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

Tributirina reduz a expressão de bcl-x_L no cólon
médio-distal quando administrada a ratos durante
a etapa de pós-iniciação de modelo de
carcinogênese de cólon

Giulianna Paola Cruzetta

São Paulo
2008

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

Tributirina reduz a expressão de bcl-x_L no cólon
médio-distal quando administrada a ratos durante
a etapa de pós-iniciação de modelo de
carcinogênese de cólon

Giulianna Paola Cruzetta

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno

São Paulo
2008

19284

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013894

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Cruzetta, Julianna Paola

C957t A tributirina reduz a expressão de bcl-x_L no cólon médio-distal quando administrada a ratos durante a etapa de pós-iniciação de modelo de carcinogênese de cólon / Julianna Paola Cruzetta. -- São Paulo, 2008. 142p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador: Moreno, Fernando Salvador

1. Nutrição experimental 2. Câncer : Prevenção 3. Alimentos funcionais : Ciência dos alimentos 4. Suplementos dietéticos : Ciência dos alimentos 5. Dieta : Nutrição experimental I. T. II. Moreno, Fernando Salvador, orientador.

641.1 CDD

Giulianna Paola Cruzetta

Tributirina reduz a expressão de bcl-x_L no cólon médio-distal quando administrada a ratos durante a etapa de pós-iniciação de modelo de carcinogênese de cólon

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno
Orientador/presidente

Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan
1º examinador

Prof. Dr. Helio Vannucchi
2º examinador

São Paulo, 24 de outubro de 2008

*Dedico ao meu marido, **Roberto Odebrecht Rocha**,
com amor, admiração e gratidão, por sua compreensão
e apoio nesta etapa tão importante da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao ilustre Professor Fernando Salvador Moreno, por ter acreditado em mim e ter me dado a oportunidade de aprender e de ser sua orientada. Obrigada por guiar meus passos nessa trajetória rumo ao meu crescimento científico, intelectual e pessoal.

Ao meu grande amor, Roberto, que nunca mediu esforços em prol da minha felicidade. Obrigada pelos sacrifícios que você fez para apoiar este meu sonho.

Aos meus pais, Cezar e Glória, por me mostrarem que a vida é feita de desafios e que não há limites que não possam ser superados. Obrigada por uma vida inteira de amor, dedicação, ensinamentos, paciência e total apoio.

À minha querida irmã, Lorena, que apesar de hoje estar fisicamente longe, nunca deixou de estar presente em todos momentos dessa trajetória. Obrigada por ouvir (ou ler) e dividir não só os momentos bons, mas também, me apoiar nos ruins.

Ao meu irmão Pietro, minha cunhada Tábata, minha avó Lourdes e minhas tias Zezé e Sandra por torcerem sempre por mim, pela compreensão, apoio e amizade.

Ao Professor Thomas Prates Ong, muito obrigada por participar efetivamente desta trajetória, seus conselhos, sugestões e ensinamentos sempre foram muito bem vindos.

Ao Professor Luiz Fernando Barbisan, agradeço por sua grande contribuição na minha qualificação e por ter estado sempre solícito, não só no meu, mas em todos os trabalhos de carcinogênese de cólon do nosso grupo.

Aos amigos Renato e Alessandra, meus grandes "companheiros do cólon", obrigada pelos ensinamentos e incentivo que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Vocês começaram esta árdua trajetória, a qual espero ter ajudado a construir.

Aos amigos e grandes pesquisadores Carlos e Aline, muito obrigada pela efetiva participação, por toda ajuda prática e científica, apoio e carinho.

À minha amiga biomédica- estatística Bruna, agradeço não só pelos ensinamentos estatísticos, mas também por cada momento agradável de convivência, que muito contribuíram para meu crescimento intelectual e pessoal.

Aos demais amigos do laboratório: André, Bianca, Camila, Clarissa, Douglas, Letícia, Joice, Juliana, Mariana e Mônica que de várias formas contribuíram para o êxito deste trabalho.

Aos Professores e amigos da monitoria de Bromatologia, pelos ensinamentos.

Às amigas monitoras Claudimar, Helena, Marliz e Milana pelos vários momentos de alegria. Foi um enorme prazer conhecê-las e ter convivido com vocês.

Aos dedicados funcionários do departamento Cléo, Edilson, Lurdinha, Joana e Mônica que muito me ajudaram e me apoiaram, meus sinceros agradecimentos.

Aos demais professores e muitos colegas do departamento por todo suporte.

Aos funcionários do biotério pelo apoio e pela dedicação aos animais que foram fundamentais neste trabalho.

À querida Valentina pelo companheirismo em todos os momentos, inclusive nas inúmeras horas que passei em frente ao computador.

À minha grande amiga e excepcional nutricionista Ana Paula (in memoriam), que sempre me incentivou a seguir com este sonho. Obrigada por cada ilustre palavra que um dia você me falou e por cada momento que passamos juntas.

Às agências de fomento, CAPES, pela concessão da minha bolsa, FAPESP e CNPQ pelo suporte financeiro do laboratório.

*“O saber não está na ciência alheia que se absorve;
mas, principalmente, nas idéias próprias,
que se geram dos conhecimentos absorvidos,
mediante a transmutação por que passam
no espírito que os assimila.”*

Rui Barbosa

RESUMO

CRUZETTA, G.P. **Tributirina reduz a expressão de bcl-x_L no cólon médio-distal quando administrada a ratos durante a etapa de pós-iniciação de modelo de carcinogênese de cólon.** 2008. 142 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O butirato é um importante ácido graxo de cadeia curta proveniente da fermentação bacteriana de vários tipos de fibras no cólon. Diversos estudos têm demonstrado que o butirato desempenha um papel importante na prevenção do câncer e na manutenção da homeostase colônica, por meio da regulação da proliferação celular, diferenciação e apoptose. A acetilação das histonas tem sido proposta como um dos possíveis mecanismos de ação responsável pelo efeito quimiopreventivo do butirato. O objetivo desse trabalho foi avaliar o papel da tributirina (TB), um pró-fármaco do ácido butírico, na fase de pós-iniciação da carcinogênese de cólon induzida por dimetilhidrazina (DMH), enfatizando a expressão das histonas acetiladas (H3K9 e H4K16) e das proteínas pró e anti-apoptóticas da família Bcl-2 (Bak, Bcl-x_L). Durante 5 semanas consecutivas, ratos Wistar receberam diariamente TB (200 mg/100 g peso corpóreo; grupo TB) ou maltodextrina (MD; 300 mg/100 g peso corpóreo; grupo MD; controle isocalórico). Focos de Criptas Aberrantes (FCAs) são lesões pré-neoplásicas e biomarcadores da carcinogênese de cólon. Esses foram analisados nos cólons corados com azul de metileno a 0,02%, porém, nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos, TB e MD ($p > 0,05$). A mucosa colônica foi utilizada para analisar a expressão de H3K9 e H4K16 por western blot, contudo, não houve diferença significativa entre os grupos TB e MD. A expressão da proteína pró-apoptótica Bak também foi semelhante nos grupos TB e MD; todavia, a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-x_L foi menor no cólon distal dos ratos tratados com TB sugerindo participação dessa na indução de apoptose. Portanto, apesar de trabalhos apontarem para os resultados benéficos do butirato, são necessários mais

estudos *in vivo* para o melhor entendimento dos efeitos mediados pelo butirato na carcinogênese de cólon.

Palavras-chaves: carcinogênese, quimioprevenção, tributirina, histona, apoptose.

ABSTRACT

CRUZETTA, G.P. **Tributylin reduces bcl-x_L expression on distal colon when offered to rats during post-initiation phase of colon carcinogenesis.** 2008. 142 p. Master's degree dissertation— Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2008.

Butyrate is an important short-chain fatty acid, product of intestinal bacterial fermentation of mainly dietary fiber. Several studies have shown that butyrate has an important role in the maintenance of colonic homeostasis as regulator of colonocyte proliferation, differentiation and apoptosis. Thus may play a role in cancer prevention. Histone deacetylation has been proposed to be one of the possible mechanisms of action of butyrate mediated effects on colon carcinogenesis. The aim of this study was to evaluate the role of tributyrin (TB), a butyric acid pro-drug, on post-initiation phase of colon carcinogenesis induced by dimethylhydrazine (DMH), emphasizing the expression of acetylated histones (H3K9, H4K16) and Bcl-2 family proteins (Bak, Bcl-x_L) mediated apoptosis. During 5 consecutive weeks, Wistar rats received daily TB (200 mg/100 g body weight; TB group) or maltodextrin (MD; 300 mg/100 g body weight; MD group; isocaloric control). Aberrant Crypt Focus (ACFs) are considered pre-neoplastic cells and biomarker of colon carcinogenesis. ACFs were counted on colons stained with 0,02% methylene blue, under a light microscope. No statistic differences were found for ACF when compared both groups receiving TB or MD ($p>0,05$). Colonic mucosa scraping was used for analysis of H3K9 and H4K16 by Western Blot. No significant differences were demonstrated between TB and MD groups. Bak expression were similar between TB and MD groups, but Bcl-x_L expression seems to be reduced only on distal colon of the TB group, suggesting that TB may induce apoptosis. Although most studies point towards beneficial results of butyrate, more *in vivo* studies are needed to contribute to our current understanding of butyrate-mediated effects on colon carcinogenesis.

Key-words: carcinogenesis, chemoprevention, tributyrin, histone, apoptosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação dos tipos de câncer mais incidentes, estimadas para o ano de 2008, na população brasileira, excluindo-se o câncer de pele não melanoma. Fonte: MS/Instituto Nacional de Câncer – INCA.

Figura 2: Representação espacial das taxas brutas de incidência de CCR, por 100.000 homens, estimadas para o ano de 2008, segundo a Unidade da Federação. Fonte: MS/Instituto Nacional de Câncer – INCA.

Figura 3: Representação espacial das taxas brutas de incidência de CCR, por 100.000 mulheres, estimadas para o ano de 2008, segundo a Unidade da Federação. Fonte: MS/Instituto Nacional do Câncer – INCA.

Figura 4: : **A.** Representação espacial das histonas H3 e H4; **B.** representação espacial do octâmero de histonas, adaptado de Davie, 2003.

Figura 5: Representação espacial da remodelação da estrutura da cromatina após a acetilação ou desacetilação das histonas pelas enzimas HAT e HDAC; adaptado de Davie, 2003.

Figura 6: Esquema representativo demonstrando as zonas proliferativas da cripta colônica normal. Adaptado de Pinho, 2005.

Figura 7: Esquema representativo do metabolismo da DMH. Adaptado de Fiala, 1977.

Figura 8: Estrutura química da molécula de tributirina, originando 3 moléculas de ácido butírico. Adaptado de Edelman, 2003.

Figura 9: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da atividade quimiopreventiva da tributirina, na etapa de pós-iniciação de modelo de carcinogênese de cólon induzida por DMH.

Figura 10: Evolução do peso corpóreo de ratos Wistar, não tratados ou submetidos ao modelo de carcinogênese de cólon e tratados com MD ou TB durante a etapa de pós-iniciação.

Figura 11: Evolução do consumo de ração dos ratos não tratados e tratados com MD ou TB, durante todo o período experimental de 8 semanas, de modelo de carcinogênese de cólon induzida por DMH.

Figura 12: Exemplo de um Foco de Criptas Aberrantes (FCAs) contendo 6 criptas aberrantes; observado na mucosa colônica de rato Wistar submetido ao modelo de carcinogênese de cólon induzida por DMH; quando corado com azul de metileno (Objetiva de 40X).

Figura 13: Número de FCAs e multiplicidade de FCAs (numero de criptas por foco) no CÓLON MÉDIO-PROXIMAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon.

Figura 14: Número de FCAs e multiplicidade de FCAs (numero de criptas por foco) no CÓLON MÉDIO-DISTAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon.

Figura 15: Número de FCAs/cm2 e multiplicidade (numero de criptas por foco) de FCAs/cm2 no CÓLON MÉDIO-PROXIMAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon.

Figura 16: Número de FCAs/cm2 e multiplicidade (numero de criptas por foco) de FCAs/cm2 no CÓLON MÉDIO-DISTAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon.

Figura 17: Immunoblotting representando a expressão de H3K9 em nível de proteína no cólon MÉDIO-PROXIMAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon.

Figura 18: Immunoblotting representando a expressão de H3K9 em nível de proteína no cólon MÉDIO-DISTAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon.

Figura 19: Immunoblotting representando a expressão de H4K16 em nível de proteína no cólon MÉDIO-PROXIMAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon.

Figura 20: Immunoblotting representando a expressão de H4K16 em nível de proteína no cólon MÉDIO-DISTAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon.

Figura 21: Immunoblotting representando a expressão de BAK em nível de proteína no cólon MÉDIO-PROXIMAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon.

Figura 22: Immunoblotting representando a expressão de BAK em nível de proteína no cólon MÉDIO-DISTAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon.

Figura 23: Immunoblotting representando expressão de Bcl-xL em nível de proteína no cólon MÉDIO-PROXIMAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon.

Figura 24: Immunoblotting representando expressão de Bcl-xL em nível de proteína no cólon MÉDIO-DISTAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso corpóreo e hepático de ratos Wistar, não tratados ou submetidos ao modelo de carcinogênese de cólon e tratados com MD ou TB durante a etapa de pós-iniciação.

Tabela 2: Número de FCAs de acordo com sua multiplicidade, no CÓLON MÉDIO-PROXIMAL de ratos Wistar tratados por 5 semanas com MD ou TB, na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon induzida por DMH.

Tabela 3: Número de FCAs de acordo com sua multiplicidade, no CÓLON MÉDIO-DISTAL de ratos Wistar tratados por 5 semanas com MD ou TB, na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon induzida por DMH.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB = ácido butírico

AGCC = ácidos graxos de cadeia curta

AOM = azoximetano

APC = gene Polipose Adenomatosa Coli

CCR = câncer colorretal

DMH = 1,2 dimetilhidrazina

E = eutanásia

EUA = Estados Unidos da América

FCAs = focos de criptas aberrantes

H3K9 = histona H3 acetilada no resíduo de lisina 9

H4K16 = histona H4 acetilada no resíduo de lisina 16

HAT = enzima acetiltransferase de histona

HDAC = enzima desacetilase de histona

HRP = "Horseradish Peroxidase"

INCA = Instituto Nacional de Câncer

MD = maltodextrina

OMS = Organização Mundial de Saúde

PBS = solução salina tamponada com fosfato

TB = tributirina

UV = ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Epidemiologia do Câncer.....	15
1.2. Carcinogênese.....	20
1.3. Eventos Epigenéticos na Carcinogênese – Modulação das Histonas.....	24
1.4. Homeostase do Epitélio Colônico	30
1.5. Ciclo celular, proliferação e diferenciação celular.....	33
1.6. Apoptose.....	34
1.7. Carcinogênese de Cólon.....	37
1.8. Quimioprevenção do Câncer de Cólon.....	49
2. OBJETIVOS.....	62
2.1.Geral.....	62
2.2.Específico.....	62
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	63
3.1. Animais	63
3.2. Modelo de Carcinogênese de Cólon.....	64
3.3. Protocolo Experimental.....	64
3.4. Pesquisa de Focos de Criptas Aberrantes (FCAs).....	67
3.5. Avaliação da expressão de H3K9 e H4K16.....	68
3.5.1. Extração ácida de histonas.....	68
3.5.2. Quantificação da concentração de histonas nas amostras.....	69
3.5.3. Western Blotting de H3K9 e H4K16.....	70
3.6. Avaliação da expressão de Bak e Bcl-xL.....	72
3.6.1. Extração de proteína citoplasmática.....	72
3.6.2. Quantificação da concentração protéica nas amostras.....	72
3.6.3. Western Blotting de Bak e Bcl-x.....	73
3.7. Análise Estatística.....	75
4. RESULTADOS.....	76
4.1. Peso dos animais.....	76
4.2. Consumo de ração dos animais.....	78

4.3. Pesquisa de Focos de Ciertas Aberrantes (FCAs).....	79
4.4. Western-blotting para H3K9 e H4K16.....	84
4.5. Western-blotting para Bak e Bcl-x _L	87
5. DISCUSSÃO.....	90
6. CONCLUSÕES.....	110
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
8. ANEXOS OBRIGATÓRIOS.....	130

1- INTRODUÇÃO:

1.1) Epidemiologia do Câncer:

Câncer é um termo universal utilizado para caracterizar um grupo de mais de 100 tipos de doenças crônico-degenerativas que pode afetar qualquer parte do organismo e qualquer indivíduo. Esta doença configura-se como um grande problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento; além de representar a segunda principal causa de morte em grande parte destes países (OMS, 2007).

De forma global, do total de 58 milhões de óbitos no ano de 2005, o câncer foi responsável por 7,6 milhões. Este número hediondo expressa 13% do total de mortes no mundo. Neste contexto, o câncer de pulmão foi o que apresentou maior mortalidade (1,3 milhão), seguido sucessivamente pelo de estômago (cerca de 1 milhão); de fígado (662 mil); de cólon (655 mil); e de mama (502 mil) (OMS, 2007).

Um estudo de Kamangar publicado em 2006 compilou dados de incidência e mortalidade dos cinco continentes, entre os anos de 1993 a 2001, e revelou resultados importantes. Neste período a média da incidência anual de câncer no mundo foi em torno de 10.864.499 casos, sendo maior nos países subdesenvolvidos quando comparados aos países desenvolvidos. Do mesmo modo, a mortalidade foi maior nos países menos desenvolvidos e alcançou uma média anual de 6.724.931 casos (KAMANGAR, 2006).

Esta diferença alarmante entre países desenvolvidos e subdesenvolvidos pode acontecer, já que a incidência e mortalidade por câncer são influenciadas por vários fatores que não só a suscetibilidade genética. A incidência de câncer também é

influenciada pela expectativa de vida de uma população, bem como, por fatores ambientais, sócio-econômicos e culturais. Cita-se como exemplo, o acesso de uma população às medidas de prevenção e controle da saúde (políticas de prevenção da doença), pela qualidade dos serviços de saúde local, bem como pelo nível de instrução e informação desta população. Já, a mortalidade pode ser influenciada pela incidência de câncer, por fatores biológicos individuais, pelas características e estadiamento do tumor ao diagnóstico, assim como, pelo acesso, tipo e resposta ao tratamento. Além disto, a falta de um efetivo controle de registros em determinados países também pode influenciar os dados de incidência e mortalidade (KAMANGAR, 2006).

Segundo a OMS, mais de 70% de todas as mortes causadas por câncer em 2005 ocorreram em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, onde os recursos disponíveis para prevenção, diagnóstico e tratamento são limitados (OMS, 2007).

Nos EUA o câncer representa a segunda causa de morte em adultos, sendo responsável por uma a cada 4 mortes. Nesse país desenvolvido, estimou-se 1.444.920 casos novos e 559.650 mortes por câncer para o ano de 2007 (JEMAL, 2007).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou que em 2008 ocorrerão 466.730 casos novos de câncer, atingindo cerca de 231.860 indivíduos do sexo masculino e 234.870 indivíduos do sexo feminino. De acordo com a localização primária da doença e, excluindo-se o câncer de pele não melanoma (estimado em 115 mil casos novos), o câncer de próstata (49 mil) e mama feminina (49 mil) ocupam a primeira posição na estimativa de incidência para 2008, seguidos respectivamente pelos cânceres de cólon e reto (27 mil) e pulmão (27 mil), de estômago (22 mil) e de colo do útero (19 mil) (MS/INCA, 2008) (Figura 1).

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comum no mundo. Segundo o estudo de Kamangar, a incidência anual de CCR no período de 1993 a 2001 ficou em torno de 1.023.256 casos e, de forma oposta à incidência geral de câncer, foi maior nos países desenvolvidos. Já a mortalidade por CCR no mesmo período atingiu uma média anual de 529.020, também maior nos países desenvolvidos. Entre os anos de 1973 e 1997 a incidência de câncer de cólon aumentou na maioria dos países do mundo, exceto nos EUA, onde começou a decair lentamente a partir de meados da década de 80, devido à implementação de políticas adequadas de controle (KAMANGAR, 2006).

Nos EUA o CCR também é o terceiro câncer mais comum e o terceiro em mortalidade para ambos os sexos, onde representa aproximadamente 10% de todos os tipos de carcinoma, com uma estimativa de 153.660 casos novos e 52.180 mortes para o ano de 2007 (JEMAL, 2007).

A incidência de casos de CCR estimada para 2008 no Brasil é ligeiramente maior em mulheres (14.500) que em homens (12.490). Excluindo-se o câncer de pele não melanoma, no sexo feminino o CCR ocupa a quarta posição, enquanto no sexo masculino o CCR ocupa a terceira posição (MS/INCA 2008), (Figuras 2 e 3).

Estudos mostram que 35% de todos os cânceres de cólon ocorrem no sigmóide, 22% no ceco, 12% no cólon ascendente, 10% no cólon transversal e 7% no cólon descendente (RUPNARAIM, 2004).

Observando-se o crescimento de casos novos ao longo dos anos acredita-se que, se a tendência atual não se modificar, em 20 anos a incidência mundial de câncer aumentará em cerca de 50% (MS/INCA, 2008).

Prevê-se que, em 2020, o número de casos novos por ano, atinja 15 milhões de indivíduos, e nesta conjuntura, aproximadamente 60% desses novos casos atingirão principalmente os países em desenvolvimento (OMS, 2007; MS/INCA, 2008).

Em relação à mortalidade por câncer, a OMS prevê que em 2020 haverá 9 milhões de mortes por câncer no mundo e este número poderá chegar a 11,4 milhões em 2030 (OMS, 2007).

Fica claro, portanto, que é necessário implementar medidas de controle e prevenção de câncer para modificar a tendência atual. Resultados de numerosas pesquisas epidemiológicas demonstraram que existem medidas efetivas de prevenção primária e secundária que podem reduzir substancialmente pelo menos um terço do número de casos novos de câncer e prevenir muitas mortes atribuídas a esta doença maligna (MS/INCA, 2008).

Figura 1: Representação dos tipos de câncer mais incidentes, estimados para o ano de 2008, na população brasileira, excluindo-se o câncer de pele não melanoma. Fonte: MS/Instituto Nacional do Câncer - INCA

Homens

Figura 2: Representação espacial das taxas brutas de incidência de CCR, por 100.000 homens, estimadas para o ano de 2008, segundo a Unidade da Federação. Fonte: MS/Instituto Nacional do Câncer - INCA

Mulheres

Figura 3: Representação espacial das taxas brutas de incidência de CCR, por 100.000 mulheres, estimadas para o ano de 2008, segundo a Unidade da Federação. Fonte: MS/Instituto Nacional do Câncer – INCA.

1.2) Carcinogênese:

Durante muitos anos, acreditou-se que o câncer seria uma doença de cunho exclusivamente genético. Hoje sabe-se que a origem epigenética do câncer é tão importante quanto a genética. Esta doença resulta, principalmente, da elevada expressão de oncogenes associada à inativação de genes supressores de tumor ou mutação de genes de reparo do DNA; bem como, da alteração epigenética em células normais (BERTRAM, 2000; CARBONE, 2004; RUPNARAIM, 2004; DASHWOOD, 2007).

A evolução de um tecido normal para um tecido com características de malignidade e invasão pode durar em torno de 5 a 20 anos e é influenciada por fatores genéticos hereditários e também por fatores ambientais que podem favorecer alterações genéticas em células somáticas (CARBONE, 2004; DE VITA, 2005). Além disto, mecanismos epigenéticos como a metilação do DNA, acetilação de histonas e “imprinting” genômico, podem alterar o padrão de expressão gênica contribuindo para a proliferação celular descontrolada e o surgimento do câncer. Assim, as modificações epigenéticas parecem predispor as células às mutações genéticas, determinando o efeito dos subseqüentes insultos genéticos, além de atuar na evolução do câncer (KLAUNIG, 2000; JONES, 2003; BAYLIN, 2006).

A palavra carcinogênese é derivada do grego, onde *karkinos* significa câncer e *genesis* significa produção ou origem. Portanto, é o processo de desenvolvimento do câncer que envolve múltiplas etapas e acumula diversas alterações genéticas e/ou epigenéticas em sua trajetória (FARBER, 1991; LOEB, 2003; DE VITA, 2005). O câncer de cólon, por exemplo, não resulta de uma única mutação, mas de pelo menos 3 a 20 delas (DE VITA, 2005). O processo carcinogênico se resume em três

etapas básicas principais: iniciação, promoção e progressão, as quais envolvem múltiplos eventos (PITOT, 1991; YOUNG, 2003; DE VITA, 2005).

O primeiro estágio da carcinogênese conhecido como etapa de iniciação, caracteriza-se pela alteração irreversível no material genético da célula iniciada (PITOT, 1991; FARBER, 1995). A iniciação começa com a exposição de células normais a agentes carcinogênicos que promovem mutações permanentes no DNA, durante a replicação ou reparo e, um ciclo de proliferação celular fixaria estas mutações (HEMMINKI, 1993; FORMAN, 2004).

Os agentes carcinogênicos iniciadores podem ser de natureza: (1) física, como por exemplo, a radiação; (2) biológica, como no caso de vírus, como *HPV*, ou bactérias, como o *H. pylori* ou (3) química, como por exemplo, a nicotina e o alcatrão (VENITT, 1994; YOUNG, 2003).

