Grupo GO2: este grupo foi composto por 20 animais tratados diariamente via entubação intragástrica com geraniol (98%; Sigma, EUA; 50 mg/100 g p.c./dia) dissolvido em OM (Mazola[®]; 0,25 mL/100 g p.c./dia);

Grupo GO3: este grupo foi composto por 20 animais tratados diariamente via entubação intragástrica com geraniol (98%; Sigma, EUA; 100 mg/100 g p.c./dia) dissolvido em OM (Mazola[®]; 0,25 mL/100 g p.c./dia);

Figura 10. Protocolo experimental.

4.3 Eutanásia dos animais e coleta do material

Ao final da 16ª semana de experimento os animais foram anestesiados com éter (Synth, Brasil) e colocados em decúbito dorsal sobre uma prancha, realizando-se a laparotomia e, em seguida, a coleta de sangue por punção da artéria aorta abdominal. O sangue coletado foi mantido em tubos de polipropileno contendo 5 mg de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, Sigma, EUA) e reservado para imediata determinação da concentração plasmática de colesterol total. A eutanásia ocorreu por secção da aorta abdominal e conseqüente choque hipovolêmico.

O cólon de todos os ratos foi removido e lavado em solução fisiológica gelada a 0,9% (ZHENG et al., 1999). A seguir, foi aberto longitudinalmente, sendo que para a análise foram consideradas somente as porções média e distal até o ânus (dividindo-se o segmento ao meio), descartando-se a região proximal caracterizada por ser estriada e não apresentar número significativo de FCAs.

Após a retirada e limpeza, os cólons foram processados da seguinte maneira:

- Cólons de 10 animais de cada grupo foram estendidos utilizando-se alfinetes e um isopor e, em seguida, fixados em formalina tamponada a 10%. Após 24 hs foram transferidos para álcool 70% (CHANG et al., 1997; DAVIDSON et al., 2000; DIAS et al., 2010) e estocados a 4°C (WALI et al., 2002) para a identificação de LPNs e posterior preparo de cortes histológicos tangenciais à superfície (ou seja, transversais às criptas) de 5 µm de espessura para o exame histopatológico e realização de imunoistoquímica para BC;
- Cólons de outros 10 animais de cada grupo, incluindo todos do grupo N, foram armazenados a -80°C para a posterior raspagem da mucosa e preparo de cortes histológicos no criostato para a microdissecção de FCAs.

4.4 Determinação das concentrações de colesterol plasmático total

Imediatamente após sua retirada, o sangue foi adicionado a tubos de centrífugas contendo 500 µl de EDTA (10 µg/µl), e centrifugado a 3500 g, a 4°C, por 10 min. Utilizou-se o “kit” enzimático-espectrofotométrico para a determinação de colesterol total (BioSystems, Espanha). Este se baseia em reações enzimáticas em que o colesterol presente na amostra (esterificado e não-esterificado) é oxidado produzindo-se, em última instância, um complexo colorido quantificável espectrofotometricamente. O procedimento

foi o indicado pelo fabricante: 10 µL de amostra de plasma foram adicionados a 1 mL do reagente fornecido com o “kit”. A solução foi homogeneizada e mantida a temperatura ambiente durante 10 min. Decorrido esse tempo, foi realizada leitura espectrofotométrica (U 3410, Hitachi, Japão) das amostras a 500 nm. As absorbâncias das amostras de plasma foram comparadas à de uma amostra padrão de colesterol (200 mg/dL), que também foi fornecida juntamente com o “kit”. De todos os valores de absorbância foi descontada a leitura do branco (1 mL de reagente, sem a adição de amostra ou padrão). Todas as determinações de colesterol plasmático total foram realizadas em triplicata.

4.5 Análise e contagem de FCAs

Os cólons fixados em formalina e armazenados em álcool 70% foram corados com azul de metileno a 0,2% por 10 minutos e, em seguida, analisados ao microscópio (Olympus; Japão) no aumento de 40X quanto à incidência de FCAs, número de criptas por foco (multiplicidade: <4 ou ≥ 4 criptas) além da sua localização no cólon (região medial ou distal) (WALI et al., 2002; WU et al., 2004; DIAS et al., 2010). Os FCAs foram caracterizados por dilatações na abertura luminal, epitélio mais espesso e coloração mais intensa quando comparados às criptas vizinhas (BIRD, 1987).

4.6 Análise e contagem de focos depletados de mucina (FDMs) ou positivos para mucina (FPMs)

Os cólons foram descorados com álcool 70% e corados com azul de toluidina 0,025% por 10 minutos. Em seguida foram analisados ao microscópio (Olympus; Japão) no aumento de 40X quanto à presença ou não de mucina no lúmen dos FCAs de acordo com DIAS et al. (2010).

4.7 Contagem e classificação histopatológica dos FCAs

A mucosa colônica foi embebida em parafina e foram realizados cortes histológicos de 5 µm seriados tangencialmente à superfície (transversais às criptas) de toda a extensão do cólon para a coloração com hematoxilina e eosina (HE). As lesões foram classificadas em convencionais ou displásicas por critérios histopatológicos como estratificação e despolarização nuclear, presença de células caliciformes e espessura epitelial (PAULSEN et al., 2005).

4.8 Imunoistoquímica para BC

A mucosa colônica foi embebida em parafina e foram realizados cortes histológicos de 5 µm seriados transversais às criptas de toda a extensão do cólon para análise de imunoistoquímica para BC. Para tanto, as secções foram incubadas *overnight* a 4°C com o anticorpo primário para proteína BC (Sigma, EUA) (diluição de 1:2000) depois de bloqueio com água oxigenada durante 20 minutos a temperatura ambiente. Em cada reação, uma lâmina sem o anticorpo primário foi utilizada como controle negativo. FCAs com padrão de marcação citoplasmática e/ou nuclear de BC foram classificados em focos positivos para BC (FPBCs) e FCAs com padrão de marcação de membrana celular, mas negativos para marcação citoplasmática e/ou nuclear foram classificados em focos negativos para BC (FNBCs) (MORI et al., 2004; SHENG et al., 2006).

4.9 Análise da apoptose no cólon distal

Células em apoptose foram analisadas em FCAs ≥ 4 convencionais ou displásicos em cortes histológicos de 5 µm seriados transversais às criptas coradas em HE do cólon distal. Índices de Apoptose (IA%) para cada tipo de FCAs foram obtidos através da seguinte fórmula:

$$IA_{FCAs} (\%): \frac{\text{Número de células epiteliais colônicas em apoptose}}{\text{Número de células epiteliais colônicas no FCAs}} \times 100$$

Obs: FCAs foram utilizados como unidades de comparação

A apoptose em células epiteliais colônicas foi identificada através de características morfológicas típicas do processo apoptótico (retração celular, fragmentação e condensação cromatínica e formação de corpos apoptóticos) (DIAS et al., 2006).

4.10 Análise da expressão de *HMGCoA-redutase* na mucosa colônica por meio da Reação em Cadeia de Polimerase - Transcriptase Reversa (RT-PCR)

4.10.1 Extração de RNA de tecido total:

A extração de RNA total a partir da mucosa colônica foi realizada de acordo com instruções do Kit illustra RNAspin Mini RNA Isolation (GE Healthcare, Alemanha). A concentração de RNA das amostras foi determinada pela leitura da absorbância em 260 nm em espectrofotômetro NanoDrop (Nanodrop ND-1000, ThermoScientific), sendo a pureza determinada pela razão entre os valores de 260 nm e 280 nm. A qualidade do RNA obtido foi verificada em gel de agarose a 1,2% com *GelRed* (Biotium, CA, USA) (considerado satisfatória quando observada a integridade das bandas 18S e 28S) e por meio da razão espectrofotométrica entre DO260/DO280 (considerado satisfatória entre 1,8 e 2,0).

4.10.2 Conversão do RNA para cDNA pela enzima transcriptase reversa

A síntese de cDNA a partir de RNA total (200 ng) ocorreu em 20 µL de uma mistura de transcrição reversa (RT), a 40°C por 90 min. Essa mistura consistiu de: KCl 50 mM; Tris-HCL 10 mM (pH 8,3); MgCl₂ 5 mM; 0,25 U de transcriptase reversa C-Master RT enzyme (Eppendorf AG; Alemanha), 1 U de inibidor de RNase, iniciador oligo-dT 0,125 pM e mistura de dNTP 1 mM.

4.10.3 Amplificação dos genes *HMGCoA-redutase* e *Beta-Actina (BA)* da mucosa colônica

Inicialmente, foram testados múltiplos ciclos (tempos e temperaturas de desnaturação, associação, extensão e extensão final) em termociclador Eppendorf epMastercycler “S” com gradiente de temperatura (Eppendorf AG, Alemanha), no sentido de se determinar aquelas condições ideais de PCR para cada gene. Assim, foi inicialmente determinado o ciclo em que a amostra apresentando a maior expressão alcançou um platô de amplificação, adotando-se um número de ciclos menor do que este que foi determinado, em fase exponencial da amplificação. Os oligos iniciadores foram desenhados de acordo com banco de dados para *Ratus Novergicus*, NCBI. Suas sequências, bem como as respectivas temperaturas de anelamento e tamanho final dos produtos, encontram-se descritos na **Tabela 1**.

Como controle endógeno (gene normalizador), avaliou-se a expressão do gene *BA* (DHINGRA, BANSAL, 2006).

As reações de amplificação por PCR com um quinto do produto da transcrição reversa

constituíram-se em: KCL 50 mM; Tris-HCL 10 mM (pH 8,3); MgCl₂ 2,5 mM; oligos iniciadores direito 5' 20 pmol; oligos iniciadores reverso 3' 20 pmol e 2,5 U de Taq DNA polimerase (Eppendorf AG, Alemanha). Estas foram realizadas em termociclador Eppendorf epMastercycler (Eppendorf, Alemanha), iniciada a 95°C por 5 min. e a amplificação dos genes *HMGC α -redutase* e *BA* foram conduzidas por 34 ciclos: 40 s. à 95°C, 1,5 min. à temperatura de associação 60°C, 1,0 min. à 72°C e 10 min. de extensão final a 72°C.

Os cDNAs amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com *GelRed* (Biotium, CA, USA) a 100V por aproximadamente 1 hora. Em seguida, o mesmo foi exposto à luz UV possibilitando avaliar e fotografar as bandas dos genes amplificados, bem como determinar sua intensidade por meio de um sistema de análise de imagens baseado em densitometria (MultiDoc-IT Imaging System, UVP, Canada, USA), utilizando-se, para tanto, o programa Quantity One (Bio-Rad v.4.3.6, Hercules, CA, USA). Os sinais foram quantificados em unidades arbitrárias e os dados obtidos, normalizados utilizando-se a quantificação do gene *BA*.

4.11 Microdissecção de FCAs

Com a utilização de um sistema para microdissecção foi possível isolar FCAs da mucosa colônica para condução de técnicas de biologia molecular. Secções seriadas da mucosa colônica de 10 μ m de espessura foram inicialmente obtidas utilizando-se, para tanto, criostato 2800N (Reichert Jung, Alemanha) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP. A seguir, estes cortes foram montados em lâminas de vidro (uma média de 20 lâminas por animal para se obter uma quantidade suficiente de FCAs) e imediatamente corados com azul de metileno 0,02% por 15 minutos. Vale ressaltar que todas as soluções foram preparadas utilizando-se água previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), para garantir soluções livres de RNAses.

O sistema de microdissecção consiste, basicamente, de uma agulha ultrassônica de corte, uma micropipeta e de um equipamento eletrônico para controlá-las simultaneamente (MicroDissector modelo PPMD, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). As duas ferramentas, ou seja, a agulha e a micropipeta, estão conectadas a micromanipuladores motorizados controlados por “joystick” e que possibilitam a movimentação tridimensional (TransferMan NK2, Eppendorf AG), adaptados a um microscópio invertido trinocular com platina mecânica, modelo Axiovert 40 C (Carl Zeiss, Alemanha). Normalmente, um volume total de 30 μ L pode ser continuamente aspirado em menos de 1 min., possibilitando a microdissecção

de >1000 células.