Os carcinógenos químicos são eletrofilicos e altamente reativos, atuam por mecanismo genotóxico. Assim, ligam-se diretamente ao DNA causando danos e formando adutos de DNA. Estes agentes carcinogênicos podem ser também diretos ou indiretos. Os diretos não necessitam de ativação prévia, enquanto os indiretos (pró-carcinógenos) precisam ser metabolizados por enzimas de fase I para exercer efeito carcinogênico (WILLIAMS, 2001; POIRIER, 2004). Este é o caso da 1,2 dimetilhidrazina (DMH), um carcinógeno químico indireto que é bastante utilizado para induzir carcinogênese de cólon em modelos experimentais e, para tal, necessita ser convertida a metildiazônio (FIALA, 1977).

As mutações podem ocorrer também em genes supressores de tumor e/ou em proto-oncogenes que se tornam oncogenes (LOEB, 2003). Um oncogene pode ser qualquer gene que codifique uma proteína capaz de induzir câncer, como exemplo o *ras* e o *v-scr* e proto-oncogene é o gene celular normal do qual o oncogene se

originou. Na maioria dos cânceres de cólon, por exemplo, pode-se observar mutação no gene *ras*, porém isto não ocorre no DNA humano normal (LUEBECK, 2002).

Uma vez iniciada, a célula pode se transformar em maligna se receber estímulos promotores específicos de malignidade (HEMMINKI, 1993; PITOT, 2001; FORMAN, 2004).

A segunda etapa da carcinogênese é denominada promoção, que apresenta longa duração e pode ser revertida desde que seja descontinuada a exposição ao agente promotor. As células que foram previamente iniciadas precisam sofrer ação de um agente carcinogênico promotor, de forma contínua, para que ocorra a expansão clonal seletiva destas células, que normalmente apresentam alterações morfológicas e/ou fenotípicas (SING, 1991; PITOT, 2001; FORMAN, 2004). Nessa fase, formam-se então, lesões pré-neoplásicas, como por exemplo, os focos de criptas aberrantes (FCAs) no cólon (BIRD, 1987; GUSTIN, 2002).

Exemplos de agentes promotores são o fenobarbital, bifenis policlorados, e hormônios como o estradiol (WILLIAMS, 2001). Alguns agentes carcinogênicos iniciadores são também promotores, os chamados carcinógenos completos, como é o caso, por exemplo, da dimetilhidrazina (DMH) (FIALA, 1977).

O último estágio da oncogênese é a progressão, quando se origina a neoplasia maligna propriamente dita. Ocorre evolução e instabilidade cariotípica, além de alterações na estrutura do genoma das células afetadas, promovendo uma taxa de proliferação aumentada e descontrolada, associada às alterações bioquímicas, estruturais e perda de função das células originais (FARBER, 1991; DE VITA, 2005).

Nesta fase, as células apresentam caráter invasivo para tecidos circunvizinhos e potencial metastático à distância. Ou seja, essas células podem se desprender e alcançar a corrente sanguínea e se estabelecer e proliferar em áreas distantes do

local de sua origem, formando metástases (SING, 1991; YOUNG, 2003; DE VITA, 2005).

Ainda assim, mesmo com a capacidade de metástase, algumas neoplasias malignas não ultrapassam a membrana basal; neste caso, apresentam melhor prognóstico e são chamados carcinomas *in situ* (DE VITA, 2005).

Sabendo-se que a característica principal do câncer é a proliferação celular descontrolada, torna-se importante estudar e elucidar os mecanismos pelos quais isto acontece na tentativa de intervir neste processo (HANAHA, 2000).

Mutações genéticas em oncogenes induzem alterações de vias de transdução de sinal causando estímulos proliferativos, inibição de apoptose ou senescência, alteração de etapas críticas do ciclo celular e/ou desregulação de fatores de transcrição, contribuindo para um genótipo maligno (HANAHA, 2000; DE VITA, 2005).

1.3) Eventos Epigenéticos na Carcinogênese – Modulação das Histonas:

Epigenética é um termo utilizado para se referir às alterações genéticas que não envolvem mudanças na sequência de DNA, mas que acabam intervindo na expressão gênica, causando silenciamento ou hiperativação de um gene. Esse evento ocorre principalmente em consequência de alterações no padrão de metilação do DNA, bem como, por modificações da cromatina em nível de histonas (DASHWOOD, 2007).

Embora as alterações epigenéticas possam ocorrer em qualquer fase da carcinogênese, parece acontecer com mais frequência durante as etapas iniciais do processo neoplásico, preferencialmente nas lesões pré-neoplásicas, favorecendo com isso, o desenvolvimento do câncer (BAYLIN, 2006).

Os eventos epigenéticos desempenham um importante papel no processo de diferenciação celular, permitindo que as células mantenham características estáveis diferentes, apesar de conterem o mesmo material genético (DAVIE, 2003; MCLAUGHLIN, 2004).

Alguns exemplos de modificações epigenéticas incluem a metilação do DNA, o *imprinting* genômico e a modulação das histonas. Como consequência destas alterações epigenéticas pode ocorrer o silenciamento ou a ativação de genes (JONES, 2003; BAYLIN, 2006).

Estudos recentes indicam que no câncer de cólon, as alterações epigenéticas parecem induzir a evolução das lesões pré-neoplásicas durante os estágios iniciais da carcinogênese por meio do silenciamento gênico anormal. Dentre os diversos genes que são silenciados, e que interferem diretamente na carcinogênese de cólon, podemos destacar por exemplo, o p21 e o bax (HINNEBUSH, 2002; BAYLIN, 2006).

As histonas são proteínas ricas em lisina e arginina que juntamente com o DNA formam uma estrutura denominada nucleossomo. Parafraseando, cada nucleossomo é composto por um octâmero, formado por quatro pares de histonas, no qual DNA se enrola duas vezes (figura 4). Várias unidades de repetição de nucleossomos formam a cromatina. A estrutura da cromatina permite que o DNA fique bem compactado para que todo genoma eucariótico se insira dentro do núcleo das células (JONES, 2003; DAVIE, 2003; MCLAUGHLIN 2004).

Existem seis classes conhecidas de histonas, quatro delas (H2A, H2B, H3 e H4) agregam-se em pares para formar o octâmero no qual o DNA se enrola. As outras duas H1 e H5 são semelhantes, e fazem parte do complexo maior que liga os nucleossomos; portanto, são primordiais para que o conjunto histona-DNA se enrole de uma forma ainda mais eficaz (DAVIE, 2003; MCLAUGHLIN, 2004).

Até a década de 90 acreditava-se na premissa de que as histonas funcionavam apenas como a matriz na qual o DNA se enrola. Contudo, hoje, estudos apostam no potencial das histonas em atuar na regulação gênica, tendo em vista que estas sofrem modificações pós-transcricionais importantes, tais como: metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, biotinilação e ribosilação (DAVIE, 2003; DASHWOOD, 2007).

As modificações nas histonas normalmente ocorrem em seu domínio amino-terminal (que se exterioriza do nucleossomo). A metilação e a acetilação são as principais modificações sofridas pelas histonas e dessa forma elas modulam os genes, de maneira epigenética. Geralmente, os genes inativos são os que apresentam mais histonas ligadas (DAVIE, 2003; MCLAUGHLIN, 2004).

Com exceção da H2A, as outras histonas podem ser acetilados em quatro ou cinco sítios. Assim, o nucleossomo tem potencial para ter 28 ou mais sítios acetilados (DAVIE, 2003).

No âmbito das alterações que acometem as histonas, podemos ressaltar dentre outras, a acetilação da H3 e H4, como parte da regulação gênica relacionada à carcinogênese (Figura 4). As histonas H3 podem ser acetiladas nos resíduos de lisina (K) 9, 14, 18, 23 e 27, localizados na extremidade amino-terminal, enquanto a H4 pode ser acetilada nos resíduos de lisina (K) 5, 8, 12 e 16. Inclusive, a metilação do resíduo de lisina 20 e a acetilação do resíduo de lisina 16 da histona H4 podem ser considerados como marcadores da carcinogênese em humanos (FRAGA, 2005; DASHWOOD 2007).

Figura 4: A. Representação espacial das histonas H3 e H4; B. representação espacial do octâmero de histonas, adaptado de Davie, 2003.

As reações de acetilação das histonas são reguladas pelas enzimas: acetilase de histonas ou histona aciltransferase (HAT) e desacetilase de histonas (HDAC). A HAT

atua doando um radical acetila para os resíduos de lisina (K) e com isso neutraliza sua carga positiva. Porém, a afinidade das histonas com o DNA ocorre pela diferença de cargas, uma vez que as histonas têm carga positiva e o DNA tem carga negativa. Conforme os resíduos de lisina vão sendo neutralizados, o DNA vai perdendo sua afinidade à histona e vai se desprendendo dela. Esta reação afrouxa a estrutura do nucleossomo e deixa o DNA mais permeável permitindo que fatores de transcrição se liguem a ele (HINNEBUSCH, 2002; WALDECKER, 2007).

De forma oposta, a enzima HDAC remove o grupamento acetila do resíduo de lisina causando condensação da cromatina e impedindo o acesso dos fatores de transcrição. Torna-se importante manter a regulação da expressão dos genes que codificam para estas enzimas pois, a mutação nestes genes e o desequilíbrio entre eles pode levar à hipoacetilação das histonas e ao conseqüente silenciamento gênico, um dos fatores que pode favorecer o surgimento do câncer. A acetilação de histonas tem sido considerada como um dos mais importantes mecanismos na regulação da expressão dos genes (WALDECKER 2008).

Em resumo, a modulação da estrutura da cromatina e as modificações dinâmicas no complexo do nucleossoma, por meio da acetilação/desacetilação de histonas, desempenham um papel vital na regulação da acessibilidade ao DNA cromossomal, e, por conseguinte, na transcrição de genes envolvidos no ciclo celular (Figura 5) (HINNEBUSCH, 2002; DASHWOOD, 2007).

Logo, podemos destacar as enzimas HAT e HDAC, que acetilam ou desacetilam os resíduos de lisina N-terminais das histonas H3 e H4, como as principais reguladoras deste fenômeno. Estas enzimas podem ser recrutadas para modificar a expressão dos genes ao permitir que fatores de transcrição específicos se liguem ao DNA (WALDECKER, 2007; CONDORELLI, 2008).

Figura 5: Representação espacial da remodelação da estrutura da cromatina após a acetilação ou desacetilação das histonas pelas enzimas HAT e HDAC; adaptado de Davie, 2003.

Observando-se a expressão de alguns genes concluiu-se que alguns inibidores de HDAC podem induzir diferenciação celular e/ou apoptose em lesões pré-neoplásicas ou mesmo células tumorais. Por estes motivos, os inibidores dietéticos da HDAC têm sido apontados como agentes quimiopreventivos, tendo em vista que modificam o padrão de acetilação das histonas e reduzem as lesões pré-neoplásicas. Inclusive, muitos deles já foram testados como medicamentos anti-tumorais (DASHWOOD, 2007; WALDECKER, 2007 e 2008).

De forma mais abrangente, os inibidores de HDAC parecem ativar a cascata de apoptose, tanto pela via intrínseca/mitocondrial quanto pela extrínseca/via receptor de morte celular (MYZAK, 2004; MARIADASON, 2008).

Muitos estudos já demonstraram que a indução intrínseca de apoptose, mediada pelos inibidores de HDAC, parece envolver alterações transcricionais que favorecem o desequilíbrio entre a expressão dos genes pró e anti-apoptóticos da família Bcl-2.

Os inibidores de HDAC induzem a expressão de BAK e reduzem a expressão de Bcl-xL, proteínas pró e anti-apoptóticas que regulam a integridade da membrana mitocondrial. Os inibidores de HDAC podem induzir a apoptose em células neoplásicas de cólon, por meio da liberação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma e subsequente ativação das caspase 9 e 3, respectivamente (CONDORELLI, 2008; MARIADASON, 2008).

1.4) Homeostase do Epitélio Colônico:

O cólon é um órgão bastante suscetível ao desenvolvimento do câncer. Isto porque as células epiteliais, que recobrem sua superfície interna estão constantemente entrando em contato com agentes carcinogênicos que chegam ao lúmen intestinal. Estes agentes podem estar nos alimentos ou substâncias ingeridas, bem como nas substâncias produzidas pelas bactérias colônicas e também nos metabólitos oriundos do processo digestivo, como por exemplo, os sais biliares secundários (BUTLER, 1999).

Um evento importante na carcinogênese de cólon inclui a perda da homeostase do epitélio colônico. O desequilíbrio entre a proliferação celular, a diferenciação e a apoptose pode favorecer o câncer. (BYKOREZ, 1984; LIPKIN, 1988; BUTLER, 1999; RONCUCCI, 2000; JOHNSON, 2002).

No tecido epitelial normal do cólon, as *stem cells* ou células-tronco, estão na base da cripta do cólon, ou seja, na chamada zona de células-tronco. Esta região caracteriza-se por uma elevada taxa de mitose e ausência de apoptose. Este fato demonstra sua importante função na produção de novas células, que, dividem-se continuamente migrando em direção ao topo da cripta e adicionando células na zona proliferativa. A zona proliferativa caracteriza-se por elevada taxa de proliferação e ausência de apoptose. Nesta região, observa-se que as células apresentam características histológicas típicas de colonócito com significativa produção de muco. Na zona de diferenciação, ocorre diminuição gradativa da produção de mucina e inversão do padrão proliferativo, em relação ao encontrado na zona de células-tronco. Essa região caracteriza-se por acentuada apoptose e redução importante da proliferação celular (Figura 6). Na superfície das criptas ocorre também *anoikis*, que

é um tipo de morte celular programada. Nesse caso, as células senescentes perdem sua capacidade de adesão, havendo portanto uma esfoliação que induz a apoptose. (BACH, 2000; JOHNSON, 2002; WONG, 2003; PINHO, 2005).

Conclui-se portanto, que a célula pode proliferar ou sofrer apoptose dependendo da sua posição hierárquica na cripta (POTTEN, 1987).

As células-tronco situadas na base da cripta são suscetíveis a mutações somáticas. Estas mutações persistem ao longo de sua migração em direção ao topo da cripta, onde as células mutadas são eliminadas por apoptose (SHANMUGATHASAN, 2000). Contudo, no tecido maligno as alterações genômicas interrompem a divisão celular normal, resultando em divisão celular descontrolada e inibição da apoptose. Sendo assim, o câncer de cólon parece originar-se das células-tronco antes de sua diferenciação a colonócito. (POTTEN, 1997; BACH, 2000; LUEBECK, 2002; WONG, 2003).

Figura 6: Esquema representativo demonstrando as zonas proliferativas da cripta colônica normal. Adaptado de Pinho, 2005.

Um equilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose é necessário para manter o epitélio colônico normal. Estes dois eventos estão intimamente relacionados e a desregulação de um deles pode contribuir para o surgimento do câncer de cólon (HAZA, 2000).

1.5) Ciclo celular, proliferação e diferenciação celular:

Existe uma forte associação entre câncer e o desequilíbrio do ciclo celular. Normalmente, as células respondem aos sinais inibitórios da proliferação celular. Assim, elas podem permanecer quiescentes em G₀, ou adquirir características de diferenciação celular, numa fase pós-mitótica. Contudo, na carcinogênese ocorre um estímulo ao ciclo celular e a célula pára de responder a aos estímulos inibitórios e prolifera desordenadamente (HANAHA, 2000).

O ciclo celular das células eucarióticas é basicamente regulado por ciclinas, quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e proteínas inibidoras de CDKs. Essas proteínas regulam a passagem pelas etapas do ciclo celular, que são G₁, S, G₂ e M. Na fase S ocorre a síntese de DNA, enquanto na fase M acontece a mitose, ou seja, a divisão celular. As fases G₁ e G₂ são as etapas que antecedem S e M, respectivamente (MALUMBRES, 2001).

Na carcinogênese de cólon podemos destacar principalmente duas proteínas reguladoras do ciclo celular, a ciclina B1 (CB1) e o inibidor de CDKs, p21. O p21 induz a parada do ciclo celular por meio da inibição das CDKs 2, 3, 4 e 6 em células normais e neoplásicas. Muitos estudos têm associado o efeito anti-carcinogênico dos inibidores de HDAC ao p21 (HINNEBUSCH, 2002)

As células neoplásicas do cólon têm demonstrado aumento de expressão de CB1, porém, outra proteína, o p53 (gene supressor de tumor) parece inibir essa expressão anormal. Isso explica em parte, porque a mutação de p53 com consequente inibição de sua expressão leva ao desenvolvimento do câncer de cólon (HINNEBUSCH, 2002).

1.6) Apoptose:

A apoptose é a morte celular programada. Representa um processo fisiológico e necessário para manter a homeostase e renovação do epitélio colônico e também para eliminar células que apresentam danos no DNA que não foram reparados. Células com danos genéticos causados por exposição à carcinógenos podem sofrer apoptose e com isso prevenir sua proliferação e expansão clonal. Portanto, o adequado controle da apoptose é tão importante quanto a proliferação celular na gênese do CCR (BACH, 2000; SHANMUGATHASAN, 2000; LUEBECK, 2002; WONG, 2003).

O mecanismo da apoptose é rigidamente controlado pela expressão de genes específicos, decorrentes da interação célula e meio externo, que resultam em alterações celulares funcionais caracterizadas morfológicamente por condensação e fragmentação cromatínica e formação de protuberâncias na superfície celular (HUPPERTZ, 1999; HAZA, 2000).

De certa forma, os genes que agem para estimular a cascata de apoptose em células tumorais visando erradicar o câncer incluem as caspases, Fas, Bid, Bad, Bax, Bak, Bik, Bok, Bcl-x_S, PUMA e 15-LOX-1. Enquanto os genes que promovem o câncer e estimulam a proliferação celular incluem Bcl-2, Bcl-x_L, Neu-3, COX-2 e p53 mutado (HUPPERTZ, 1999; SHANMUGATHASAN, 2000; RUPNARAIM 2004; DE VITA, 2005).

As caspases são cisteíno-proteases, ativadas especificamente em células programadas para morrer, que podem causar mudanças morfológicas nas células em apoptose. Elas clivam proteínas em um ou mais sítios, sempre após um resíduo de ácido aspártico, resultando em ativação ou inativação do substrato clivado.

Portanto, sua ação vai depender da função do substrato clivado. As caspases podem ser ativadas via receptores de morte celular ou via mitocondrial. Uma vez ativadas, os diferentes tipos de caspases seguem rotas distintas, dependendo do estímulo que desencadeou a maquinaria de morte celular programada (HUPPERTZ, 1999; SHANMUGATHASAN, 2000; RUPNARAIM 2004; DE VITA, 2005).

A via mitocondrial é ativada em resposta a danos no DNA envolvendo a ativação de membros da família Bcl-2. Esta família de proteínas tem importância substancial na regulação da apoptose, pois possui membros ativadores e inibidores da cascata apoptótica. O desequilíbrio entre os membros anti e pró-apoptóticos da família Bcl-2 já foi observado em vários tipos de câncer (SHANMUGATHASAN, 2000).

Os membros anti-apoptóticos Bcl-2 e Bcl-x_L, estão localizados na membrana mitocondrial externa de diferentes tipos celulares capazes de proliferação e morfogênese, como por exemplo, as células epiteliais do cólon. No epitélio normal é esperado que estes sejam expressos na zona proliferativa da cripta, já que inibem a apoptose e estimulam a proliferação celular. De forma oposta, as proteínas pró-apoptóticas Bax, Bak e Bid favorecem a apoptose na superfície da cripta (HUPPERTZ, 1999; SHANMUGATHASAN, 2000; RUPNARAIM 2004; DE VITA, 2005).

A via de ativação da cascata apoptótica inclui a liberação de citocromo c a partir da membrana mitocondrial. Os membros pró-apoptóticos estimulam a liberação do citocromo c para o citosol, enquanto os anti-apoptóticos inibem. No citosol, o citocromo c, na presença de ATP ou ADP, associa-se com Apaf-1 e pró-caspase-9, formando o complexo apoptossoma que ativa caspase-9 (iniciadora). Uma vez ativada, a caspase-9 pode então clivar as caspases efetoras subsequentes (-2, -3, -6 e -7). Portanto, a ativação da caspase-9 mediada pelo citocromo c serve como um

mecanismo amplificação de sinais durante o processo apoptótico (HUPPERTZ, 1999; SHANMUGATHASAN, 2000; RUPNARAIM 2004; DE VITA, 2005).

Verifica-se então, que o Bcl-2 e o Bcl-x_L, atuam inibindo a apoptose de duas formas: por meio da supressão da liberação do citocromo c ou, interferindo posteriormente na formação do apoptossoma e consequente ativação da caspase-9 (HUPPERTZ, 1999; SHANMUGATHASAN, 2000; RUPNARAIM 2004).

O Bcl-2 e o Bcl-x_L são considerados proto-oncogene e estão normalmente superexpressos no CCR e em adenomas. Já foi descrito na literatura, em modelo experimental, que o Bcl-2 apresentou maior expressão no epitélio não-displásico, adjacente às lesões displásicas. Isso indica que a expressão deste proto-oncogene está aumentada antes mesmo do epitélio se tornar displásico (HUPPERTZ, 1999; SHANMGATHASAN, 2000; RUPNARAIM 2004).

Por outro lado, os genes Bax, ou seu homólogo Bak, funcionam como genes supressores de tumor e já demonstrou-se que os mesmos apresentam expressão reduzida em CCR humano (HUPPERTZ, 1999; SHANMGATHASAN, 2000; AVIVI-GREEN, 2002; RUPNARAIM 2004).

1.7) Carcinogênese de Cólon:

O câncer de cólon se desenvolve como resultado de um acúmulo progressivo de alterações genéticas e epigenéticas que transformam o epitélio colônico normal em adenocarcinoma. Estas alterações podem ser observadas numa seqüência progressiva que envolve múltiplas etapas, as quais são bem caracterizadas tanto em nível molecular, quanto morfológico (GRADY, 2005).

Fearon e Vogelstein propuseram um modelo genético, demonstrando que o epitélio normal do cólon adquire sucessivas mutações específicas, com conseqüente ativação de oncogenes e silenciamento de genes supressores de tumor, durante a transição de tecido normal para maligno. Estas alterações são conhecidas como seqüência adenoma-carcinoma (FEARON 1990; GRADY, 2005).

O primeiro passo na carcinogênese do cólon parece envolver a perda dos dois alelos do gene *APC* funcional que resulta na sua inativação. O *APC* é um gene supressor de tumor que se encontra mutado em 60 a 80% dos adenomas e carcinomas esporádicos. O gene *APC* inibe a habilidade da proteína Wnt de ativar a expressão do gene *myc*, que por sua vez é um fator de transcrição que induz a expressão de muitos genes necessários à transição da fase G₁ para S do ciclo celular. Portanto, a inativação do *APC* possibilita a proliferação celular desordenada. O *APC* também é responsável pela fosforilação da β -catenina e posterior ubiquitinação; com a inativação do *APC*, a β -catenina se acumula na célula e estimula a expressão de genes que favorecem a proliferação celular, como o *c-myc* e a ciclina D (GUSTIN, 2002).

Se uma das células do cólon, que apresenta inativação do *APC*, sofrer outra mutação, desta vez ativando o oncogene *ras*, sua progênie divide-se de maneira mais descontrolada formando um adenoma benigno (GUSTIN, 2002).

Nesta seqüência, a mutação e inativação de outro gene supressor de tumor, o *DCC*, que está presente em mais de 70% dos CCR, seguida de inativação do gene *p53*, resulta em carcinoma com fenótipo maligno (GUSTIN, 2002).

Nem todo carcinoma de cólon adquire todas estas mutações e não necessariamente, nesta mesma ordem. Na verdade, o acúmulo de mutações parece ser mais importante que a seqüência em que elas ocorrem. Contudo, a maioria dos carcinomas apresenta, em seu DNA, mutações em todos os genes citados (GUSTIN, 2002).

Uma série de mudanças histopatológicas ocorre no epitélio colônico em função destas anormalidades genéticas (Gustin 2002). Acredita-se que o câncer de cólon evolua através de estágios morfológicos distintos e bem caracterizados. De modo geral, a seqüência adenoma-carcinoma de cólon inicia-se na seguinte ordem: FCAs (focos de criptas aberrantes), adenoma benigno e carcinoma (BIRD, 1987; 1995).

Os FCAs são lesões microscópicas na mucosa colônica que foram primeiramente identificados em modelos experimentais (roedores) por Bird em 1987, poucas semanas após a injeção de carcinógenos químicos. Posteriormente, em 1991, Pretlow relatou a presença de FCAs em humanos. Os FCAs são considerados lesões pré-neoplásicas, devido às suas características celulares, moleculares e morfológicas e funcionam como biomarcadores em estudos com modelos pré-clínicos de câncer de cólon (BIRD, 1987; MCLELLAN, 1988; PRETLOW, 1991; GUSTIN, 2002).

As criptas aberrantes são fáceis de serem visualizadas em microscópio após coloração com azul de metileno, pois apresentam coloração mais escura e intensa que as criptas coradas ao seu redor e diferem morfológicamente das criptas normais por possuírem espessura, altura, tamanho e abertura luminal 2 a 3 vezes maior (BIRD, 1987). Além disto, costumam se agrupar de forma desordenada formando aglomerados. Os FCAs, podem ser compostos portanto, por uma ou mais criptas aberrantes e isso é comumente caracterizado como sua multiplicidade, ou seja, número de criptas por foco (LASKO, 1995).

Sabe-se que com o passar do tempo e a evolução do processo neoplásico, o número de criptas por FCAs tende a aumentar em animais tratados com carcinógenos químicos. Isso ocorre em função de sua maior atividade proliferativa. Observa-se também, que alguns FCAs passam a apresentar displasia (YAMADA, 2003).

Os FCAs tendem a aparecer antes e com maior incidência na região distal, quando comparada à região proximal. Um estudo de cinética utilizando diversas doses de carcinógeno em tempos distintos, demonstrou que a região distal parece originar também maior número de tumores que a região proximal. Com isso, observa-se uma tendência a reduzir proporcionalmente o número de FCAs, com o decorrer do tempo. Contudo, observa-se que a região proximal parece ter proporcionalmente maior número de FCAs e menor de tumores quando comparada à região distal. Estes dados sugerem que com o passar do tempo, alguns FCAs evoluem enquanto outros podem desaparecer. Parece haver uma relação inversa entre o número de FCAs e a incidência de carcinomas no cólon (BIRD, 1995; CORPET, 2002).

Estudos indicam que os FCAs que possuem 4 ou mais criptas estão em um estágio mais avançado da carcinogênese e, por isso, apresentam maior possibilidade de evoluir para o câncer do que aqueles com menos de 4 criptas, (ZHANG, 1992; LASKO, 1995; THORUP, 1997; BIRD, 2000). Porém os FCAs com uma única cripta também podem evoluir para o câncer, principalmente se possuírem características displásicas (CHENG, 2003).

Corpet, em 2002, fez algumas considerações dignas de nota a respeito dos FCA:

- i) FCAs foram induzidos por todos os carcinógenos químicos de cólon já testados de uma forma dose e espécie-dependente;
- ii) O número e a multiplicidade dos FCAs são modulados de acordo com o tipo de agente quimiopreventivo testado;
- iii) Os FCAs predizem o aparecimento do câncer em vários estudos usando roedores;
- iv) Os FCAs se correlacionam com o risco de câncer de cólon e com o tamanho e numero de adenomas em humanos;
- v) As características morfológicas e genotípicas dos FCAs no cólon de humanos foram similares às encontradas em cólon de animais; além disto, muitas alterações presentes nos FCAs, ocorrem também nos carcinomas;
- vi) Alguns FCAs apresentaram displasia; contudo, a natureza pré-neoplásica dos FCAs é controversa e outras lesões pré-malignas foram recentemente descritas no cólon de ratos.

Os FCAs podem ser basicamente classificados em: hiperplásicos e displásicos. Os FCAs hiperplásicos possuem características semelhantes ao tecido normal e apresentam normalmente mutação no oncogene *k-ras*. Os FCAs displásicos contêm células displásicas, semelhantes àsquelas encontradas nos adenomas, apresentam

mutações do gene *APC* e, portanto, acúmulo de β -catenina. As lesões displásicas são as que mais tendem a evoluir para adenoma e, posteriormente, para carcinoma. (RENEHAM, 2001; GUSTIN, 2002; CADERNI, 2003; CHENG, 2003; GRADY, 2005; VOLATE, 2005).

A prevalência de FCAs displásicos no retosigmoide é de 5,1% em indivíduos normais, 13,8% em indivíduos com adenomas prévios e 52,1% em indivíduos com carcinoma prévio. (PRETLOW, 1993; TAKAYAMA, 1998; GUSTIN 2002)

Novas formas de classificação dos FCAs já foram descritas em modelos de carcinogênese química de cólon, e essas são igualmente válidas para que eles sejam utilizados como biomarcadores em estudos com finalidade quimiopreventiva. Nesse contexto, podemos destacar principalmente os focos depletados de mucina (FDM) e os focos com acúmulo de β -catenina (YAMADA, 2000; 2003; CADERNI, 2003; HIROSE, 2003; OCHIAI, 2003; VOLATE, 2005; PAULSEN, 2005).

Muitos modelos experimentais têm sido propostos, com o objetivo de estudar a ação de determinadas substâncias contidas nos alimentos e o mecanismo pelos quais estão envolvidas na carcinogênese (MORSE, 1993; BANERJEE, 1998; CORPET, 2002, 2005).

Os modelos experimentais de carcinogênese de cólon representam uma peça chave para avaliar a eficácia das substâncias testadas como agentes quimiopreventivos, pois permitem a avaliação de características importantes como a incidência, a morfologia, o crescimento, além de fatores celulares e moleculares dos FCAs em determinadas condições experimentais. Neste contexto, os FCAs são largamente utilizados como biomarcadores em estudos de quimioprevenção (KELLOFF, 1994, 2000; WARGOVICH, 1996; BAZO, 2002; LEE, 2003).

Em roedores, o modelo de carcinogênese química de cólon é capaz de reproduzir histologicamente a sequência adenoma-carcinoma do epitélio colônico de forma semelhante à que ocorre em humanos. Entretanto, alguns eventos genéticos parecem ser um pouco diferentes; mesmo assim, estes modelos animais são ótimos para estudar a carcinogênese (KELLOFF, 1994, 2000; GUSTIN, 2002; CHENG, 2003).

O câncer de cólon não se desenvolve espontaneamente em ratos. Portanto, é necessário induzi-lo por meio da administração de agentes carcinogênicos químicos. Carcinógenos químicos normalmente utilizados para induzir a carcinogênese de cólon em modelos experimentais são: 1,2 dimetilhidrazina (DMH), azoximetano (AOM), metoximetano (MAM) e *N*-metil-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (MNNG). O câncer de cólon também pode ser produzido por meio de derivados da hidrazina, aflatoxinas, aminas aromáticas e alquilnitrosamidas. A maioria destes compostos age metilando nucleosídeos do DNA (normalmente a guanina) resultando em mutações específicas do DNA. Desta forma, estes agentes carcinogênicos conseguem reproduzir em animais, algumas modificações moleculares que ocorrem na carcinogênese em humanos (BANERJEE, 1998; GUSTIN, 2002; NEWELL, 2004).

A DMH, em especial, é um potente agente carcinogênico alquilante, completo e indireto que induz adutos no DNA, mutações pontuais, micronúcleos e troca de cromátides-irmãs (BLAKEY, 1985; BANERJEE, 1998; NEWELL, 2004)

Existem dois mecanismos propostos para a iniciação da carcinogênese no cólon por meio da DMH. A via principal ocorre no fígado e envolve a oxidação da DMH em azometano. Posteriormente observa-se oxidação do azometano em AOM. O AOM sofre *n*-hidroxilação e origina metilazoximetanol que, subsequente, sofre

conjugação com ácido glicurônico e depois excreção pelas vias biliares. No intestino, a glicuranida sofre hidrólise bacteriana sendo desconjugada a metilazoximetanol. A seguir, este se oxida a metilazoxiformaldeído gerando o carcinógeno ativo metildiazônio no lúmen colônico. Por fim, o metildiazônio gera formaldeído e o íon carbônio que é o responsável pela metilação do DNA no epitélio colônico (FIALA, 1977; BANERJEE, 1998; SOHN, 2001; NEWELL, 2004) (Figura 7).

Figura 7: Esquema representativo do metabolismo da DMH. Adaptado de Fiala, 1977.

Reddy observou, em 1976, menor incidência de tumores induzidos por DMH em ratos com o cólon estéril ("*germ-free*") quando comparados aos ratos convencionais. Isto indicou que a microflora colônica pode ter influenciado positivamente o surgimento destes tumores induzidos por DMH (REDDY, 1976).

Contudo, a carcinogênese de cólon induzida pela DMH não parece ser dependente exclusivamente da flora bacteriana intestinal, já que animais estéreis também desenvolvem tumores no cólon quando injetados com DMH. Estudos em segmentos isolados do cólon mostraram que a DMH e seus metabólitos podem ser transportados para as células epiteliais do cólon pela corrente sanguínea sem a necessidade da excreção biliar. Portanto, o carcinógeno ativo é capaz de chegar ao cólon pelo sangue ou pelas fezes (BANERJEE, 1998).

No estudo de Chan, 1976, a administração intrarretal (i.r.) de DMH, na dose de 250 mg/Kg de peso corporal, diminuiu a síntese de DNA no cólon distal após alguns minutos e aumentou a incorporação de [3H]timidina após 24 horas, mantendo este efeito por 2 semanas. Este resultado também foi observado utilizando-se doses menores de DMH (0,25 a 25mg/Kg), porém, com intensidade reduzida.

Todavia, no cólon proximal nenhuma decorrência foi observada. Baseado nisto, o autor sugeriu que a DMH atuaria também diretamente no cólon, por meio de um sistema enzimático presente nas células da mucosa colônica, independente da metabolização da DMH no fígado. Ao ser administrada pela via i.r. a DMH é adsorvida no cólon, em seguida chega ao fígado, retornando ao intestino pela bile. Portanto, se a ação deste carcinógeno fosse condicionada apenas a sua ativação no fígado, o cólon proximal teria sido afetado tanto quanto o distal (CHAN, 1976).

O primeiro efeito mutagênico do carcinógeno ativo nas células do epitélio colônico é a metilação da guanina do DNA na posição N-7. As guaninas alquiladas são alteradas para parearem com a timina ao invés de citosina. Estas doam um próton para a citosina e modificam as duas bases. Durante a subsequente replicação ocorre a troca de guanina por timina e citosina por adenina originando mutações no DNA (BANERJEE, 1998; SOHN, 2001).

A O6-metilguanina (O6-MeG) é um aduto do grupo metil do DNA, formado a partir da administração de DMH. Este aduto é tóxico, mutagênico e carcinogênico, no entanto, pode ser reparado pela enzima metilguanina metiltransferase (MGMT). Contudo, após a administração de altas doses de DMH, que resulta também em grande quantidade de adutos, ocorre saturação da via de reparo, já que cada grupo metila se liga a um sítio da MGMT. Logo, na ausência de reparo no DNA a O6-MeG pode induzir mutações no DNA (ROGGERS, 1977; POVEY, 1987; NEWELL, 2004).

Apesar de não serem alvos diretos da DMH, também pode ocorrer metilação do DNA no intestino delgado, fígado e no rim, causando nestes dois últimos, hemangiomas hepáticos e cistos renais, respectivamente (BANERJEE, 1998).

Uma única dose subcutânea de DMH já induz danos citológicos na mucosa colônica, alteração na cinética proliferativa da cripta e inibição da migração e diferenciação celular ao longo da cripta 8 horas após a administração (CHAN, 1976).

O período inicial pós administração de DMH é marcado pela redução da síntese de DNA, que dura poucos dias. A seguir, ocorre um aumento generalizado da proliferação celular e alargamento da zona proliferativa com o surgimento de figuras mitóticas na zona de diferenciação (terceira e mais alta zona da cripta) e na superfície do epitélio. Após 2 ou 3 meses de tratamento com DMH ocorre hiperplasia do epitélio, redução das células caliciformes e áreas de atipia focal. Adenomas e adenocarcinomas aparecem entre o quarto e o sexto mês (BANERJEE, 1998).

Não foi observada alteração entre a quantidade de células diferenciadas nos dois terços superiores da cripta após 2 semanas de administração da DMH pela via i.r. Isto provavelmente ocorreu em virtude do lúmen intestinal ter sido banhado por DMH por um período considerado curto, já que a solução de DMH foi administrada via i.r. e logo absorvida ou excretada (CHAN, 1976).

Esse fato explica a diferença na resposta encontrada após a administração desse carcinógeno pelas vias i.r. ou subcutânea (s.c.). O efeito da DMH quando administrada por via s.c. tende a ser mais duradouro, pois seus metabólitos ficam circulando na corrente sanguínea por mais tempo. Nesse caso, o efeito da DMH acaba sendo cumulativo (CHAN, 1976).

DMH e AOM são os carcinógenos mais utilizados em experimentos de quimioprevenção em modelos experimentais de carcinogênese química e podem ser injetados via intraperitoneal ou subcutânea (BIRD, 1995).

Nas doses de 10 e 20mg/Kg de peso corporal, a DMH e o AOM produzem adenomas e adenocarcinomas em ratos, camundongos e hamsters. O período de latência é em torno de 6 meses. A redução da dose para 7mg/Kg de peso corporal aumenta o tempo de latência para um ano. Uma única dose de 10mg/Kg de peso corporal de DMH ou AOM produz câncer de cólon em ratos após o período de latência de 15 a 20 meses. Quanto maior a dose administrada (entre 10 e 40 mg/Kg de peso corporal do animal), menor é o período de latência, ou seja, mais rápido o câncer aparece (WEISBURGUER, 1971; WARD, 1974; BANERJEE, 1998).

Doses elevadas de AOM (15mg/Kg de peso corporal) favorecem o aparecimento de neoplasias no cólon distal (esquerdo), enquanto doses menores (7mg/Kg de peso corporal) favorecem maior frequência no cólon proximal (direito) (BANERJEE, 1998).

Tendo em vista que o AOM é um metabólito da DMH, a literatura utiliza doses menores de AOM quando comparadas às de DMH. O uso destas em protocolos já anteriormente testados possibilita comparação entre os diversos estudos encontrados na literatura.

A substância a ser testada pode ser oferecida antes e/ou após a administração do carcinógeno, ou seja, em períodos distintos da carcinogênese. Diversos modelos

estudados iniciam a administração do agente testado como quimiopreventivo uma ou duas semanas antes da primeira dose do carcinógeno (iniciação) e continuam a oferecer a substância por poucas (pós-iniciação), algumas (promoção) ou várias semanas (progressão, onde já se encontram carcinomas) após a última dose do carcinógeno. Em muitos estudos a substância testada é oferecida aos ratos durante o período de iniciação e pós-iniciação (antes, durante e depois do carcinógeno). Contudo, o protocolo só da fase de pós-iniciação tem mais relevância clínica, pois este pode indentificar os agentes que previnem a progressão para o câncer (WEISBURGER, 1971).

Sabe-se que se o carcinógeno for administrado de forma concomitante com a substância testada, pode haver interferência desta substância diretamente com a metabolização do carcinógeno, e isto pode interferir na resposta quimiopreventiva, dependendo do modo de ação da substância testada (BIRD, 1995).

A carcinogenicidade da DMH pode ser completamente anulada se esta for administrada concomitantemente com alguns compostos que interferem diretamente no seu metabolismo (FIALA, 1977).

Kelloff propôs, em 2000, um modelo de pós-iniciação onde as substâncias eram testadas uma semana após a administração da última dose do carcinógeno AOM. Este intervalo foi necessário para a completa metabolização do AOM, e importante para que não houvesse interferência da substância testada no metabolismo do AOM. Neste modelo, a administração das substâncias testadas durou 4 semanas.

Por conseguinte, utilizando-se os modelos experimentais de carcinogênese química e os biomarcadores citados é possível monitorar eventos biológicos e moleculares em diferentes fases do processo de carcinogênese, e testar a ação

quimiopreventiva das substâncias em diferentes doses e intervalos de tempo na tentativa de elucidar mecanismos envolvidos no processo de prevenção do câncer.

O tipo, a dose total, o tempo, a frequência e a via de administração do carcinógeno, bem como, a espécie, a linhagem, o sexo e a idade dos animais no momento da injeção do carcinógeno, são fatores que interferem na distribuição dos FCAs e dos tumores, influenciando também a resposta quimiopreventiva da substância testada. Em suma, o desenho do estudo deve ser bem planejado, e manipulado de forma a minimizar a influência destas variáveis. Desta forma, é possível estudar as diferentes etapas da carcinogênese e os mecanismos pelo qual ela pode ser prevenida e/ou bloqueada (BIRD, 1995; BANERJEE, 1998; GUSTIN, 2002).

1.8) Quimioprevenção do Câncer de Cólon:

A prevenção tende a ser um método eficaz de controle do câncer de cólon e pode ser coordenada em dois níveis distintos. A prevenção primária inclui modificações dos fatores de risco relacionados ao câncer de cólon. Neste contexto, destacam-se entre outras, as mudanças nos hábitos alimentares. Esta medida por si só, pode reduzir a incidência de CCR em 70 a 80% (CUMMINGS, 1998; CORPET, 2002) e reduzir a mortalidade em até 35% (DOLL, 1981). Já a prevenção secundária inclui identificação e intervenções precoces visando evitar a progressão para o câncer, como por exemplo, a colonoscopia periódica para indivíduos com mais de 50 anos e a retirada de pólipos e adenomas (GUSTIN, 2002; KAMANGAR 2007).

A alimentação parece exercer potencial efeito na gênese do câncer. A elevada ingestão de carne vermelha, o desequilíbrio na ingestão de ácidos graxos ômega 6/ômega 3 e a reduzida ingestão de fibras parecem ser fatores favoráveis ao surgimento do câncer. De forma oposta, o maior consumo de frutas e hortaliças, parece reduzir o risco de desenvolver câncer (DIVISI, 2006; NGUYEN, 2006; RYAN-HARSHMAN, 2007).

Dentre os tipos de câncer que mais sofrem influência dietética podemos citar o de mama, próstata, pulmão e o colorretal (DIVISI, 2006; NGUYEN, 2006; RYAN-HARSHMAN, 2007).

O CCR tem sido associado com determinadas condições nutricionais e/ou diversos fatores dietéticos. Indivíduos com sobrepeso e/ou diabéticos apresentam um maior risco para o CCR (KIUNGA, 2004) Acredita-se que a modificação no metabolismo da glicose seja uma condição que predispõe ao câncer (KIUNGA, 2004; DIVISI, 2006; NGUYEN, 2006; RYAN-HARSHMAN, 2007; RODRIGO, 2007).

Diversos estudos citam como medidas dietéticas de proteção ao CCR o aumento da ingestão de frutas e hortaliças, fibras, produtos lácteos, soja, chá verde e ao mesmo tempo, a diminuição do consumo de carne vermelha, gordura animal, óleos ricos em ácidos graxos ômega 6 e cafeína (GIOVANNUCCI, 1994; SLATTERY, 2004; SERRANO, 2004; DIVISI, 2006; NGUYEN 2006; RYAN-HARSHMAN 2007).

Alguns nutrientes e compostos bioativos (CBAs) presentes na dieta parecem ser responsáveis por esta proteção, como por exemplo: selênio, ácido fólico, vitamina B12, vitamina D, vitamina E, cálcio, fibras, carotenóides, polifenóis, resveratrol, entre outros. O uso de probióticos também parece exercer um efeito positivo na diminuição do risco de câncer (SURH, 2003; DIVISI, 2006; NGUYEN, 2006; RYAN-HARSHMAN, 2007; RODRIGO, 2007).

Contudo, a interação entre os nutrientes, CBAs e os genes envolvidos com a carcinogênese ainda não está totalmente elucidada. Isso compromete a eficiência na implementação de estratégias de controle de prevenção primária. Uma medida bem promissora nesta área é investir em estudos de quimioprevenção do câncer. Estes estudos possibilitam cada vez mais elucidar os mecanismos responsáveis pelo impacto da dieta na proteção contra o desenvolvimento do câncer (SURH, 2003).

A quimioprevenção é a administração de compostos naturais ou sintéticos com o objetivo de bloquear, reverter, cessar ou prevenir o desenvolvimento do câncer (WATTENBERG, 1985, 1997; GUSTIN, 2002).

De acordo com sua atuação, os agentes quimiopreventivos são classificados em dois grupos: (1) agentes bloqueadores, aqueles que atuam na fase de iniciação da carcinogênese por meio do bloqueio ou reparo dos danos genotóxicos causados pelo carcinógeno; e (2) agentes supressores, aqueles que atuam nas fases de promoção ou progressão da carcinogênese por meio da alteração da proliferação

celular e indução da apoptose e/ou diferenciação celular (WATTENBERG, 1985; BIRD, 1995; STONER, 1997).

Mais de 300 substâncias já foram testadas como quimiopreventivas em roedores, antes, durante ou após a injeção de carcinógenos químicos, visando abranger diferentes fases da carcinogênese de cólon (WARGOVICH, 1996, 2000; CORPET, 2002).

Nesse contexto, o efeito protetor das fibras tem levantado bastante polêmica, pois, apesar de numerosos estudos epidemiológicos e de caso-controle encontrarem uma relação inversa entre fibras alimentares e o risco de CCR, alguns estudos de coorte prospectivos não observaram nenhuma relação (GIOVANNUCCI, 1994; FUCHS, 1999; BINGHAM, 2003, 2004; PARK, 2005; MICHELS, 2005).

Logo, as fibras e seus produtos de fermentação ainda têm sido alvo de estudos de quimioprevenção; na tentativa de elucidar os supostos mecanismos pelos quais ela exerce efeito protetor (LUPTON, 2004; PARK, 2005, MICHELS, 2005; DIVISI, 2006; NGUYEN, 2006; RYAN-HARSHMAN, 2007).

As hipóteses sugerindo que a fibra reduza o risco de desenvolvimento do câncer baseiam-se na forma com que esta chega ao cólon e depende tanto de suas características físico-químicas, como também da microflora colônica (LUPTON, 2004).

As fibras menos fermentadas pelas bactérias colônicas atuam aumentando o volume do bolo fecal, estimulando fisicamente a peristalse e diminuindo o tempo de trânsito intestinal das fezes no cólon. Como consequência ocorre redução do tempo de exposição dos carcinógenos e pró-carcinógenos que ficam mais diluídos nas fezes. Estas fibras também apresentam afinidade com os ácidos biliares e se ligam a ele, reduzindo o pH do lúmen intestinal e também aumentando a excreção desses

compostos. Os ácidos biliares, principalmente os secundários desoxicólico e litocólico, parecem atuar como promotores de tumores induzindo a proliferação celular (BIRD, 1997).

As fibras presentes em frutas e hortaliças, que são altamente fermentáveis, produzem maior quantidade de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), incluindo o ácido propiônico, ácido acético e o ácido butírico (AB). O efeito anti-carcinogênico na mucosa do cólon parece estar associado ao AB, fato que parece mais sólido em ensaios *in vitro*, porém apresenta algumas controvérsias em ensaios *in vivo* (PARODI, 1997; LUPTON 2004; NGUYEN, 2006).

Em suma, o AB é gerado principalmente pela fermentação bacteriana das fibras alimentares no ceco e cólon. Tão logo chega ao cólon, o AB é absorvido por difusão passiva ou por transporte ativo por bomba de $\text{HCO}_3^-/\text{H}^+$. Após, o AB alcança o fígado por meio da veia porta (HAMER, 2008).

Mais de 95% do butirato é rapidamente absorvido e metabolizado, assim que chega ao lúmen intestinal. A maior parte do butirato é metabolizada pelas células do epitélio conônico, por esse motivo, encontra-se baixa concentração de butirato no sangue portal. A concentração de butirato nas fezes de humanos é em torno de 11 a 25 mM (WONG, 2006; HAMER, 2008).

Uma vez absorvido, o AB é rapidamente metabolizado e convertido em corpos cetônicos, principalmente o 3-hidroxibutirato; e outros metabólitos como o butiril-CoA, enoil-CoA, L-hidroxoacil-CoA, acetoacetil-CoA e acetil-CoA. Vale lembrar que a acetil-CoA é utilizada como energia pelos colonócitos. Sendo assim, o AB tem um importante papel como combustível metabólico preferencial dos colonócitos, já que é responsável por prover 70 a 90% da energia que essas células consomem. Deste modo, o AB promove proliferação e diferenciação das células epiteliais e contribui

para o desenvolvimento normal do cólon (CUMMINGS, 1987; SCHEPPACH, 1992; FITCH, 1999; LESCHELLE, 2000; BAUER-MARINOVIC, 2006; WONG, 2006).

Em ratos, a absorção do AB é mais eficiente em animais jovens e aumenta proporcionalmente, de acordo com o aumento de sua concentração no lúmen intestinal (FITCH, 1999).

A concentração intestinal de AB depende principalmente da ingestão de fibras, em especial as mais fermentáveis pelas bactérias colônicas (SHEPPACH, 1992; PARODI, 1997; FITCH, 1999; WONG, 2005; HAMER 2008).

Boffa demonstrou em 1992 que os níveis de butirato no lúmen colônico podem ser modulados pela adição de fibras à dieta (farelo de trigo). Nesse estudo, o autor relatou uma correlação inversa entre os níveis de AB no lúmen colônico, e a proliferação celular no cólon. Observou-se também uma correlação linear positiva entre os níveis de AB no lúmen colônico, e a acetilação de histonas nas células epiteliais do cólon.

Estudos *in vitro* demonstraram que o butirato interfere nos mecanismos de sinalização da proliferação celular, causando parada do ciclo celular na fase G0/G1, ao estimular a expressão de p21, um inibidor de ciclina D1, na fase G1 do ciclo celular (BAUER-MARINOVIC, 2006; WONG, 2006).

O AB foi a primeira substância identificada com potencial de inibir a HDAC e este parece ser o mecanismo pelo qual ele exerce efeito quimiopreventivo na carcinogênese de cólon. Estudos utilizando linhagens celulares de câncer de cólon demonstraram inclusive, uma relação entre a inibição da proliferação celular e a hiperacetilação de histonas (WALDECKER, 2007 e 2008).

Em ratos submetidos ao modelo de carcinogênese de cólon induzida por DMH, o AB reduziu a incidência de FCAs e carcinomas, em comparação ao grupo controle,

quando foi administrado de forma intracecal contínua, por 4 semanas [1,5mL/hora] (MEDINA, 1998).