A microdissecção foi realizada basicamente de acordo com HARSCH et al. (2001). Os cortes foram inicialmente recobertos com 500 µL de álcool absoluto, localizando-se, em seguida, a área de interesse a ser dissecada. A seguir, a frequência e amplitude da agulha de microdissecção foram devidamente ajustadas (de 25 a 55 kHz e de 0 a 2 µm), observando-se a interação da mesma com o tecido. A micropipeta equipada com ponteira GEloader com filtro MDS (Eppendorf AG, Alemanha) possibilitou, então, a aspiração contínua das partículas de tecido geradas e do álcool, após o posicionamento próximo (máximo 400 µm) da área a ser dissecada. A lesão tecidual é evitada, graças à elasticidade dessa ponteira. A taxa de aspiração do álcool foi regulada na unidade de controle e ajustada à velocidade de microdissecção.

Após a dissecção, o álcool contendo as partículas de tecido geradas foi, então, transferido para um tubo de microcentrífuga, por meio da própria micropipeta de aspiração sendo agora utilizada em seu modo de ejeção (HARSCH et al., 2001).

Figura 11. Foto do equipamento de microdissecção.

Por meio da utilização de uma agulha ultrassônica, a área de interesse do tecido é fragmentada em partículas celulares, que são aspiradas para o interior de micropipeta.

4.12 Análise da expressão de *K-Ras* e *c-myc* em FCAs microdissecados por meio de RT-PCR

4.12.1 Extração de RNA de FCAs microdissecados

Após evaporação do álcool absoluto em um concentrador a vácuo SS32 Speed Vac (Savant, NY, USA), a extração de RNA de amostras de fragmentos microdissecados de mucosa de ratos normais e de FCAs foi realizada pelo método do

fenol/clorofórmio/isopropanol (FU et al., 2003). Cada amostra foi inicialmente homogeneizada com 100 μ L de solução desnaturante. Após incubação em gelo (aproximadamente 5 a 10 minutos), foi realizada uma centrifugação a 15.000 g para remoção dos “debris” celulares. O sobrenadante foi removido e transferido a um novo tubo, para adição de fenol saturado e clorofórmio. Após incubação em gelo e centrifugação a 15.000 g, a fase aquosa da solução contendo RNA foi removida e o procedimento de extração com fenol e clorofórmio foi repetido por duas vezes. A solução contendo o RNA foi adicionada de isopropanol e submetida à centrifugação a 15.000 g durante 15 minutos para a precipitação do RNA. Este precipitado foi lavado com etanol a 80% e ressuscitado em 10 μ L de água livre de RNase. Todas as etapas de centrifugação e incubação foram realizadas a 4°C. A concentração de RNA das amostras foi determinada pela leitura da absorbância em 260 nm em espectrofotômetro NanoDrop (Nanodrop ND-1000, ThermoScientific), sendo a pureza determinada pela razão entre os valores de 260 nm e 280 nm. A qualidade do RNA obtido foi verificada em gel de agarose a 1,2% com *GelRed* (Biotium, CA, USA) (considerado satisfatória quando observada a integridade das bandas 18S e 28S), e por meio da razão espectrofotométrica entre DO260/DO280 (considerado satisfatória entre 1,8 e 2,0).

4.12.2 Tratamento com a enzima DNase

Após a extração do RNA total foi realizado um segundo tratamento com a enzima DNase (Invitrogen, EUA), com o objetivo de remover qualquer DNA contaminante da amostra. Para tanto, o RNA foi tratado com DNase durante 15 min à 37°C. Logo a seguir, foi adicionado EDTA e a temperatura foi elevada para 65°C por 10 min para inativação da DNase (FU et al., 2003). O RNA foi quantificado novamente e armazenado a -80°C até sua utilização.

4.12.3 Conversão do RNA para cDNA pela enzima transcriptase reversa

A síntese de cDNA a partir de RNA total dos FCAs microdissecados (200 ng) ocorreu em 20 μ L de uma mistura de transcrição reversa (RT), a 40°C por 90 min. Essa mistura consistiu de: KCl 50 mM; Tris-HCL 10 mM (pH 8,3); MgCl₂ 5 mM; 0,25 U de transcriptase reversa C-Master RT enzyme (Eppendorf AG; Alemanha), 1 U de inibidor de RNase, iniciador oligo-dT 0,125 pM e mistura de dNTP 1 mM.

4.12.4 Amplificação dos genes *K-Ras*, *c-myc* e *BA* de FCAs microdissecados

A análise da expressão do gene *K-Ras* a partir do RNA extraído após a microdissecção dos FCAs colônicos foi realizada por RT-PCR duplex. Como controle positivo e controle endógeno (gene normalizador) avaliou-se a expressão do gene *BA* (DHINGRA, BANSAL, 2006). Já a análise da expressão do gene *c-myc* não foi possível por meio de RT-PCR duplex, mas as reações de PCR foram realizadas ao mesmo tempo no termociclador e submetidas às mesmas condições eletroforéticas. Avaliou-se também a expressão do gene *BA* como controle positivo e controle endógeno (gene normalizador).

As reações de amplificação por PCR com um quinto do produto da transcrição reversa constituíram-se em: KCL 50 mM; Tris-HCL 10 mM (pH 8,3); MgCl₂ 2,5 mM; oligos iniciadores direito 5' 20 pmol; oligos iniciadores reverso 3' 20 pmol e 2,5 U de Taq DNA polimerase (Eppendorf AG, Alemanha). Estas foram realizadas em termociclador Eppendorf epMastercycler (Eppendorf, Alemanha). Para *K-Ras* a reação foi iniciada a 95°C por 5 min. e a amplificação dos genes foi conduzida por 36 ciclos: 30 s. à 95°C, 30 s à temperatura de associação 65° C, 30 s à 72°C e 10 min. de extensão final a 72°C. Para *c-myc*, esta foi iniciada a 95°C por 5 min. e a amplificação dos genes foi conduzida por 37 ciclos: 30 s. à 95°C, 30 s. à temperatura de associação 57° C, 30 s à 72°C e 5 min. de extensão final a 72°C. Os oligo iniciadores utilizados também estão indicados na **Tabela 1**.

Os cDNAs amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com *GelRed* (Biotium, CA, USA) a 100V por aproximadamente 1 hora. Em seguida, o mesmo foi exposto à luz UV possibilitando avaliar e fotografar as bandas dos genes amplificados, bem como determinar sua intensidade por meio de um sistema de análise de imagens baseado em densitometria (MultiDoc-IT Imaging System, UVP, Canada, USA), utilizando-se, para tanto, o programa Quantity One (Bio-Rad v.4.3.6, Hercules, CA, USA). Os sinais foram quantificados em unidades arbitrárias e os dados obtidos normalizados utilizando-se a quantificação do gene *BA*.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores dos transcritos dos genes alvo, tamanho do produto e temperatura de anelamento, utilizados para análise de transcriptase reversa RT-PCR.

Gene		Sequência dos Oligonucleotídeos Iniciadores	Tª de anelamento	Tamanho do produto
<i>β-actina*</i>	direito	5' CGTTGACATCCGTAAAGACCTCTA 3'	60-65°C	290 pb
	reverso	5' TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC 3'		
<i>HMG CoA-red</i>	direito	5'-CATGATTTCCAAGGGTACGG-3'	60°C	323 pb
	reverso	5'-GGGCACATGCAATGTAGATG-3'		
<i>K-Ras</i>	direito	5' AGGCCTGCTGAAAATGACTG 3'	65°C	235 pb
	reverso	5' CCCTCCCCAGTTCTCATGTA 3'		
<i>c-myc</i>	direito	5' CAAACTGGTCTCCGAGAAGC 3'	57°C	230 pb
	reverso	5' GAATCGGACGAGGTACAGGA 3'		

Legenda: * gene normalizador; pb = pares de base

4.13 Análise Estatística

O ensaio biológico foi realizado em animais devidamente aleatorizados e todos os dados obtidos foram testados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade das variâncias (testes de Levene e Brown Forsythe).

Quando satisfeitas as condições para aplicação dos testes estatísticos paramétricos de comparação de médias entre o grupo controle e os grupos experimentais, foi aplicado o teste one-way *ANOVA* seguido de Duncan. Nos casos em que não foram observadas distribuição normal e, principalmente, homogeneidade de variância, as análises estatísticas foram confirmadas pelo teste estatístico não paramétrico de Kruskal Wallis.

Na análise de incidência de FCAs < 4 em relação à de FCAs ≥ 4 criptas e de FDMs em relação à de FPMs no cólon médio e distal, a porcentagem (ou frequência/proporção) foi comparada pelo teste apropriado para dados de frequência do Qui-Quadrado.

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão e as análises estatísticas foram realizadas pelo programa STATISTICA 8.0 (StatSoft) adotando-se nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

V. Resultados

5.1 Peso corpóreo médio dos animais tratados com diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon

A evolução do peso corpóreo dos animais foi avaliada durante todo o experimento com o intuito de se verificar a aplicação adequada do modelo de carcinogênese, bem como observar possíveis efeitos tóxicos das substâncias utilizadas.

As **Tabelas 2 e 3** e as **Figuras 12 e 13** apresentam os pesos corpóreos médios iniciais e finais de ratos Wistar normais (N), tratados com OM (grupo controle) ou diferentes doses de GO (grupo GO1, GO2 e GO3) durante 9 semanas consecutivas, em período compreendendo a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

Foi possível verificar que os pesos médios iniciais dos diferentes grupos foram próximos, o que indica que a distribuição dos animais foi realizada de forma correta e aleatória. Ao final do experimento, quando comparado ao grupo N, observamos que o grupo OM (apenas submetido ao modelo de carcinogênese de cólon) apresentou menor peso corpóreo médio ($p \leq 0,05$). Por outro lado, não observamos diferenças estatísticas nos grupos tratados com diferentes doses de GO quando comparamos ao grupo OM ($p > 0,05$).

Deve-se ressaltar que foram desprezados das análises os animais cujas mortes ocorreram por ocasião da intubação e que foram consideradas acidentais.

Tabela 2. Pesos corpóreos médios de ratos Wistar antes e após a administração de DMH.

	n	Peso corpóreo médio inicial (g)	Peso corpóreo médio final (g)
N	10	158,9±9	318,9±18
Grupo DMH	80	164,8±11	306,7±12

n = número de animais;

N = normal

Figura 12. Evolução do peso corpóreo de ratos Wistar durante a administração de DMH.

Tabela 3. Pesos corpóreos médios de ratos Wistar normais, tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

Grupos	n	Peso corpóreo médio inicial (g)	Peso corpóreo médio ao final do experimento (g)
N	10	350,5±26	422,6±29
OM	19	339,3±18	400,5±23 ^a
GO1	19	330,9±16	403,6±25
GO2	17	339,4±19	410,1±21
GO3	19	335,4±12	383,8±27

n = número de animais;

N = normal; OM = óleo de milho (controle); GO1= geraniol (25 mg/100 g); GO2=geraniol (50 mg/100g);

GO3=geraniol (100mg/100g de peso corpóreo);

^aDiferença estatística em relação ao grupo normal (N) ($p \leq 0,05$) segundo ANOVA seguida do teste de Duncan.

Figura 13. Evolução do peso corpóreo de ratos Wistar normais, tratados com OM ou diferentes doses GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

N = normal; OM = óleo de milho (controle); GO1= geraniol (25 mg/100 g); GO2=geraniol (50 mg/100g); GO3=geraniol (100mg/100g de p.c.).

5.2 Concentração plasmática de colesterol total de animais tratados com diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon

A **Tabela 4** e a **Figura 14** apresentam os resultados referentes às concentrações plasmáticas de colesterol total de ratos Wistar normais, tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon. Verificou-se que a concentração plasmática de colesterol total foi menor ($p \leq 0.05$) no grupo GO3 em comparação ao grupo OM.

Tabela 4 – Concentração plasmática de colesterol total de ratos Wistar normais, tratados com OM ou diferentes doses GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

Grupos	n	Colesterol Plasmático Total (mg/dL)
N	9	53,5 ± 5,3
OM	14	53,4 ± 5,6
GO1	13	53,6 ± 5,8
GO2	13	51,2 ± 4,6
GO3	15	44,3 ± 5,1 ^a

n = número de animais;

N = normal; OM = óleo de milho (controle); GO1= geraniol (25 mg/100 g); GO2=geraniol (50 mg/100g); GO3=geraniol (100mg/100g de peso corpóreo);

^aDiferença estatística em relação ao grupo OM (controle) ($p \leq 0,05$), segundo ANOVA seguida do teste de Duncan.

Figura 14. Concentração plasmática de colesterol total de animais normais, tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

^aDiferença estatística em relação ao grupo OM (controle) ($p \leq 0,05$), segundo ANOVA seguida do teste de Duncan.