De forma semelhante, em outro trabalho utilizando o mesmo modelo, tanto a administração de fibras fermentáveis pelas bactérias colônicas na ração dos animais, bem como, a instilação intrarectal de 50mM de AB, foram capazes de diminuir o número de FCAs, remetendo a um efeito quimioprotetor por parte do AB (AVIVI-GREEN, 2000).

O AB também apresentou atividade quimiopreventiva quando administrado diretamente no cólon distal, nas doses de 0,5 mL, 2 vezes por dia (80μmol/mL/dia), ou na dose de 1,0 mL, 5 vezes por dia (400 μmol/mL/dia), durante 4 semanas, em modelo de carcinogênese de cólon induzida por AOM em ratos. O efeito mais pronunciado se deu no ensaio de 5 vezes ao dia. A maior dose de butirato utilizada neste trabalho, 400μmol/mL/dia, corresponde à produção normal aproximada de butirato derivada de uma dieta suplementada com 10% de farelo de trigo (WONG, 2005).

Quando administrado por 5 semanas, por via oral, misturado à ração, na dose de 25 mg/100g de peso corporal, o AB reduziu o número de FCAs no modelo de carcinogênese de colon induzida por AOM. Porém, este efeito ocorreu de forma pouco pronunciada (WARGOVICH, 1996).

Por outro lado, quando o AB foi administrado na água de beber de ratos submetidos ao modelo de carcinogênese de cólon induzida por DMH, nas doses de 1 ou 2%, não foi observada atividade quimiopreventiva (FREEMAN, 1986).

Em ratos submetidos ao modelo de carcinogênese de cólon induzida por AOM, a adição de AB aos "pellets" de liberação lenta, na dose de 150mg/dia, em uma dieta com elevado teor lipídico, não reduziu o número nem a multiplicidade dos FCAs,

nem carcinomas, após o período de administração de 10 ou 33 semanas (CADERNI, 1998, 2001).

Na prática clínica, o AB não pode ser usado diretamente como agente quimiopreventivo nem quimioterápico, apesar de seu efeito anti-carcinogênico promissor, já descrito na literatura. Isto porque o AB apresenta um rápido metabolismo e uma meia vida sanguínea muito curta, de apenas 6 minutos. Logo, não é possível manter concentrações sanguíneas eficientes de AB (em torno de 0,5 mM) se o mesmo for administrado isoladamente por via oral, necessitando de administração parenteral contínua (AUGERON, 1984; EGORIN, 1999; CLARKE 2001).

Alguns análogos e derivados do AB, como por exemplo, os sais de butirato (butirato de sódio e butirato de arginina), fenilbutirato, isobutiramida e a tributirina, têm sido amplamente estudados e testados *in vitro* e *in vivo* visando-se encontrar uma forma viável e segura de administração do AB.

A tributirina (TB), pró-fármaco análogo do AB, é um triglicerídeo neutro contendo 3 moléculas de AB esterificadas no glicerol; é similar em estrutura a 95% dos ácidos graxos encontrados nos alimentos (CLARKE, 2001), (Figura 8).

Nesse contexto, a TB tem se mostrado bastante promissora, pois é rapidamente absorvida e quimicamente estável no plasma; difunde-se pelas membranas biológicas e é metabolizada pelas lipases intracelulares, permitindo que o butirato liberado seja 3 vezes mais potente e exerça seu efeito terapêutico por mais tempo, diretamente na célula alvo. Além disso, sua meia-vida é de aproximadamente 40 minutos (EGORIN, 1999 ; EDELMAN, 2003; NEWMARK, 1994, 1995).

In vitro, a TB tem sido considerada como efetivo agente anti-tumoral, anti-angiogênico e anti-metastático quando administrada isoladamente ou em

combinação com outros agentes (GASCHOTT, 2001; CLARKE, 2001; SCHRÖDER, 2001).

Figura 8: Estrutura química da molécula de Tributirina originando 3 moléculas de ácido butírico. Adaptado de Edelman, 2003.

Portanto, por meio da ingestão de TB é possível manter níveis séricos adequados de butirato e ainda oferecer certas vantagens em relação aos outros derivados do AB. Por ser administrada por via oral, apresenta menor custo e maior aceitabilidade por parte dos pacientes testados, já que os sais de butirato precisam ser administrados por via intravenosa de forma lenta, o que pode durar um dia inteiro devido ao grande volume de líquido a ser infundido, além de requerer um cuidado maior com o acesso venoso (CONLEY, 1998; EGORIN 1999; GASCHOTT, 2001; SCHRÖDER, 2001).

Em estudos de quimioprevenção utilizando modelo de carcinogênese de mama induzida por nitrosometiluréia (NMU) a administração de TB apresentou efeito quimiopreventivo. O grupo tratado com TB na dose de 300 mg/100g de peso

corporal por 14 semanas apresentou menor multiplicidade de nódulos mamários (BELOBRAJDIC, 2000).

A TB já foi testada por via oral, também, em estudos de farmacocinética e de fase I. Estes estudos conseguiram estabelecer uma dose não tóxica, bem tolerada e que conseguisse manter níveis efetivos de butirato no sangue em ratos e em pacientes com câncer. Contudo, para administração oral em humanos, são necessárias várias cápsulas/dia para alcançar a dose efetiva de 200 mg/Kg de peso corporal, já que uma cápsula gelatinosa de tributirina contém em torno de 500 mg da substância ativa (em torno de 28 cápsulas/dia para um indivíduo de 70 Kg) (CONLEY, 1998; EGORIN 1999; GASCHOTT, 2001; SCHRÖDER, 2001; EDELMAN, 2003; SU, 2004; LUPTON, 2004).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, os estudos de nutrigenômica têm evoluído bastante e aos poucos elucidam mecanismos importantes da interação entre nutrientes e CBAs com os genes relacionados à carcinogênese.

Pesquisadores da área vêm estudando substâncias que atuem de maneira a controlar a proliferação celular visando impedir o avanço da carcinogênese. Estas podem atuar por meio de vários mecanismos como: alterar a expressão de genes envolvidos no ciclo celular e de genes que controlam a apoptose, além de modular a acetilação de histonas e a metilação do DNA. *In vitro*, tanto o butirato, quanto a tributirina, exercem efeitos promissores neste sentido (CHEN, 1994; HAZA, 2000; SCHRÖDER, 2001; CLARKE, 2001; RUPNARAIM, 2004).

Neste contexto, o AB parece atuar diminuindo a proliferação e induzindo a diferenciação celular em diversos tipos celulares, inclusive em leucemias e células de tumores sólidos como o câncer de cólon, além de induzir apoptose por uma via

independente de p53 (ZORAN, 1997; PARODI, 1997; EGORIN, 1999; HAZA, 2000; GASCHOTT 2001; LUPTON 2004).

A influência do AB na proliferação celular pôde ser demonstrada com a administração de doses elevadas de butirato de sódio (10 mmol/L) diretamente no lúmen do cólon de ratos. Após a administração do carcinógeno, ao AB aumentou a proliferação celular na base da cripta, mas diminuiu a proliferação, na superfície das criptas; o que seria o primeiro passo para a carcinogênese (VELAZQUEZ, 1996).

Com relação a atuação do AB no processo apoptótico, observou-se em culturas de células Caco-2 tratadas com butirato, aumento na expressão de Bak (pró-apoptótica) e redução da expressão de Bcl-X_L (anti-apoptótica). Contudo, não houve alteração na expressão de Bax nem Bid. Isto sugere que a via pela qual o butirato estimula apoptose no câncer de cólon esteja associada à síntese mitocondrial de Bak acompanhada da redução de Bcl-X_L, que resulta em liberação de citocromo c no citosol e formação de apoptossoma (RUEMMELE, 1999, 2003).

No mesmo sentido, outros estudos mostraram que o butirato de sódio foi capaz de reduzir a expressão de Bcl-2 e Bcl-X_L, enquanto aumentava a expressão de Bax e Bak. Além disto, promoveu a clivagem da poly-(ADP-ribose)polimerase pela caspase 3 (LITVAK, 1998; MANDAL, 2001).

Haza (2000) demonstrou que o butirato de sódio e o ácido desoxicólico induziram apoptose em células de cólon HT-29 e FHC (células humanas da mucosa colônica fetal) e este resultado é consistente com outros da literatura.

In vitro, a TB apresenta ação antiproliferativa, pró-apoptótica e indutora de diferenciação em células tumorais, efeitos que parecem ser ainda mais pronunciado que do butirato. (CHEN, 1994; SCHRÖDER, 2001; CLARKE, 2001; RUPNARAIM, 2004)

Em células mamárias da linhagem MCF-7, após 24h de exposição a 0,2 mM de TB houve acentuada redução das células na fase S do ciclo celular e um acúmulo de células na fase G₂/M (HEERDT, 1999).

Em células de tumor de próstata, a tributirina promoveu diferenciação e apoptose (MAIER, 2000).

Um estudo recente demonstrou que a exposição de células de câncer de cólon da linhagem HT-29 ao butirato, TB e fenilbutirato, resultou em menor proliferação celular tanto dose, quanto tempo dependente, por parte das 3 substâncias testadas, e também em aumento na diferenciação celular. Assim sendo, a inibição da proliferação celular pareceu estar associada ao bloqueio da fase G₁/S do ciclo celular pela hipofosforilação da proteína retinoblastoma (Rb), bem como ao aumento da apoptose mediado pela ativação da via da caspase 3. Dentre as 3 substâncias testadas, a TB provou ser a mais potente para reduzir proliferação celular quando comparada ao fenilbutirato e ao butirato (CLARKE, 2001).

Entretanto, neste mesmo estudo, o butirato foi o mais potente agente indutor de diferenciação celular, talvez porque a exposição à TB e ao fenilbutirato tenha induzido mais apoptose. O melhor resultado anti-proliferativo e pró-apoptótico por parte da TB quando comparada ao butirato pode se basear no fato de que a completa hidrólise de cada mole de TB pelas lípases e esterases das células fornecia 3 moles de butirato. Os autores observaram também que cada 1 mM de TB resultava em efeito citotóxico semelhante a 3 mM de butirato. Este fato sustenta a hipótese de que a TB é um pró-farmaco do butirato. Houve também maior captação celular de TB por esta ser mais lipofílica que o butirato (CLARKE, 2001).

Resultados semelhantes foram observados em outra linhagem de células do cólon. In vitro o tratamento com 0,6 a 1 mM de TB em células LS 174T induziu

diferenciação celular e apoptose tempo e dose-dependentes, fato intimamente ligado à redução da proliferação celular, ativação da fosfatase alcalina e características morfológicas típicas de apoptose além de translocação da fosfatidilserina, indução de proteases específicas e surgimento de fragmentos de DNA. A atividade da caspase 3 aumentou após exposição à tributirina, indicando que esta substância possa estar envolvida na indução da apoptose por essa via da caspase 3 (SCHRÖDER, 2002).

Estudo anterior do mesmo grupo observou aumento na expressão do receptor de morte celular Fas após tratamento com 0,6 mM de TB em células LS 174T, recrutando, conseqüentemente, caspase 8. Porém, após a incubação com inibidores da caspase 9 não se observou variação na taxa apoptótica, sugerindo que a indução de apoptose pela tributirina pode não envolver necessariamente essa via mitocondrial (SCHRÖDER, 2001).

É importante ressaltar que, em outro estudo utilizando células Caco-2, ou seja, outra linhagem celular, enfatizou-se a importância da via apoptótica intrínseca, ou seja, via mitocondrial, na qual inibidores das caspases 3 e 9, mas não da caspase 8, bloquearam a apoptose mediada pelo butirato (MARIADASON, 2008).

Em nível molecular, tanto o butirato, quanto a TB parecem modular mecanismos epigenéticos. Quando testado *in vitro*, o butirato induziu hiperacetilação de histonas, principalmente H3 e H4, sendo considerado um potente inibidor de desacetilases de histonas (HDACs), além de causar hipermetilação do DNA, embora o mecanismo preciso pelo qual isto acontece ainda não esteja bem elucidado (HINNEBUSCH, 2002).

Ao inibir a atividade das HDACs o butirato pode induzir a expressão de genes específicos que provocam mudanças metabólicas e da morfologia celular, como o

controle da proliferação celular, diferenciação e apoptose. Esses eventos epigenéticos estão associados com a diminuição ou inativação da expressão de oncogenes (ZORAN, 1997; PARODI, 1997; EGORIN, 1999; GASCHOTT, 2001; LUPTON, 2004).

In vivo, já foi observado a hiperacetilação de histonas e diminuição da proliferação celular nas células epiteliais do cólon de ratos alimentados com uma dieta rica em fibras que, conseqüentemente, apresentavam elevado teor de butirato no lúmen intestinal (HINNEBUSCH, 2002).

Baseado nas descobertas animadoras encontradas na literatura atual, que *in vitro* demonstraram efeitos importantes do AB e da TB na carcinogênese, avaliou-se de forma original, a eventual atividade quimiopreventiva da TB, quando administrada a ratos wistar durante a etapa de pós-iniciação do modelo de carcinogênese de cólon.

2- OBJETIVOS:

2.1- GERAL:

Avaliar a eventual atividade quimiopreventiva da tributirina quando administrada a ratos Wistar continuamente por cinco semanas, durante a etapa de pós-iniciação de modelo de carcinogênese de cólon.

2.2- ESPECÍFICO:

Analisar a expressão de alguns genes associados à tributirina no cólon médio-proximal e médio-distal em modelo de carcinogênese de cólon:

2.2.1. Avaliar o padrão de acetilação das histonas H3K9 e H4K16 em ratos não tratados e tratados com maltodextrina (MD) ou tributirina (TB).

2.2.2. Investigar a expressão dos genes pró-apoptótico BAK e anti-apoptótico Bcl-x_L, da família Bcl-2, em ratos não tratados e tratados com MD ou TB.

3- MATERIAL E MÉTODOS:

3.1. Animais:

O ensaio biológico foi realizado nas dependências do biotério da FCF/IQ-USP nas seguintes condições ambientais controladas: temperatura de 22°C ± 2°C, ciclo de iluminação claro-escuro de 12 h (claro a partir das 6 h) e umidade ambiental de 60%. O mesmo iniciou-se após a aclimação prévia dos animais neste ambiente por sete dias.

Foram utilizados neste estudo 30 ratos machos, albinos, da linhagem Wistar, com pesos iniciais compreendidos entre 70 e 80 g e obtidos da colônia do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química da Universidade de São Paulo (FCF/IQ-USP).

Esses animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (3 ratos/gaiola) com tampa de aço inoxidável, contendo em seu interior maravalha previamente esterilizada, que foi trocada em dias alternados.

Durante todo o experimento os ratos receberam água filtrada e autoclavada e ração comercial peletizada comum para roedores de laboratório (Purina Nutrimentos Ltda., Brasil) *ad libitum*. Seus pesos corpóreos e consumo de ração foram avaliados diariamente.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais de Experimentação (Protocolo CEEA nº 165).

3.2. Modelo de Carcinogênese de Cólon:

A carcinogênese química de cólon foi induzida por meio da aplicação intraperitoneal do agente iniciador e promotor DMH, na dose de 40 mg/kg de peso corpóreo (p.c.) dissolvido em solução 1mM de EDTA (37 mg/100 ml de solução salina 0,9%) com pH ajustado para 6,5 com NaOH 10N. No total foram administradas quatro doses distribuídas no segundo e quinto dias das duas semanas consecutivas (WARGOVICH, 2000; RODRIGUES, 2002; LIMA, 2005; AGNER, 2005; DIAS, 2006).

Como a proposta do estudo era avaliar a ação da TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese, o tratamento diário dos animais com TB ou MD foi iniciado uma semana após a administração da última dose do carcinógeno, prosseguindo por mais cinco semanas consecutivas quando se deu a eutanásia dos mesmos (YOUNG, 1996; KELLOFF, 2000). Com isso, visou-se eliminar o influência direta das substâncias testadas no metabolismo da DMH.

3.3. Protocolo Experimental:

Os 30 animais foram distribuídos de forma aleatória nos três seguintes grupos experimentais:

3.3.1- Grupo não tratado (NT): 6 animais não submetidos ao modelo de carcinogênese de cólon nem a qualquer tratamento, somente mantidos nas mesmas condições ambientais dos animais dos grupos tratados;

Os outros 24 animais foram distribuídos em dois grupos, os quais foram submetidos ao modelo de carcinogênese de cólon e tratados por entubação gástrica ("gavage") como indicado abaixo:

3.3.2- Grupo Maltodextrina (MD): 12 animais tratados diariamente com Maltodextrina (Nidex®, Nestlé, Brasil) na dose de 300 mg/100 g de p.c./dia, dissolvida em água filtrada, perfazendo um volume de 0,42 mL/100 g de p.c./dia. Este foi considerado o grupo controle, tendo em vista que a MD foi fornecida em quantidade isocalórica à TB (6 Kcal/g) com o objetivo de eliminar uma importante variável que seria a administração de maior quantidade de calorias (Gioielli, 2002);

3.3.3- Grupo Tributirina (TB): 12 animais tratados diariamente com tributirina (98%; Aldrich, EUA), na dose de 200 mg/100 g de p.c./dia, perfazendo um volume de 0,2 mL/100 g de p.c./dia;

A entubação gástrica dos animais ocorreu pela manhã, sempre no mesmo horário, com revezamento diário entre o primeiro e o último animal a ser tratado. O tratamento com MD ou TB teve duração total de cinco semanas consecutivas (WARGOVICH, 2000), conforme esquema apresentado na **Figura 9**.

□ NT = GRUPO NÃO TRATADO

▨ MD = GRUPO MALTODEXTRINA (CONTROLE) (300mg/100g/PC)

▧ TB = GRUPO TRIBUTIRINA (200mg/100/PC)

DMH = 1,2 dimetilhidrazina (40 mg/Kg/PC)

E = Eutanásia

Figura 9: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da atividade quimiopreventiva da tributirina, na etapa de pós-iniciação de modelo de carcinogênese de cólon induzida por DMH.

Na noite anterior à eutanásia as rações foram retiradas para que os ratos ficassem em jejum. Imediatamente antes da eutanásia os animais foram anestesiados com éter etílico (Merck, Brasil) e colocados em decúbito dorsal sobre uma prancha, realizando-se a laparotomia e, em seguida, a secção da aorta abdominal com conseqüente choque hipovolêmico.

O cólon de todos os ratos foi removido, lavado em solução salina gelada 0,9%, apoiado em papel de filtro e aberto longitudinalmente (ZHENG, 1999; DAVIDSON, 2000). A seguir, o mesmo foi dividido horizontalmente em duas porções de extensão semelhante. A metade superior foi denominada porção médio-proximal e a porção inferior, médio-distal (HIROSI, 2003).

Cada porção do cólon foi também dividida longitudinalmente em dois hemicólons. O primeiro hemicólon foi codificado e fixado em etanol a 70% para a posterior identificação e classificação, ao microscópio invertido, de focos de criptas aberrantes (FCAs) (KOB-EK-JARSEN, 2005). No outro hemicólon foram coletadas as células da mucosa por raspagem com lâmina de bisturi. O material coletado foi devidamente identificado, congelado em nitrogênio líquido e conservado a -80°C para posterior extração protéica (DAVIDSON, 2000; WALI, 2002).

3.4. Pesquisa de Focos de Criptas Aberrantes (FCAs):

Os hemicólons, relativos às porções do cólon médio-proximal e médio-distal, fixados em etanol a 70%, foram medidos em seu comprimento e largura e depois corados com azul de metileno a 0,02% (dissolvido em etanol 70%) durante 10 minutos (WALI, 2002). As duas porções dos cólons de todos os animais tratados foram apoiadas em lâminas de vidro com a superfície da mucosa voltada para cima e posteriormente analisadas topograficamente no microscópio invertido (Carl Zeiss, Alemanha), no aumento de 40X, quanto à incidência de FCAs e número de criptas por foco (1, 2, 3 ou > 4 criptas conforme WU, 2004).

Os FCAs foram caracterizados por suas dilatações na abertura luminal, rodeados por um espesso epitélio e corados mais intensamente com azul de metileno quando comparados às criptas vizinhas consideradas normais. (BIRD, 1987; BAZO, 2002).

3.5 Avaliação da expressão de H3K9 e H4K16:

Para avaliação da expressão, em nível de proteína, da Histona H3 acetilada na lisina 9 (H3K9) e da Histona H4 acetilada na lisina 16 (H4K16) pela técnica de *Western Blotting* foi necessário fazer a extração ácida de histonas da mucosa colônica pela adaptação dos protocolos de Jeong et al. (2003) e Druesne et al. (2004).

3.5.1- Extração ácida de histonas:

O protocolo de extração ácida de histonas de tecidos foi feito em três etapas. Na primeira etapa homogeneizou-se em “dounce” de 2 mL, 50 mg de mucosa colônica, obtida por ocasião da eutanásia dos animais, com 300 µL de tampão de lise gelado (Tris 10 Mm; bissulfito de sódio 50Mm; Triton X-100 1%; MgCl₂ 10 Mm; sacarose 8,6%; PMSF e água ultra-pura, acertando-se o pH para 6,5).

Em seguida, centrifugou-se esta solução à 700 g por 15 minutos à 4° C para separar os núcleos e lavá-los com tampão Tris-EDTA (Tris 10Mm; EDTA 13Mm; PMSF e água ultra-pura, acertando o pH para 8,0).

Os núcleos lavados foram centrifugados novamente a 700 g por 15 minutos à 4° C para a formação de precipitados. Esses precipitados foram então re-suspendidos com H₂SO₄ 0,6N e incubados em temperatura de 4° C, por uma noite (em torno de 12 à 18 horas). Esse tempo foi necessário para que ocorresse a separação da fração solúvel em meio ácido.

A etapa seguinte incluiu a centrifugação da solução formada a 10.000 g por 15 minutos, à temperatura de 4° C. Em seguida, separou-se o sobrenadante, que foi então neutralizado com acetona e incubado em temperatura de -20° C, por uma noite (em torno de 12 a 18 horas) visando com isto, a precipitação das histonas.

Por fim, a última etapa incluiu a centrifugação desta solução a 12.000 g por 5 minutos em temperatura de 4° C. Em seguida, separou-se o precipitado formado que foi então neutralizado com NaOH 3N e re-suspendido em tampão de carregamento (uréia 5,8M; ácido acético glacial 0,9M; glicerol 16%, verde de metila 0,2%; 2-mercaptoetanol 4,8% e água ultra-pura).

3.5.2- Quantificação da concentração de histonas nas amostras:

Adotou-se o método de absorção no ultravioleta (UV), para quantificar o conteúdo protéico (histonas) das amostras extraídas.

Esse método baseia-se no fato de que as proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm. Para tanto, foi utilizado o aparelho de leitura UV Gene-Quant Pro (Amersham Pharmacia biotec, EUA) ajustado para o comprimento de onda de 280 nm.

A concentração protéica das amostras foi determinada com base em uma curva padrão de albumina (0 a 4000 µg/mL).

3.5.3- Western Blotting de H3K9 e H4K16:

Os extratos protéicos (histonas) de três animais de cada grupo (NT, MD e TB) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 15%, utilizando-se uma cuba de eletroforese vertical (Hoefer mini VE Electrophoresis System, EUA) e usando o tampão Tris-glicina (Tris, Glicina, SDS, água-ultra-pura) de acordo com o método de Laemmli (LAEMMLI, 1970).

Posteriormente, as proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose Hybond-ECLTM (Amersham Biosciences, EUA), com poro de diâmetro 0,2 µm, por 30 minutos. A eficácia da transferência foi observada após coloração da membrana com Ponceau-S (USB, EUA).

O bloqueio da membrana de nitrocelulose foi feito em temperatura ambiente por 1 hora utilizando-se uma solução de albumina bovina sérica a 3% diluída em tampão PBS (NaCl 137Mm; Na₂HPO₄ 10Mm; KCl 2,68Mm; KH₂PO₄ 1,76Mm e água ultra-pura, acertando-se o pH para 7,4). Em seguida, a membrana bloqueada foi lavada com tampão PBS contendo 1% de detergente Tween (USB, EUA), em 3 ciclos de 10 minutos.

A membrana foi então incubada a 4°C, por uma noite (em torno de 12 a 14 horas) com o anticorpo primário específico para cada histona analisada, ou seja, anticorpo policlonal anti-acetil H3K9 (Upstate, EUA) na concentração 1:1000 e anticorpo policlonal anti-acetil H4K16 (Upstate, EUA) na concentração 1:1000, os dois diluídos em tampão PBS.

Após novo ciclo de lavagens a membrana foi incubada por 1 hora com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase HRP anti-imunoglobulina de coelho (Amersham Biosciences, EUA) na concentração 1:10.000, diluído em tampão PBS.

Por fim, a imunodeteção foi feita pelo método de quimioluminescência utilizando-se o “Kit” ECL (Amersham Biosciences, EUA) e expondo-se um filme de raio-x (Kodak X-Omat, EUA) à respectiva membrana, para o desenvolvimento das bandas.

Posteriormente, a membrana foi corada com o corante de comassie (Comassie Blue, Pierce, EUA) para ser utilizada como controle de carregamento das proteínas.

Os “immunoblottings” e as membranas coradas com Comassie Blue foram analisados em densitômetro de imagens (Modelo GS-700, BIO-RAD, EUA) para quantificar a intensidade das bandas com a ajuda de um software específico (Molecular Analyst, BIO-RAD, EUA). Os sinais medidos foram quantificados em unidades arbitrárias. Os valores que representaram a expressão de H3K9 e H4K16 foram normalizados pelos valores da membrana corada com Comassie Blue, visando dessa forma, corrigir as variações no carregamento das proteínas.

Foi realizado um ensaio independente de “immunoblotting” de cada tipo histona analisada na porção de cólon médio-proximal, bem como na porção do cólon médio-distal, contendo três amostras (animais) de cada grupo: NT, MD e TB em cada “immunoblotting”.

3.6 Avaliação da expressão de Bak e Bcl-x_L:

Primeiramente foi realizada a extração de proteína citoplasmática da mucosa colônica das frações médio-proximal e médio-distal para posteriormente avaliar a expressão de Bak e Bcl-x_L, em nível de proteína, pela técnica de *Western-blotting*.

3.6.1- Extração de proteína citoplasmática:

Os extratos protéicos de frações celulares citoplasmáticas de mucosa colônica foram obtidos por meio do "kit" de extração protéica citoplasmática e nuclear NE-PER[®] (Pierce, EUA), seguindo-se as instruções do protocolo do fabricante .

Para tanto, pesou-se uma alíquota de aproximadamente 25 mg de mucosa colônica, recolhida por ocasião do sacrifício e congelada a -80°C, de seis animais de cada grupo (não tratado e tratados com MD ou TB).

Em seguida, as amostras foram submetidas à lise celular com ruptura da membrana plasmática, com conseqüente liberação e purificação do extrato citoplasmático. Em seguida, os núcleos intactos foram separados por centrifugação e submetidos à lise, ocorrendo quebra da carioteca e liberação do extrato nuclear. O extrato nuclear não foi utilizado.

3.6.2. Quantificação da concentração protéica nas amostras:

A metodologia para quantificação da concentração de proteína nos extratos protéicos citoplasmáticos das amostras de todos os grupos foi a mesma descrita no item 3.5.2.

3.6.3- Western Blotting de Bak e Bcl-x_L:

A técnica de Western Blotting utilizada foi semelhante com a descrita anteriormente no item 3.5.3, porém, com algumas alterações, conforme particularidades de cada proteína, e descritas a seguir:

Depois da eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond-CTM extra (Amersham Biosciences, EUA), com poro de diâmetro 0,45µm, por 45 minutos.

A membrana de nitrocelulose foi bloqueada em temperatura ambiente por 1 hora utilizando-se uma solução própria do "kit" ECL Advanced (Amersham Bioscience, EUA) diluída em e PBS contendo 1% de detergente Tween (USB, EUA).

Cada membrana foi então incubada a 4 C° por uma noite (em torno de 14 a 16 horas) com anticorpo primário específico para cada proteína analisada. Foram usados os seguintes anticorpos primários: anti-bak policlonal (Santa Cruz Biotechnology Inc) na concentração de 1:1000; e anti-bclx_L monoclonal (Santa Cruz Biotechnology Inc) na concentração de 1:2000, todos diluídos em PBS.

Posteriormente, cada membrana foi incubada com seu anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase HRP (Amersham Bioscience, EUA) anti-imunoglobulina de coelho para Bak na concentração 1:10000 e anti-imunoglobulina de rato para bclxl na concentração 1:40000, todos diluídos em PBS.

A imunodeteção também foi feita pelo método de quimioluminescência, porém, utilizando-se o "Kit" ECL Advanced (Amersham Biosciences, EUA).

Foram realizados dois ensaios independentes de “immunoblotting” da porção de cólon médio-proximal e dois da porção do cólon médio-distal, cada um contendo três amostras por grupo: NT, MD e TB, perfazendo um total de seis animais por grupo.

3.7. Análise Estatística:

Os experimentos foram realizados de forma inteiramente casualizada 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).

Na constatação de que foram satisfeitas as condições para aplicação dos testes estatísticos paramétricos de comparação de médias, as seguintes análises estatísticas foram realizadas:

- a) as comparações com relação aos FCAs entre os grupos TB e MD foram realizadas pelo teste *t* de Student;
- b) as comparações com relação ao peso inicial e final do animais dos grupos NT, MD e TB foram realizadas por Análise de Variância Unidimensional (One-way ANOVA) seguida do teste de Duncan. Os mesmos testes foram utilizados para analisar a expressão de H3K9, H4K16;
- c) as comparações com relação à expressão de BAK e Bcl-xL dos grupos NT, MD e TB foram realizados por Análise de Variância Bidimensional (Two-way ANOVA) seguida do teste de Duncan.

Nos conjuntos de dados em que não foram observadas distribuição normal e, principalmente, a homogeneidade das variâncias, testes estatísticos não-paramétricos foram adotados. Para comparação de dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney e para mais de dois grupos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis.

Os resultados foram expressos como média dos resultados $\pm$ desvio padrão. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa STATISTICA 7.0 e adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4- RESULTADOS:

4.1. Peso dos animais:

Os pesos corpóreos dos animais foram controlados diariamente durante todo o experimento, ou seja, 8 semanas (Figura 10). Na **Tabela 1** estão apresentados os pesos corpóreos inicial, final e peso hepático dos animais não tratados (NT) e daqueles submetidos à modelo de carcinogênese de cólon induzido por DMH e tratados com MD (controle) ou TB. Os pesos corpóreos iniciais de todos os animais foram semelhantes (Tabela 1), indicando homogeneidade entre os grupos no momento da aleatorização. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre o peso corpóreo final dos animais dos grupos controle e experimental. O mesmo foi observado em relação ao peso do fígado destes animais. Estes dois parâmetros sugerem ausência de toxicidade por parte das substâncias administradas (MD e TB) nas doses utilizadas (Tabela 1).

A diferença estatística ($p < 0,05$) entre o peso corporal final dos animais do grupo não tratado e dos grupos tratados com MD ou TB (Tabela 1), justifica-se pela administração intraperitoneal de DMH para aplicação do modelo de carcinogênese de cólon. Isso é esperado e sugere que a aplicação do modelo ocorreu de forma satisfatória.

Tabela 1: Peso corpóreo e hepático de ratos Wistar, não tratados ou submetidos ao modelo de carcinogênese de cólon e tratados com MD ou TB durante a etapa de pós-iniciação

Grupo	n	Peso Corpóreo Inicial (g)	Peso Corpóreo Final (g)	Peso Hepático (g)	Peso Hepático Relativo (g/100 g de p.c.)
NT	6	81,2 ± 4,5	361,61 ± 19,64	9,31 ± 1,34	2,58 ± 0,43
MD	11	80,9 ± 4,9	329,08 ± 21,46*	8,05 ± 0,80	2,44 ± 0,17
TB	12	81,3 ± 4,1	309,16 ± 22,25*	7,56 ± 0,92	2,44 ± 0,21

n = número de animais; NT = Grupo não tratado; MD = Grupo maltodextrina, TB = Grupo tributirina. Resultados expresso como média ± desvio padrão da média.

* diferença estatística entre o grupo NT e os grupos MD e TB, segundo One-way ANOVA seguida de Duncan.

Figura 10: Evolução do peso corpóreo de ratos Wistar, não tratados ou submetidos ao modelo de carcinogênese de cólon e tratados com MD ou TB durante a etapa de pós-iniciação.

NT = Grupo não tratado (n=6); MD = Grupo Maltodextrina (300 mg/100 g/p.c.) (n=11); TB = Grupo Tributirina (200 mg/100/p.c.) (n=12); DMH = 1,2 dimetilhidrazina (4 doses de 40 mg/Kg/p.c.)

4.2. Consumo de ração dos animais:

O consumo de ração dos animais de todos os grupos experimentais foi controlado diariamente no período em que os ratos foram tratados com MD ou TB. Pode-se observar na **Figura 11** que não houve diferença estatística entre o consumo de ração dos animais do grupo não tratado e dos grupos tratados com MD ou TB e submetidos a modelo de carcinogênese de cólon.

Durante todo o ensaio biológico não se observou qualquer intercorrência digestiva digna de nota por parte dos animais dos três grupos estudados. Este fato, associado ao consumo de ração semelhante entre os grupos confirma a ausência de toxicidade das substâncias administradas por entubação gástrica, já observada em relação ao peso corpóreo.

Figura 11: Evolução do consumo de ração dos ratos não tratados e tratados com MD ou TB, durante todo o período experimental de 8 semanas, de modelo de carcinogênese de cólon induzida por DMH.

Grupo Normal = não tratado (n=6); Grupo Controle = tratado com maltodextrina (300 mg/100 g/p.c.) (n=11); Grupo Tributirina = tratado com tributirina (200 mg/100 g/p.c.) (n=12)

4.3. Pesquisa de Focos de Criptas Aberrantes (FCAs):

As **Figuras 13, 14, 15 e 16** mostram os resultados referentes à quantidade de FCAs por região do cólon expressos tanto em número absoluto, como também em número de FCAs por área (cm²) de tecido analisado. Vale ressaltar que apenas os grupos tratados com DMH apresentaram FCAs. Tanto no grupo tratado com MD, quanto no grupo tratado com TB, a incidência de FCAs foi de 100%.

Observou-se no cólon médio-proximal, uma média de 23,09 FCAs no grupo tratado com MD e 16,25 FCAs no grupo tratado com TB. No cólon médio-distal houve uma incidência maior de FCAs, como era esperado, traduzindo-se numa média de 39,27 e 52 FCAs nos grupos tratados com MD e TB, respectivamente. Não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais com relação à incidência do número de FCAs nos cólons médio-distal e médio-proximal; o mesmo aconteceu em relação à incidência por área de cólon analisada (FCAs/cm²).

Analisou-se, também, por região do cólon a multiplicidade destes FCAs, ou seja, quantos focos tinham de 1 a 3 criptas aberrantes e quantos tinham 4 ou mais criptas aberrantes (Tabelas 2 e 3). Pode-se observar que o nosso modelo apresentou um número maior de FCAs com 1 a 3 criptas comparado ao número de FCAs com mais de 4 criptas. Entretanto, ao compararmos a multiplicidade de FCAs entre os grupos tratados com MD e TB, não encontramos diferença estatística, nem para os focos menores, com 1 a 3 criptas, nem para os focos maiores, com 4 ou mais criptas aberrantes. Este fato foi constatado no cólon médio-proximal e no médio-distal, tanto em números absolutos, quanto em número de FCAs por área [FCAs/cm²] (Tabelas 2 e 3).

Figura 12: Exemplo de um Foco de Criptas Aberrantes (FCAs) contendo 6 criptas aberrantes; observado na mucosa colônica de rato Wistar submetido ao modelo de carcinogênese de cólon induzida por DMH; quando corado com azul de metileno (Objetiva de 40X).

Tabela 2: Número de FCAs de acordo com sua multiplicidade, no CÓLON MÉDIO-PROXIMAL de ratos Wistar tratados por 5 semanas com MD ou TB, na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon induzida por DMH.

Grupos	Número de FCAs com 1 a 3 criptas	Número de FCAs com 4 ou + criptas	Número de FCAs/cm ² com 1 a 3 criptas	Número de FCAs/cm ² com 4 ou + criptas
MD	18,45 ± 14,14	5,55 ± 4,34	2,56 ± 1,76	0,72 ± 0,69
TB	13,50 ± 13,23	2,75 ± 3,11	2,00 ± 1,97	0,39 ± 0,45

Resultados expressos como média ± desvio padrão.

MD: grupo tratado com maltodextrina (controle) (n = 11)

TB: grupo tratado com tributirina (n = 12)

FCAs: focos de criptas aberrantes

Comparações entre os grupos MD e TB realizadas pelo teste de *t* Student.

Tabela 3: Número de FCAs de acordo com sua multiplicidade, no CÓLON MÉDIO-DISTAL de ratos Wistar tratados por 5 semanas com MD ou TB, na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon induzida por DMH.

Grupos	Número de FCAs com 1 a 3 criptas	Número de FCAs com 4 ou + criptas	Número de FCAs/cm ² com 1 a 3 criptas	Número de FCAs/cm ² com 4 ou + criptas
MD	33,36 ± 20,04	5,55 ± 4,34	5,48 ± 4,01	0,93 ± 0,71
TB	44,75 ± 30,14	7,25 ± 6,45	5,95 ± 3,88	0,96 ± 0,87

Resultados expressos como média ± desvio padrão.

MD: grupo tratado com maltodextrina (controle) (n = 11)

TB: grupo tratado com tributirina (n = 12)

FCAs: focos de criptas aberrantes

Comparações entre os grupos MD e TB realizadas pelo teste de *t* Student.

Figura 13: Número de FCAs e multiplicidade de FCAs (numero de criptas por foco) no CÓLON MÉDIO-PROXIMAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Grupo MD = tratado com maltodextrina (n = 11); Grupo TB = tratado com tributirina (n = 12); FCAs = focos de criptas aberrantes. Comparações entre os grupos MD e TB realizadas pelo teste de *t* Student.

Figura 14: Número de FCAs e multiplicidade de FCAs (numero de criptas por foco) no CÓLON MÉDIO-DISTAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Grupo MD = tratado com maltodextrina (n = 11); Grupo TB = tratado com tributirina (n = 12); FCAs = focos de criptas aberrantes. Comparações entre os grupos MD e TB realizadas pelo teste de *t* Student.

Figura 15: Número de FCAs/cm² e multiplicidade (numero de criptas por foco) de FCAs/cm² no CÓLON MÉDIO-PROXIMAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Grupo MD = tratado com maltodextrina (n = 11); Grupo TB = tratado com tributirina (n =12); FCAs = focos de criptas aberrantes. Comparações entre os grupos MD e TB realizadas pelo teste de *t* Student.

Figura 16: Número de FCAs/cm² e multiplicidade (numero de criptas por foco) de FCAs/cm² no CÓLON MÉDIO-DISTAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Grupo MD = tratado com maltodextrina (n = 11); Grupo TB = tratado com tributirina (n =12); FCAs = focos de criptas aberrantes. Comparações entre os grupos MD e TB realizadas pelo teste de *t* Student.

4.4. Western-blotting para H3K9 e H4K16:

Nas **Figuras 17, 18, 19 e 20** são apresentadas as bandas que representam a expressão de H3K9 e H4K16 nas regiões do cólon médio-proximal e médio-distal de proteínas dos animais não tratados e daqueles submetidos à modelo de carcinogênese de cólon induzido por DMH e tratados com MD (controle) ou TB, juntamente com as bandas coradas com Comassie Blue usadas como controle de carregamento e os gráficos expressando os valores arbitrários correspondentes à densidade das bandas.

Tanto no cólon médio-proximal, como no cólon médio-distal a expressão de H3K9 e H4K16, em nível de proteína, foi semelhante ($p>0,05$), comparando-se os grupos não tratado e tratados com MD ou TB (Figuras 17,18,19 e 20).

Figura 17: Imunoblotting representando a expressão de H3K9 em nível de proteína no cólon MÉDIO-PROXIMAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Grupo NT = não tratado (n=3); MD = tratado com maltodextrina (n=3); TB = tratado com tributirina (n=3). Comparações entre os grupos NT, MD e TB realizadas por One-way ANOVA.

A. Imunoblot de H3K9; B. Membrana corada com Comassie Blue para controle de carregamento.

Figura 18: Imunoblotting representando a expressão de H3K9 em nível de proteína no cólon MÉDIO-DISTAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Grupo NT= não tratado (n=3); MD= tratado com maltodextrina (n=3); TB= tratado com tributirina (n=3). Comparações entre os grupos NT, MD e TB realizadas por One-way ANOVA

A. Imunoblot de H3K9; B. Membrana corada com Comassie Blue para controle de carregamento.

Figura 19: Imunoblotting representando expressão de H4K16 em nível de proteína no cólon MÉDIO-PROXIMAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon.

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Grupo NT = não tratado (n=3); MD = tratado com maltodextrina (n=3); TB = tratado com tributirina (n=3). Comparações entre os grupos NT, MD e TB realizadas por One-way ANOVA

A. Imunoblot de H4K16; B. Membrana corada com Coomassie Blue para controle de carregamento.

Figura 20: Imunoblotting representando expressão de H4K16 em nível de proteína no cólon MÉDIO-DISTAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon.

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Grupo NT= não tratado (n=3); MD= tratado com maltodextrina (n=3); TB= tratado com tributirina (n=3). Comparações entre os grupos NT, MD e TB realizadas por One-way ANOVA

A. Imunoblot de H4K16; B. Membrana corada com Coomassie Blue para controle de carregamento.

4.5. Western-blotting para BAK e Bcl-x_L:

As Figuras 21, 22, 23 e 24 apresentam as bandas obtidas por “western blotting” de BAK e Bcl-x_L nas regiões do cólon médio-proximal e médio-distal; as bandas para controle de carregamento coradas com Comassie Blue e os gráficos expressando os valores arbitrários correspondentes à densidade das bandas de BAK e Bcl-x_L dos animais não tratados e daqueles submetidos à modelo de carcinogênese de cólon induzido por DMH e tratados com MD (controle) ou TB

Não houve diferença significativa na expressão da proteína pró-apoptótica BAK, entre os grupos não tratado ou tratados com MD ou TB, nas duas regiões do cólon estudadas (Figuras 21 e 22).

A expressão de Bcl-x_L, em nível de proteína, no cólon médio-proximal, não apresentou diferença estatística entre os grupos NT, MD e TB (Figura 23). Entretanto, no cólon médio-distal observou-se uma menor expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-x_L quando comparou-se o tratamento com a TB e os demais grupos (não tratado e MD), este resultado apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan (Figura 24).

Figura 21: Imunoblotting representando a expressão de BAK em nível de proteína no cólon MÉDIO-PROXIMAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Grupo NT = não tratado (n=6); MD = tratado com maltodextrina (n=6); TB = tratado com tributirina (n=6). Comparações entre os grupos NT, MD e TB realizadas por Two-way ANOVA

A. Imunoblot de BAK; B. Membrana corada com Comassie Blue para controle de carregamento.

Figura 22: Imunoblotting representando a expressão de BAK em nível de proteína no cólon MÉDIO-DISTAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Grupo NT= não tratado (n=6); MD= tratado com maltodextrina (n=6); TB= tratado com tributirina (n=6). Comparações entre os grupos NT, MD e TB realizadas por Two-way ANOVA

A. Imunoblot de BAK; B. Membrana corada com Comassie Blue para controle de carregamento.

Figura 23: Imunoblotting representando expressão de Bcl-x_L em nível de proteína no cólon MÉDIO-PROXIMAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon. Resultados expressos como média ± desvio padrão. Grupo NT = não tratado (n=6); MD = tratado com maltodextrina (n=6); TB = tratado com tributirina (n=6). Comparações entre os grupos NT, MD e TB realizadas por Two-way ANOVA

A. Imunoblot de Bcl-x_L; B. Membrana corada com Comassie Blue para controle de carregamento.

Figura 24: Imunoblotting representando expressão de Bcl-x_L em nível de proteína no cólon MÉDIO-DISTAL dos animais tratados por 5 semanas com MD ou TB na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon. Resultados expressos como média ± desvio padrão. Grupo NT= não tratado (n=6); MD= tratado com maltodextrina (n=6); TB= tratado com tributirina (n=6).

*Diferença estatisticamente significativa segundo Two-way ANOVA seguida de Duncan.

A. Imunoblot de Bcl-x_L; B. Membrana corada com Comassie Blue para controle de carregamento.

5- DISCUSSÃO:

O binômio, nutrição e câncer tem sido alvo de bastante interesse na comunidade científica e vem sendo amplamente estudado, principalmente nos últimos 25 anos. Já é conhecido o fato de que certos nutrientes e CBAs, presentes nos alimentos, têm potencial para diminuir o risco de desenvolvimento do câncer, em especial o de cólon (WARGOVICH, 1996; DIVISI, 2006; NGUYEN, 2006; RYAN-HARSHMAN, 2007; RODRIGO, 2007).

A tendência atual, depois do seqüenciamento do genoma humano em 2003, aponta para um novo conceito, a nutrigenômica, que associada ao estudo da carcinogênese, resulta em trabalhos envolvendo os nutrientes ou CBAs e sua atuação na expressão de genes específicos que possam estar relacionados com o câncer. Neste contexto, podemos destacar os estudos de quimioprevenção e sua importância como medida de controle do câncer.

Contudo, para avaliar o potencial quimiopreventivo de determinada substância é necessário aplicá-la em modelos utilizando animais de experimentação, antes de efetivamente testá-la em humanos (DIVISI, 2006; RODRIGO, 2007).

Os estudos de quimioprevenção podem ser realizados por meio da utilização de modelos experimentais específicos, como por exemplo, o modelo de carcinogênese química induzida por DMH, um carcinógeno alquilante, completo e indireto, que atua principalmente no cólon destes animais. Este modelo parece reproduzir de forma satisfatória em ratos, a evolução, morfológica e genética, de um epitélio colônico normal para a neoplasia maligna de cólon, de forma semelhante à que ocorre em humanos (GUSTIN, 2002).

De forma inédita, o presente trabalho visou avaliar o potencial quimiopreventivo da TB, quando administrada a ratos na fase de pós-iniciação da carcinogênese de cólon induzida por DMH.

Ao analisarmos o número e multiplicidade dos FCAs na mucosa colônica das porções dos cólons médio-proximal e médio-distal, não observamos diferença significativa entre os grupos tratados com TB e MD (controle). Isto sugere que a TB não apresenta efeito quimiopreventivo quando administrada diariamente, na dose de 200 mg/100 g peso corpóreo, por 5 semanas, na etapa de pós-iniciação no modelo de carcinogênese de cólon induzida por DMH.

De forma semelhante, Deschner, 1990, também não observou atividade quimiopreventiva da TB, ainda que tenha observado quantidade significativa de AB nas fezes dos animais. Não houve redução na incidência, número e tamanho dos FCAs displásicos após a administração de 5% de TB na ração oferecida a camundongos, por 48 semanas, continuamente nas fases de iniciação e promoção da carcinogênese de cólon induzida por AOM. A quantidade de TB administrada equivaleu a aproximadamente a 500 mg/100 g de peso corpóreo.

Por outro lado, Heidor, 2007, observou menor número de FCAs com 4 ou mais criptas no grupo que recebeu TB, quando comparados ao grupo controle. Estes dados constatarem a atividade quimiopreventiva da TB, quando esta foi administrada a ratos continuamente por 8 semanas desde a iniciação do modelo de carcinogênese de cólon induzida por DMH, nas mesmas doses que o presente estudo. Conclui-se que a TB possui efeito quimiopreventivo na fase de iniciação, porém não na fase de pós-iniciação desse modelo.

Outro estudo do nosso grupo, demonstrou atividade quimiopreventiva por parte da TB quando administrada a ratos continuamente por 8 semanas, desde a fase de

iniciação do modelo do hepatócito resistente. A dose de TB foi a mesma utilizada no presente estudo (KUROIWA-TRZMIELINA, 2007).

Em ratas submetidas a modelo de carcinogênese de mama induzida por nitrosometiluréia (NMU), o grupo tratado com TB adicionada à ração, na dose de 300 mg/100 g de peso corpóreo, apresentou menor multiplicidade de nódulos, sugerindo um efeito quimioprotetor por parte da TB. Contudo, este efeito não foi observado com a administração de uma dose menor de TB, ou seja, 100 mg/100 g de peso corpóreo (BELOBRAJDIC, 2000).

A literatura também aponta um efeito promissor do AB, um metabólito da TB, na quimioprevenção do câncer de cólon. Esse fato foi confirmado por Kelloff (1994) que classificou o AB como agente quimiopreventivo supressor.

Avivi-Green, 2000, relatou atividade quimiopreventiva do AB, em modelo de carcinogênese de cólon induzida por DMH, por meio da redução do número de FCAs e de carcinomas. Nesse trabalho, foi administrada uma ração enriquecida com 15% de pectina cítrica (fibra solúvel que é fermentada e produz alta concentração de AB no cólon) ou instilação intracolônica de butirato de sódio, um análogo do AB, na dose de 50 mM/dia. Concluiu-se que o butirato, quando administrado em doses elevadas, obtido por meio da fermentação bacteriana de fibras ou por instilação retal, inibiu eventos precoces e tardios da carcinogênese de cólon induzida por DMH.

Em ratos submetidos ao modelo de carcinogênese de cólon induzida por AOM, o AB também apresentou atividade quimiopreventiva quando administrado na fase de iniciação da carcinogênese, por infusão no cólon distal, durante 4 semanas, na dose de 400 μ mol/mL/dia (1,0 mL; 5 vezes ao dia), mas não na dose de 80 μ mol/mL/dia

(0,5 mL; 2 vezes ao dia). Além disso, o efeito quimiopreventivo não foi observado na fase de pós-iniciação da carcinogênese de cólon (WONG, 2005).

Le Leu, 2007, também utilizou o modelo de carcinogênese de cólon induzido por AOM e observou que o efeito quimioprotetor de uma dieta rica em amido resistente, aconteceu em decorrência da fermentação ativa deste carboidrato no cólon e da conseqüente produção de butirato.

Wargovich, 1996, avaliou a ação quimipreventiva de 41 substâncias isoladamente e observou que o butirato de sódio reduziu o número de FCAs, mas não inibiu o desenvolvimento de carcinomas, quando administrado por 4 semanas, por via oral, misturado na ração, na dose 2,5 g/Kg, mas não na dose de 1,25 g/Kg, durante a etapa de iniciação, em ratos submetidos ao modelo de carcinogênese de colon induzida por AOM.