5.3 Pesquisa de FCAs

Focos contendo criptas maiores, com camadas epiteliais mais espessas, aberturas luminais alongadas e coradas mais intensamente que aquelas a seu redor foram caracterizados como FCAs (**Figura 15**).

Assim, o cólon de cada animal foi corado com azul de metileno e, então, analisado quanto à multiplicidade (FCAs $<$ ou ≥ 4 criptas) e a localização (cólon médio ou distal). Primeiramente foi realizada a contagem do número de FCAs $<$ ou ≥ 4 criptas por cm^2 de mucosa colônica (**Figuras 16, 17, 18 e 19**).

Figura 15. FCAs contendo 2 (seta superior) e 5 (seta inferior) criptas aberrantes, respectivamente, de cólon de rato Wistar submetido ao modelo de carcinogênese induzida por DMH quando corado com azul de metileno (objetiva 100X).

Figura 16. Número de FCAs < 4 criptas/cm² presentes no cólon médio de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

Figura 17. Número de FCAs ≥ 4 criptas/cm² presentes no cólon médio de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

Figura 18. Número de FCAs < 4 criptas/cm² presentes no cólon distal de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

Figura 19. Número de FCAs ≥ 4 criptas/cm² presentes no cólon distal de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

Podemos notar que não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p > 0,05$) tanto no cólon médio quanto no cólon distal.

Posteriormente foi realizado um teste de frequência/proporção dos FCAs ≥ 4 em relação aos FCAs < 4 em cada região colônica (**Figura 20**).

Figura 20. Frequência de FCAs ≥ 4 criptas no cólon distal de animais tratados com OM e diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

^{a,b}Diferença estatística em relação ao grupo OM (controle) ($p \leq 0,05$) segundo teste do Qui-Quadrado.

N = normal; OM = óleo de milho (controle); GO1= geraniol (25 mg/100 g); GO2=geraniol (50 mg/100g); GO3=geraniol (100mg/100g de p.c.).

Assim, analisando a frequência de FCAs ≥ 4 em relação à de FCAs < 4 , observamos que o grupo GO3 apresentou menor frequência de FCAs ≥ 4 em comparação ao grupo OM, enquanto que os grupos GO1 e GO2 apresentaram maiores frequências dos mesmos somente no cólon distal ($p \leq 0,05$). Nenhuma diferença foi observada no cólon médio (dados não mostrados) ($p > 0,05$).

5.4 Pesquisa de FDMs e FPMs

A **Figura 21** ilustra exemplo de Foco Depletado de Mucina (FDM) e Foco Positivo para Mucina (FPM). Após a coloração com azul de toluidina, os cólons foram analisados quanto ao número total de FDMs e FPMs por cm^2 e localização (medial ou distal) (**Figura 22 e 23**).

Figura 21. FDM (objetiva 20X-fotomicrografia à esquerda) e FPM (objetiva 10X-fotomicrografia à direita) de cólon de rato Wistar submetido ao modelo de carcinogênese induzida por DMH quando corado com azul de toluidina.

Figura 22. Número de FPMs e FDMs/cm² presentes no cólon médio de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

Figura 23. Número de FPMs e FDMs/cm² presentes no cólon distal de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

Os resultados indicam que não houve diferenças estatísticas em relação à incidência de FDMs e FPMs /cm² entre os tratamentos ($p > 0,05$) tanto no cólon médio quanto no cólon distal.

Posteriormente foi realizado um teste de frequência/proporção dos FDMs em relação aos FPMs em cada região colônica (**Figura 24**).

Frequência de Focos Depletados de Mucina - Cólon Distal

Figura 24. Frequência de FDMs no cólon distal de animais tratados com OM e diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon. ^{a,b}Diferença estatística em relação ao grupo OM (controle) ($p \leq 0,05$) segundo teste do Qui-Quadrado.

N = normal; OM = óleo de milho (controle); GO1= geraniol (25 mg/100 g); GO2=geraniol (50 mg/100g); GO3=geraniol (100mg/100g de peso corpóreo).

Assim, analisando a frequência de FDMs em relação à de FPMs, observamos que o grupo GO3 apresentou menor frequência de FDMs em comparação ao grupo OM, enquanto que os grupos GO1 e GO2 apresentaram maiores frequências dos mesmos somente no cólon distal ($p \leq 0,05$). Nenhuma diferença foi observada no cólon médio (dados não mostrados) ($p > 0,05$).

5.5 Pesquisa de FCAs convencionais e displásicos

FCAs foram classificados por critérios histopatológicos, conforme exemplos da **Figura 25**, quantificados (número por mm^2) e analisados quanto à multiplicidade e localização no cólon (**Figuras 26-29**).

Figura 25. FCA displásico (A) e convencional (B), respectivamente, de cólon de rato Wistar submetido ao modelo de carcinogênese induzida por DMH em cortes histológicos corados em HE (objetiva 20X).

Figura 26. Número de FCAs convencionais e/ou displásicos/ mm^2 presentes no cólon médio de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

Figura 27. Número de FCAs convencionais e/ou displásicos/mm² presentes no cólon distal de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

Levando-se em consideração a classificação de FCAs totais/mm² (**Figuras 26 e 27**) podemos observar que não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p > 0,05$).

Analisando somente FCAs ≥ 4 criptas (**Figura 28 e 29**), descritos como aqueles de maiores vantagens de crescimento, podemos notar que, da mesma forma, não houve diferenças estatísticas tanto no cólon médio quanto no cólon distal ($p > 0,05$).

Figura 28. Número de FCAs ≥ 4 criptas convencionais e/ou displásicos/mm² presentes no cólon médio de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

Figura 29. Número de FCAs ≥ 4 criptas convencionais e/ou displásicos/mm² presentes no cólon distal de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

5.6 Pesquisa de FPBCs e FNBCs citoplasmática e/ou nuclear

FCAs foram classificados levando-se em consideração a marcação imunoistoquímica citoplasmática e/ou nuclear de BC (**Figura 30**), quantificados (número por mm^2) e analisados quanto à multiplicidade e localização no cólon (**Figuras 31-34**).

Figura 30. FCA positivo para BC citoplasmática/nuclear (setas, objetiva 20X).

Figura 31. Número de FCAs/ mm^2 positivos e negativos para BC presentes no cólon médio de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

Figura 32. Número de FCAs/mm² positivos e negativos para BC presentes no cólon distal de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

Levando-se em consideração FCAs totais/mm², observa-se que não houve diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$) (**Figuras 31 e 32**).

Analisando-se somente FCAs ≥ 4 negativos e positivos para BC (**Figuras 33 e 34**), podemos notar que, da mesma forma, não houve diferenças estatísticas tanto no cólon médio quanto no cólon distal ($p > 0,05$).

Figura 33. Número de FCAs ≥ 4 /mm² positivos e negativos para BC presentes no cólon médio de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

Figura 34. Número de FCAs ≥ 4 /mm² positivos e negativos para BC presentes no cólon distal de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

5.7 Análise da apoptose em FCAs ≥ 4 do cólon distal de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

Nas mesmas lâminas coradas em HE nas quais os FCAs foram classificados de acordo com sua histopatologia, foi realizada a análise de apoptose por critérios clássicos morfológicos (**Figura 35**). O índice apoptótico foi calculado somente naqueles FCAs ≥ 4 criptas tanto convencionais quanto displásicos presentes no cólon distal.

A **Figura 36** mostra os valores do índice apoptótico em FCAs ≥ 4 convencionais e displásicos no cólon distal dos diferentes tratamentos. Podemos observar um aumento significativo ($p \leq 0,05$) da apoptose nos FCAs ≥ 4 especificamente displásicos no grupo GO3 quando comparado ao OM.

Figura 35: Fotomicrografias de FCAs convencional (A) e displásicos (B) em cortes histológicos transversais às criptas corados com HE (objetiva de 20X, setas); Figuras de apoptose em FCAs convencional (C) e displásicos (D) (objetiva de 100X, cabeças de seta).

* Figuras de mitoses.

Figura 36: Número médio do índice apoptótico por área (mm^2) presentes em FCAs ≥ 4 do cólon distal de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon.

^aDiferença estatística em relação ao grupo OM (controle) ($p \leq 0,05$), segundo ANOVA seguida do teste de Duncan.

N = normal; OM = óleo de milho (controle); GO1= geraniol (25 mg/100 g); GO2=geraniol (50 mg/100g); GO3=geraniol (100mg/100g de p.c.).

5.8 Análise da expressão de *HMGC α -redutase* na mucosa colônica de animais tratados com diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon

A **Figura 37** mostra a expressão de *HMGC α -redutase* na mucosa colônica de animais tratados com diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon. Podemos notar que não houve diferença na expressão desse gene entre os diferentes tratamentos ($p > 0,05$).

Figura 37: (A) Expressão dos genes *HMGC_oA-redutase* e *BA* na mucosa colônica de animais tratados com OM ou diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon. (B) Quantificação da expressão *HMGC_oA-redutase* normalizada pela expressão do gene *BA* nos ratos dos grupos N, OM e GO. Valores expressos em média ± desvio padrão da média de 5 animais. *BA*=beta-actina; N=normal; OM=óleo de milho; GO1=geraniol (25 mg/100 g); GO2=geraniol (50 mg/100g); GO3=geraniol (100mg/100g de p.c.).

5.9 Microdissecção de FCAs

A **Figura 38** ilustra a microdissecção realizada em cortes histológicos feitos no criostato e corados com azul de metileno para a extração de RNA e posterior realização da técnica de RT-PCR.

Figura 38. Cortes da mucosa colônica de 10 μm feitos em criostato e corados com azul de metileno para a microdissecção de FCAs (aumento 40X).

5.10 Análise da expressão de *K-Ras* e *c-myc* em FCAs microdissecados da mucosa colônica em animais tratados com diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon

As **Figuras 39 e 40** ilustram a expressão de *K-Ras* e *c-myc* em FCAs presentes em cortes histológicos da mucosa colônica dos animais.

Embora sem diferenças estatísticas, foi possível notar que o grupo OM apresentou maior expressão de *K-Ras* em relação ao grupo N (30%); já quando comparado ao grupo OM,

o grupo GO3 pareceu reduzir esse padrão a valores semelhantes aos observados no grupo N.

Em relação à expressão do gene *c-myc*, observamos que o grupo OM apresentou maior valor quando comparado ao grupo N (1,7%) e que o grupo GO3 apresentou menor valor quando comparado ao grupo OM (5,2%). Por outro lado, essas diferenças não foram significantes ($p > 0,05$).

Figura 39. (A) Expressão dos genes *K-Ras* e *BA* em FCAs microdissecados da mucosa colônica de animais tratados com OM e diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon. (B) Quantificação da expressão *K-Ras* normalizada pela expressão do gene *BA* nos ratos dos grupos N, OM e GO. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão da média de 3 animais. *BA*=beta-actina; N=normal; OM=óleo de milho; GO1= geraniol (25 mg/100 g); GO2=geraniol (50 mg/100g); GO3=geraniol (100mg/100g de p.c.).

Figura 40. (A) Expressão dos genes *c-myc* e *BA* em FCAs microdissecados da mucosa colônica de animais tratados com OM e diferentes doses de GO durante a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon. (B) Quantificação da expressão *c-myc* normalizada pela expressão do gene *BA* nos ratos dos grupos N, OM e GO. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão da média de 3 animais. *BA*=beta-actina; N=normal; OM=óleo de milho; GO1= geraniol (25 mg/100 g); GO2=geraniol (50 mg/100g); GO3=geraniol (100mg/100g de p.c.).

VI. Discussão

O câncer de cólon é o resultado final de um processo de múltiplas etapas em que a transição de FCAs para os estágios mais avançados só é alcançada por aqueles focos que adquirem um conjunto de alterações que conferem maior grau de displasia e vantagens de crescimento. Diferentes biomarcadores tais como FCAs displásicos, FDMs e FPBCs, com predominância de mutações em *APC* ou *BC*, ausência de mucina, atipias celulares e maior probabilidade de se desenvolverem em adenocarcinomas, têm sido descritos em roedores tratados com carcinógenos específicos de cólon (MORI et al, 2004, FEMIA et al, 2008). Por outro lado, FCAs convencionais, com mutações principalmente em *K-Ras* e caracterizados pela presença de mucina e hiperplasia, também são considerados LPNs importantes para a carcinogênese de cólon, pois podem adquirir alterações adicionais com potencial para se tornarem displásicos futuramente (SUEHIRO, HINODA, 2008). A existência de FCAs mistos contendo criptas convencionais e displásicas presentes no mesmo foco, e possíveis de serem observados no presente trabalho, pode comprovar essa hipótese (RAJU, 2008).