É importante observar que boa parte dos estudos que apresentaram efeito quimioprotetor por parte do AB e da TB, haviam iniciado a administração das substâncias no momento da injeção do carcinógeno, ou seja, na fase de iniciação.

Porém, no estudo em questão optou-se por administrar a TB no período de pós-iniciação da carcinogênese de cólon, tendo em vista que os resultados obtidos nesta fase da carcinogênese são mais relevantes na prática clínica.

Isso porque, as células do organismos podem ser agredidas e iniciadas a qualquer momento, porém, é na etapa de pós-iniciação/promoção da carcinogênese que ocorre o estímulo para expansão clonal dessas células lesadas. Caso contrário, sem o estímulo contínuo do agente promotor, as células iniciadas podem não evoluir para o câncer (SING, 1991; PITOT, 2001; FORMAN, 2004). Uma vez atuando na fase de pós-iniciação, por meio de mecanismos supressores da carcinogênese, a substância testada é considerada mais promissora (CARBONE, 2004).

Além disso, para que não haja nenhuma interferência da substância testada no metabolismo e excreção do carcinógeno, é importante que os mesmos sejam administrados em períodos distintos. Assim sendo, a substância deve ser ofertada preferencialmente na fase de pós-iniciação/promoção da carcinogênese (BIRD, 1995). Logo, no presente estudo, a fase em que a TB foi administrada pode ter influenciado seu resultado.

Algumas variáveis parecem não ter influenciado o resultado deste estudo. Por exemplo: a TB parece não ter interferido no metabolismo do carcinógeno já que a mesma foi dada após a administração da DMH. Tão pouco observou-se influência do consumo de ração dos animais tratados, ou do ganho de peso dos mesmos, já que não houve diferença estatística entre os grupos nestes dois parâmetros avaliados.

Mesmo após o resultado deste trabalho, não se pode descartar o potencial da TB em atuar como agente quimiopreventivo, pois, avaliou-se esta substância somente em uma fase inicial da carcinogênese e por um período de tempo muito curto. Talvez, administrando-se a TB por mais tempo, avançando no processo de carcinogênese, o resultado, a longo prazo, seja diferente.

Neste sentido, Lasko em 1995, relatou que o epitélio colônico tratado com carcinógenos encontra-se num estado dinâmico, exibindo flutuações na cinética das células e na população de FCAs. Em um estudo de quimioprevenção no cólon, este autor demonstrou que as respostas iniciais (4 semanas de tratamento) a mudanças dietéticas foram bem diferentes das respostas tardias (12 semanas de tratamento) à esta mesma dieta. Fato que reforça a idéia de que a dieta pode agir de forma diferente dependendo do período em que é ofertada.

De acordo com esta observação, Corpet em 2002, relatou potencial efeito quimiopreventivo de determinadas substâncias ao reduzir o carcinoma de cólon (fase tardia); porém, sem alterar os FCAs (fase inicial).

Apesar da TB não ter diminuído o número, nem a multiplicidade dos FCAs neste modelo, talvez ela possa agir posteriormente em fases mais tardias, diminuindo o número de carcinomas. Isto ocorreu, por exemplo, com o celecoxibe. Em ratos, o celecoxibe, um anti-inflamatório não esteroideal inibidor de cox-2, já foi classificado como um potente quimioprotetor na progressão do câncer de cólon, ao reduzir a incidência de carcinomas. Porém, esta substância não atuou diminuindo os FCAs em modelos de iniciação e pós-iniciação/promoção da carcinogênese de cólon (CORPET, 2002).

Assumindo-se que o AB é um agente supressor e já foi descrito como regulador de mecanismos de apoptose e acetilação de histonas, acredita-se que, administrando-se a TB continuamente por mais tempo, abrangendo fases mais tardias, talvez ela possa atuar por meio de mecanismos supressores da carcinogênese e evitar o aparecimento do câncer.

Isso pôde ser observado no estudo de Medina, 1998, em que o butirato de sódio foi administrado a ratos, por infusão intracecal contínua (1,5 mL/h), por 4 semanas, na fase de iniciação da carcinogênese de cólon induzida por DMH. Os ratos foram eutanasiados ao final da 11ª semana, quando observou-se redução da incidência de carcinomas. O autor sugeriu que o tratamento com AB possa ter relação com a inibição da transformação maligna, atuando em fases mais tardias da carcinogênese de cólon.

Em contrapartida, Freeman em 1986, demonstrou que o butirato de sódio não apresentou atividade quimiopreventiva, quando administrado na água de beber, nas

doses de 1 ou 2%, em ratos submetidos ao modelo de carcinogênese de cólon induzida por DMH. Entretanto, avaliou-se apenas a incidência de carcinomas e a morfologia da mucosa, pois, nessa época, os FCAs ainda não haviam sido descritos por Bird (1987).

Analizando-se todos os trabalhos citados até o momento, observa-se que o AB parece exercer ação quimiopreventiva quando sua concentração no lúmen do cólon é bem elevada. Isto foi conseguido por meio de infusão direta no cólon ou ceco, instilação intrarectal, e fornecimento de ração com teor elevado de butirato ou fibras fermentáveis pelas bactérias colônicas (gerando em torno 80% da dose máxima tolerada de AB).

Wong em 2005, relatou que a quantidade de butirato no lúmen do cólon distal eficaz para suprimir a formação dos FCAs é muito maior do que a quantidade necessária para reverter atrofia da mucosa, diminuir a inflamação da mucosa, cicatrizar feridas anastomóticas e manter o trofismo intestinal; para tal, a administração semanal de duas doses de 80 mM foi suficiente.

Para ser considerado um bom agente quimioprotetor a substância deve, dentre outros aspectos, não ser tóxica e apresentar uma forma de administração simples e eficaz, que possa ser usada por um prazo indeterminado. Neste caso, a administração por via oral é a que melhor atende estas especificações (SPORN, 2002; DE FLORA, 2005).

Contudo, o grande desafio é saber a quantidade exata de AB que chega ao lúmen colônico, quanto deste é absorvido, quanto alcança a corrente sanguínea e consegue manter níveis plasmáticos adequados após a administração por via oral. A literatura ainda necessita de um consenso a respeito da quantidade de AB que

chega efetivamente ao lúmen do cólon distal, por meio da administração oral de butirato e seus análogos, como a TB, por exemplo (WONG, 2005).

Sendo assim, optou-se neste trabalho por testar o potencial quimiopreventivo da TB, ao invés do AB, já que, nos estudos onde o AB foi administrado diretamente por via oral, seu efeito quimiopreventivo não foi tão significativo (FREEMAN, 1986; CADERNI, 1998; 2001).

Este fato pode ter ocorrido em função da meia-vida sanguínea curta do AB, fato que limita sua recomendação como bom quimioprotetor (AUGERON, 1984; CLARKE, 2001). Ao contrário, a TB possui uma meia-vida plasmática maior, em torno de 40 minutos, o que parece ser suficiente para que exerça atividade quimiopreventiva (NEWMARK, 1995). Inclusive, estudos sugerem que a TB pode ser testada como agente quimiopreventivo já que é bem tolerada por via oral, atingindo e mantendo níveis sanguíneos eficientes (CONLEY, 1998; EDELMAN, 2003).

Egorin estudou em 1999, a farmacocinética da TB quando administrada por via oral a ratas e camundongos fêmeas. O autor relatou que em camundongos, todas as doses de TB ofertadas (3,1, 5,2, 7,8 e 10,3 g/Kg de peso corpóreo) resultaram em aumento da concentração plasmática de butirato após 5 minutos de tratamento, porém as maiores concentrações foram observadas entre 15 e 60 minutos após o tratamento com TB, dependendo da dose utilizada. Além disso, a concentração plasmática de butirato foi proporcional a dose de TB ofertada. Na dose de 3,1 g/kg de peso corpóreo, o pico máximo de butirato plasmático ocorreu após 45 minutos, atingindo a concentração plasmática de 0,5 mM. Contudo, 10% dos animais que receberam a dose de 10,3 g/kg de peso corpóreo morreram. Em ratas, todas as doses de TB administradas por via oral (3,6; 5,2 e 10,3 g/Kg de peso corpóreo) foram capazes de ocasionar níveis plasmáticos de butirato superiores a 0,5mM. A

dose de 10,3 g/Kg de peso corpóreo atingiu o pico máximo aos 75 minutos, elevando a concentração plasmática de butirato a 3,07 mM, enquanto as doses de 5,2 e 3,6 g/Kg de peso corpóreo atingiram seu pico máximo aos 60 minutos, elevando a concentração plasmática de butirato a 0,73 e 0,72 mM respectivamente. Demonstrou-se ainda que a TB não apresentou toxicidade quando administrada em dose inferior a 10,3 g/Kg de peso corpóreo (1,03 g/100 g). Logo, sugeriu-se que esta seria a dose máxima tolerada por via oral.

Em outro estudo recente, observou-se que a administração oral de TB na dose de 2 g/Kg de peso corpóreo, ou seja, a mesma dose administrada no presente estudo, resultou em aumento da concentração plasmática de TB e AB, que foi mantida por 6 horas (SU, 2006).

No presente trabalho utilizou-se TB na dose de 200 mg/100 g de peso corpóreo, já que esta dose parece ser suficiente para manter os níveis plasmáticos de butirato em torno de 0,5 mM, ou seja, nível necessário para atividade biológica (WONG, 2005). Contudo, a dose empregada não foi suficiente para proteger a mucosa colônica contra os efeitos da DMH na fase de pós-iniciação da carcinogênese de cólon.

No entanto, a dose de TB utilizada no presente estudo (200 mg/100g de peso corpóreo) já havia sido utilizada em trabalhos anteriores do nosso grupo, quando foi observada atividade quimiopreventiva por parte da TB quando administrada na fase de iniciação da carcinogênese de cólon e fígado (HEIDOR, 2007; KUROIWA-TRZMIELINA, 2007).

Não há relatos na literatura de efeitos tóxicos com a dose utilizada; tão pouco foi observado qualquer problema nos animais estudados (CONLEY, 1998; EGORIN, 1999; EDELMAN, 2003).

Acredita-se que na fase de pós-iniciação/promoção da carcinogênese de colon, a dose de TB (200 mg/100g de peso corpóreo) administrada aos ratos, tenha sido insuficiente para atuar como quimiopreventiva, visto que representou somente 20% da dose máxima tolerada (1,03 g/100g de peso corpóreo). Talvez, administrando-se doses mais elevadas, o efeito quimiopreventivo seja mais evidente já que essa fase da carcinogênese é um pouco mais avançada do que a fase de iniciação.

Esse fato foi ressaltado, por exemplo, no estudo de Belobrajdic (2000) que observou atividade quimiopreventiva com a dose de 300 mg/100 g de peso corpóreo, mas não com a dose de 100 mg/100 g de peso corpóreo; igualmente, no estudo de Wargovich (1996) que observou atividade quimiopreventiva com a dose de 2,5 g/Kg de ração, mas não com a dose de 1,25 g/Kg e também no estudo de Wong (2005) que apresentou atividade quimiopreventiva com a infusão de AB na dose de 400 µmol/mL/dia (1,0 mL; 5 vezes ao dia), mas não na dose de 80 µmol/mL/dia (0,5 mL; 2 vezes ao dia).

Cabe lembrar que a escolha do agente carcinogênico, bem como sua forma de administração, dose e tempo de exposição, também podem influenciar a resposta quimiopreventiva da substância testada (BIRD, 1995; BANERJEE, 1998).

No presente estudo, a opção pelo uso da DMH como carcinógeno ocorreu em virtude de sua eficiência para formação de lesões pré-neoplásicas, comprovada por diversos estudos de quimioprevenção que utilizaram este carcinógeno (WARGOVICH, 2000; RODRIGUES, 2002; LIMA, 2005; AGNER, 2005; DIAS, 2006). Isso remeteu a um forte embasamento científico que permitiu comparação entre os resultados obtidos nesse estudo e os encontrados na literatura. Além disto, nosso grupo já apresentava experiência bem sucedida com a utilização de DMH em trabalhos anteriores (VIEIRA, 2007; HEIDOR, 2007).

A administração de apenas uma dose de DMH (entre 10 e 40 mg/Kg de peso corpóreo do animal), já é suficiente para formação de FCAs e este efeito é dose e tempo dependente. Existe uma correlação negativa entre a dose e o tempo de latência, ou seja, quanto menor a dose administrada maior é o período de latência. (WEISBURGUER, 1971; WARD, 1974; BANERJEE, 1998). Baseando-se nessa constatação, utilizou-se uma dose total elevada, 160 mg/Kg de peso corpóreo (4 doses de 40mg/Kg de peso corpóreo), visando-se acelerar o processo de carcinogênese e diminuir o tempo de latência para formação dos FCAs.

O modelo de carcinogênese utilizado foi adequado e satisfatório já que os FCAs foram encontrados somente nos animais que receberam DMH e o número destes foi semelhante ao número de FCAs citados por outros autores que administraram este mesmo carcinógeno (Inamine, 2005; Dias, 2006; Heidor, 2007).

No presente estudo, escolhemos utilizar o FCA clássico como biomarcador por ser de fácil detecção, baixo custo e estar embasado na literatura atual, permitindo com isso, avaliar o potencial quimioprotetor da TB. Assim, foi possível constatar a incidência e a multiplicidade das lesões pré-neoplásicas nos grupos tratados com MD (controle) ou TB, e comparar o efeito do tratamento entre os grupos.

Embora existam outros biomarcadores atualmente descritos na literatura e denominados FCAs displásicos, ainda observa-se a utilização dos FCAs clássicos em estudos de quimioprevenção. Isso ocorre principalmente porque a quantidade dos FCAs displásicos parece ser proporcional à de FCAs clássicos, fato que reforça a idéia da utilização dos FCAs clássicos como biomarcadores, já que são mais simples de serem visualizados e oferecem igual eficácia para avaliar o efeito quimiopreventivo de uma substância na carcinogênese de cólon (PLATE, 2006).

Exemplos de outros biomarcadores da carcinogênese de cólon são: os focos depletados de mucina (CADERNI, 2003; FEMIA, 2007), os focos com acúmulo de β -catenina (YAMADA, 2000 e 2003) e os FCAs planos, (PAULSEN, 2005).

Muitos estudos *in vitro* apontam algum efeito anti-carcinogênico do AB. Entretanto, até o momento, pouco ainda se sabe sobre as vias pelas quais estas substâncias atuam *in vivo*, fato que demanda a necessidade de mais estudos.

Eventos epigenéticos que resultam em remodelação da cromatina, por meio da acetilação e desacetilação de histonas, parecem estar envolvidos diretamente na patogênese do câncer (HINNEBUSH, 2002; WALDECKER, 2008).

A modulação do padrão de acetilação das histonas é um dos mecanismos mais importantes da regulação gênica. Nesse processo, o radical acetil é transferido para as terminações N-terminais das histonas pela enzima HAC e retirados pela enzima HDAC. A adição do radical acetil rompe a interação iônica das histonas com o DNA deixando a cromatina mais relaxada, permitindo que fatores de transcrição se liguem à determinadas seqüências do DNA. Em consequência, alguns genes são mais expressos e outros menos expressos. Desse modo, os inibidores de HDAC podem induzir diferenciação celular e apoptose em lesões pré-neoplásicas e células tumorais (HINNEBUSH, 2002; DAVIE, 2003; ROCCHI, 2005; WALDECKER, 2008).

Embora o mecanismo exato ainda não tenha sido descrito, o AB tem sido considerado como um inibidor da HDAC, resultando em hiperacetilação de H3 e H4. A inibição da HDAC pelo butiratoe pela TB tem sido diretamente relacionada ao bloqueio da carcinogênese de cólon (HINNEBUSCH, 2002; ROCCHI, 2005; WALDECKER, 2008; HAMER, 2008).

Acredita-se que duas moléculas de AB possam ocupar o sítio hidrofóbico da HDAC e assim inativá-la; esse bloqueio pode ocorrer também por meio de mecanismos de inibição não competitiva (DAVIE, 2003).

No presente estudo, avaliou-se a expressão das histonas H3 acetilada na lisina 9 e H4 acetilada na lisina 16, porém não foi observada diferença estatística entre os grupos não tratado e tratados com TB ou MD. Isso sugere que no modelo proposto, a TB não foi capaz acetilar as histonas H3 e H4, inibir HDAC ou estimular a HAT.

De forma oposta, *in vivo*, o butirato demonstrou seu potencial inibidor de HDAC em ratos alimentados com uma dieta rica em fibras (que produzia um nível alto de butirato no lúmen intestinal). Esse efeito foi associado com a hiperacetilação de histonas e a inibição da proliferação celular no cólon (BOFFA, 1992).

Em um estudo de fase I, dois pacientes oncológicos que receberam TB não apresentaram variação no padrão de acetilação de histonas. O autor sugeriu que a quantidade de butirato (65 e 61 μ M) detectada no plasma destes pacientes não foi suficiente para produzir o resultado desejado (EDELMAN, 2003).

O efeito do butirato na indução da diferenciação celular e apoptose em células neoplásicas do cólon parece depender de sua capacidade de inibir a HDAC e hiperacetilar as histonas (HINNEBUSH, 2002).

Rocchi, 2005, demonstrou que o butirato e a TB, inibidores da classe I de HDAC, reduziram a proliferação celular e induziram diferenciação em células de neuroblastoma humano.

Um dos eventos mais precoces na carcinogênese de cólon envolve a alteração do padrão proliferativo das células epiteliais nas criptas colônicas. A perda do controle entre: proliferação celular, diferenciação celular e apoptose; pode favorecer

o desenvolvimento do câncer de cólon (KLURFELD, 1992; BUTLER, 1999; LUPTON, 2004).

Evidências recentes sugerem que o AB induz apoptose por meio de uma via mediada pela hiperacetilação de histonas, que resulta na ativação da caspase-3 (MEDINA, 1997).

A literatura necessita de melhor entendimento das modificações que ocorrem nas células do cólon. A adequada mensuração de parâmetros relacionados a proliferação, diferenciação e apoptose poderia ajudar a orientar estudos de intervenção nutricional que tentam bloquear a carcinogênese (BOFFA, 1992).

Resultados de vários trabalhos indicam que a inibição da proliferação celular, a indução da diferenciação celular e da apoptose são propostas como mecanismos de ação do AB e da TB na quimioprevenção do câncer de cólon (GASCHOTT, 2001; HINNEBUSCH, 2002; LUPTON, 2004).

A inibição da apoptose pode estimular o desenvolvimento do câncer por facilitar o acúmulo de células, que sofreram danos em seu DNA por agentes carcinogênicos, nas criptas da mucosa colônica. Portanto, em um estudo de quimioprevenção é importante também avaliar, se possível, entre outros aspectos, o efeito da substância testada nas vias envolvidas com a apoptose (HAZA 2000).

Os efeitos do AB nas vias envolvidas com a carcinogênese têm sido pronunciados em estudos *in vitro*. Nesse contexto, o AB já foi descrito como potente inibidor da apoptose em diversos ensaios *in vitro* em diferentes linhagens de células tumorais (YAN, 2003; WILLIAMS, 2003; KUEFER, 2004).

Ainda nesse sentido, a TB foi capaz de diminuir a proliferação celular e estimular a apoptose em linhagens de células de câncer de próstata (MAIER, 2000) e nas células MCF-7 de câncer de mama (HEERDT, 1999).

Em células de câncer de cólon da linhagem LS 174T, a TB induziu simultaneamente diferenciação celular e apoptose, quando sua concentração no meio estava entre 0,6 e 1 mM. Esse efeito mostrou-se dose e tempo dependente (SCHRÖDER, 2002).

O efeito pró-apoptótico do AB já foi verificado também *in vivo*, em modelo de carcinogênese de cólon induzida por DMH. Avivi-Green em 2000, observou que o índice apoptótico no cólon distal de ratos alimentados com uma dieta enriquecida com 15% de pectina cítrica, fibra que produz alta concentração de AB no cólon, foi maior do que no cólon distal dos animais recebendo uma dieta padrão.

Da mesma forma, em outro estudo, dessa vez utilizando modelo de carcinogênese de cólon induzido por AOM, observou-se aumento da apoptose e diminuição da proliferação celular no cólon distal dos animais tratados com amido resistente. O autor associou este efeito ao elevado teor de AB no lúmen, que foi produzido por meio da fermentação do amido resistente pelas bactérias colônicas (LE LEU, 2007).

Já foi demonstrado que a expressão de genes anti e pró-apoptóticos da família Bcl-2 está intimamente associada com a sensibilidade das células em sofrer apoptose. A concentração celular das proteínas codificadas pelos genes anti-apoptóticos (Bcl-2 e Bcl-X_L) e pró-apoptóticos (Bax e Bak) pode determinar se a célula vai proliferar ou entrar em apoptose (HUPPERTZ, 1999; SHANMUGATHASAN, 2000; AVIVI-GREEN, 2002; RUPNARAIM 2004).

Fica claro, portanto, que as caspases e as proteínas da família Bcl-2 são mediadores importantes nas etapas iniciais da apoptose (AVIVI-GREEN, 2000; SCHRÖDER, 2002).

Em estudos de quimioprevenção, a redução citoplasmática de Bcl-2 e Bcl-x_L, proteínas anti-apoptóticas, e/ou aumento de Bax e BAK, proteínas pró-apoptóticas, sugerem indução da apoptose. Esse mecanismo ocorre por meio do aumento da liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol. A seguir, ele se associa com Apaf-1 e pró-caspase-9 para formar o complexo apoptossoma e, conseqüentemente, ativar a caspase-9 (iniciadora). Por fim, a caspase-9 cliva as caspases efetoras subseqüentes, dentre elas, a caspase-3 que vai induzir apoptose (HUPPERTZ, 1999; SHANMUGATHASAN, 2000; AVIVI-GREEN, 2002; RUPNARAIM 2004).

Estudos sugerem que as proteínas da família Bcl-2 desempenham um importante papel na apoptose induzida pelo AB (HAGUE, 1997).

Portanto, no presente trabalho optou-se por avaliar a influência da TB na modulação da apoptose por meio da expressão de BAK (pró-apoptótica) e Bcl-x_L (anti-apoptótica) em nível de proteína.

No cólon médio-proximal não observou-se diferença estatística entre a expressão de BAK ou Bcl-x_L nos animais tratados com TB ou MD (controle). Entretanto, houve redução da expressão de Bcl-x_L no cólon médio-distal, porém sem alterar a expressão de BAK.

Nota-se que houve uma diferença na expressão de Bcl-x_L entre o cólon proximal e o distal. Em parte, isso pode ser explicado pelas diferenças que existem entre eles, não só embriológicas e fisiológicas, mas também em nível de biologia molecular. Essas diferenças fazem com que muitas vezes se comportem como órgãos distintos (GERVAZ, 2004).

O cólon distal é a região do cólon que tem mais relevância, já que em modelos experimentais utilizando carcinógenos químicos, observa-se maior incidência de neoplasias nesta área. Ao mesmo tempo, a variação no tipo e quantidade de fibras

parece exercer maior influência no cólon distal, quando comparado ao proximal (WONG, 2003).

De certa forma, os resultados obtidos neste trabalho concordam com os trabalhos de Ruemmele (1999 e 2003) onde observou-se redução da expressão de Bcl-X_L em culturas de células Caco-2 tratadas com AB.

Do mesmo modo, Litvak (1998) e Mandal (2001) mostraram *in vitro*, que o butirato de sódio foi capaz de induzir apoptose ao reduzir a expressão de Bcl-2 e Bcl-X_L, enquanto aumentava a expressão de Bax e BAK.

Chirakkal em 2006, avaliou a expressão de Bcl-X_L, Bax e BAK em células HCT 116, Caco 2 e HT 29 e observou aumento na expressão de BAK nos três tipos celulares; porém, não houve alteração na expressão de Bcl-X_L, Bax.

Em outro estudo, o autor avaliou a expressão de Bcl-2 e demonstrou redução desta proteína, tanto no grupo tratado com dieta enriquecida com 15% de pectina cítrica (fibra que aumenta a quantidade de AB no cólon), quanto no tratado com instilação de butirato de sódio, quando comparados aos animais recebendo dieta padrão (AVIVI-GREEN, 2000). A indução de apoptose causada pelo AB, parece estar associada com a via apoptótica regulada pela família Bcl-2. Isso porque, no mesmo estudo, observou-se maior índice apoptótico e menor expressão de Bcl-2 no grupo tratado com AB (por meio da administração de ração suplementada com fibra).

Além disso, o mesmo autor analisou a expressão de caspase-1, por northern e western blot, onde observou-se maior expressão de mRNA e maior concentração de proteína nos animais tratados com instilação de 50 mM de butirato de sódio (AVIVI-GREEN, 2000).

Clarke (2001) testou a TB em células de câncer de cólon da linhagem HT-29 e observou que a TB induziu apoptose por meio da via da caspase-3, uma caspase efetora, que pode ser ativada pela caspase-9. Isso sugere que a indução da apoptose pelo AB e TB esteja envolvida com a ativação da caspase-3, por estímulo da via mitocondrial, em consequência da expressão dos genes da família Bcl-2 (HUPPERTZ, 1999; SHANMUGATHASAN, 2000; AVIVI-GREEN, 2002; RUPNARAIM 2004).

Por outro lado, Schröder notou em 2002, que as caspases 3 e 8 desempenham papel importante na apoptose induzida pela TB em células de câncer de cólon da linhagem LS 174T, na concentração de 0,6 mM, via receptores de morte celular. Contudo, o estudo sugeriu que a TB parece não participar da via mitocondrial de ativação da apoptose das células LS 174T, tendo em vista que não houve inibição da apoptose quando as células foram incubadas conjuntamente com inibidores da caspase 9 e 0,6 mM de TB. Assim, sugeriu-se que a TB possa não estar envolvida com a liberação do citocromo c e recrutamento de APAF-1 com consequente ativação de caspase-9 e caspase-3.

Dessa forma, os estudos *in vitro* já apontaram que o AB induz a apoptose em parte pela ativação da caspase-3 mediada pelo citocromo-c, e em parte pela autofagia dos inibidores de morte celular (HEERDT, 1997; BAUER-MARINOVIC, 2006).

O butirato parece apresentar um papel protetor na prevenção e na evolução do câncer. Contudo, o efeito na apoptose e proliferação celular parece diferir entre os diferentes tipos celulares, inclusive entre células neoplásicas e células não tumorais (HAMER, 2008).

Observou-se no presente estudo que apesar da TB não ter apresentado atividade quimiopreventiva, já que não inibiu o surgimento de FCAs, ela diminuiu a expressão de Bcl-x_L no cólon médio-distal, sem alterar a expressão de BAK, reforçando a idéia de que o AB atue em vias anti-apoptóticas nesta região do cólon.

Estes resultados são semelhantes aos relatados por Caderni (1998, 2001). Em uma dieta com elevado teor lipídico, testou-se a atividade quimiopreventiva do butirato de sódio, um análogo do AB, adicionando-o a “pellets” de liberação lenta, na dose de 150mg/dia, por 10 ou 33 semanas, em ratos F344 submetidos ao modelo de carcinogênese de cólon induzida por AOM. O butirato de sódio não reduziu o número nem a multiplicidade dos FCAs; tão pouco, alterou a incidência de carcinomas, porém aumentou a taxa de apoptose neste modelo experimental.

Em contraste aos achados relativamente consistentes que indicam os benefícios do AB e da TB em células neoplásicas, estudos em células não tumorais são bem diversificados e nem sempre apontam na mesma direção que a carcinogênese. Os efeitos aparentemente contraditórios do AB são chamados de “paradoxo do butirato” (WONG, 2006; HAMER, 2008).

Existem algumas hipóteses que justificam os resultados conflitantes e polêmicos do AB e da TB. Em primeiro lugar, os trabalhos utilizam diferentes linhagens de células tumorais, que muitas vezes se encontram em um estado de ativação distinto. Em segundo lugar, os autores incubam no meio de cultura concentrações de AB e TB diferentes; igualmente, o tempo de exposição às substâncias é desigual. Por fim, a habilidade de cada tipo de célula em β -oxidar o butirato pode interferir na forma como as células responderão à ele, bem como, influenciar a taxa de remoção de AB do citoplasma e por esta razão, intervir na disponibilidade de butirato necessária para exercer sua atividade (HAMER, 2008).

No presente estudo, além do fato da TB ter sido testada *in vivo*, ela foi administrada em uma fase pré-neoplásica; portanto, as células podem ter se comportado de forma diferente, quando comparada às células de linhagens tumorais utilizadas em estudos *in vitro*.

Podemos concluir que os efeitos benéficos da TB e do AB na prevenção do câncer de cólon dependem principalmente do modelo utilizado, da fase de carcinogênese em que esse modelo foi testado, da dose de TB/AB administrada e do tempo de suplementação destas substâncias.

Embora estudos *in vitro* destaquem o potencial efeito quimiopreventivo, modulador de histonas e indutor de apoptose por parte da TB, percebemos ainda a necessidade de mais esclarecimentos, principalmente em ensaios *in vivo*, buscando vislumbrar em quais modelos e fases da carcinogênese ela vai atuar, bem como elucidar seus possíveis modos de ação.

6- CONCLUSÕES:

- A TB não apresentou atividade quimiopreventiva quando administrada continuamente por 5 semanas a ratos Wistar na etapa de pós-iniciação da carcinogênese de cólon induzida por DMH ($p > 0,05$).
- A administração de TB não modificou a acetilação das histonas H3K9 e H4K16 no cólon dos animais tratados ($p > 0,05$).
- O tratamento com TB não alterou a expressão da proteína pró-apoptótica BAK em nenhuma das duas frações do cólon estudadas ($p > 0,05$). Entretanto, reduziu a expressão de Bcl-x_L na mucosa do cólon médio-distal ($p < 0,05$), mas não do médio-proximal ($p > 0,05$). Isso sugere envolvimento desta substância na via regulação da apoptose mediada pelas proteínas da família Bcl-2.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AGNER, A. R.; BAZO, A. P.; RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D.M.F. DNA damage and aberrant crypt foci as putative biomarkers to evaluate the chemopreventive effect of annatto (*Bixa orellana* L.) in rat colon carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 582, p. 146–154, 2005.
- ALBERTS, D. S.; GARCIA, D. J. An overview of clinical cancer chemoprevention studies with emphasis on positive phase III studies. **J. Nutr.**, v. 125, p. 692s-7s, 1995.
- AUGERON, C.; LABOISSE, C. Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate, **Cancer Res.**, v. 44, p. 3961-3969, 1984.
- AVIVI-GREEN, C.; POLAK-CHARCON, S.; MADAR, Z.; SCHWARTZ, B. Apoptosis cascade proteins are regulated in vivo by high intracolonic butyrate concentration: correlation with colon cancer inhibition. **Oncol. Res.**, v.12, n.2, p.83-95, 2000.
- AVIVI-GREEN, C.; POLAK-CHARCON, S.; MADAR, Z.; SCHWARTZ, B. Different molecular events account for butyrate-induced apoptosis in two human colon cancer cell lines. **J. Nut.**, v.132, p.1812-1818, 2002.
- BACH, S.P.; RENEHAN, A.G.; POTTEN, C.S. Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. **Carcinogenesis**, v. 21, p.469–476, 2000.
- BANERJEE, A.; QUIRKE, P. Experimental models of colorectal. **Dis. Colon Rectum**, Philadelphia, v. 41, p. 490-505, 1998.
- BANNASCH, P. Pre-neoplastic lesions as end points in carcinogenesis testing. I. Hepatic Preneoplasia. **Carcinogenesis**, v.7, p.689-95, 1986.
- BASSON, M.D.; TUROWSKI, G.A.; RASHID, Z.; HONG, F.; MADRI, J.A. Regulation of human colonic cell line proliferation and phenotype by sodium butyrate. **Dig. Dis. Sci.**, v. 41, p. 1989–1993, 1996.
- BAUER-MARINOVIC, M.; FLORIAN, S.; MULLER-SCHMEHL, K.; GLATT, H.; JACOBASCH, G. Dietary resistant starch type 3 prevents tumor induction by 1,2-dimethylhydrazine and alters proliferation, apoptosis and dedifferentiation in rat colon. **Carcinogenesis**, v. 27, p. 1849–59, 2006.
- BAYLIN, S.B.; OHM, J.E. Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nat. Rev. Ca.**, v. 6, p. 107-116, 2006.
- BAZO A. P., MARCHESAN M. A., SFORCIN J. M., VIANA J. L., RIBEIRO L. R., SALVADORI D. M. F., Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v.22, p.183-194, 2002.

- BELOBRAJDIC, D.P.; MCINTOSH, G.H. Dietary butyrate inhibits NMU-induced mammary cancer in rats. **Nutr. Cancer.**, v.36, n.2, p.217-23, 2000.
- BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Mol. Aspects Med.**, v. 21, p. 167-223, 2000.
- BINGHAM S., RIBOLI E. Diet And Cancer: The European Prospective Investigation Into Cancer And Nutrition. **Nat Rev Ca**, v. 4, 2004.
- BINGHAM S.A., DAY N.E., LUBEN R. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. **Lancet** v.361, p. 1496 – 501, 2003.
- 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.
- 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. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Cancer Lett.**, v. 51, p. 55-71, 1995.
- BIRD, R.P. Observation and quantification of aberrants crypts in the murine colon treated with a colon carcinogenesis: preliminary findings. **Cancer Lett.**, v. 37, p.147-51, 1987.
- BLAKEY D. H.; DUNCAN A. M. V.; WARGOVICH M. J.; GOLDBERG M.; BRUCE T. W. R.; HEDDLE J. A. Detection of Nuclear Anomalies in the Colonic Epithelium of the Mouse. **Cancer Res.** v. 45, p. 242-249, 1985.
- BOFFA, L.C.; LUPTON, J.R.; MARIANI, M.; CEPPI, M.; NEWMARK, H.; SCALMATI, A.; LIPKIN, M. Modulation of colonic epithelial cell proliferation, histone acetylation, and luminal short chain fatty acids by variation of dietary fiber (wheat bran) in rats, **Cancer Res.**, v. 52, p. 5906-5912, 1992.
- BOONE, C. W., KELLLOFF, G. J., MALONE, W. E. Identification of candidate cancer chemoipreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review. **Cancer Res.**, v. 50, p. 2-9, 1990.
- BUDIHARDJO, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 15, p. 269-290, 1999.
- BUTLER, L. M.; HEWETT, P. J; FITRIDGE, R. A.; COWLED, P. A. Deregulation of apoptosis in colorectal carcinoma: theoretical and therapeutic implications. **Aust. N. Z. J. Surg.** v. 69(2), p. 88-94, 1999.

- BUTRUM RR, CLIFFORD CK, LANZA E. NCI dietary guidelines: rationale. **Am J Clin Nutr** v. 48, p. 888-95, 1988.
- BYKOREZ, A.I.; IVASHCHENKO, Y.D. Gastrointestinal stem cells and their role in carcinogenesis. **Int. Rev. Cytol.**, v. 90, p. 309–373, 1984.
- CADERNI, G., LUCERI, C., DE FILIPPO, C., SALVADORI, M., GIANNINI, A., TESSITORE, L., DOLARA, P. Slow-release pellets of sodium butyrate do not modify azoxymethane (AOM)-induced intestinal carcinogenesis in F344 rats. **Carcinogenesis** v. 22, p. 525–527, 2001.
- CADERNI, G., LUCERI, C., LANCIONI, L., TESSITORE, L., DOLARA, P. Slow-release pellets of sodium butyrate increase apoptosis in the colon of rats treated with azoxymethane, without affecting aberrant crypt foci and colonic proliferation. **Nutr. Cancer** v. 30, p. 175–181, 1998.
- 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, N.10, p. 2388-92, 2003.
- CARBONE, M.; KLEIN, G.; GRUBER, J.; WONG, M. Modern criteria to establish human cancer etiology. **Cancer Res.**, v.64, p.5518–5524, 2004.
- CHAN, P. C.; COHEN, L. A.; NARISAWA, T.; WEISBURGER J. H. Early Effects of a Single Intrarectal Dose of 1,2-Dimethylhydrazine in Mice. **Cancer Res.**, v. 36, p. 13-17, 1976.
- 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, N. 4, p. 721-730, 1997.
- CHEN, C.; KONG, A.N. Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. **Trends Pharmacol Sci.**, v.26, n.6, p.318-326, 2005.
- CHEN, Y.X.; FANG, J.Y.; ZHU, H.Y.; LU, R.; CHENG, Z.H.; QIU, D.K. Histone acetylation regulates p21^{WAF1} expression in human colon cancer cell lines. **World J. Gastroenterol.**, v.10, n.18, p.2643-2646, 2004.
- CHEN, Z.-X., BREITMAN, T. R. Tributyrin: a prodrug of butyric acid for potential clinical application in differentiation therapy. **Cancer Res.** V. 54, p. 3494–3499, 1994.
- CHENG, L.; LAI, M. D. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. **World J Gastroenterol.** v. 9(12), p. 2642-9, 2003.

- CHIRAKKAL, H.; LEECH, S.H.; BROOKES, K.E.; PRAIS, A.L.; WABY, J.S.; CORFE, B.M. Upregulation of BAK by butyrate in the colon is associated with increased Sp3 binding. **Oncogene**, v. 25, p. 7192–200, 2006.
- CLARKE, K.O.; FEINMAN, R.; HARRISON, L.E. Tributyrin, an oral butyrate analogue, induces apoptosis through the activation of caspase-3. **Cancer Lett.**, v. 28, n. 171(1), p. 57-65, 2001.
- CLAUSEN M. R., BONNEN H., MORTENSEN P. B. Colonic fermentation of dietary fibre to short chain fatty acids in patients with adenomatous polyps and colonic cancer. **Gut** v. 32, p. 923-928, 1991.
- COLUMBANO, A. Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. **J. Cell. Biochem.**, v.58, p.181-90, 1995.
- CONDORELLI, F.; GNEMMI, I.; VALLARIO, A.; ENAZZANI, A.A.; CANONICO, P.L. Inhibitors of histone deacetylase (HDAC) restore the p53 pathway in neuroblastoma cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. 657–668, 2008.
- CONLEY B. A., EGORIN M. J., TAIT N., ROSEN D. M., SAUSVILLE E. A., DOVER G., FRAM R. J., VAN ECHO D. A. Phase I Study of the Orally Administered Butyrate Prodrug, Tributyrin, in Patients with Solid Tumors. **Clinical Cancer Research** v. 4, p. 629-634, 1998.
- 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.
- CORPET, D. E.; TACHÉ, S. Most Effective Colon Cancer Chemopreventive Agents in Rats: A Systematic Review of Aberrant Crypt Foci and Tumor Data, Ranked by Potency. **Nutrition and Cancer**, v. 43, n. 1, p. 1–21, 2002.
- CROWELL, P. L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **J. Nutr.**, v.129, p.775S-78S, 1999.
- CUMMINGS, J.H. Short chain fatty acids in human colon. **Gut**, v.22, p.763-779, 1981.
- CUMMINGS, J.H.; BINGHAM, S.A. Diet and the prevention of cancer. **BMJ**, v. 317, p. 1636–40, 1998.
- CUMMINGS, J.H.; POMARE, E.W.; BRANCH, W.J.; NAYLOR, C.P.E.; MACFARLANE, G.T. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. **Gut**, v.20, p.1221–1227, 1987.

- DASHWOOD, R.; MYZAK, M.C.; HO, E. Dietary HDAC inhibitors: time to rethink weak ligands in cancer chemoprevention? **Carcinogenesis**, v. 27 n. 2 p.344–349, 2006.
- DASHWOOD, R.H.; HO E. Dietary histone deacetylase inhibitors: From cells to mice to man. **Seminars in Cancer Biology**, v. 17, n. 5, p. 363-369, 2007.
- 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, nº 8, p. 1513-1519, 2000.
- DAVIE, J.R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. **J. Nutr.**, v.133, p.2485S–2493S, 2003.
- DAVIS, C.D.; MILNER, J. Frontiers in nutrigenomics, proteomics, metabolomics and cancer prevention. **Mutat. Res.**, v.551, n.1-2, p.51-64, 2004.
- DE FLORA S.; FERGUSON, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutat. Res.**, v.591, n.1, 2, p.8-15, 2005.
- DE VITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. Cancer: principles and practice of Oncology. 7^a ed. Editora Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- DEBRUYNE D., OLIVEIRA M. J., BRACKE M., MAREEL M., LEROY A. Colon cancer cells: Pro-invasive signaling. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 2006.
- DESCHNER, E.E.; RUPERTO, J.F.; LUPTON, J.R.; NEWMARK, H.L. Dietary butyrate (tributyrin) does not enhance AOM-induced colon tumorigenesis. **Cancer Lett.**, v.52, n.1, p.79-82, 1990.
- 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.
- DIPPLE, A. DNA adducts of chemical carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 16, p.437-441, 1995.
- DIVISI D., DI TOMMASO S., SALVEMINI S., GARRAMONE M., CRISCI R. Diet and cancer. **ACTA BIOMED** v. 77; p. 18-123, 2006.
- DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 66, p1191-308, 1981.

- DRUESNE, N.; PAGNIEZ, A.; MAYEUR, C.; THOMAS, M.; CHERBUY, C.; DUEE P.H.; MARTEL, P.; CHAUMONTET, C. Diallyl disulfide (DADS) increases histone acetylation and p21waf1/cip1 expression in human colon cancer cell lines. **Carcinogenesis**, v. 25, p. 1227–36, 2004.
- EDELMAN M.J., BAUER K., KHANWANI S., TAIT N., TREPEL J., KARP J., NEMIEBOKA N., CHUNG EUN-JOO, VAN ECHO D. Clinical and pharmacologic study of tributyrin: an oral butyrate prodrug. **Cancer Chemother Pharmacol** v. 51, p. 439–444, 2003.
- EGORIN M. J., YUAN ZHI-MIN, SENTZ D. L., PLAISANCE K., EISEMAN J. L. Plasma pharmacokinetics of butyrate after intravenous administration of sodium butyrate or oral administration of tributyrin or sodium butyrate to mice and rats. **Cancer Chemother Pharmacol** v. 43, p. 445-453, 1999.
- FARBER, E. Cell proliferation as a major risk factor for cancer: a concept of doubtful validity. **Cancer Res.**, v. 55, p. 3759-62, 1995.
- FARBER, E., RUBIN, H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. **Cancer Res.**, v. 51, p. 2751-2761, 1991
- FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, b. A genetical model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61. p. 759-767, 1990.
- FEMIA, A.P.; CADERNI, G.; BUZZIGOLI, C.; COCCA, E.; SALVADORI, M.; DOLARA, P. Effect of simple phenolic compounds on azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rat colon. **Nutr. and Cancer**, v.41, n.1-2, p.107-10, 2001.
- FEMIA, A.P.; DOLARA, P.; GIANNINI, A.; SALVADORI, M.; BIGGERI, A.; CADERNI, G. Frequent Mutation of Apc Gene in Rat Colon Tumors and Mucin-Depleted Foci, Preneoplastic Lesions in Experimental Colon Carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 67, n. 2, p. 445–9, 2007.
- FENECH, M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. **Toxicology**, v. 181-182, p. 411-416, 2002.
- FIALA, E. S. Investigations into the Metabolism and Mode of Action of the Colon Carcinogens 1,2-Dimethylhydrazine and Azoxymethane. **Cancer**, V. 40, p. 2436-2445, 1977.
- FINNBERG, N.; SILINS, I.; STENIUS, U.; HÖGBERG, J. Characterizing the role of MDM2 in diethylnitrosamine induced acute liver damage and development of pre-neoplastic lesions. **Carcinogenesis**, v.25, n.1, p.113-122, 2004.
- FITCH, M.D.; FLEMING, S.E. Metabolism of short-chain fatty acids by rat colonic mucosa in vivo. **Am. J. Physio. Gastrointest. Liver Physiol.**, v.277, p.G31–G40, 1999.

- 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
- FRAGA, M.F.; BALLESTAR, E.; VILLAR-GAREA, A.; BOIX-CHORNET, M.; ESPADA, J.; SCHOTTA, G.; BONALDI, T.; HAYDON, C.; ROPERO, S.; PETRIE, K.; IYER, N.G.; PÉREZ-ROSADO, A.; CALVO, E.; LOPEZ, J.A.; CANO, A.; CALASANZ, M.J.; COLOMER, D.; PIRIS, M.A.; AHN, N.; IMHOF, A.; CALDAS, C.; JENUWEIN, T.; ESTELLER, M. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. **Nat. Genet.**, v. 37, p. 391–400, 2005.
- FREEMAN, H. J. Effects of differing concentrations of sodium butyrate on 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat intestinal neoplasia. **Gastroenterology** v. 91, p. 596–602, 1986.
- FUCHS C.S., GIOVANNUCCI E.L., COLDITZ G.A. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. **N Engl J Med** v.340, p. 169 – 76, 1999.
- GASCHOTT, T.; STEINHILBER, D.; MILOVIC, V.; STEIN, J. Tributyrin, a Stable and Rapidly Absorbed Prodrug of Butyric Acid, Enhances Antiproliferative Effects of Dihydroxycholecalciferol in Human Colon Cancer Cells. **J. Nutr.** , v.131, p. 1839–1843, 2001.
- GERVAZ, P.; BUCHER, P.; MOREL P. Two Colons-Two Cancers: Paradigm Shift and Clinical Implications. **Journal of Surgical Oncology**, v. 88, p. 261–266, 2004.
- GIOIELLI, L.A. Lipídios estruturados. In: Rui Curi; Celine Pompéia; Célio Kenji Miyasaka; Joaquim Procópio. (Org.). Entendendo a gordura: os ácidos graxos. São Paulo: Manole, 2002, p.457-465.
- GIOVANNUCCI, E., RIMM E.B., STAMPFER M.J., COLDITZ G.A., ASCHERIO A.; WILLETT W.C. Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. **Cancer Res.** v.54, p. 2390 – 2397, 1994.
- GRADY, W.M. Epigenetic events in the colorectum and in colon cancer. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 33, n. 4, p. 684-8, 2005.
- GREAVES, M. Cancer causation: the darwian downside of past success. **Lancet Oncol.**, v. 3, p. 244-251, 2002.
- GUSTIN D. M.; BRENNER D. E. Chemoprevention of colon cancer: Current status and future prospects. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 21, p. 323-348, 2002.

- HAAS, P.; ANTON, A.; DE FRANCISCO, A. Câncer colo retal no Brasil: consumo de grãos integrais como prevenção. **RBAC**, v. 39(3), p. 231-235, 2007.
- HAGUE, A.; BUTT, A.J.; PARASKEVA, C. The role of butyrate in human colonic epithelial cells: an energy source or inducer of differentiation and apoptosis? **Proc. Nutr. Soc.**, v.55, n.3, p.937-943, 1996.
- HAGUE, A.; DÍAZ, G.D.; HICKS, D.J.; KRAJEWSKI, S.; REED, J.C.; PARASKEVA, C. Bcl-2 and bak may play a pivotal role in sodium butyrate-induced apoptosis in colonic epithelial cells; however overexpression of bcl-2 does not protect against bak-mediated apoptosis. **Int. J. Cancer**, v.72, p.898–905, 1997.
- HAMER, H. M.; JONKERS, D.; VENEMA, K.; VANHOUTVIN, S.; F. J. TROOST; BRUMMER R.-J. Review article: the role of butyrate on colonic function. **Aliment Pharmacol Ther.**, v. 27, p. 104–119, 2007.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, p.57–70, 2000.
- HASHIM, Y.Z.H-Y.; GILL, C. I.R.; MCGLYNN, H.; ROWLAND, I.R. Components of Olive Oil and Chemoprevention of Colorectal Cancer. **Nutrition Reviews**, vol. 63, No. 11, p. 374-386, 2005.
- HAZA, A I.; GLINGHAMMAR, B.; GRANDIEN, A.; RAFTER J. Effect of Colonic Luminal Components on Induction of Apoptosis in Human Colonic Cell Lines. **Nutrition and Cancer**, v. 36, n. 1, p.79–89, 2000.
- HEERDT, B.G.; HOUSTON, M.A.; ANTHONY, G.M.; AUGENLICHT, L.H. Initiation of growth arrest and apoptosis of MCF-7 mammary carcinoma cells by tributyrin, a triglyceride analogue of the short-chain fatty acid butyrate, is associated with mitochondrial activity. **Cancer Res.**, v.59, p.1584–1591, 1999.
- HEERDT, B.G.; HOUSTON, M.A.; AUGENLICHT, L.H. Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. **Cancer Res.**, v.54, n.12, p.3288-3293, 1994.
- HEERDT, B.G.; HOUSTON, M.A.; AUGENLICHT, L.H. Short-chain fatty acid-initiated cell cycle arrest and apoptosis of colonic epithelial cells is linked to mitochondrial function, **Cell Growth Diff.**, v. 8, p. 523-532, 1997.
- HEIDOR, R. "Tributirina apresenta atividade quimiopreventiva quando administradas isoladamente, mas não em associação com a vitamina A, em ratos submetidos ao modelo de carcinogênese de cólon". 2007. 120 p. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- HEMMINKI, K. DNA adducts, mutations and cancer. **Carcinogenesis**, 14 (10):2007-12, 1993.

- HINNEBUSCH, B.F.; MENG, S.; WU, J.T.; ARCHER, S.Y.; HODIN, R.A. The Effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. **J. Nutr.**, v. 132, p. 1012–7, 2002.
- HIROSE, Y.; KUNO, T.; YAMADA, Y.; SAKATA, K.; KATAYAMA, M.; YOSHIDA, K.; QIAO, Z.; HATA, K.; YOSHIMI, N.; MORI H. Azoxymethane-induced beta-catenin-accumulated crypts in colonic mucosa of rodents as an intermediate biomarker for colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.24, n.1, p.107–111, 2003.
- HUERTA S., GOULET E. J., LIVINGSTON E. H. Colon cancer and apoptosis. **The American Journal of Surgery** v.191, p. 517–526, 2006.
- HUPPERTZ, B.; FRANK, H.G.; KAUFMANN, P. The apoptosis cascade-morphological and immunohistochemical methods for its visualization. **Anat. Embryol.** (Berl), v. 200, n. 1, p. 1-18, 1999.
- INAMINE, M.; SUZUI, M.; MORIOKA, T.; KINJO, T.; KANESHIRO, T.; SUGISHITA, T.; OKADA, T.; YOSHIMI, N. Inhibitory effect of dietary Monoglucosylceramide 1-O- β -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, p. 876–881, 2005.
- JEMAL A., SIEGEL R., WARD E., MURRAY T., XU J., THUN M. J. Cancer Statistics, 2007. **CA Cancer J Clin**, v.57, p. 43-66, 2007.
- JEONG, J.; ADAMSON, L.K.; HATAM, R.; GREENHALGH, D.G.; CHO, K. Alterations in the expression and modification of histones in the liver after injury. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 75, n. 3, p. 256-64, 2003.
- 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. 683–92, 2007.
- KAMANGAR F., DORES M.G., ANDERSON W.F. Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World. **J Clin Oncol** v.24, p. 2137-2150, 2006.
- KELLOFF, G.J.; BOONE, C.W.; STEELE, V.E.; FAY, J.R.; LUBET, R.A.; CROWELL, J.A.; SIGMAN, C.C. Mechanistic considerations in chemopreventive drug development. **J. Cell. Biochem. (Suppl)**, v.20, p.1-24, 1994.