Em estudo prévio de nosso laboratório, o GO (na dose de 25 mg/100 g de p.c.) apresentou efeito importante na indução da apoptose e inibição da proliferação celular quando administrado durante as fases de iniciação e promoção ou apenas na promoção da hepatocarcinogênese em ratos submetidos ao modelo do Hepatócito Resistente (ONG et al., 2006; CARDOZO et al., 2011).

Posteriormente, esse monoterpene apresentou atividade quimiopreventiva (na mesma dose utilizada nos estudos de hepatocarcinogênese, ou seja, 25 mg/100 g de p.c.) nas fases iniciais da carcinogênese de cólon induzida pela DMH, inibindo FCAs totais e FCAs ≥ 4 criptas e aumentando a apoptose no cólon distal quando administrado continuamente durante as fases de iniciação e pós-iniciação (VIEIRA et al., 2011).

Dessa forma, optamos em avaliar os efeitos de diferentes doses desse isoprenóide (25, 50 e 100 mg/100 g p.c.) quando administrado durante 9 semanas a ratos Wistar compreendendo especificamente a fase de pós-iniciação tardia de modelo de carcinogênese de cólon, onde há maior incidência de lesões consideradas displásicas.

Inicialmente é importante destacar que, de acordo com as **Tabelas 2 e 3 e Figuras 12 e 13**, não houve diferença significativa no padrão de crescimento entre os grupos experimentais em comparação ao grupo OM após o tratamento com GO. Dessa forma, podemos sugerir que a substância não apresentou toxicidade sistêmica aparente nas doses utilizadas. Por outro lado, quando comparado ao grupo N, podemos notar que o grupo OM, ou

seja, aquele apenas submetido ao modelo de carcinogênese e que não recebeu GO como tratamento, apresentou menor peso corpóreo médio final ($p \leq 0,05$). Esse resultado sugere um efeito adverso decorrente das administrações da DMH.

6.1 Efeitos das diferentes doses de GO em FCAs

Diferentes parâmetros têm sido utilizados para a contagem de FCAs, incluindo o número de FCAs por comprimento ou por centímetro quadrado (cm^2) de cólon, número de criptas aberrantes (CAs) por foco (multiplicidade), tamanho do foco, frequência/proporção de FCAs ou ainda o grau de alterações luminais dos FCAs em cada região colônica (SHIH et al., 2004; XIAO et al., 2008).

No presente estudo observamos que o tratamento com diferentes doses de GO não alterou qualquer um dos parâmetros como número, multiplicidade e localização de FCAs/ cm^2 (medial ou distal).

Quando analisamos a frequência/proporção de FCAs ≥ 4 em relação ao de FCAs < 4 criptas no cólon médio não observamos nenhuma diferença entre os tratamentos. Por outro lado, no cólon distal, o tratamento com a maior dose de GO (GO3) reduziu esse parâmetro (ou seja, resultou em menor frequência de FCAs ≥ 4 em relação à de FCAs < 4) enquanto as outras doses (grupos GO1 e GO2) aumentaram o mesmo.

Modelos que utilizam o carcinógeno DMH revelam que o número de FCAs aumenta com o decorrer do tempo. Isso sugere que alguns deles se desenvolvam mais rapidamente do que outros. Esses focos também podem sofrer processo de remodelação, sendo que os menores (focos contendo 1, 2 ou 3 criptas) podem regredir e os maiores (focos contendo 4 ou mais criptas) apresentam maior probabilidade de progredirem para o câncer. É muito importante considerarmos que existem diferenças biológicas naqueles FCAs que exibem diferentes multiplicidades, que estes são regulados diferencialmente e que a transição de microadenomas para adenocarcinomas pode ser retardada por compostos presentes na alimentação. FCAs com maior número de criptas por foco representam lesões mais avançadas e apresentam menor capacidade em responder a agentes quimiopreventivos ou quimioterapêuticos (MCLELLAN; MEDLINE; BIRD, 1991; BIRD, 1995, RONCUCCI, 2000).

FCAs aumentam seu tamanho por um mecanismo denominado de fissão da cripta. Quando o índice de proliferação na região das células-tronco supera um determinado limiar, a cripta ramifica-se a partir de sua base gerando duas novas criptas (RONCUCCI et al, 2000;

HUMPHRIES; WRIGHT, 2008). Com isso, o número de criptas presentes em cada foco, também chamado de multiplicidade, pode ser um parâmetro importante para avaliação do crescimento e progressão de FCAs (CHENG et al, 2003; HUMPHRIES; WRIGHT, 2008). E, nesse estudo, a maior dose de GO (100 mg/100 g de p. c. [grupo GO3]) inibiu a frequência especificamente dos FCAs de maiores multiplicidades no cólon distal.

6.2 Isoprenóides e quimioprevenção do câncer de cólon

Baseando-se em seus efeitos na proliferação da linhagem celular CACO-2 de adenocarcinoma de cólon humano, verificou-se que tratamento com GO causou inibição da proliferação celular, com acúmulo de células na fase S do ciclo celular e, simultaneamente, inibição da síntese de DNA (CARNESECCHI et al., 2002).

Outros isoprenóides foram também testados em roedores, a maioria deles, durante ou após a administração do carcinógeno de cólon (WARGOVICH et al., 2000). Em estudos prévios com animais de experimentação, foi observada ação inibitória do álcool perilílico em modelo de carcinogênese de cólon induzida pelo AOM em ratos F-344 machos associada à indução de apoptose nas neoplasias de cólon (REDDY et al., 1997). O tratamento com 1% de esqualeno na ração foi capaz de inibir a indução e multiplicidade de FCAs em ratos F344 iniciados com AOM (RAO et al., 1998).

Da mesma forma, foi observada atividade quimiopreventiva em ratos F-344 tratados com farnesol (0,8 g e 1,6 g/100 g de ração) uma semana antes da administração de AOM e quatro semanas após. Em ambas as concentrações na ração, o isoprenóide inibiu FCAs ≥ 4 criptas (WARGOVICH et al., 2000). Em outro estudo, a administração de farnesol a 1,5% e lanosterol a 1% na ração de ratos F-344, uma semana antes da iniciação da carcinogênese com AOM e nove semanas após, resultou em redução da incidência e multiplicidade de FCAs (FCAs ≥ 4 criptas) no cólon (RAO et al., 2002). Mais recentemente, o farnesol suprimiu fases iniciais da carcinogênese de cólon em ratos Wistars por meio da redução do dano oxidativo e da resposta apoptótica e inflamatória induzida pela DMH (KHAN; SULTANA, 2011).

O isoprenóide cíclico, a β -ionona, apresentou atividade quimiopreventiva durante as fases de iniciação e pós-iniciação de modelo de carcinogênese de cólon induzido por AOM reduzindo tanto o número total de FCAs quanto o de FCAs ≥ 4 quando administrada na ração durante 11 semanas de tratamento (JANAKIRAM et al., 2008).

Por outro lado, Bidinotto et al. (2010), administrando óleo essencial de capim-limão (1,28% de GO e 51,46% de geranial) nas doses de 125 e 500 mg/Kg na fase de pós-iniciação

não observaram efeito protetor contra o desenvolvimento de FCAs no cólon de camundongos iniciados (BIDINOTTO et al., 2010). Diferenças nas concentrações e modos de administração do GO, além do desenho experimental utilizado podem explicar a variação nos resultados obtidos.

6.3 Efeitos das diferentes doses de GO em biomarcadores de displasia

Quando analisamos a presença de mucina em FCAs, observamos que o tratamento com diferentes doses de GO não alterou a incidência e a localização de FPMs e FDMs/cm² tanto no cólon médio quanto no cólon distal.

Quando analisamos a frequência/proporção de FDMs em relação à de FPMs no cólon médio, de forma semelhante ao observado em FCAs, nenhuma diferença foi observada entre os tratamentos. Por outro lado, no cólon distal, a maior dose de GO (100 mg/100 g de p.c. [grupo GO3]) reduziu a frequência de FDMs enquanto as outras doses (grupos GO1 e GO2) aumentaram a mesma.

Já em relação à histopatologia dos FCAs e à marcação citoplasmática e/ou nuclear de BC não observamos nenhuma diferença entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Devido à escassez de estudos envolvendo o efeito de GO em biomarcadores de displasia existentes na carcinogênese de cólon procuramos comparar resultados de outros estudos envolvendo atividades de diferentes CBAs em todas as categorias de LPNs colônicas conhecidas, obtendo-se alguns resultados contraditórios.

Enquanto alguns pesquisadores sugerem que FDMs sejam biomarcadores mais confiáveis para carcinogênese experimental de cólon por estarem mais relacionados com a incidência de neoplasias devido às suas características displásicas (FEMIA et al., 2004), outros demonstraram correlações positivas em estudos de quimioprevenção entre FCAs convencionais, FCAs ≥ 4 criptas e FDMs (SAKANO et al., 2006; ARIKAWA; GALLAHER, 2008; ALFARAS et al., 2010).

Além disso, em trabalhos posteriores, Femia et al., (2010) observaram que arabinosilano-oligossacarídeo reduziu tanto FDMs quanto FCAs principalmente no cólon distal (FEMIA et al., 2010) e Dias et al. (2010) observaram que tratamento com licopeno na dieta durante a fase de pós-iniciação reduziu ambos FCAs $< e \geq 3$ criptas e FDMs em ratos Wistars (DIAS et al., 2010).

Ainda, em um dos primeiros trabalhos de Femia, Dolara e Caderni (pioneiros na descrição dos FDMs), os autores afirmam que os resultados estarão correlacionados com a

carcinogênese de cólon somente se uma substância quimiopreventiva apresentar efeitos similares em ambas as categorias de LPNs (FCAs e FDMs) (FEMIA et al., 2004).

No presente estudo observamos os mesmos efeitos tanto em FCAs ≥ 4 criptas, quanto em FDMs no cólon distal, no qual o tratamento com a maior dose de GO (GO3) reduziu a frequência de ambas LPNs, conforme descrito acima. Por outro lado, as outras doses (grupo GO1 e GO2) mostraram aumentar a frequência de FCAs ≥ 4 e FDMs nessa mesma região colônica.

Alguns estudos de quimioprevenção utilizaram tanto FCAs convencionais quanto FCAs displásicos como biomarcadores na carcinogênese de cólon. Selvam et al. (2008) observaram que a suplementação com pronil-lisina foi capaz de reduzir FCAs totais, FCAs displásicos e neoplasias em ratos Wistars iniciados com DMH (SELVAM et al., 2008). De forma semelhante, Sangeetha et al. (2009) investigaram o efeito de silibinina em ratos Wistars iniciados com DMH e observaram que esse composto inibiu os 2 tipos de LPNs (SANGEETHA et al., 2009).

Outros estudos utilizaram ainda, além de FCAs convencionais e displásicos, FPBCs como biomarcadores na carcinogênese de cólon. Nabandith et al. (2004) verificaram que alfa-mangostina (*Garcinia mangostana*) apresentou potente efeito quimiopreventivo quando administrado na ração a ratos F344 durante as fases de iniciação e pós-iniciação de modelo de carcinogênese de cólon induzido por DMH, reduzindo tanto FCAs convencionais e displásicos, quanto FPBCs, porém não apresentou qualquer efeito nos FCAs ≥ 4 criptas (NABANDITH et al., 2004). Já Shimizu et al. (2009) observaram que epigallocatequina suprimiu tanto FCAs ≥ 4 criptas quanto FPBCs em camundongos db/db iniciados com AOM (SHIMIZU et al., 2009).

Recentemente, as ações quimiopreventivas de muitas substâncias estão sendo avaliadas utilizando-se FCAs convencionais e FPBCs conjuntamente como biomarcadores da carcinogênese de cólon em modelos animais. É o caso de flavonóides, citrus unshiu, esfingolipídeos, pitavastatina, aminoácidos de cadeias ramificadas (MORIOKA et al., 2005; INAMINE et al., 2005; SUZUKI et al., 2007; ASANO et al., 2007; SHIMIZU et al., 2009; MIYAMOTO et al., 2010; YASUDA et al., 2010). E em todos os estudos citados acima ocorreu inibição de ambas as categorias de LPNs colônicas.

Assim, podemos notar que cada categoria de LPNs pode responder diferencialmente à nossa intervenção, dependendo do CBA (e da dose utilizada) e também da fase da carcinogênese que está sendo estudada. Dessa forma, a dose de 100 mg/100 g de p.c. (GO3) pareceu atuar preferencialmente em FCAs ≥ 4 criptas, mais avançados, e em FDMs, de

características displásicas, reduzindo a frequência de ambas.

6.4 Carcinogênese de cólon nas diferentes regiões colônicas

Outro importante critério para a compreensão da carcinogênese de cólon é o progresso diferencial dos FCAs em cada região colônica (GHIRARDI et al., 1999), dada a origem embriológica e fisiologia distinta que cada segmento do órgão apresenta (GERVAZ et al., 2004).

A distribuição espacial dos FCAs difere entre o cólon proximal (caracterizado pela raríssima existência de FCAs), medial e distal em ratos tratados com AOM, com maior incidência de FCAs na região medial comparada à região distal (GHIRARDI et al., 1999; RAJU, 2008). Outros estudos confirmam essa hipótese. Shih et al. (2004) observaram que FCAs induzidos por AOM apareceram predominantemente no cólon médio, com menos FCAs no cólon distal e raros no cólon proximal (SHIH et al., 2004).

No presente estudo, confirmamos o descrito acima, onde observamos maior incidência de FCAs no cólon médio, região onde os tratamentos não apresentaram qualquer efeito. Além disso, o grupo GO3 apresentou menor frequência de FCAs ≥ 4 criptas e FDMs somente no cólon distal. Nessa mesma região, as doses GO1 e GO2 apresentaram resultados contrários a esse grupo. Com isso podemos notar efeitos diferentes de cada dose de GO dependendo da região colônica analisada.

Assim, vale ressaltar que os principais efeitos na redução da frequência de FCAs ≥ 4 criptas e de FDMs observados no grupo GO3 ocorreram no cólon distal, região colônica mais propensa ao desenvolvimento de adenocarcinomas, tanto em animais de experimentação quanto em humanos (PRETLOW et al., 1991).

6.5 GO e apoptose

Sabe-se que o evento mais precoce da carcinogênese de cólon envolve o desequilíbrio da homeostase do epitélio colônico (POTTEN et al., 1997; WONG, GIBSON, 2003), no qual a perda do controle de morte celular programada está presente nas fases iniciais da progressão neoplásica (RONCUCCI et al., 2000).

Poucos estudos *in vitro* estudaram a capacidade de modulação da apoptose pelo GO. Foi observado que a inibição do crescimento de células de melanoma B16 pelo GO envolvia a indução de morte apoptótica das células neoplásicas (YU et al., 1995). Duncan et al. (2004)

não observaram a mesma atividade por parte do GO em células MCF-7 de carcinoma de mama (DUNCAN et al., 2004). Por outro lado, o GO foi capaz de induzir a apoptose em adenocarcinomas pancreáticos PC-1 transplantados em hamsters (BURKE et al., 2002).

Em trabalhos que utilizaram modelos experimentais de carcinogênese química para avaliar a atividade quimiopreventiva do GO, foi possível observar que o monoterpreno aumentou a apoptose em LPNs hepáticas quando administrado continuamente durante as fases de iniciação e promoção ou apenas na promoção da hepatocarcinogênese (ONG et al., 2006; CARDOZO et al., 2011) e também em criptas colônicas do cólon distal durante as fases de iniciação e pós-iniciação de modelo de carcinogênese de cólon (VIEIRA et al., 2011).

Como a indução de apoptose poderia estar associada aos efeitos quimiopreventivos do GO nesses estudos de carcinogênese em ratos (ONG et al., 2006; CARDOZO et al., 2011; VIEIRA et al., 2011), células apoptóticas foram quantificadas no presente estudo utilizando, para isso, critérios morfológicos bem estabelecidos (DIAS et al., 2010).

O índice apoptótico foi calculado somente em FCAs ≥ 4 criptas no cólon distal, já que o GO (na dose de 100 mg/100g de p.c.[grupo GO3]) pareceu atuar principalmente nessa região colônica e que os FCAs ≥ 4 são considerados lesões mais avançadas e com maiores vantagens de crescimento (BIRD, 1995; RONCUCCI, 2000).

Foi possível observar que a maior dose do isoprenóide (GO3) resultou em aumento da apoptose especificamente naqueles FCAs ≥ 4 com característica histopatológica displásica, considerados prováveis lesões precursoras e mais relacionadas ao desenvolvimento de neoplasias. Dessa forma, os dados sugerem que a indução da morte celular programada poderia representar um mecanismo importante de atuação do GO3 na quimioprevenção da carcinogênese experimental de cólon.

6.6 GO, concentração plasmática de colesterol total e HMGCoA-redutase

Diversos isoprenóides, tais como o farnesol (CORELL et al., 1994; MEIGS et al., 1997; ONG et al., 2006), tocotrienóis (PARKER et al., 1993), beta-caroteno (MORENO et al., 1995), β -ionona (ELSON, 1995; ESPÍNDOLA et al., 2005), limoneno (QURESHI et al., 1998), mentol (CLEGG et al., 1982), geranilgeraniol (SEVER et al., 2003; ESPÍNDOLA et al., 2005) e GO (YU et al., 1994; ELSON, 1995) apresentam a capacidade de inibir *in vitro* e *in vivo* a enzima HMGCoA-redutase (PARKER et al., 1993; ELSON et al., 1994; 1995; ELSON et al., 1999). Em vários casos, a inibição da HMGCoA-redutase resultou em reduções modestas dos níveis plasmático de colesterol total (CROWELL, 1999; ELSON et al., 1994;

1995; 1999).

No presente estudo, constatou-se menor concentração plasmática de colesterol total (mg/dL) nos ratos Wistar somente no grupo GO3. Devido ao fato de estudos indicarem o GO como um potente inibidor da atividade da HMGCoA-redutase (YU et al., 1994; YU et al., 1995; ELSON, 1999), a redução da concentração plasmática de colesterol pode ser consequência do impacto que esse isoprenóide apresenta na supressão dessa enzima (YU et al., 1994). Em um estudo com diferentes isoprenóides, houve pronunciada redução na concentração plasmática de colesterol total pelo tratamento com GO em modelo de carcinogênese mamária (YU et al., 1995). Isso indica que a diminuição da concentração de colesterol pode ser considerada uma medida indireta da redução da atividade de HMGCoA-redutase e conseqüente inibição da via do mevalonato (ESPÍNDOLA et al., 2005). Com isso, estaria limitada a disponibilidade de colesterol e dos isoprenóides intermediários dessa via, os quais são necessários para o processamento pós-traducional (prenilação) de proteínas relacionadas à proliferação celular e apoptose, importantes para a transformação neoplásica, como as da família Ras.

Por outro lado, quando avaliamos o padrão de expressão do gene da *HMGCoA-redutase* na mucosa colônica, não observamos alterações entre os diferentes tratamentos. Esse resultado pode sugerir, eventualmente, que a HMGCoA-redutase possa ter sido regulada pós-transcricionalmente pelo tratamento com a maior dose GO3 (já que apenas essa mostrou reduzir o colesterol plasmático total), ou ainda que GO3 apresente mecanismos não relacionados à via do mevalonato e independente da inibição da atividade de HMGCoA-redutase (BURKE et al., 1997; DUNCAN et al., 2004; ONG et al., 2006), tais como a inibição da atividade da ornitina descarboxilase que se encontra elevada no câncer (CARNESECCHI et al., 2002).

6.7 GO e expressão de *K-Ras* e *c-myc* em FCAs microdissecados na carcinogênese de cólon

O estudo de alterações moleculares envolvidas na carcinogênese requer uma correlação precisa entre populações de LPNs e células normais ao redor. Além da heterogeneidade inerente às próprias células pré-neoplásicas, esses tecidos são compostos por uma variedade de células do estroma, de infiltrados inflamatórios e de células endoteliais do tecido pré-existente. A presença de múltiplos tipos de células e de LPNs pode diluir as alterações significantes que ocorrem em células específicas e fazer, portanto, com que os mais

sofisticados métodos utilizados em patologia molecular tenham valor limitado quando aplicados ao tecido total.

Desta forma, visando-se a realização de experimentos envolvendo técnicas de biologia molecular mais sensíveis e capazes de amplificar o RNA extraído, considera-se como indispensável a microdissecção tecidual para se discernir adequadamente populações celulares, como por exemplo, aquelas oriundas de tecidos especialmente pré-neoplásicos daquelas provenientes de tecido colônico normal ao seu redor (KANAI et al., 2000; MAGGIONI et al., 2000). A análise de modificações moleculares ocorridas em etapas de LPNs pode proporcionar indícios em relação a alterações fundamentais subjacentes ao desenvolvimento do câncer (EMMERT-BUCK et al., 1996).

Nesse sentido e de forma original, FCAs foram microdissecados para a avaliação da expressão de genes relevantes na progressão da carcinogênese de cólon.

K-Ras e *c-myc* são proto-oncogenes envolvidos na carcinogênese de cólon que podem estar mutados e/ou hipometilados levando a desvio de funções e aumento de expressão, caracterizando-os como oncogenes. Quando hiperexpressos podem ocasionar a ativação de vias de transdução de sinais relacionadas com proliferação celular e apoptose (ABUBAKER et al., 2009).

Tem sido sugerido que a transformação maligna na carcinogênese de cólon é dependente de mutações em *APC* enquanto mutações em *K-Ras* poderiam estar envolvidas em estágios mais avançados de progressão. Porém, nos últimos anos, muitos pesquisadores têm analisado alterações de *K-Ras* em FCAs induzidos com diferentes carcinógenos e protocolos experimentais. A maioria desses estudos tem mostrado que FCAs apresentam alterações frequentes em *K-Ras* (FEMIA, et al., 2008; SUEHIRO, HINODA, 2008). Além disso, mutações em *K-Ras* são observadas principalmente em FCAs convencionais (YAMADA, MORI, 2003), embora existam estudos indicando a presença também em FCAs displásicos (SUEHIRO, HINODA, 2008).

Assim, além da importância de *K-Ras*, uma guanosina trifosfatase (GTPase) de baixo peso molecular, na cascata de sinalização celular mediada pela modificação pós-traducional (prenilação) realizada pelos isoprenóides, principalmente pelos monoterpenos (CROWELL, 1999), esse gene está envolvido na dinâmica dos FCAs durante a carcinogênese de cólon. Também tem sido reportado que mutações em genes da família *Ras* determinam ativação crônica de *Ras* prenilado contribuindo, portanto, para a progressão do câncer (RAJESH et al., 1999; PALOZZA et al., 2010).

O gene *c-myc* está relacionado na carcinogênese de cólon com a via de sinalização da

BC e, conseqüentemente, com a transformação displásica de FCAs. Sua transcrição é ativada pelo acúmulo de BC citoplasmática e/ou nuclear levando, assim, a um aumento da proliferação celular (MORI et al., 2004).

Dessa forma, realizamos a análise do padrão de expressão de *K-Ras* e *c-myc* com o intuito de verificarmos se alguma dose de GO utilizada poderia alterá-lo ou inibir algum subgrupo específico de LPN, já que o potencial de um determinado FCA em progredir para o câncer pode ser determinado molecularmente (NAMBIAR et al., 2004).

Embora alguns trabalhos tenham relatado a influência de isoprenóides na expressão de *K-Ras* e *c-myc* (OHIZUM et al., 1997; GIRI et al., 1999; CERDA et al., 1999; HOLSTEIN et al., 2002; 2003; MO, ELSON, 2004; CLARK, 2006; REYNOSO-CAMACHO et al, 2011) e em proteínas relacionadas, isso parece não ter ocorrido no presente estudo. Podemos observar que o grupo GO3 foi o que apresentou menor valor de expressão de ambos genes em FCAs, porém os resultados não foram significantes. Assim, o GO não atuou nas expressões desses genes nas doses utilizadas.

VII - Conclusões

A partir dos dados obtidos no presente trabalho podemos notar que as doses de GO atuaram de maneiras distintas em cada categoria de LPNs induzidas durante a fase da carcinogênese de cólon estudada, a de pós-iniciação tardia, caracterizada por uma grande heterogeneidade de LPNs.

A dose de 100 mg/100 g de p.c. de GO (GO3) mostrou ser mais interessante do ponto de vista quimiopreventivo por resultar em menor frequência de FCAs ≥ 4 criptas e de FDMs (em relação aos FCAs < 4 criptas e FPMs), além de aumentar a apoptose em FCAs ≥ 4 displásicos principalmente no cólon distal, onde há maiores relatos de incidência de adenocarcinomas de cólon, tanto em animais quanto em humanos. Importante ressaltar que GO3 pareceu atuar especificamente em lesões com maiores probabilidades de progressão, tanto aquelas de maiores multiplicidades quanto aquelas de características displásicas. Por outro lado, os grupos GO1 e GO2 apresentaram efeitos contrários comprovando a importância de estudarmos diferentes doses em estudos de quimioprevenção de carcinogênese.

Já em relação às outras categorias de LPNs, como FCAs convencionais e displásicos e focos positivos ou negativos para BC nuclear e/ou citoplasmática, não constatamos diferenças entre os tratamentos com GO.

Quando analisamos a expressão dos genes *HMGC α -A redutase* (na mucosa colônica), *K-Ras* e *c-myc* (em FCAs microdissecados), da mesma forma, não observamos diferenças significativas. Isso pode sugerir que o GO, especificamente o GO3, pareceu não atuar por meio desses mecanismos.

Por outro lado, a maior dose foi a única a atuar significativamente na redução da concentração plasmática de colesterol total sugerindo, talvez, que GO3 regule a enzima pós-transcricionalmente ou que apresente mecanismos não relacionados à via do mevalonato e independente da inibição da atividade de HMGC α -redutase.

Assim, a indução da morte celular programada em FCAs ≥ 4 preferencialmente displásicos poderia representar um mecanismo importante de atuação do GO na dose de 100 mg/100 g de p.c. na redução da frequência de FCAs ≥ 4 criptas e de FDMs (também utilizado como marcador de displasia) durante a fase de pós-iniciação tardia da carcinogênese experimental de cólon.

Além disso, o biomarcador mais prático, informativo e vantajoso a ser utilizado exatamente nessa fase e nesse modelo de carcinogênese experimental de cólon é o FDM e FPM, pois essa análise nos possibilita contarmos o número de FCA e analisarmos a presença

ou ausência de mucina ao mesmo tempo, além de não necessitarmos da realização de cortes histológicos e de técnicas de imunoistoquímica.

VIII. Referências Bibliográficas

ABUBAKER, J., BAVI, P., AL-HAQAWI, W., SULTANA, M., AL-HARBI, S., AL-SANEA, N., ABDULJABBAR, A., ASHARI, L. H., ALHOMOUD, S., AL-DAYEL, F., UDDIN, S., AL-KURAYA, K. S. Prognostic significance of alterations in KRAS isoforms KRAS-4A/4B and KRAS mutations in colorectal carcinoma. **J. Pathol.** v. 219(4), p. 435-45, 2009.

AGGARWAL, B. B, SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochem. Pharmacol.** v. 14;71(10), p.1397-421, 2006.

ALFARAS, I., JUAN, M,E., PLANAS, J.M. Trans-Resveratrol reduces precancerous colonic lesions in dimethylhydrazine-treated rats. **J. Agric. Food Chem.** v. 14;58(13):8104-8110, 2010.

ARIKAWA, A. Y., GALLAHER, D. D. Cruciferous vegetables reduce morphological markers of colon cancer risk in dimethylhydrazine-treated rats. **J. Nutr.** v. 138(3), 526-532, 2008.

ASANO, N., KUNO, T., HIROSE, Y., YAMADA, Y., YOSHIDA, K., TOMITA, H., NAKAMURA, Y., MORI, H. Preventive effects of a flavonoid myricitrin on the formation of azoxymethane-induced premalignant lesions in colons of rats. **Asian Pac. J. Cancer Prev.** v. 8(1):73-6, 2007.

BANERJEE, A., QUIRKE, P. Experimental models of colorectal. **Dis. Colon Rectum, Philadelphia.** v. 41, p. 490-505, 1998.

BARDON, S., FOUSSARD, V., FOURNELB, S., LOUBAT, A. Monoterpenes inhibit proliferation of human colon cancer cells by modulating cell cycle-related protein expression. **Cancer Letters.** v. 181, p. 187–194, 2002.

BARKOVICH, R., LIAO, J. C. Metabolic Engineering of Isoprenoids. **Metabolic Engineering.** v. 3, p. 27-39, 2001.

BARTH, S. W., FAHNDRICH, C., BUB A., DIETRICH H., WATZL B., WILL F., BRIVIBA K., RECHKEMMER G. Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats. **Carcinogenesis**. v.26 no.8 pp.1414--1421, 2005.

BIDINOTTO, L. T., COSTA, C. A., SALVADORI, D. M., COSTA, M., RODRIGUES, M. A., BARBISAN, L. F. Protective effects of lemongrass (*Cymbopogon citratus* STAPF) essential oil on DNA damage and carcinogenesis in female Balb/C mice. **J. Appl. Toxicol.** 2010 [Epub ahead of print].

BIRD, R.P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogenesis: preliminary findings. **Cancer Lett.** v. 37, p.147-51, 1987.

BIRD, R. P. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Cancer Lett.** v. 51, p. 55-71, 1995.

BIRD, R. P., SALO, D., LASKO, C., GOOD, C. A novel methodological approach to study the level of specific protein and gene expression in aberrant crypt foci putative preneoplastic colonic lesions by Western blotting and RT-PCR. **Cancer Lett.** v.116, p.15-19, 1997.

BIRD, R. P., GOOD, C. K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Toxicol. Lett.** v.112-113, p. 395-402, 2000.

BURKE, Y. D., STARK, M. J., ROACH, S. L., SEM, S. E., CROWELL, P. L. Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. **Lipids**. v. 32, p. 151-156, 1997.

BURKE, Y. D., AYOUBI, A. S., WERNER, S. R., MCFARLAND, B. C., HEILMAN, D. K., RUGGERI, B. A., CROWELL, P. L. Effects of the isoprenoids perillyl alcohol and farnesol on apoptosis biomarkers in pancreatic cancer chemoprevention. **Anticancer Res.** v. 22, p. 3127-3134, 2002.

CADERNI, G., FEMIA, A.P., GIANNINI, A., FAVUZZA, A., LUCERI, C., SALVADORI, M., DOLARA, P. Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: correlation with carcinogenesis. **Cancer Res.** v.63(10), p. 2388-92, 2003.

CARDOZO, M. T., DE CONTI, A., ONG, T. P., SCOLASTICI, C., PURGATTO, E., HORST, M. A., BASSOLI, B. K., MORENO, F. S. Chemopreventive effects of β -ionone and geraniol during rat hepatocarcinogenesis promotion: distinct actions on cell proliferation, apoptosis, HMGC_oA reductase, and RhoA. **J. Nutr. Biochem.** v. 22(2), p.130-5, 2011.

CARNESECCHI, S., SCHNEIDER, Y., CERALINE, J., DURANTON, B., GOSSE, F., et al. Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 298, p. 197-200, 2002

CARNESECCHI, S., BRAS-GONÇALVES, R., BRADAIA, A., ZEISEL, M., GOSSÉ, F., POUPON M-F., RAUL, F. Geraniol, a component of plant essential oils, modulate DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. **Cancer Lett.** v. 215, p.53-59, 2004

CASEY, P. J.; SEABRA, M. C. Protein Prenyltransferases. **J. Biol. Chem.** v. 271, n.10, p.5289-5292, 1996.

CERDA, S. R., WILKINSON, J. 4TH., THORGEIRSDOTTIR, S., BROITMAN, S. A. R-(+)-perillyl alcohol-induced cell cycle changes, altered actin cytoskeleton, and decreased ras and p34(cdc2) expression in colonic adenocarcinoma SW480 cells. **J. Nutr. Biochem.** v. 10(1), p.19-30, 1999.

CHANG, W-C. L., CHAPKIN, R. S., LUPTON, J. R. Predictive value of proliferation, differentiation and apoptosis as intermediate markers for colon tumorigenesis. **Carcinogenesis.** v. 18 (nº4), p. 721-730, 1997.

CHENG, L., LAI, M. D. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. **World J. Gastroenterol.** v. 9(12), p. 2642-9, 2003.

CLARK, S. S. Perillyl alcohol induces c-Myc-dependent apoptosis in Bcr/Abl-transformed leukemia cells. **Oncology**. v.70(1), p. 13-18, 2006.

CLEGG, R. J.; MIDDLETON, B.; BELL, G. D., WHITE, D. A. The mechanisms of cyclic monoterpene inhibition of 3-hydroxi-3methylglutaryl coenzyme A reductase in vivo in the rat. **J. Biol. Chem.** v. 257, p.2294-99, 1982

CORPET, D. E, PIERRE, F. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. **Eur. J. Cancer**. v. 41(13), p.1911-22, 2005

CORRELL, C. C., NG, L., EDWARDS, P. A. Identification of farnesol as the nonsterol derivative of mevalonic acid required for the accelerated degradation of 3-hydroxi-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. **J. Biol. Chem.** v. 269, p. 17390-17393, 1994

CROWELL, P. L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **J. Nutr.** v. 129, p.775S-78S, 1999.

DAVIDSON, L. A., LUPTON, J. R.,JIANG, Y. H., CHAPKIN, R. S. Carcinogen and dietary lipid regulate ras expression and localization in rat colon without affecting farnesylation kinetics. **Carcinogenesis**. v. 20, p.785–791, 1999

DAVIDSON, L. A, BROWN, R. E., CHANG W-C. L., MORRIS, J. S., WANG, N., CARROL, R. J., TURNER, N. D., LUPTON, J. R., CHAPKIN, R. S. Morphodensitometric analysis of protein kinase C β II expression in rat colon: modulation by diet and relation to in situ cell proliferation and apoptosis. **Carcinogenesis**. v. 21, (8), p. 1513-1519, 2000.

DHINGRA, S.; BANSAL, M.P. Hypercholesterolemia and tissue-specific differential mRNA expression of type-1 5'-iodothyronine deiodinase under different selenium status in rats. **Biol. Res.** v. 39, n. 2, p. 307-319, 2006.

DIAS, M. C., SPINARDI-BARBISAN, A. L. T., RODRIGUES, M. A. M., DE CAMARGO, J. L. V., TERA'N, E., BARBISAN, L.F. Lack of chemopreventive effects of ginger on colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. **Food Chem. Toxicol.** v. 44, p. 877–884, 2006.

DIAS, M. C., VIEIRALVES, N. F., GOMES, M. I., SALVADORI, D. M. , RODRIGUES, M. A., BARBISAN, L.F. Effects of lycopene, synbiotic and their association on early biomarkers of rat colon carcinogenesis. **Food Chem. Toxicol.** V.48(3), p.772-80, 2010.

DUNCAN, R. E., LAU, D., EL-SOHEMY, A., ARCHER, M. C. Geraniol and β -ionone inhibit proliferation, cell cycle progression, and cyclin-dependent kinase 2 activity in MCF-7 breast cancer cells independent of effects on HMG-CoA reductase activity. **Biochem. Pharmacol.** v. 68, p. 1739-1747, 2004.

EDWARDS, P. A.; ERICSSON, J. Sterols and isoprenoids: Signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. **Annu. Ver. Biochem.** v.68, p.157-185, 1999.

ELSON, C. E.; YU, S. G. The chemoprevention of cancer by mevalonate-derived constituents of fruits and vegetables. **J. Nutr.** v.124, p. 607-14, 1994.

ELSON, C. E. Suppression of mevalonate pathway activities by dietary isoprenoids: Protective roles in cancer and cardiovascular disease. **J. Nutr.** v. 125, p. 1666s-72s, 1995.

ELSON, C. E., PEFFLEY, D. M., HENTOSH, P., MO, H. Isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis: Potential application to cancer. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 221, p.294-311, 1999.

EMMERT-BUCK, MR, BONNER, RF, SMITH, PD, CHUAQUI, RF, et al. Laser capture microdissection. **Science.** v. 274(5289), p. 998-1001, 1996.

ESPINDOLA, R. D., MAZZANTINI, R. P., ONG, T. P., CONTI, A. D., HEIDOR, R., MORENO, F. S. Geranylgeraniol and beta-ionone inhibit hepatic preneoplastic lesions, cell proliferation, total plasma cholesterol and DNA damage during the initial phases of hepatocarcinogenesis, but only the former inhibits NF-kappaB activation. **Carcinogenesis**. 2005.

FARBER, E.; SARMA, D.S.R. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. **Lab. Invest.** v.56(1), p.4-22, 1987.

FEARON, E. R., VOGELSTEIN, B. A genetical model for colorectal tumorigenesis. **Cell**. v. 61. p. 759-767, 1990.

FEARON, E. R. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.** v.6, p. 479–507, 2011.

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

FEMIA, A. P., GIANNINI, A., FAZI, M., TARQUINI, E., SALVADORI, M., RONCUCCI, L., TONELLI, F., DOLARA, P., CADERNI, G. Identification of mucin depleted foci in the human colon. **Cancer Prev. Res. (Phila)**. v.1(7):562-567, 2008

FEMIA, A. P., TARQUINI, E., SALVADORI, M., FERRI, S., GIANNINI, A., DOLARA, P., CADERNI, G. K-ras mutations and mucin profile in preneoplastic lesions and colon tumors induced in rats by 1,2-dimethylhydrazine. **Int. J. Cancer**. v. 122(1), p.117-123, 2008.

FEMIA, A. P., SALVADORI, M., BROEKAERT, W. F., FRANÇOIS, I. E., DELCOUR JA, COURTIN, C. M., CADERNI, G. Arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) reduce preneoplastic lesions in the colon of rats treated with 1,2-dimethylhydrazine (DMH). **Eur. J. Nutr.** v. 49(2):127-132, 2010.

FORMAN, M.R.; HURSTING, S.D.; UMAR, A.; BARRETT, J.C. Nutrition and cancer prevention: A multidisciplinary perspective on human trials. **Annu. Rev. Nutr.** v.24, p.223–254, 2004.

FU, Y., DENG, W., KAWARADA, Y., KAWAGOE, M., MA, YZ., LI, X., GUO, N., KAMEDA, T., TERADA, K., SUGIYAMA, T. Mutation and expression of the p53 gene during chemical hepatocarcinogenesis in F344 rats. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1628, p. 40-49, 2003.

GERVAZ, P., BUCHER, P., MOREL, P. Two Colons-Two Cancers: Paradigm Shift and Clinical Implications. **J. Surg.Oncol.** v. 88, p. 261–266, 2004.

GHIRARDI, M., NASCIMBENI, R., VILLANACCI, V., FONTANA, M. G., DI BETTA, E., SALERNI, B. Azoxymethane-induced aberrant crypt foci and colorectal tumors in F344 rats: sequential analysis of growth. **Eur. Surg. Res.** v. 31(3):272-280. 1999.

GILL, C. I., ROWLAND, I. R. Diet and cancer: assessing the risk. **Br. J. Nutr.** v. 88, p. 573-87, 2002.

GIRI, R. K., PARIJA, T., DAS, B. R. D-limonene chemoprevention of hepatocarcinogenesis in AKR mice: inhibition of c-jun and c-myc. **Oncol. Rep.** v. 6(5), p. 1123-1127. 1999.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M.S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature.** v. 343, p.425-30, 1990.

GREENWALD, P., KELLOFF, G. J., BOONE, C. W, Genetic and cellular changes in colorectal cancer: proposed targets of chemopreventive agents. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** v. 4, p. 691-702, 1995.

GUSTIN D. M., BRENNER D. E. Chemoprevention of colon cancer: Current status and future prospects. **Cancer Metastasis Rev.** v. 21, p. 323-348, 2002.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell.** v.100, p.57–70, 2000.

HARSCH, M. *et al.* A new method for histological microdissection utilizing an ultrasonically oscillating needle demonstrated by differential mRNA expression in human lung carcinoma tissue. **Am. J. Pathol.** v.158, p.1985-90, 2001.

HE, L., MO, H., HADISUSILO, S., QURESHI, A. A., ÉLSON C. E. Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo. **J. Nutr.** v.127, p.668-674, 1997.

HOLSTEIN, S. A., WOHLFORD-LENANE, C. L., HOHL, R. J. Isoprenoids influence expression of Ras and Ras-related proteins. **Biochemistry.** v. 41, p. 13698– 13704, 2002.

HOLSTEIN, S. A., WOHLFORD-LENANE, C. L., WIEMER, D. F., HOHL, R. J. Isoprenoid pyrophosphate analogues regulate expression of Ras-related proteins. **Biochemistry.** v. 42, p. 4384–4391, 2003.

HUMPHRIES, A., WRIGHT, N. A Colonic crypt organization and tumorigenesis. **Nat. Rev. Cancer.** v. 8(6):415-424, 2008.

INAMINE, M., SUZUI, M., MORIOKA, T., KINJO, T., KANESHIRO, T., SUGISHITA, T., OKADA, T., YOSHIMI, N. Inhibitory effect of dietary monoglucosylceramide 1-O-beta-glucosyl-N-2'-hydroxyarachidoyl-4,8-sphingadienine on two different categories of colon preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in F344 rats. **Cancer Sci.** v. 96(12):876-81, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2010: Incidência do câncer no Brasil. Disponível em:< www.inca.gov.br> Acesso em: 17 out. 2010.

JANAKIRAM, N. B., COOMA, I., MOHAMMED, A., STEELE, V. E., RAO, C. V. Beta-ionone inhibits colonic aberrant crypt foci formation in rats, suppresses cell growth, and induces retinoid X receptor-alpha in human colon cancer cells. **Mol. Cancer Ther.** v. 7: 181-190, 2008.

JOHNSON, I. T. Anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the colorectal mucosa. **Food Chem. Toxicol.** v. 40, p. 1171-1178, 2002.

JONES, P.A.; BAYLIN, S.B. The Epigenomics of Cancer. **Cell**. v.128, p.683-692, 2007.

KANAI, Y, USHIJIMA, S, TSUDA, H, SAKAMOTO, M, HIROHASHI, S. Aberrant DNA methylation precedes loss of heterozygosity on chromosome 16 in chronic hepatitis and liver cirrhosis. **Cancer Lett**. v.148, p.73-80, 2000.

KHAN, R., SULTANA, S. Farnesol attenuates 1,2-dimethylhydrazine induced oxidative stress, inflammation and apoptotic responses in the colon of Wistar rats. **Chem. Biol. Interact**. v. 192, p.193–200, 2011.

KLAUNIG, J. E., KAMENDULIS, L. M., XU, Y. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. **Hum. Exp. Toxicol**. v. 19, p. 543-555, 2000.

KOLONEL, L. N., ALTSHULER, D., HENDERSON, B .E. The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. **Nat. Rev. Cancer**. v. 4(7), p. 519-27, 2004.

LEE, B. M.; PARK, K. K. Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents. **Mutation Res**. v.523, p.265-278, 2003.

LIU, J. R., CHEN, B. Q., YANG, B. F., DONG, H. W., SUN, C. H., WANG, Q., SONG, G., SONG, Y. Q. Apoptosis of human gastric adenocarcinoma cells induced by β -ionone. **World J. Gastroenterol**. v. 10, p.348-351, 2004.

LOEB, L. A., LOEB, K. R., ANDERSON, J. P. Multiple mutations and cancer. **Proc. Nat. Acad. Sci**. v. 100, p. 776-781, 2003.

MAGGIONI, M, COGGI, G, CASSANI, B, BIANCHI, P. Molecular changes in hepatocellular dysplastic nodules on microdissected liver biopsies. **Hepatology**. 32: 942-6, 2000.

MATHEW, A., PETERS, U., CHATTERJEE, N., KULLDORFF, M., SINHA, R. Fat, fiber, fruits, vegetables, and risk of colorectal adenomas. **Int. J. Cancer**. v. 108, p. 287–292, 2004.

MCLLELLAN, 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, p. 5270, 1991.

MEIGS, T. E., SIMONI, R. D. Farnesol as a regulator of HMG-CoA reductase degradation: Characterization and role of farnesyl pyrophosphatase. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 345, p. 1-9, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - **INCA**. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. INCA, Rio de Janeiro, 2006, 92p.

MIYAMOTO, S., YASUI, Y., OHIGASHI, H., TANAKA, T., MURAKAMI, A. Dietary flavonoids suppress azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in male C57BL/KsJ-db/db mice. **Chem. Biol. Interact.** v. 27;183(2):276-83, 2010.

MO, H., ELSON, C. E. Apoptosis and cell-cycle arrest in human and murine tumor cells are initiated by isoprenoids. **J. Nutr.** v. 129, p. 804-813, 1999.

MO, H., ELSON C. E. Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. **Exp. Biol. Med.** v. 229(7), p. 567-85, 2004.

MORENO, F. S., ROSSIELO, M. R., MANJESHWAR, S., NATH, R., RAO, P. M., RAJALAKSHMI S., SARMA, D. S. R. Effect of β -caroteno on the expression of 3-hydroxi-3-mehyglutaryl coenzyme A reductase in rat liver. **Cancer Lett.** v.96, p. 201-208, 1995.

MORI, H., YAMADA, Y., KUNO, T., HIROSE, Y. Aberrant crypt foci and beta-catenin accumulated crypts; significance and roles for colorectal carcinogenesis. **Mutation Res.** v. 566, p. 191–208, 2004.

MORIOKA, T., SUZUI, M., NABANDITH, V., INAMINE, M., ANIYA, Y., NAKAYAMA, T., ICHIBA, T., YOSHIMI, N. Modifying effects of Terminalia catappa on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. **Eur. J. Cancer Prev.** v. 14(2):101-5, 2005.

NABANDITH, V., SUZUI, M., MORIOKA, T., KANESHIRO, T., KINJO, T.,

MATSUMOTO, K., AKAO, Y., IINUMA, M., YOSHIMI, N. Inhibitory effects of crude alpha-mangostin, a xanthone derivative, on two different categories of colon preneoplastic lesions induced by 1, 2-dimethylhydrazine in the rat. **Asian Pac. J. Cancer Prev.** v. 5(4):433-8, 2004.

NAMBIAR, P. R., NAKANISHI, M., GUPTA, R., CHEUNG, E., FIROUZI, A., MA, X. J., FLYNN, C., DONG, M., GUDA, K., LEVINE, J., RAJA, R., ACHENIE, L., ROSENBERG, D. W. Genetic signatures of high- and low-risk aberrant crypt foci in a mouse model of sporadic colon cancer. **Cancer Res.** v. 15;64(18), p. 6394-6401, 2004.

NEWELL, L. E., HEDDLE J. A. The potent colon carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. **Mutation Res.** v. 564, p. 1-7, 2004.

OHIZUMI, H., MASUDA, Y., YODA, M., HASHIMOTO, S., AIUCHI, T., NAKAJO, S., SAKAI, I., OHSAWA, S., NAKAYA, K.. Induction of apoptosis in various tumor cell lines by geranylgeraniol. **Anticancer Res.** v. 17(2A), p.1051-1057, 1997.

OMS. Organização Mundial de Saúde, **WHO**, 2011.

ONG, T.P.; HEIDOR, R.; DE CONTI, A.; DAGLI, M.L.Z.; MORENO, F.S. Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. **Carcinogenesis.** v.27(6), p.1194-1203, 2006.

PALOZZA, P., COLANGELO, M., SIMONE, R., CATALANO, A., BONINSEGNA, A., LANZA, P., MONEGO, G., RANELLETTI, F. O. Lycopene induces cell growth inhibition by altering mevalonate pathway and Ras signaling in cancer cell lines. **Carcinogenesis.** v.. p.1813-21, 2010.

PAN, M. H., HO C.T. Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. **Chem. Soc. Rev.**, v.37, p. 2558–2574, 2008.

PANAGIOTIS, A., KONSTANTINOPOULOS, MICHALIS V., KARAMOUZIS &

ATHANASIOS, G. PAPA VASSILIOU. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 6, p. 541-555, 2007.

PARKER, R. A., PEARCE, B. C., CLARK, R. W., GORDAN, D. A., WRIGHT, J. J. K. Tocotrienols regulate cholesterol production in mammalian cells by post-transcriptional suppression of 3-hydroxi-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. **J. Biol. Chem.** v. 268, p. 11230-11238, 1993.

PARMIGIANI, R. B.; CAMARGO, A. A. O genoma humano e o câncer. In: FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004.

PAUL, S., DECASTRO, A. J., LEE, H. J., SMOLAREK, A.K. SO, J. S., SIMI, B.. WANG, C. X., ZHOU, R., RIMANDO, A. M., SUH, N. Dietary intake of pterostilbene, a constituent of blueberries, inhibits the b-catenin/p65 downstream signaling pathway and colon carcinogenesis in rats. **Carcinogenesis**. v. 31(7) p.1272–1278, 2010

PAULSEN, J. E. , LOBERG, E. M. , OLSTORN, H. B., KNUTSEN, H., STEFFENSEN, I. L, ALEXANDER, J. Flat dysplastic aberrant crypt foci are related to tumorigenesis in the colon of azoxymethane-treated rat. **Cancer Res.** v.65(1), p.121-9, 2005.

PITOT, H. C., DRAGAN, Y. P, TEEGUARDEN, J., HSIA, S., CAMPBELL, H. Quantitation of multistage carcinogenesis in rat liver. **Toxicol. Pathol.** v.24, p.119-128, 1996.

PITOT, H. C. Pathway of progression in hepatocarcinogenesis. **Lancet**. v. 358, p. 859-860, 2001.

POTTEN, C. S., WILSON, J. W., BOOTH, C. Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium. **Stem Cells**. v. 15, p. 82-93, 1997.

PRETLOW, T. P., BARROW, B. B., ASHTON, W. S. O'RIORDAN, M. A., PRETLOW, T. G., JURCISEK, J. A., STELLATO, T. A. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. **Cancer Res.** v. 51, p.1564-1567, 1991.

PRETLOW, T., PRETLOW, T. Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): Initiation of

colorectal cancer? **Biochim Biophys Acta**. 2005.

QURESHI, A. A., MANGELS, W. R., DIN, Z. Z., ELSON, C. E. Inhibition of mevalonate biosynthesis by the monoterpene d-limonene. **J. Agric. Food. Chem.** v. 36, p. 1220-1224, 1998.

RAJAMANICKAM, S., AGARWAL, R. Natural products and colon cancer: current status and future prospects. **Drug Dev. Res.** v: 69(7), p. 460–471, 2008.

RAJESH, D. Ras mutation , irrespective of cell type and p53 status, determines a cell's destiny to undergo apoptosis by okadaic acid, na inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A. **Mol. Pharmacol.** v. 56, p. 515-525, 1999.

RAJU, J. Azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci: Relevance in studying chemoprevention of colon câncer. **World J. Gastroenterol.** v: 14(43), p. 6632-6635, 2008.

RAO, C. V., NEWMARK, H. L., REDDY, B. S. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 287-290, 1998.

RAO, C. V., NEWMARK, H. L., REDDY, B. S. Chemopreventive effect of farnesol and lanosterol on colon carcinogenesis. **Cancer Detect. Prev.** v. 26, p.419-425, 2002.

REDDY, B. S., WANG, C. X., SAMAHA, H., LUBET, R.'STEELE, V. E., KELLOFF, G. J., RAO, C. V. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. **Cancer Res.** v. 57, p. 420-25, 1997

RENEHAN, A. G., O'DWYER, S. T, HABOUBI, N. J., POTTEN, C. S. Early cellular events in colorectal carcinogenesis. **Colorectal Disease.** v. 4, p. 76–89, 2001.

REYNOSO-CAMACHO, R., GONZÁLEZ-JASSO, E., FERRIZ-MARTÍNEZ, R., VILLALÓN-CORONA, B., LOARCA-PIÑA, G .F., SALGADO, L. M., RAMOS-GOMEZ, M. Dietary supplementation of lutein reduces colon carcinogenesis in DMH-treated rats by modulating K-ras, PKB, and β -catenin proteins. **Nutr. Cancer.** v. 63(1), p. 39-45, 2011.

RONCUCCI, L., PEDRONI M., VACCINAF., BENATTI P., MARZONA L., DE POL A.

Aberrant crypt foci in colorectal carcinogenesis. Cell and crypt dynamics, **Cell Prolif.** v. 33, p. 1-18, 2000.

SAKANO, K., TAKAHASHI, M., KITANO, M., SUGIMURA, T., WAKABAYASHI, K. Suppression of azoxymethane-induced colonic premalignant lesion formation by coenzyme Q10 in rats. **Asian Pac. J. Cancer Prev.** v. 7(4):599-603, 2006.

SELVAM, J. P., ARANGANATHAN, S., NALINI, N. Aberrant crypt foci and agnors as putative biomarkers to evaluate the chemopreventive efficacy of pronyl-lysine in rat colon carcinogenesis. **Invest. New Drugs.** v. 26(6), 531-540, 2008.

SENGOTTUVELAN, M., NALINI, N. Dietary supplementation of resveratrol suppresses colonic tumour incidence in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats by modulating biotransforming enzymes and aberrant crypt foci development. **Br. J. Nutr.** v. 96(1):145-53, 2006.

SEVER, N., SONG, B-L, YABE, D., GOLDSTEIN, J. L., BROWN, M. S., et al. Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 52479-52490, 2003.

SHENG, H., HIROSE, Y., HATA, K., ZHENG, Q., KUNO, T., ASANO, N., YAMADA, Y., HARA, A., OSAWA, T, MORI, H. Modifying effect of dietary sesaminol glucosides on the formation of azoxymethane-induced premalignant lesions of rat colon **Cancer Letters.** v. 8;246(1-2), p. 63-68, 2006.

SHIH, C. K., CHIANG, W., KUO, M. L. Effects of adlay on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. **Food Chem. Toxicol.** v.42(8):1339-47, 2004.

SHIMIZU, M., SHIRAKAMI, Y., SAKAI, H., ADACHI, S., HATA, K., HIROSE, Y., TSURUMI, H., TANAKA, T., MORIWAKI, H. Epigallocatechin gallate suppresses azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in male C57BL/KsJ-db/db mice. **Cancer Prev. Res. (Phila).** v.1(4), 298-304. 2008.

SHIMIZU, M., SHIRAKAMI, Y., IWASA, J., SHIRAKI, M., YASUDA, Y., HATA, K.,

HIROSE, Y., TSURUMI, H., TANAKA, T., MORIWAKI, H. Supplementation with branched-chain amino acids inhibits azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in male C57BL/KsJ-db/db mice. **Clin. Cancer Res.** v.1;15(9):3068-75, 2009.

SHOFF, S. M., GRUMMER, M., YATVIN, M. B., ELSON, C. E. Concentration-dependent increase of murine P388 and B16 population doubling time by the acyclic monoterpene geraniol. **Cancer Res.** v.51, p. 37-42, 1991.

SING, V. N., GABY, S. K. Premalignant lesions: role of antioxidant vitamins and β -carotene in risk reduction and prevention of malignant transformation. **Am. J. Clin. Nutr.** v.53, p. 386s-90s, 1991.

SINGH, J., HAMID, R., REDDY, B. S. Dietary Fat and Colon Cancer: Modulating Effect of Types and Amount of Dietary Fat on ras-p21 Function during Promotion and Progression Stages of Colon Cancer **Cancer Res.** v. 57, p.253-258, 1997.

SOHN, O. S., FIALA, E. S., REQUEIJO, S. P., WEISBURGER, J. H., GONZALEZ, F. J. Differential effects of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoxymethanol. **Cancer Res.** v. 61(23), p.8435-40, 2001.

SPORN M. B. *et al.* Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). **Fed. Proc.**, v.35, p.1332-8, 1976.

SUÁREZ, Y., FERNÁNDEZ, C., LEDO, B., MARTÍN, M., GÓMEZ-CORONADO, D., LASUNCIÓN, M. A. Sterol stringency of proliferation and cell cycle progression in human cells. **Biochim Biophys Acta.** v. 1734(2), p. 203-213, 2005.

SUEHIRO, Y., HINODA, Y. Genetic and epigenetic changes in aberrant crypt foci and serrated polyps. **Cancer Sci.** v. 99, p. 1071–1076, 2008.

SURH, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nat. Rev. Cancer.** v. 3, p. 768-780, 2003.

SUZUKI, R., KOHNO, H., YASUI, Y., HATA, K., SUGIE, S., MIYAMOTO, S.,

SUGAWARA, K., SUMIDA, T., HIROSE, Y., TANAKA, T. Diet supplemented with citrus unshiu segment membrane suppresses chemically induced colonic preneoplastic lesions and fatty liver in male db/db mice. **Int. J. Cancer.** v.15;120(2), p. 252-258, 2007.

TATMAN, D., MO, H. Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine b16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. **Cancer Lett.** v.175, p. 129-139, 2002.

THIERY-VUILLEMIN, A., NGUYEN, T., PIVOT, X., SPANO, J. P., DUFRESNE, A., SORIA, J. C., Molecularly targeted agents: Their promise as cancer chemopreventive interventions. **Eur. J. Cancer.** v.41, p. 2003–2015, 2005.

VIEIRA, A., HEIDOR, R., CARDOZO, M. T., SCOLASTICI, C., PURGATTO, E., SHIGA, T. M., BARBISAN, L. F., ONG, T. P., MORENO, F. S. Efficacy of geraniol but not of β -ionone or their combination for the chemoprevention of rat colon carcinogenesis. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 44(6), p. 538-545, 2011.

WALI R. K., KHARE S., TRETIAKOVA M., COHEN G., NGYEN L., HART J., WANG J., WEN M., RAMASWAMY ^a, JOSEPH L., SITRIN M., BRASITUS T. and BISSONNETTE M. Ursodeoxycholic Acid and F6-D3 Inhibit Aberrant Crypt Proliferation in the Rat Azoxymethane Model of Colon Cancer: Roles of Cyclin D1 and E-Cadherin, **Cancer Epidemiology, Biomarkers, Prevention.** v. 11, 1653-1662, 2002.

WALKER, A. R. Colon cancer and diet, with special reference to intakes of fat and fiber. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 29(12), p. 1417-26, 1976.

WARGOVICH, M. J., JIMENEZ, A., MCKEE, K., STEELE, V. E., VELASCO, M., WOODS J., PRICE, R., GRAY, K., KELLOFF G. J. Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression. **Carcinogenesis.** v. 21, p. 1149-1155, 2000.

WONG, C. S. M., GIBSON, P. R. The trophic effect of dietary fibre is not associated with a

change in total crypt number in the distal colon of rats. **Carcinogenesis**. v. 24. n. 2, p. 343-348, 2003.

WU, B., IWAKIRI, R., OOTANI, A., TSUNADA, S., FUJISE, T., SAKATA, Y., SAKATA,* H., TODA, S., FUJIMOTO, K. Dietary Corn Oil Promotes Colon Cancer by Inhibiting Mitochondria-Dependent Apoptosis in Azoxymethane-Treated Rats. **Exp. Biol. Med.** v. 229, p.1017–1025, 2004.

XIAO, H., HAO, X., SIMI, B., JU, J., JIANG, H., REDDY, B. S., YANG, C. S. Green tea polyphenols inhibit colorectal aberrant crypt foci (ACF) formation and prevent oncogenic changes in dysplastic ACF in azoxymethane-treated F344 rats. **Carcinogenesis**. V. 29(1), p. 113-119, 2008

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

YASUDA, Y., SHIMIZU, M., SHIRAKAMI, Y., SAKAI, H., KUBOTA, M., HATA, K., HIROSE, Y., TSURUMI, H., TANAKA, T., MORIWAKI, H. Pitavastatin inhibits azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in C57BL/KsJ-db/db obese mice. **Cancer Sci.** v.101(7):1701-7, 2010.

YOUNG, M. R., YANG, H-S., COLBURN, N. H. Promising molecular targets for cancer prevention: AP-1, NF-kB and Pcd4. **Trends in Molec. Med.** v. 9., p. 36-41, 2003.

YU, S. G., ABUIRMEILEH, N. M., QURESHI, A. A., ELSON, C. E. Dietary β -ionone suppresses hepatic 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 42, p. 1493-1496, 1994.

YU, S. G., HILDEBRANDT, L. A., ELSON, C. E. Geraniol, an inhibitor of mevalonate biosynthesis, suppress the growth of hepatomas e melanomas transplanted to rats and mice. **J. Nutr.** v. 125, p. 2763-2767, 1995.

ZHENG, Y., KRAMER, M., LUBET, R.A., STEELE, V. E., KELLOFF, G. J., PEREIRA, M. A. Effect of retinoids on AOM-induced colon cancer in rats: modulation of cell proliferation, apoptosis and aberrant crypt foci. **Carcinogenesis**. v. 20, p. 255-260, 1999.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA/FCF/67 /2009

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **“Avaliação da eventual atividade quimiopreventiva do isoprenóide Geraniol em lesões displásicas colônicas quando administrado durante a fase de pós-iniciação de modelo de carcinogênese de cólon”** (Protocolo nº 239), de responsabilidade da pesquisadora **Alessandra Vieira** sob a orientação do(a) Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA, desta Faculdade, em 13 de julho de 2009.

São Paulo, 11 de agosto de 2009.

Prof. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEEA/FCF/USP