- KELLOFF, G.J.; CROWELL, J.A.; STEELE, V.E.; LUBET, R.A.; MALONE, W.A.; BOONE, C.W.; KOPELOVICH, L.; HAWK, E.T.; LIEBERMAN, R.; LAWRENCE, J.A.; ALI, I.; VINER, J.L.; SIGMAN, C.C. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. **J. Nutr.**, v.130, p.467S–471S, 2000.
- KIM E. J., LEE YONG-JIN, SHIN HYUN-KYUNG, PARK J. H. Y. Induction of apoptosis by the aqueous extract of *Rubus coreanum* in HT-29 human colon cancer cells. **Nutrition** v. 21, p. 1141–1148, 2005.
- KINOSHITA, M.; SUZUKI, Y.; SAITO, Y. Butyrate reduces colonic paracellular permeability by enhancing PPAR γ activation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.293, n.2, p.827–831, 2002.
- KIUNGA, G.A.; RAJU, J.; SABLJIC, N.; BAJAJ, G.; GOOD, C.K.; BIRD, R.P. Elevated insulin receptor protein expression in experimentally induced colonic tumors. **Cancer Lett.**, v. 10, n. 211(2), p.145-53, 2004.
- KLAUNIG, J. E., KAMENDULIS, L. M., XU, Y. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 19, p. 543-555, 2000.
- KLURFELD, D.M. Dietary fiber-mediated mechanisms in carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.1, n. 52(7 Suppl), p. 2055s-2059s, 1992.
- KOB-EK-LARSEN, M., CHRISTENSEN, L., P., VACH, W., RITSKES-HORTIGA, J., BRANDT, K., Inhibitory effects of feeding with carrots or (-) falcarinol on development of azoximethane-induced preneoplastic lesions in the rat colon. **J. Agric. Food Chem**, p. 1823-1827, 2005.
- KRUH, J. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. **Mol. Cell. Biochem.**, v.42, p.65-82, 1982.
- KUEFER, R.; HOFER, M.D.; ALTUG, V.; ZORN, C.; GENZE, F.; KUNZI-RAPP, K.; HAUTMANN, R.E.; GSCHWEND, J.E. Sodium butyrate and trybutyrin induce *in vivo* growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer. **British J. Cancer**, v.90, p.535-541, 2004.
- KUROIWA-TRZMIELINA, J. “Atividade Quimiopreventiva da tributirina na hepatocarcinogênese em ratos”. 2007. 167 p. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LASKO, C.M.; BIRD, R.P. Modulation of aberrant crypt foci by dietary fat and caloric restriction: the effects of delayed intervention. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 4, n. 1, p. 49-55, 1995.

- LE LEU, R.K.; BROWN, I.L.; HU, Y.; ESTERMAN, A.; YOUNG, G.P. Suppression of Azoxymethane-Induced Colon Cancer Development in Rats by Dietary Resistant Starch. **Cancer Biol Ther.** v. 19, p. 6-10, 2007.
- LEE, B. M.; PARK, K. K. Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents. **Mutation Res.**, v.523, p.265-278, 2003.
- LESCELLE, X.; DELPAL, S.; GOUBERN, M.; BLOTTIÈRE, H.M.; BLACHIER, F. Butyrate metabolism upstream and downstream acetyl-CoA synthesis and growth control of human colon carcinoma cells. **Eur. J. Biochem.**, v.267, p.6435-6442, 2000.
- LIMA, R. O A, BAZO A P., SAID, R. A, SFORCIN, J. M., BANKOVA, V., DARROS, B. R., SALVADORI, D. M. F., Modifying effect of propolis on dimethylhydrazine-induced DNA damage but no colonic aberrant crypt foci in rats., **Environ. Mol. Mutagen.** v. 45(1), p. 8-16, 2005.
- LIPKIN, M. New rodent models for studies of chemopreventive agents. **J Cell. Biochem Suppl**; v. 28-29, p. 144-7, 1997.
- LIPKIN, M.; REDDY, B.; NEWMARK, H.; LAMPRECHT, S.A. Dietary factors in human colorectal cancer. **Annu Rev Nutr.**, v.19, p. 545-86, 1999.
- LITVAK, D.A.; EVERS, B.M.; HWANG, K.O.; HELLMICH, M.R.; KO, T.C.; TOWNSEND, C.M. Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is associated with apoptosis and early induction of p21Waf1/Cip1 and p27Kip1. **Surgery**, v. 124, p. 161–169, 1998.
- LIU RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **J. Nutr.**, v.134, n.12, p.3479S-3485S, 2004.
- LOEB, L. A., LOEB, K. R., ANDERSON, J. P. Multiple mutations and cancer. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 100, p. 776-781, 2003.
- LUEBECK, E.G.; MOOLGAVKAR, S.H. Multistage carcinogenesis and the incidence of colorectal cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, p. 15095–15100, 2002.
- LUPTON J. R. Microbial Degradation Products Influence Colon Cancer Risk: the Butyrate Controversy. **J. Nutr.** v.134, p. 479–482, 2004.
- LUPTON, J. R. Butyrate and colonic cytokinetics: differences between in vitro and in vivo studies. **Eur. J Cancer Prev.** v. 4, p. 373–378, 1995.
- MAIER, S.; REICH, E.; MARTIN, R.; BACHEM, M.; ALTUNG, V.; HAUTMANN, R. E.; GSCHWEND, J. E. Tributyrin induces differentiation, growth arrest and apoptosis in androgen-sensitive and androgen-resistant human prostate cancer cell lines. **Int. J. Cancer**, v. 88, p. 245–251, 2000.

- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v.1, n.3, p.222-231, 2001.
- MANDAL, M.; OLSON, D.J.; SHARMA, T.; VADLAMUDI, R.K.; KUMAR, R. Butyric acid induces apoptosis by up-regulating Bax expression via stimulation of the c-Jun N-terminal kinase/activation protein-1 pathway in human colon cancer cells. **Gastroenterology**, v. 120, p. 71–78, 2001.
- MARIADASON, J.M. HDACs and HDAC inhibitors in colon cancer. **Epigenetics**, v. 3, n. 1, p. 28-37, 2008.
- MCINTYRE, A., GIBSON, P. R., YOUNG, G. P. Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. **Gut**, v. 34, p. 386–391, 1993.
- MCLAUGHLIN, F.; LA THANGUE, N.B. Histone deacetylase inhibitors open new doors in cancer therapy. **Biochem. Pharmacol.**, v. 68, p.1139–1144, 2004.
- MCLELLAN, E.A., BIRD, R.P. Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon. **Cancer Res.**, v. 48, p. 6187–6192, 1988.
- MEDINA, V.; AFONSO, J.J.; ALVAREZ-ARGUELLES, H.; HERNANDEZ, C.; GONZALEZ, F. Sodium butyrate inhibits carcinoma development in a 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. **JPEN: J. Parenter. Enteral Nutr.**, v.22, n.1, p.14-17, 1998.
- MICHEL K. B., FUCHS C. S., GIOVANNUCCI E., COLDITZ G. A., HUNTER D. J., STAMPFER M. J., WILLETT W. C. Fiber Intake and Incidence of Colorectal Cancer among 76,947 Women and 47,279 Men. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** v.14(4), p. 842–849, 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. Estimativa 2008: Incidência de câncer no Brasil, 96p. **INCA**, Rio de Janeiro, 2008.
- MORSE, M. A., STONER, G. D. Cancer chemoprevention: principles and prospects. **Carcinogenesis**, v. 14, p. 1737-1746, 1993.
- MYZAK, M.C.; DASHWOOD, R.H. Histone deacetylases as targets for dietary cancer preventive agents: Lessons learned with butyrate, diallyl disulfide, and sulforaphane. **Current Drug Targets**, v. 7, n. 4, p. 443-452, 2006.
- MYZAK, M.C.; HO, E.; DASHWOOD, R.H. Dietary Agents as Histone Deacetylase Inhibitors. **Molecular Carcinogenesis**, v. 45, p. 443–446, 2006.
- MYZAK, M.C.; KARPLUS, P.A.; CHUNG, F.L.; DASHWOOD, R.H. A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane: inhibition of histone deacetylase. **Cancer Res.** V.64, p.5767–74, 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.
- NEWMARK H.L.; LUPTON J.R.; YOUNG C.W. Butyrate as a differentiating agent: pharmacokinetics, analogues and current status. **Cancer Lett.**, v. 78, p. 1-5, 1994.
- NEWMARK H.L.; YOUNG C.W. Butyrate and phenylacetate as differentiating agents: practical problems and opportunities. **J. Cell Biochem.**, v. 22, p. 253, 1995.
- NGUYEN K.A., CAO Y., CHEN J.R., TOWNSEND Jr. C.M., KO T.C. Dietary Fiber Enhances a Tumor Suppressor Signaling Pathway in the Gut. **Ann Surg** v. 243, p. 619–627, 2006.
- OCHIAI, M.; USHIGOME, M.; FUJIWARA, K.; UBAGAI, T.; KAWAMORI, T.; SUGIMURA, T.; NAGAO, M.; NAKAGAMA, H. Characterization of Dysplastic Aberrant Crypt Foci in the Rat Colon Induced by 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo[4,5-b]Pyridine. **American Journal of Pathology**, v. 163, n. 4, p. 1607-1614, 2003.
- OMS. The World Health Organization's Fight Against Cancer: Strategies That Prevent, Cure and Care. **WHO**, 2007.
<http://www.who.int/cancer/publicat/WHOCancerBrochure2007.FINALweb.pdf>
- PARK Y., HUNTER D.J., SPIEGELMAN D., BERGKVIST L., BERRINO F., VAN DEN BRANDT P. A., BURING J. E., COLDITZ G. A., FREUDENHEIM J. L., FUCHS C. S., GIOVANNUCCI E., GOLDBOHN R. A., GRAHAM S., HARNACK L., HARTMAN A. M., JACOBS, JR D. R., KATO I., KROGH V., LEITZMANN M. F., MCCULLOUGH M. L., MILLER A.B., PIETINEN P., ROHAN T. E., SCHATZKIN A., WILLETT W. C., WOLK A., ZELENIUCH-JACQUOTTE A., ZHANG S. M., SMITH-WARNER S. A. Dietary Fiber Intake and Risk of Colorectal Cancer: A Pooled Analysis of Prospective Cohort Studies. **JAMA**. V. 294, p. 2849-2857, 2005.
- 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.
- PARODI P. W. Cows' Milk Fat Components as Potential Anticarcinogenic Agents. **J. Nutr.** v. 127, p. 1055–1060, 1997.
- 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.

- PINHO, M.S.L. A estória biomolecular do pólio adenomatoso. **Rev bras Coloproct**, v. 26, n. 2, p. 197-203, 2005.
- PITOT, H. C., DRAGAN, Y. P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **FASEB J.**, v.5, p.2280-2286, 1991.
- PLATE, A.Y.; GALLAHER, D.D. Effects of indole-3-carbinol and phenethyl isothiocyanate on colon carcinogenesis induced by azoxymethane in rats. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 2, p. 287-92, 2006.
- POIRIER, M.C. Chemical-induced DNA-damage and human cancer risk. **Nat. Rev. Cancer**, v.4. n. 8, p.630-637, 2004.
- 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.
- POVEY, A.C.; BARTSCH, H.; O'NEILL, I.K. Magnetic polyethyleneimine (PEI) microcapsules as retrievable traps for carcinogen electrophiles formed in the gastrointestinal tract. **Cancer Lett.**, v. 36, n. 1, p. 45-53, 1987.
- PREHN R. T. Cancers beget mutations versus mutations beget cancers. **Cancer Res.** V.54. p.5296-300, 1994.
- 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.
- REDDY, B.S.; NARISAWA, T.; WEISBURGER J.H. Colon Carcinogenesis in Germ-free Rats with Intrarectal 1,2-Dimethylhydrazine and Subcutaneous Azoxymethan. **Cancer Research**, v. 36, p. 2874-2876, 1976.
- RENEHAN A. G., O., DWYER S. T., HABOUBI N. J. POTTEN C. S. Early cellular events in colorectal carcinogenesis, **Blackwell Science, Colorectal Disease**, v.4, p.76-89, 2001.
- ROCCHI, P.; TONELLI, R.; CAMERIN, C.; PURGATO, S.; FRONZA, R.; BIANUCCI, F.; GUERRA, F.; PESSION, A.; FERRERI, A.M. p21Waf1/Cip1 is a common target induced by short-chain fatty acid HDAC inhibitors (valproic acid, tributyrin and sodium butyrate) in neuroblastoma cells. **Oncology Reports**, v. 13, p.1139-1144, 2005.
- RODRIGO, L.; Riestra, S. [Diet and colon cancer]. **Rev. Esp. Enferm. Dig.**, v. 99, n. 4, p. 183-189, 2007.

- RODRIGUES, M. A. M.; SILVA, L. A. G.; SALVADORI, D. M. F. CAMARGO, J. L. V.; MONTENEGRO, M. R. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short-and-medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 351-355, 2002.
- ROGGERS K. J.; PEGG A. E. Formation of 06-Methylguanine by Alkylation of Rat Liver, Colon, and Kidney DNA following Administration of 1,2 dimethylhydrazine. **Câncer Res**, v. 37. p. 4082-4087, 1977
- RONCUCCI, L.; PEDRONI M.; VACCINA F.; 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.
- RUEMMELE, F.M.; DIONNE, S.; QURESHI, I.; SARMA, D.S.; LEVY, E.; SEIDMAN, E.G. Butyrate mediates Caco-2 cell apoptosis via up-regulation of pro-apoptotic BAK and inducing caspase-3 mediated cleavage of poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP). **Cell Death Differ.**, v. 6, p. 729-735, 1999.
- RUEMMELE, F.M.; SCHWARTZ, S.; SEIDMAN, E.G.; DIONNE, S.; LEVY, E.; LENTZE, M.J. Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway. **Gut**, v.52, n.1, p.94-100, 2003.
- RUPNARAIN, C.; DLAMINI, Z.; NAICKER S.; BHOOLA, K. Colon cancer: genomics and apoptotic events. **Biol. Chem.**, v. 385, p. 449-464, 2004.
- RYAN-HARSHMAN M., ALDOORI W. Diet and colorectal cancer **Can Fam Physician** v. 53, p.1913-1920, 2007.
- SCHEPPACH, W.; BARTRAM, P.; RICHTER, A.; RICHTER, F.; LIEPOLD, H.; DUSEL, G.; HOFSTETTER, G.; RUTHLEIN, J.; KASPER, H. Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro. **JPEN: J. Parenter. Enteral Nutr.**, v.16, n.1, p.43-48, 1992.
- SCHRÖDER, C.; MAURER, H.R. Tributyrin-induced differentiation promotes apoptosis of LS 174T colon cancer cells in vitro. **Int. J. Oncol.**, v.20, p.195-200, 2002.
- SERRANO D., LAZZERONI M., DECENSI A. Chemoprevention of colorectal cancer: an update. **Tech Coloproctol** v. 8, p. S248-S252, 2004.
- SHANMUGATHASAN, M.; JOTHY, S. Apoptosis, anoikis and their relevance to the pathobiology of colon cancer. **Pathol Int.** v. 50(4), p. 273-9, 2000.
- SHARMA, S.; STUTZMAN, J. D.; KELLOFF, G. J.; STEELE, V. E. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 54, p. 5848-55, 1994.

- 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, B.; HALESTRAP, A.P.; PARASKEVA, C. Butyrate can act as a stimulator of growth or inducer of apoptosis in human colonic epithelial cell lines depending on the presence of alternative energy sources. **Carcinogenesis**, n.18, p.1265–1270, 1997.
- SLATTERY M. L., CURTIN K. P., EDWARDS S. L., SCHAFFER D. M. Plant foods, fiber, and rectal cancer. **Am J Clin Nutr** v. 79, p. 274–281, 2004.
- 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.; LIBY, K.T. Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. **Nat. Clin. Pract. Oncol.**, v.2, n.10, p.518-525, 2005.
- SPORN, M.B.; SUH, N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v.2, p.537-743, 2002.
- STANLEY, L. A. Molecular aspects of chemical carcinogenesis: the roles of oncogenes and tumour suppressor genes. **Toxicology**, v.104, p.173-94, 1995.
- STATLAND, B. E., Nutrition and cancer. **Clin Chem**, 38(8B Pt 2), p.1587-94, 1992.
- STATISTICA 7.0 for Windows**, v. 1. Tulsa, OK: StatSoft Inc. Software, 2006.
- STONER, G.D.; MORSE, M.A.; KELLOFF, G.J. Perspectives in cancer chemoprevention. **Environ. Health. Perspect.**, v.1, n.5(Suppl 4), p.945-954, 1997.
- SU J., ZHANG N., HO P. C. Determination of tributyrin and its metabolite butyrate in Wistar rat plasma samples by gas chromatography/mass Spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** v.18, p. 2217–2222, 2004.
- SURH, Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nat. Rev. Cancer**, v.3, n.10, p.768-780, 2003.
- TAKAYAMA, T.; KATSUKI, S.; TAKAHASHI, Y.; OHI, M.; NOJIRI, S.; SAKAMAKI, S.; KATO, J.; KOGAWA, K.; MIYAKE, H.; NIITSU, Y. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. **N Engl J Med.**, v. 29, n. 339(18), p. 1277-84, 1998.

- THORUP, I. Histomorphological and immunohistochemical characterization of colonic aberrant crypt foci in rats: relationship to growth factor expression. **Carcinogenesis**. v. 18, n. 3, p. 465-72, 1997.
- TIROSH O., PARDO M., SCHWARTZ B., MISKIN R. Long-lived aMUPA transgenic mice show reduced SOD2 expression, enhanced apoptosis and reduced susceptibility to the carcinogen dimethylhydrazine. **Mechanisms of Aging and Development** v.126, p. 1262–1273, 2005.
- UEDA, N., SHAH, S. Apoptosis. **J. Lab. Clin. Med.**, v.124, p.169-77, 1994.
- VANAMALA J., LEONARDI T., PATIL B. S., TADDEO S. S., MURPHY M. E., PIKE L. M., CHAPKIN R. S., LUPTON J. R., TURNER N. D. Suppression of colon carcinogenesis by bioactive compounds in grapefruit. **Carcinogenesis**, v. 27, n.6, p. 1257-1265, 2006.
- VELAZQUEZ, O.C.; ZHOU, D.; SETO, R.W.; JABBAR, A.; CHOI, J.; LEDERER, H.M.; ROMBEAU, J.L. In vivo crypt surface hyperproliferation is decreased by butyrate and increased by deoxycholate in normal rat colon: associated in vivo effects on c-Fos and c-Jun expression. **J. Parenter. Enteral. Nutr.**, v. 20, p. 243–250, 1996.
- VENITT, S. Mechanisms of carcinogenesis and individual susceptibility to cancer. **Clin. Chem.**, v.40, p. 1421-1425, 1994.
- VIEIRA, A. “Geraniol, mas não beta-ionona ou associação desses isoprenóides, possui atividade quimiopreventiva em ratos submetidos a modelo de carcinogênese de cólon”. 2007. 116 p. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Cancer genes and the pathways they control. **Nat. Med.**, v.10, n.8, p.789-99, 2004.
- VOLATE, S. R.; DAVENPORT, D. M.; MUGA, S. T.; WARGOVICH, M. J. Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin). **Carcinogenesis**, v. 26, n. 8, p. 1450-1456, 2005.
- WALDECKER M, KAUTENBURGER T, DAUMANN H, BUSCH C, SCHRENK D. Inhibition of histone deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. **J Nutr Biochem.**, 2007 (Epub ahead of print).
- WALDECKER, M.; KAUTENBURGER, T.; DAUMANN, H.; VEERIAH, S.; WILL, F.; DIETRICH, H.; POOL-ZOBEL, B.L; SCHRENK, D. Histone-deacetylase inhibition and butyrate formation: Fecal slurry incubations with apple pectin and apple juice extracts. **Nutrition**, v. 24, p. 366–374, 2008.

- 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 e Prevention**, v. 11, 1653-1662, 2002.
- WARD, J.M. Morphogenesis of chemically induced neoplasms of the colon and small intestine in rats. **Lab. Invest.**, v. 30, n. 4, p.505-513, 1974.
- 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.
- WARGOVICH, M.J., CHEN, C.D., JIMENEZ, A., STEELE, V.E., VELASCO, M., STEPHENS, L.C., PRICE, R., GRAY, K., KELLOFF, G.J. Aberrant crypts as a biomarker for colon cancer: evaluation of potential chemopreventive agents in the rat. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 5, p. 355-360, 1996.
- WATTENBERG, L. W. An overview of chemoprevention: current status and future prospects. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 216, p. 133-141, 1997.
- WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of cancer. **Cancer Res.**, v.45, n.1, p.1-8, 1985.
- WEISBURGUER J.H. Colon carcinogens: their metabolism and mode of action. **Cancer**, v. 28; n.1; p. 60-70, 1971.
- WILLIAMS, E.A.; COXHEAD, J.M.; MATHERS, J.C. Anti-cancer effects of butyrate: use of micro-array technology to investigate mechanisms. **Proc. Nutr. Soc.**, v.62, p.107-115, 2003.
- WILLIAMS, G. M. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. **Toxicology**, v. 166, p. 3-10, 2001.
- WINTERSBERGER, E.; MUDRAK, I.; WINTERSBERGER, U. Butyrate inhibits mouse fibroblasts at a control point in the G1 phase. **J. Cell. Biochemistry**, v.21, p.239-247, 1983.
- 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(2), p. 343-348, 2003.
- WONG, C.S.; SENGUPTA, S.; TJANDRA, J.J.; GIBSON, P.R. The influence of specific luminal factors on the colonic epithelium: high-dose butyrate and physical changes suppress early carcinogenic events in rats. **Dis Colon Rectum**, v.48, n.3, p.549-559, 2005.

- WONG, J.M.; DE SOUZA, R.; KENDALL, C.W.; EMAM, A.; JENKINS, D.J. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 40, n. 3, p. 35-43, 2006.
- 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.** 229:1017-1025, 2004.
- YAMADA, Y.; MORI, H. Pre-cancerous lesions for colorectal cancers in rodents: a new concept. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 6, p.1015-1019, 2003.
- YAMADA, Y.; YOSHIMI, N.; HIROSE, Y.; KAWABATA, K.; MATSUNAGA, K.; SHIMIZU, M.; HARA, A.; MORI, H. Frequent b-Catenin Gene Mutations and Accumulations of the Protein in the Putative Preneoplastic Lesions Lacking Macroscopic Aberrant Crypt Foci Appearance, in Rat Colon Carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 60, p. 3323-3327, 2000.
- YAN, J.; XU, Y.H. Tributyrin inhibits human gastric cancer SGC-7901 cell growth by inducing apoptosis and DNA synthesis arrest. **World J. Gastroenterol.**, v.9, n.4, p.660-664, 2003.
- YANAGI, S.; YAMASHITA, M.; IMAI, S. Sodium butyrate inhibits the enhancing effect of high fat diet on mammary tumorigenesis. **Oncology**, v.50, n.4, p.201-204, 1993.
- YOUNG, G.P.; MCINTYRE, A.; ALBERT, V.; FOLINO, M.; MUIR, J.G.; GIBSON, P.R. Wheat bran suppresses potato starch-potentiated colorectal tumorigenesis at the aberrant crypt stage in a rat model. **Gastroenterology**, v. 110, n. 2, n. 508-14, 1996.
- 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.
- ZHANG, J.; WU, G.; CHAPKIN, R.S.; LUPTON, J.R. Energy metabolism of rat colonocytes changes during the tumorigenic process and is dependent on diet and carcinogen. **J. Nutr.**, v.128, p.1262-1269, 1998.
- 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: moion of cell proliferation, apoptosis and aberrant crypt foci. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 255-260, 1999.
- ZORAN, D.L.; TURNER, N.D.; TADDEO, S.S.; CHAPKIN, R.S.; LUPTON, J.R. Wheat bran reduces tumor incidence in a rat model of colon cancer independent of effects on distal luminal butyrate concentrations. **J. Nutr.** v. 127, p.2217-2225, 1997.

8 - ANEXOS OBRIGATÓRIOS:

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

Ofício CEEA nº 02/2008

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto “Avaliação da eventual atividade quimiopreventiva da tributirina quando administrada a ratos Wistar durante a etapa de pós-iniciação do modelo de carcinogênese de cólon” (Protocolo CEEA nº165), de responsabilidade da pesquisadora **Giulianna Paola Cruzetta** sob a orientação do Prof. 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 11/2/2008.*

São Paulo, 11 de fevereiro de 2008.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA