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

Tributirina apresenta atividade quimiopreventiva quando administrada isoladamente, mas não em associação com a vitamina A, em ratos submetidos a modelo de carcinogênese de cólon.

Renato Heidor

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Titular Fernando Salvador Moreno

São Paulo
2007

Renato Heidor

Tributirina apresenta atividade quimiopreventiva quando administrada isoladamente, mas não em associação com a vitamina A, em ratos submetidos a modelo de carcinogênese de cólon.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Titular Fernando Salvador Moreno
orientador/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

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

Heidor, Renato
H465t Tributirina apresenta atividade quimiopreventiva quando administrada isoladamente, mas não em associação com a vitamina A, em ratos submetidos a modelo de carcinogênese de cólon / Renato Heidor. -- São Paulo, 2007.
120p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Moreno, Fernando Salvador

1. Nutrição experimental : Ciência dos alimentos 2. Bioquímica nutricional I. T. II Moreno, Fernando Salvador, orientador.

641.1 CDD

Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo...

Fernando Pessoa

DEDICATÓRIA

À minha esposa, Dalmara, por seu incentivo, carinho, e principalmente por seu amor tão essencial para mim.

Ao me filho Felipe que com sua alegria me desculpava pelos meus momentos de ausência.

Aos meus pais, Uradir e Dinorah, que não mediram esforços, até hoje, para me ensinar a retirar os obstáculos que a vida coloca em meu caminho.

A Rafael Eduardo Heidor (em sua memória)
Agora o meu barco navega sozinho...

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Fernando Salvador Moreno, pela sua confiança depositada ao convite para fazer pós-graduação; por seu estímulo em fazer com que eu aprendesse cada vez mais. A sua paixão pela pesquisa é contagiante e por isso sou grato a ele, pois se não fosse assim, teria seguido outros caminhos e seria outra pessoa, talvez infeliz.

Ao Professor Thomas Prates Ong, pela amizade e alegre convívio, desde quando fazíamaos "*Northern blots*" na véspera de Natal...e que davam certo!

Á Dra Clarissa Scolastici, por suas sugestões para que esse trabalho pudesse ser realizado.

À colega de laboratório Alessandra Vieira, que aceitou o desafio de trabalhar com carcinogênese de cólon, apesar de todas as dificuldades que nós passamos em padronizar o modelo. Sem a sua ajuda, não teríamos chegado tão longe.

À colega de laboratório Giulianna Paola Cruzetta, que também aceitou o desafio de trabalhar com carcinogênese de cólon, pela sua ajuda e alegria.

Aos amigos do laboratório: Aline, André, Bruna, Camila, Carlos, Douglas, Ernesto, Mariana, Mônica, pela alegria da convivência e apoio.

Aos Docentes do FBA-USP: Alfredo Tenuta, Beatriz, Bernadette, Carlos Henrique, Célia, Eduardo Purgato, Flávio, Franco Lajolo, Inar de Castro, João Roberto, Jorge Mancini, Júlio Tirapegui, Lígia, Maria Inês, Maria Tereza, Marisa, Marilene, Sílvia e Úrsula, pelo apoio fornecido desde a graduação.

Aos Professores Luís Fernando Barbisan da UNESP de Botucatú e Sílvia Berlanga da FCF-USP, por terem aceitado em participar da minha banca de mestrado.

Aos Secretários do FBA-USP: Cleo, Edílson e Mônica, pelo auxílio, amizade e principalmente, paciência.

Aos Funcionários do FBA-USP: Alexandre, Ivanir, Joana, Kátia, Luciene, Lúcia, Lurdinha, Rosa, Rosângela, Tânia e Tatiana, pela amizade.

Aos colegas do FBA-USP: Alexandre Lobo, Maria Aderuza, João Paulo, Renato, Cristiane, Carolina, Aline, Mônika, Márcia e Malú, pelo apoio.

Aos ex-funcionários do FBA, Ângela e Luís, pelo apoio e amizade.

Ao Jorge e a Elaine, da Secretaria de Pós-Graduação, pela atenção.

Aos Funcionários do Biotério da FCF/IQ-USP, principalmente Silvânia e Flávia, pelo fornecimento e cuidado dos animais.

Às agencias de fomento FAPESP, CNPQ e CAPES pelo apoio financeiro.

Aos demais colegas do FBA, que muito me apoiaram.

À todos, sou muito grato!

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO..... 16

1.1 Neoplasias: Aspectos Gerais..... 16

1.2 Neoplasias: Eventos Epigenéticos..... 21

1.3 Carcinogênese de Cólon..... 25

1.4 Focos de Criptas Aberrantes..... 29

1.5 Carcinogênese Química Experimental de Cólon..... 32

1.6 Quimioprevenção..... 34

1.7 Vitamina A, Tributirina e Quimioprevenção..... 36

2-OBJETIVOS..... 41

2.1 Objetivo geral..... 41

2.2 Objetivos específicos..... 41

3-MATERIAL E MÉTODOS..... 42

3.1 Animais..... 42

3.2 Modelo de carcinogênese de cólon..... 42

3.3 Protocolo experimental..... 43

3.4 Eutanásia a coleta dos cólons..... 46

3.5 Pesquisa de FCAs..... 46

3.6 Avaliação de danos no DNA de células da mucosa do cólon..... 47

3.7 Avaliação do padrão de metilação global do DNA nas células da mucosa do cólon..... 49

3.7.1 Extração do DNA de células da mucosa do cólon... 49

3.7.2 “Dot blot”..... 50

3.8 Análise estatística..... 51

4-RESULTADOS..... 53

4.1 Crescimento dos animais..... 53

4.2 Pesquisa de focos de criptas aberrantes..... 55

4.3 Quantificação de danos no DNA da mucosa do cólon 60

4.4 Avaliação do padrão global de metilação do DNA.... 64

5- DISCUSSÃO..... 67

6- CONCLUSÕES..... 84

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 85

LISTA DE ABREVIAÇÕES

AOM – azoximetano

DMH – 1,2-dimetilhidrazina

E – eutanásia

FCA – foco de cripta aberrante

HAT – enzima acetilase de histonas

HDAC – enzima deacetilase de histonas

HDACi – inibidor da enzima deacetilase de histonas

MGMT – metilguanina metiltransferase

NI – não iniciados

OM+MA – óleo de milho e maltodextrina

RAR – receptor nuclear para ácido retinóico

RXR – receptor nuclear para retinóides X

TB – tributirina

VA – vitamina A

VA+TB – associação de vitamina A com tributirina

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática da estrutura das histonas..... 23

Figura 2: Mapa de algumas modificações de histonas..... 24

Figura 3: Alterações genéticas na carcinogênese de cólon..... 26

Figura 4: Seqüência adenoma-carcinoma no cólon..... 27

Figura 5: Pólipo Adenomatoso e displasia..... 28

Figura 6: Mecanismo bottom-up e down-top..... 29

Figura 7: Hidrólise da tributirina..... 38

Figura 8: Desenho experimental..... 45

Figura 9: Evolução da massa corpórea de ratos Wistar tratados ou não com vitamina A e tributirina, isoladamente ou em associação e submetidos a modelo de carcinogênese de cólon..... 54

Figura 10: Evolução do consumo de ração de ratos tratados ou não com vitamina A e tributirina, isoladamente ou em associação e submetidos a modelo de carcinogênese de cólon..... 55

Figura 11: Foco de cripta aberrante, corado com azul de metileno e observado com objetiva de 10X..... 60

Figura 12: Exemplo de nucleóides observados com objetiva de 10X 64

Figura 13: Densitometria do "dot blot" da análise do padrão de metilação global do DNA em ratos tratados ou não com vitamina A e tributirina, isoladamente ou em associação e submetidos a modelo de carcinogênese de cólon..... 65

Figura 14: A) Digitalização de fotografia do filme de raios x do "dot blot". **B)** Digitalização de fotografia da membrana corada com azul de metileno utilizada para a normalização dos resultados..... 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Massa corpórea inicial e final de ratos tratados ou não com vitamina A ou tributirina, isoladamente ou em associação e submetidos a modelo de carcinogênese de cólon..... . 53

Tabela 2: Quantidade média de FCAs, FCAs ≥ 4 e relações FCAs/cm^2 e FCAs ≥ 4/cm^2 em toda a extensão dos hemicólons de ratos submetidos a modelo de carcinogênese e tratados ou não com vitamina A ou tributirina, isoladamente ou em associação..... 56

Tabela 3: Quantidade média de FCAs, FCAs ≥ 4 e relações FCAs/cm^2 e FCAs ≥ 4/cm^2 na porção proximal dos hemicólons de ratos submetidos a modelo de carcinogênese e tratados ou não com vitamina A ou tributirina, isoladamente ou em associação..... 58

Tabela 4: Quantidade média de FCAs, FCAs ≥ 4, área média analisada e relações FCAs/cm^2 e FCAs ≥ 4/cm^2 na porção distal dos hemicólons de ratos submetidos a modelo de carcinogênese e tratados ou não com vitamina A ou tributirina, isoladamente ou em associação..... 59

Tabela 5: Comprimento dos "nucleóides" de células da mucosa colônica de ratos Wistar submetidos a modelo de carcinogênese e tratados ou não com vitamina A ou tributirina, isoladamente ou em associação e também da mucosa de ratos não iniciados, tratados ou não com peróxido de hidrogênio..... 62

RESUMO

HEIDOR, R. **Tributirina apresenta atividade quimiopreventiva quando administrada isoladamente, mas não em associação com a vitamina A, em ratos submetidos a modelo de carcinogênese de cólon.** 2007. 120 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Avaliou-se a atividade quimiopreventiva da tributirina (TB), e da vitamina A (VA) administradas em associação ou não, antes, durante e após a iniciação em ratos submetidos a modelo de carcinogênese de cólon. Ratos Wistar receberam VA [1 mg/100 g de p.c (grupo VA)], tributirina [200 mg/100 g de p.c (grupo TB)] ou associação de VA com TB (grupo VA+TB). Ratos tratados com óleo de milho e maltodextrina serviram como controle (GC). Avaliou-se a presença de focos de criptas aberrantes (FCA) e sua localização nos cólons, além de danos e do padrão de metilação global do DNA na mucosa colônica. No cólon total, distal e proximal, o grupo TB apresentou menor ($p<0,05$) número de FCA com 4 ou mais criptas/cm^2, considerados mais agressivos, em relação ao GC. Quanto aos danos no DNA, os grupos VA, TB e VA+TB apresentaram cometas de comprimentos menores ($p<0,05$) em comparação ao GC. Não houve diferenças estatisticamente significantes quanto ao padrão de metilação global do DNA. Assim, TB consiste em agente quimiopreventivo promissor da carcinogênese de cólon quando administrada isoladamente, mas não em associação com a VA.

ABSTRACT

HEIDOR, R. **Tributyrin exhibits chemopreventive activity when administrated alone, but not in combination with vitamin A, in colon carcinogenesis model in rats.** 2007.120 p. Master degree dissertation – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2007.

Chemopreventive activities of tributyrin (TB) and vitamin A (VA) were administered in combination or not, before, during and after the initiation in rats subjected to carcinogenesis model of colon. Wistar rats received VA [1 mg/100 g of b.w (group VA)], tributyrin [200 mg/100 g of b.w (TB group)] or association of VA with BD (group VA + TB). Rats treated with corn oil and maltodextrin were used as control (GC). The presence of aberrant foci crypts (ACF) was evaluated and their location in colon tissue was determined. In addition, DNA damages and the global pattern of DNA methylation in colonic cells was measured. In total colon as in distal and proximal portions, the TB group presented lower ($p < 0.05$) number of ACF with 4 or more crypts/cm2 in comparison to the GC group. The number of ACF with 4 or more crypts /cm2 was used as criteria of aggressiveness. In relation to the damage of DNA, the VA, VA + TB and TB groups exhibits smaller nucleoids lengths ($p < 0.05$) compared to the GC group. There were no statistically significant differences on the global pattern of DNA methylation. So TB is promising chemopreventive agent in carcinogenesis of the colon when administered alone, but not in combination with the VA.

1-INTRODUÇÃO

1.1 Neoplasias: Aspectos Gerais.

Devido à melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos com a origem e o desenvolvimento das neoplasias, acredita-se que estas possam estar relacionadas com modificações na estrutura e função do DNA. Como esta molécula está presente nas células de organismos vivos desde a origem da vida, pode-se afirmar que esta condição patológica surgiu antes mesmo do aparecimento do homem. Esse fato foi confirmado analisando-se osteomas em fósseis de dinossauros (CAPASSO, 2005).

Carcinogênese é termo utilizado para denotar o desenvolvimento da neoplasia, que é a proliferação anormal de células que apresentam crescimento autônomo e tendem a perder sua diferenciação, independente de estímulos por fatores de crescimento (BANNASCH, 1986; BANNASCH; ZERBAN, 1990). As neoplasias podem ser classificadas em benignas ou malignas. As primeiras apresentam uma proliferação celular localizada e circunscrita, exercendo pressão nos tecidos adjacentes, mas que não ultrapassam suas divisas. Ao contrário, neoplasias malignas ou cânceres têm a capacidade de invadir e se multiplicar em diferentes partes do organismo (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Descreve-se que a carcinogênese consiste em um processo longo envolvendo múltiplas etapas na transformação das células normais em malignas, requerendo para isto cerca de metade a 2/3 da vida das

diferentes espécies (FARBER, 1990). Entretanto, é bastante discutível o número exato de etapas que compõem o processo de formação da neoplasia, havendo evidências de que este ocorra em três estágios básicos: iniciação, promoção e progressão (PITOT, 2001; YOUNG; YANG; COLBURN, 2003).

A iniciação, que consiste no primeiro estágio do processo de carcinogênese, envolve alterações genéticas irreversíveis e permanentes na célula afetada, que adquire uma capacidade de crescimento autônomo. (PITOT, 2001; PANG et al., 2006). Esta capacidade pode permanecer latente durante anos e a célula iniciada é, na maioria das vezes, morfologicamente indistinguível das células ao seu redor (surrounding).

A iniciação pode ser induzida por agentes de natureza química (carcinogênese química) que reagem com o DNA genômico por meio de transferência de resíduos alquila, formando produtos estáveis conhecidos como adutos (DIPPLE, 1995). Se o aduto não é eliminado pelo sistema de reparo e, após a replicação do DNA seguida de divisão celular, ocorre a formação de alterações denominadas mutações (MARTINEZ et al., 2003).

Agentes carcinogênicos podem necessitar de ativação enzimática para reagirem com o DNA. Desta forma, são convertidos a agentes carcinogênicos definitivos após metabolização por enzimas de fase I, como as do sistema citocromo P450. Substâncias com essas características são denominadas carcinógenos indiretos ou pró-carcinógenos, como, por exemplo, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Já os agentes carcinogênicos que não necessitam de

ativação prévia são denominados de carcinógenos diretos, como, por exemplo, a aquil nitrosouréia (DIPPLE, 1995).

A etapa subseqüente à iniciação é a promoção, onde ocorre a expansão clonal seletiva das células iniciadas com a formação de lesões pré-neoplásicas (PITOT, 2001; YOUN, YANG, COLBURN, 2003). Esta etapa ocorre sob ação de agentes promotores que atuam por mecanismos que não envolvem danos no DNA, como, por exemplo, alterando a expressão gênica, estimulando a proliferação celular das células iniciadas e inibindo a apoptose nas mesmas (YOUNG et al., 2003). Contrapondo-se à iniciação, a promoção é caracterizada pela sua reversibilidade que resulta da remoção do agente promotor (PITOT, 2001). Exemplos de tais agentes são o fenobarbital e o estradiol (WILLIAMS, 2001).

A progressão corresponde ao último estágio do desenvolvimento neoplásico. Essa fase é caracterizada pela instabilidade cariotípica e por uma contínua evolução das características independentes, como mudanças bioquímicas nas células malignas, aumento da proliferação celular, invasão e metástase (YOUN, YANG, COLBURN, 2003).

O ciclo celular é uma seqüência ordenada de eventos em que a célula duplica o seu material genético (cromossomos) e se divide em duas células idênticas. Essa divisão ocorre em quatro fases distintas: na fase S [synthesis (síntese)] o material genético é duplicado e, na fase M [mitosis (mitose)] os cromossomos duplicados são distribuídos igualmente entre duas células filhas. As fases restantes são simplesmente denominadas de G1 [gap1 (intervalo1)] e de G2 [gap2 (intervalo2)]. G1

precede a fase S e G2 antecede a fase M. Vários mecanismos regulatórios atuam em todas as fases do ciclo celular, destacando-se as proteínas denominadas ciclinas e as cdks [cyclin dependent kinases (ciclinas dependentes de quinases)] (TESSEMA, LEHMANN, KREIPE, 2004; HU et al., 2005).

Na carcinogênese ocorre freqüentemente a ativação aberrante do ciclo celular alcançada pela inativação dos genes inibidores, tais como os supressores de tumor, por mutações ou diminuição de sua expressão. Nesse processo ocorre também a ativação de genes estimuladores, como os proto-oncogenes. (OKADA; MAK, 2004; KROEMER et al., 2005).

Os diversos processos de morte celular também constituem fenômeno biológico importante. Dentre eles, a apoptose constitui evento fisiológico organizado, essencial para a manutenção da homeostase, envolvendo redução do volume celular, fragmentação do núcleo e formação de corpúsculos apoptóticos (OKADA, MAK, 2004; KROEMER et al., 2005). A perda da posição correta da célula no estroma, pode desencadear outro tipo de morte, similar à apoptose, denominada anoikis (OKADA, MAK, 2004; KROEMER et al., 2005).

Duas vias podem dar início a apoptose: a via extrínseca, mediada por receptores de morte presentes na membrana plasmática; e a via intrínseca, associada com o aumento da permeabilidade mitocondrial. Em ambas, descreve-se que há ativação de proteases específicas, as caspases, responsáveis pela quebra do substrato celular (OKADA, MAK, 2004; KROEMER et al., 2005).

O proto-oncogene *c-myc* está associado com o aumento da proliferação celular (DANG,1999). Em células que não estão em processo de divisão celular, a expressão de *c-myc* é indetectável. Entretanto, após um estimulo proliferativo a expressão de mRNA e da proteína c-myc é rapidamente induzida e as células entram na fase G1. Logo após, os níveis de mRNA e de proteína c-myc diminuem, mantendo-se constantes durante a progressão do ciclo celular (PELENGARIS, KHAN, 2003).

A proteína c-myc atua na progressão no ciclo celular através da ativação e silenciamento de alguns genes por meio do heterodímero formado com a proteína max. Dessa forma, c-myc-max atua como um fator de transcrição, ativando determinados genes, incluindo os que codificam para ciclina D2 e cdk 4 e impede a expressão de proteínas inibitórias de cdks como a $p21^{WAF1}$ (PELENGARIS, KHAN, 2003).

O gene *c-myc* apresenta atividades apoptóticas, devido à ativação de Bax (proteína pró-apoptótica, que aumenta a permeabilidade da membrana mitocondrial). Outra via que parece estar envolvida na ativação da apoptose pelo c-myc, seria a ligação do c-myc com o receptor de morte CD95/Fas, e, além disso, pode inibir a ativação do fator de transcrição NFκB, levando ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (PELENGARIS, KHAN, 2003).

É provável que a carcinogênese dependa do balanço entre os danos ao DNA, à efetividade do reparo, a proliferação celular, a apoptose e da resposta aos estímulos do microambiente (JING, NAN, HU, 2005). Dessa forma, a apoptose exerce relevante papel quando o mecanismo de reparo do DNA não é suficiente para evitar o dano

genético. Assim, a célula mutada pode ser eliminada do organismo por esse tipo de morte, que representa um mecanismo de proteção contra a transformação e desenvolvimento da neoplasia, e elimina células com dano genético ou que não respondem aos estímulos anti-proliferativos (HENGARTNER, 2000; KONG et al., 2001).

1.2 Neoplasias: Eventos Epigenéticos.

No início da década de 1980, Andy Feinberg e Bert Vogelstein observaram alterações no padrão de metilação de células neoplásicas (FEINBERG, VOGELSTEIN, 1983). Esse foi o um dos primeiros eventos epigenéticos relatados em neoplasias, onde modificações na expressão gênica foram observadas com diferentes conseqüências fenotípicas, sem que houvesse mudança na seqüência de DNA. (FEINBERG, TYCHO, 2004; CARBONE et al., 2004).

Há dois tipos principais inter-relacionados de herança epigenética: metilação do DNA e modificações nas histonas (FEINBERG, TYCKO, 2004).

A metilação é a principal modificação epigenética do genoma humano e consiste na adição covalente de um grupamento metila na posição 5´ do anel da citosina do dinucleotídeo CG (ROBERTSON, JONES, 2000). Existem regiões da cromatina denominadas “ilhotas CpG” que são trechos de DNA com 200-2000 pares de bases que apresentam uma maior freqüência de citocinas e guaninas do que o restante do genoma. Muitas “ilhotas CpG” foram perdidas durante o processo evolutivo dos mamíferos, mas estão presentes em aproximadamente 1% do DNA

humano e normalmente apresentam-se metiladas (ISSA, 2004). Entretanto, quando estão presentes na região promotora de um gene se encontram usualmente não metiladas (TAKAI, JONES, 2002).

Em neoplasias foram observados dois tipos concomitantes de alterações da metilação do DNA. No primeiro, a quantidade de citosinas metiladas em nível genômico está reduzida em comparação a tecidos normais. Em certos casos, essa hipometilação genômica se correlaciona com uma ativação gênica anormal. No segundo caso, mais intensamente estudado, genes estão transcricionalmente silenciados em neoplasias, devido a uma hipermetilação de seu promotor (ROBERTSON, JONES, 2000). Genes regulados dessa forma incluem supressores de tumor, genes envolvidos com o reparo do DNA e aqueles envolvidos com a proliferação, diferenciação e outras funções celulares importantes (ESTELLER, 2003).

Assim, acredita-se que a metilação do DNA contribua para com a carcinogênese, por meio de inativação da expressão gênica (HERMAN, 2002).

O DNA de eucariotos é condensado e ordenado em uma estrutura dinâmica denominada cromatina. Essa estrutura é formada por unidades básicas de repetição, os nucleossomos, que consistem de aproximadamente duas voltas de DNA enrolados em torno de um octâmero formado por pares de proteínas histonas: H2A, H2B, H3 e H4. Os nucleossomos repetitivos agrupam-se numa estrutura maior ligada por uma histona H1. Histonas são proteínas que apresentam um domínio que

se exterioriza do nucleossomo, a região amino-terminal; e um domínio carboxi-terminal (TURNER, 2005) **(Figura 1)**.

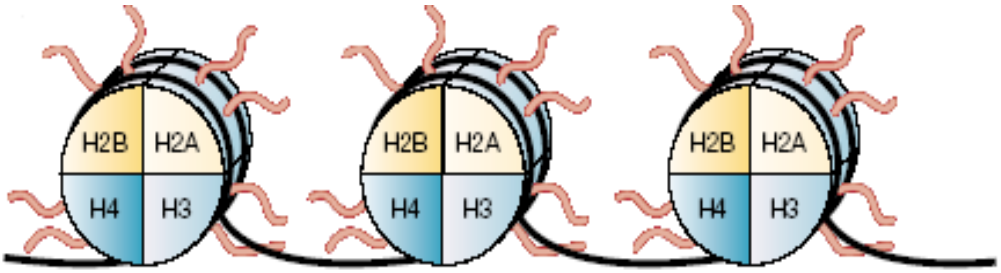


Figura 1. *Representação esquemática da estrutura das histonas. Histonas H2A, H2B, H3 e H4 enroladas pelo DNA para formar o nucleossomo, onde a região amino-terminal está em vermelho. Adaptado de MARKS et al. (2001).*

A região amino-terminal pode sofrer diversas modificações pós-transcricionais tais como acetilação, ubiquitinação e metilação dos resíduos de lisina; fosforilação de resíduos de serina e treonina e metilação de resíduos de arginina (FISCHLE; WANG; ALLIS, 2003).

Como a modificação mais estudada, a acetilação de histonas pode estar presente na H2A, H2B, H3 e H4. Na histona H3, podem estar acetilados os resíduos de lisina (K) 9, 14, 18, 23 e 27 e na H4, as lisinas 5, 8, 12 e 16 (SANTOS-ROSA; CALDAS, 2005) **(Figura 2)**.

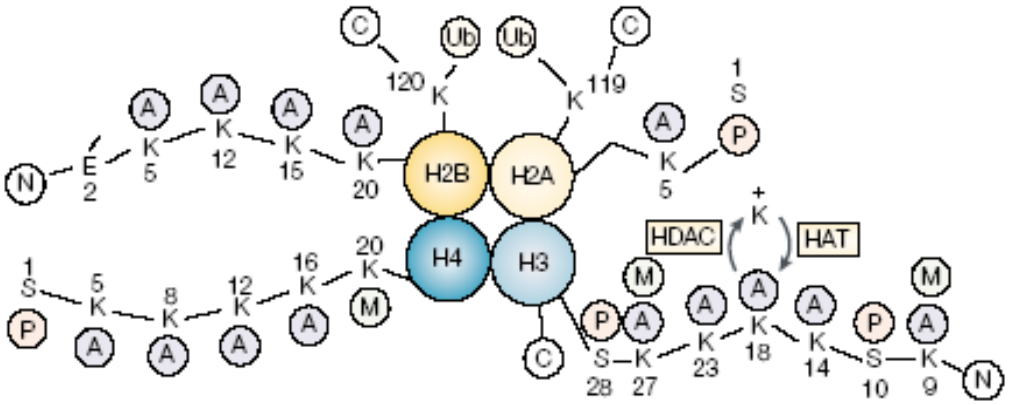


Figura 2. *Mapa de algumas modificações das histonas. Resíduos de lisina (K) da H2A, H2B, H3 e H4 são sítios potenciais para a ação das HAT/HDAC. A = acetilação; C = região carboxi-terminal; E = ácido glutâmico; M = metilação; N = região amino-terminal; P = fosforilação; S = resíduo de serina; Ub = ubiquitinação. Adaptado de MARKS et al. (2001).*

A acetilação neutraliza a carga positiva dos resíduos de lisina, diminuindo a afinidade das histonas pelo DNA, que possui carga negativa. Esse evento permite o desprendimento da terminação da histona do nucleossomo, afrouxando a estrutura da cromatina, permitindo o acesso de fatores de transcrição (GRUNSTEIN, 1997).

A regulação do estado de acetilação das histonas é comandada pelas enzimas acetilases (HAT) e desacetilases de histonas (HDAC) (Figura 2) (DAVIE, 2003). A ruptura do equilíbrio entre as enzimas HAT e HDAC pode levar à perda da atividade normal da célula e, em última instância, ao desenvolvimento da neoplasia (CHUNG, 2002). Dentre as causas desse desequilíbrio estão as mutações nos genes que codificam para as HATs e superexpressão de HDACs, com subseqüente

hipoacetilação de histonas e silenciamento gênico (FRAGA et al., 2005; SANTOS-ROSA, CALDAS, 2005).

Descreve-se que alterações em genes específicos são responsáveis pela carcinogênese: oncogenes, genes supressores de tumor e genes de estabilidade, como os que codificam para enzimas de reparo. Desta maneira, essas modificações, sejam elas genéticas ou epigenéticas, podem causar a ativação de oncogenes de forma constitutiva ou não encontrada normalmente e a inativação ou a diminuição da atividade de genes supressores de tumor, estimulando o processo neoplásico. Esses eventos acarretam aumento da proliferação, inibição da morte celular e facilidade na provisão de nutrientes pela angiogênese. Além disso, mutações em genes de estabilidade podem reduzir a capacidade de reparo de danos ao DNA, que predispõe à ação dos agentes carcinogênicos (FRIEDBERG, 2003; VOGELSTEIN, KINZLER, 2004).

1.3 Carcinogênese de Cólon.

A incidência de neoplasias de cólon tem apresentado, no mundo todo, uma tendência ao crescimento, em especial em países desenvolvidos e áreas urbanas de países menos desenvolvidos. No Brasil, com o aumento da expectativa de vida da população, as neoplasias de cólon vêm ganhando cada vez mais importância no perfil de morbidade e mortalidade, sendo responsáveis por 12% do total de casos de doenças neoplásicas diagnosticadas em 2006 (INCA: INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2006; KAMANGAR et al., 2006).

Por se tratar de um problema de saúde pública com grande impacto social, a elucidação dos eventos moleculares da carcinogênese de cólon vem recebendo muita atenção da comunidade científica principalmente nos últimos 20 anos. No final da década de 1980 procurava-se associar mecanismos genéticos, conhecidos há décadas, com recém descobertos mecanismos epigenéticos para a compreensão da transformação maligna. Desta forma, Fearon e Vogelstein analisaram biópsias de pacientes com neoplasias de cólon e constataram que para a transformação maligna são necessárias por volta de quatro alterações genéticas **(Figura 3)**. Muitas das neoplasias de cólon apresentam desenvolvimento a partir de adenomas benignos, como resultado de uma ativação de oncogenes em conjunto com a inativação de genes supressores de tumor (FEARON; VOGELSTEIN, 1990; TOYOTA et al., 2002; DAVIES, MILLER, COLEMAN, 2005; DAVIES et al., 2006).

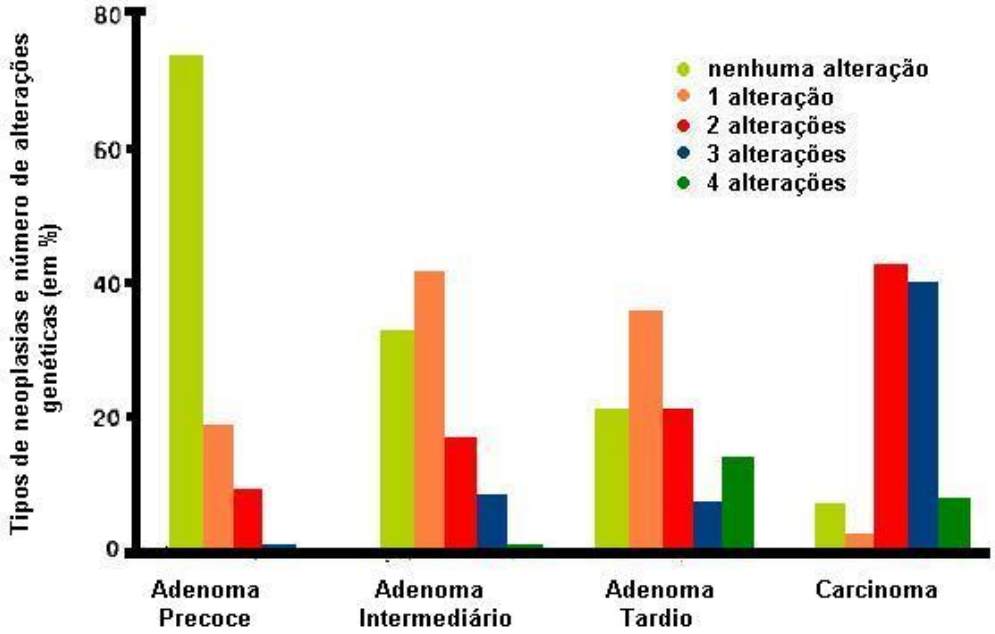


Figura 3. *Múltiplas alterações genéticas estão presentes na carcinogênese de cólon. Adenoma precoce é o que mede 1,0 cm de comprimento ou menos. Adenoma intermediário apresenta comprimento maior que 1,0 cm e não contém focos de carcinoma. Adenoma tardio mede mais do que 1,0 cm e contém focos de carcinoma. Adaptado de FEARON; VOGELSTEIN, 1990.*

Assim, sugere-se que uma das formas em que a carcinogênese de cólon tem inicio é com a inativação do gene supressor de tumor *APC* [Adenomatous Polyposis Coli (Polipose Adenomatosa Coli)], tornando o epitélio do cólon hiperproliferativo. Após o silenciamento do gene APC, uma mutação no gene *K-RAS* promove a transformação do epitélio hiperproliferativo em adenoma. A próxima etapa do processo é a inativação do gene supressor de tumor *DCC* [Deleted in Colo-rectal Câncer (Eliminado em Câncer Colorretal)], seguida pelo silenciamento do gene supressor de tumor P53, que aparentemente envolve a transformação de adenoma a carcinoma (FEARON, VOGELSTEIN, 1990) **(Figura 4)**

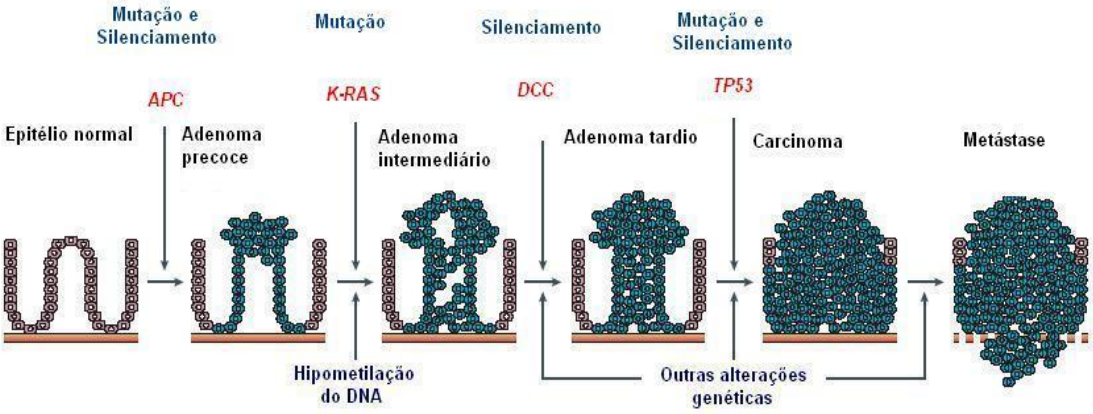


Figura 4. *A seqüência adenoma – carcinoma no cólon. A transformação do epitélio normal em adenoma na carcinogênese colorretal é caracterizada pelo acúmulo de alterações em genes específicos. Adaptado de Davies et al., 2005.*

As neoplasias do cólon, incluindo adenomas e carcinomas, são monoclonais por natureza, ou seja, provêm de uma única célula, que no epitélio normal sofre modificações que conferem uma vantagem de crescimento seletiva em relação às células epiteliais ao redor (FEARON, VOLGELSTEIN, 1990).

Acredita-se que as neoplasias se originam de *stem cells*, ou células tronco. No cólon, as células tronco são encontradas na base das criptas. Entretanto, em estágios precoces da carcinogênese, células displásicas, ou seja, que apresentam alterações morfológicas como aumento de tamanho e desorganização celular, quando observadas em cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina, são encontradas na superfície luminal da cripta (SHIH et al., 2001) **(Figura 5)**.

A **B**

Figura 5: ***A****- Pequeno pólipo adenomatoso corado com hematoxilina e eosina. As células displásicas estão localizadas na porção superior da cripta. Na região central da cripta ocorre uma transição abrupta entre o epitélio displásico e os colonócitos histologicamente normais.* ***B****- Mucosa colônica de aparência histológica normal. Adaptado de Shih et al., 2001.*

É possível que células aparentemente normais presentes na base da cripta de pequenos adenomas estejam transformadas e que a displasia se manifeste somente quando os colonócitos começem a se diferenciar e migrar para o topo da cripta, em mecanismo conhecido como "bottom-up" **(Figura 6)** (POTTEN, WILSON, BOOTH, 1997; SHIH et al, 2001).

Entretanto, as células displásicas presentes nas porções superiores das criptas representam clones mutantes que são geneticamente diferentes dos colonócitos presentes na base (SHIH et al., 2001). Assim, sugere-se que as precursoras das células displásicas possam estar localizadas nas regiões intercriptas na superfície da mucosa ao invés da

base. Assim, essas células displásicas migram lateralmente e para baixo, empurrando o epitélio nas criptas adjacentes em direção à base em um mecanismo denominado "top-down" (SHIH et al., 2001; WRIGHT; POULSOM, 2002) **(Figura 6)**.

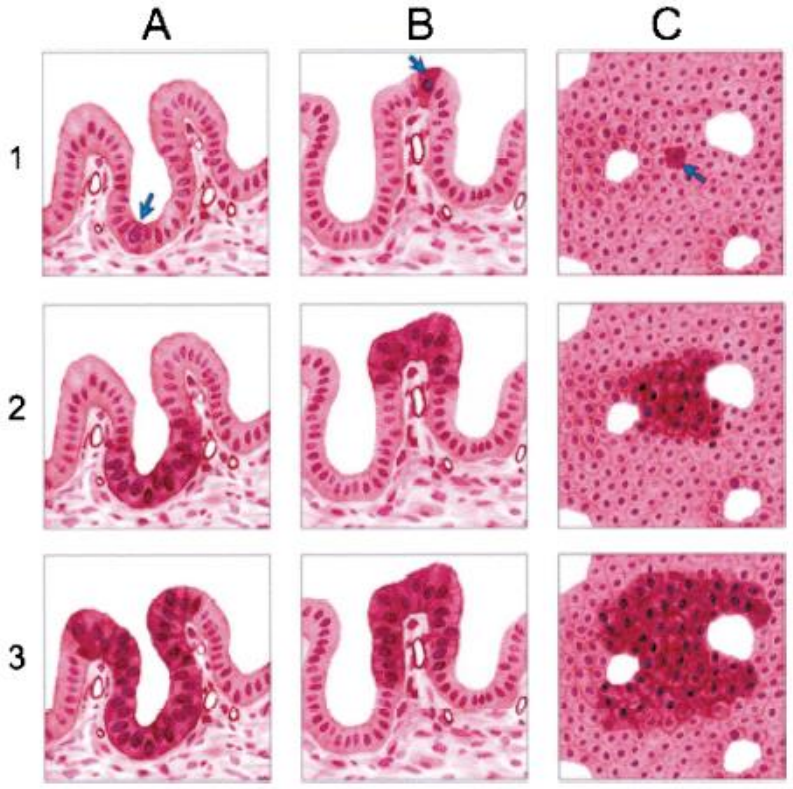


Figura 6: *Mecanismo bottom-up e down-top. Na coluna A, representação do mecanismo bottom-up, onde a célula tronco localizada na base da cripta (identificada pela seta azul) dá origem do processo de transformação displásica do epitélio, cuja evolução pode ser observada pelas linhas 2 e 3. Na coluna B, representação do mecanismo top-down, similar ao que ocorre na coluna A, porém com a célula tronco localizada na região intercriptas. Na coluna C, representação do mecanismo top-down, visualizado en face. Adaptado de Shih et al., 2001.*

1.4 Focos de Criptas Aberrantes.

Na década de 1980, Ranjana Bird analisou a superfície da mucosa do cólon de camundongo e descreveu criptas que eram mais largas,

espessas e escuras do que as demais. Essas foram referidas como focos de criptas aberrantes (FCA) e consideradas precursoras da carcinogênese de cólon (BIRD, 1987; PRETLOW et al., 1991; BIRD, GOOD, 2000).

Essas lesões se caracterizam morfologicamente por apresentarem criptas com hipercromasia quando coradas com azul de metileno, aberturas luminais variando de circular até alongada ou tortuosa, espessamento epitelial com células proeminentes e tamanho maior que as criptas adjacentes (BIRD, 1987; SIU et al., 1997).

Quando os FCAs foram descritos pela primeira vez em 1987, Bird utilizou características relacionadas com sua superfície luminal. Entretanto, especulou-se que FCAs poderiam ser displásicos (BIRD, 1987).

Dessa forma, desde a metade da década de 1990 procurou-se classificar os FCAs de modo a estabelecer uma relação entre displasia e carcinogênese de cólon. Assim, subgrupos de FCAs foram caracterizados aqueles com produção alterada de sialomucina (CADERNI, et al., 1994; JENAB; CHEN; THOMPSON, 2001), com depleção de mucina (FEMIA et al., 2001; CADERNI, et al., 2003) e com acumulo de β-catenina (YAMADA et al., 2000; YAMADA et al., 2003). Recentemente, mais um FCA foi caracterizado, os "planos" (PAULSEN et al., 2005). Vários estudos demonstraram que os FCAs displásicos, que representam apenas uma pequena fração do total, são os precursores diretos da transformação de adenomas a carcinomas (OCHIAI et al., 2003; OCHIAI et al 2005; PAULSEN et al., 2006).

Os FCAs foram extensivamente usados para a detecção de fatores que influenciam a carcinogênese de cólon em ratos tratados com

carcinógenos químicos, como a 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e azoximetano (COLPERT, PIERRE, 2005).

Estudos evidenciam a presença de grande número de FCAs em animais tratados com agentes carcinogênicos químicos como a DMH, sendo que grande parte deles desenvolveu neoplasias colônicas, mostrando que os FCAs são marcadores confiáveis de lesões pré neoplásicas em cólons (PARK et al.,1997). Tais lesões podem ser induzidas pela administração da DMH em roedores, de forma dose-dependente (DESCHNER, 1974; BRAMBILLA et al.,1978; BERRIEL et al.,2005).

Foram realizados muitos estudos para estimar o número, tamanho e distribuição de FCAs no cólon de roedores submetidos à ação de agentes carcinogênicos. Assim, constatou-se em ensaios que a quantificação e classificação dos FCAs são excelente parâmetro, com boa especificidade e sensibilidade, para se avaliar o potencial de proteção ou de risco para o desenvolvimento do câncer em modelos experimentais (PRETLOW, PRETLOW,2005).

Não se conhecem os mecanismos da transformação de FCAs em neoplasias, mas sabe-se da existência da relação entre alterações de oncogenes e de mecanismos genéticos com a formação de FCAs em seres humanos. Assim, por exemplo, mutações nos genes K-RAS e P53 estão envolvidas no desenvolvimento do câncer de cólon, associadas ao aumento do número de FCAs. Descreve-se, também, um conjunto de FCAs com multiplicidade mais elevada progredindo para lesões mais

avançadas, as quais poderiam ser exploradas como marcadores de risco para carcinogênese de cólon (SHIVAPURKAR et al.,1997).

O número e a multiplicidade de FCA no cólon variam com o tempo e indicam que as criptas estão em um estado dinâmico e que podem "remodelar" ou até mesmo regredir. Entretanto, o mecanismo pelo qual a "remodelação" ou regressão de criptas ocorre ainda não é conhecido (BIRD, GOOD, 2000; JU et al., 2003;).

1.5 Carcinogênese Química Experimental de Cólon.

A 1,2-dimetilhidrazina (DMH) ou seu metabólito azoximetano (AOM) é freqüentemente utilizada como um agente carcinogênico potente e completo, já que induz as etapas de iniciação e promoção em estudos de carcinogênese de cólon em uma relação dose resposta (KAMALEESWARI et al., 2006). A DMH induz neoplasias especificamente no cólon de animais após uma única dose (WARD, 1974). Sua ativação metabólica ocorre no fígado ou no cólon com a formação de eletrólitos reativos como o íon metildiazônio. Os metabólitos da DMH são transportados pela bile ou pelo sangue até o intestino grosso, que é o principal alvo da ação desse agente (KAMALEESWARI et al., 2006).

Os produtos do metabolismo da DMH, em especial o íon metildiazônio induzem a formação de adutos de grupos metila no DNA, mutações pontuais e separação aberrante de cromátides irmãs (NEWELL, HEDDLE, 2004). Além disso, a DMH induz a apoptose no cólon, assim como aumenta a proliferação de colonócitos (BLAKEY et al., 1985).

Animais de experimentação tratados com DMH apresentam adutos do tipo O^6-metilguanina. O mecanismo de reparo dessas lesões envolve a metilguanina metiltransferase (MGMT). Doses elevadas de DMH em animais de experimentação levam à saturação da MGMT, já que cada molécula da enzima de reparo liga-se a somente um grupo metila. Dessa forma, não ocorre o reparo total dos danos, fixando-os no DNA (NEWELL, HEDDLE, 2004).

Lesões induzidas por AOM ou DMH em roedores apresentam características histológicas semelhantes às encontradas em humanos, mas apresentam pouca tendência a formarem metástase. Essas lesões, assim como as observadas em humanos, apresentam mutações em K-ras e no gene que codifica para β-catenina. Entretanto, ao contrário do que ocorre em humanos, as lesões não apresentam mutações no gene p53 e raramente apresentam alterações no gene Apc. Entretanto, como o gene APC mutado em adenomas e carcinomoas humanos, lesões induzidas por AOM e DMH em roedores acumulam β-catenina no núcleo de colonócitos (FEMIA et al, 2001).

1.6 Quimioprevenção.

Devido à complexidade, alta mortalidade e crescente incidência de neoplasias no mundo, a prevenção é o método mais adequado para o controle dessa doença (SPORN, 1976; SPORN, SUH, 2002).

Nas décadas de 1960 e 1970, surgiam indícios de que as doenças neoplásicas estavam relacionadas a fatores ambientais, e que, portanto,

poderiam ser prevenidas. Nessa época, diversos epidemiologistas observaram os efeitos da imigração e das mudanças de hábito nas populações, juntamente com modificações nos tipos de doenças neoplásicas malignas (ALCANTARA, SPECKMANN, 2006).

Desse modo, em 1981, Doll e Peto publicaram uma importante revisão, relatando que as neoplasias malignas eram passíveis de prevenção ao observar que as diferentes taxas de incidência de câncer entre os países poderiam ser atribuídas, em parte, aos fatores ambientais e ao estilo de vida, como fumo, comportamento reprodutivo, exposição ocupacional a carcinógenos e alimentação. Esses pesquisadores chegaram à conclusão de que modificações na alimentação poderiam reduzir em 35% a mortalidade por doenças neoplásicas nos Estados Unidos (com uma variação de 10 a 70%) (DOLL, PETO,1981).

De Flora e Ferguson (2005) discorreram a respeito das 3 formas para se prevenir o câncer: a prevenção primária, aplicada a indivíduos saudáveis e que, inclui, portanto, a inibição da iniciação e promoção; a prevenção secundária, direcionada a pacientes em estágios precoces da doença, podendo inibir a etapa de conversão da neoplasia benigna em maligna; e a prevenção terciária, com a qual se evitam metástases ou recidivas do câncer.

A maior parte dos estudos visa a prevenção secundária, isto é acaba incidindo em pacientes que já têm o diagnóstico de câncer. O bloqueio dos agentes etiológicos, ou seja, a prevenção primária seria a abordagem mais adequada, pois diminuiria a incidência de neoplasias em

populações de alto risco (SPORN; LIBY, 2005). A aplicação de vacinas contra alguns tipos de neoplasias (LOLLINI et al., 2006) e a eliminação do hábito de fumar (VINEIS et al., 2004) são medidas possíveis em prevenção primária do câncer. Porém, na maior parte das situações esse objetivo torna-se inviável, já que estamos constantemente expostos a uma mistura de agentes que podem agir em diferentes estágios da carcinogênese (HURSTING et al., 1999) e, além disso, mais de 50% das causas de neoplasias malignas humanas são ainda desconhecidas (WATTENBERG, 1997).

Diversos estudos epidemiológicos ou com animais já enfocaram a relação direta entre dieta e neoplasias de pulmão, cólon, mama, próstata, estômago, bexiga, entre outros (AICR/WCRF, 1997; KELLOFF et al., 2000; FORMAN ET AL., 2004), sendo que o consumo de frutas, hortaliças e fibras revelaram ter um efeito protetor (DOLL, 1990; AGGARWAL; SHISHODIA, 2006; ALCANTARA; SPECKMANN, 2006); ao contrário da ingestão de gordura e carne vermelha (BIRT, 1987; DOLL, 1990). Esse efeito protetor se deve principalmente à ação dos compostos bioativos presentes nesses alimentos (CBAs) (DAVIS, MILNER, 2004).

Nesse sentido, insere-se o conceito da quimioprevenção, como o método mais apropriado para se evitar o câncer que consiste na prevenção, inibição ou reversão das etapas iniciais da carcinogênese, ou seja, antes da progressão, pela administração de um ou mais compostos químicos sintéticos ou naturais (STONER, MORSE, KELLOFF, 1997).

Assim, diversos compostos apresentam atividade quimiopreventiva na carcinogênese de cólon. Entre eles, destacam-se os antiinflamatórios

não esteroidais, como o ácido acetil salicílico e o piroxicam, além dos inibidores seletivos de cicloxigenase 2 (CORPET, PIERRE, 2005). Dentre os compostos bioativos presentes nos alimentos (CBAs), destacam-se o sulfeto de dialila (KATSUKI et al., 2006) e o ácido butírico (SENGUPTA, MUIR, GIBSON, 2006).

A atividade quimiopreventiva de certos compostos em modelos experimentais com animais é essencial para que se prossiga com ensaios clínicos (SPORN; SUH, 2002). Portanto, a busca de mecanismos que elucidem a influência dos alimentos no câncer contribui para esclarecer aspectos fundamentais da carcinogênese e do comportamento biológico das neoplasias malignas, além de promover um grande impacto em estratégias de prevenção (AMES, GOLD, WILLETT, 1995).

1.7 Vitamina A, Tributirina e Quimioprevenção

Vitamina A e seus análogos são essenciais a processos fisiológicos como visão, reprodução, desenvolvimento embrionário, hematopoiese e para manutenção do estado normal de diferenciação de numerosos tecidos e tipos celulares. Fontes importantes de vitamina A pré-formada (isto é, ésteres de retinila) na alimentação são constituídas exclusivamente por produtos de origem animal como, por exemplo, fígado, ovos e leite (LOTAN, 1996; CAMPBELL et al., 2004).

Os retinóides formam um grupo de análogos estruturais e funcionais da vitamina A. Uma das primeiras evidências do papel dos retinóides na prevenção do câncer foi em 1925 quando a vitamina A foi

descrita como fundamental para a homeostase celular (WOLBACH, HOWE, 1925).

Diversos estudos utilizando animais de experimentação mostraram a ação quimiopreventiva da vitamina A em modelos de carcinogênese em diversos órgãos, como fígado (SILVEIRA et al., 2001; FONSECA et al., 2005) e cólon (DELAGE et al., 2004; DELAGE et al., 2005).

Um dos mecanismos de atividade quimiopreventiva da vitamina A é a indução da apoptose, como observado em cultura de células neoplásicas de cólon (MAZIERE, et al., 1997). Já o ácido retinóico todo trans, análogo à vitamina A, apresentou grande capacidade de induzir a diferenciação de células HT29, sendo mais potente nesse parâmetro quando comparado com outros possíveis agentes quimiopreventivos, como o butirato de sódio (REYNOLDS, RAJAGOPAL, CHAKRABARTY, 1998).

Os efeitos da vitamina A ou de seus análogos podem ser mediados por receptores nucleares que incluem os para ácido retinóico (RAR) e os para retinóides X (RXR). Cada receptor apresenta três subtipos, que existem em diferentes isoformas. O silenciamento do gene para o receptor nuclear RAR-$_2$ na carcinogênese é um evento epigenético que ocorre por metilação da região promotora. Sugere-se que esse fenômeno pode ser considerado como um biomarcador para carcinogênese de mama (BEAN et al., 2005) e também para neoplasias de pulmão (XIU, 2006). Considera-se, também, que tal gene seja um supressor de tumor (MARK et al., 1999; ESTELLER, 2003).

Dessa forma, modelos experimentais in vivo, estudos epidemiológicos e testes clínicos fornecem subsídios para a utilização da vitamina A e retinóides na quimioprevenção e terapia do câncer (DRAGNEV, RIGAS, DMITROVSKY, 2000).

A tributirina é um triacilglicerol que contém três moléculas de ácido butírico esterificadas com o glicerol **(Figura 7)**, e está presente no leite e seus derivados (LAI et al., 1997; PARODI, 1997).

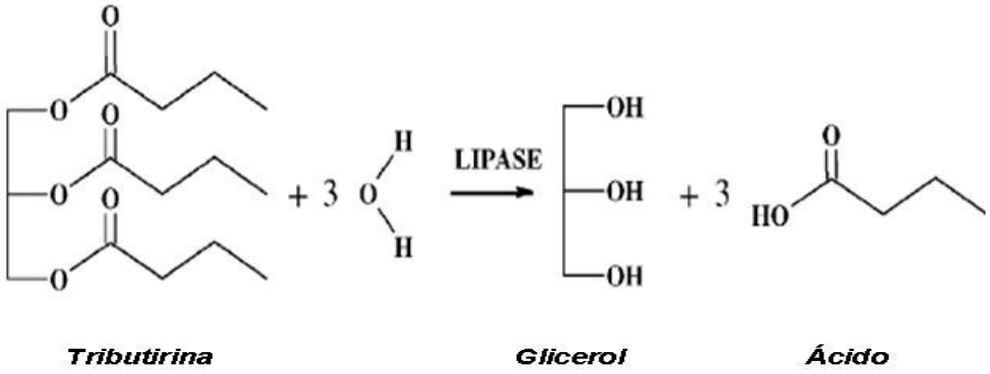


Figura 7. *Esquema da hidrólise de uma molécula de tributirina pela lipase pancreática para dar origem a 3 moléculas de ácido butírico.*

Com relação às propriedades antineoplásicas da tributirina, demonstrou-se que o tratamento com essa substância causou bloqueio da proliferação e indução da apoptose de um maior número de células, quando comparado à administração equimolar de seu metabólito, o ácido butírico, em linhagem de câncer de próstata (KUEFER et al., 2004). A administração da tributirina mostrou ser eficiente também na indução da apoptose em linhagem de hepatocarcinoma (WATKINS et al., 1999) e de câncer de mama (HEERDT et al., 1999).

No que se refere à diferenciação celular, o tratamento com a tributirina foi mais eficiente que a administração do ácido butírico em linhagem de leucemia (CHEN; BREITMAN, 1994). Outros estudos demonstraram a indução da diferenciação pelo tratamento de linhagens de câncer de cólon e próstata, este último associado ao aumento da expressão de diversos genes (SCHRÖDER, MAURER, 2002; FLORYK, HUBERMAN, 2005).

Estudos in vivo com tributirina e carcinogênese de cólon são raros na literatura. Uma exceção é o de Deschner et al., (1990) que não relataram ação quimiopreventiva digna de nota da tributirina. Após 48 semanas da iniciação com AOM e de tratamento dos animais com tributirina adicionada à ração de camundongos, não houve redução da incidência, número e tamanho de focos displásicos, apesar de quantidades significativas de ácido butírico terem sido encontradas nas fezes.

Como o ácido butírico apresenta ações antineoplásicas relacionadas a sua atuação como inibidor da enzima desacetilase de histonas (HDACi), especula-se que a tributirina possa apresentar o mesmo mecanismo de ação. A inibição das HDAC promove um estado de hiperacetilação de histonas e de demais proteínas, modulando a transcrição de vários genes (DRUMMOND et al., 2005).

Ao contrário do silenciamento transcricional por modificações genéticas, eventos epigenéticos não interferem com o conteúdo da informação dos genes afetados e são potencialmente reversíveis. Assim na carcinogênese de cólon observa-se um estado de hipometilação

global, que pode ser modulado com a administração de agentes quimiopreventivos (TAO et al., 2004).

A associação entre retinóides e HDACi apresentou resultados positivos em vários estudos recentes (KNOW et al., 2006; SANTOS, ZAMBRANO, ARANDA, 2007; OHNUMA-ISHIKAWA et al., 2007; KATO et al., 2007) e não há descrições na literatura quanto a seu emprego em modelo de carcinogênese de cólon.

Dessa forma, pretendeu-se neste estudo avaliar as eventuais atividades quimiopreventivas da vitamina A e da tributirina quando administrados isoladamente ou em associação em ratos Wistar iniciados com DMH durante os períodos de iniciação e pós-iniciação em modelo de carcinogênese de cólon. Além disso, a investigação de possíveis mecanismos que poderiam estar relacionados com a eventual atividade quimiopreventiva da vitamina A, tributirina ou associação dessas substâncias foi realizada por meio da avaliação de danos e do padrão de metilação global do DNA na mucosa do colônica.

2- OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as eventuais atividades quimiopreventivas da vitamina A, tributirina ou da associação dessas substâncias na carcinogênese de cólon.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar em ratos tratados ou não com vitamina A, tributirina ou com a associação dessas substâncias quando administradas continuamente durante as etapas de iniciação e pós-iniciação de modelo de carcinogênese de cólon:

- danos no DNA de células colônicas;
- padrão de metilação global do DNA.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com massas iniciais compreendidas 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). Os animais permaneceram durante todo o experimento nas seguintes condições: temperatura de 22°C ± 2°C e ciclo de iluminação claro-escuro de 12 h. Estes tiveram livre acesso à água filtrada e ração comercial peletizada para roedores de laboratório (Purina Nutrimentos Ltda., Brasil). Os animais foram acomodados em caixas de polipropileno (não excedendo a 4 ratos por caixa) e assoalho forrado com raspas de madeira, mantidos segundo as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF-USP, que aprovou este estudo. Suas massas corpóreas e consumo de ração foram avaliados diariamente.

3.2. Modelo de Carcinogênese de Cólon

O modelo de carcinogênese de cólon consistiu na administração intraperitonial de 4 doses de DMH (40 mg/Kg p.c), sendo as duas primeiras na terceira e as duas restantes na quarta semana de experimento, dissolvida em EDTA (1 mM em solução salina 0,9%) e pH 6,5 (WARGOVICH et al., 2000). Os animais foram eutanaziados na 9º semana.

3.3 Protocolo Experimental

Os animais foram aleatorizados e após um período de aclimatação de 3 dias deu-se início ao modelo experimental **(Figura 8)**. Do total de 70 animais, 10 não foram iniciados com DMH e nem submetidos a qualquer tratamento e permaneceram nas mesmas condições ambientais dos demais ratos **[Grupo não iniciado (NI)]**. O restante foi dividido em 4 grupos experimentais:

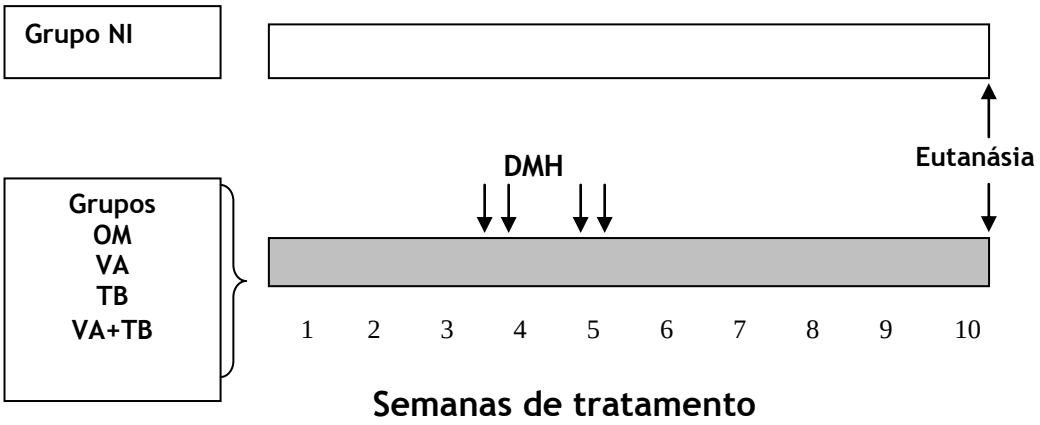
Grupo óleo de milho + maltodextrina (OM); controle dos grupos experimentais: "VA, TB e VA+TB". Os 15 animais desse grupo foram iniciados com DMH e receberam, em dias alternados, óleo de milho (Mazola®; 0,25 mL/100 g p.c./dia) e maltodextrina (CriAlimentos; 300 mg/100g p.c/dia) como controle isocalórico [6 Kcal/g (GIOIELLI, 2002)] por entubação gástrica.

Grupo vitamina A (VA): composto por 15 animais que foram iniciados com DMH e receberam, em dias alternados, vitamina A (palmitato de retinila, Basf, Alemanha; 1 mg/100 g p.c/dia) dissolvido em OM (Mazola®; 0,25 mL/100 g p.c./dia) e diariamente maltodextrina (controle isocalórico) (CriAlimentos; 0,42 mL/100g p.c/dia) por entubação gástrica.

Grupo tributirina (TB): grupo experimental com 15 animais que foram iniciados com DMH e receberam, diariamente, tributirina (Aldrich, EUA; 200 mg/100g p.c/dia) e, em dias alternados, óleo de milho (Mazola®; 0,25 mL/100 g p.c./dia) por entubação gástrica.

Grupo vitamina A + tributirina (VA+TB): Grupo experimental com 15 animais que foram iniciados com DMH e receberam vitamina A (palmitato de retinila, Basf; Alemanha; 1 mg/100 g p.c./dia) dissolvido em OM (Mazola®; 0,25 mL/100 g p.c./dia) em dias alternados e tributirina (Aldrich, EUA; 200mg/100 g p.c./dia), diariamente por entubação gástrica.

Os tratamentos com as substâncias tiveram início 2 semanas antes da aplicação da DMH e duração total de 9 semanas (WARGOVICH et al., 2000) conforme apresentado na **figura 8.**



Grupo NI: grupo não iniciado.

Grupo OM: grupo óleo de milho (0,25 mL/100 g p.c) + maltodextrina (300 mg/100 g p.c).

Grupo VA: grupo vitamina A (1 mg/100 g p.c) + maltodextrina (300 mg/100 g p.c).

Grupo TB: grupo tributirina (200 mg/100 g p.c) + óleo de milho (0,25 mL/100 g p.c).

Grupo VA+TB: grupo vitamina A (1 mg/100 g p.c) + tributirina (200 mg/100 g p.c).

DMH: 1,2-dimetilhidrazina (40 mg/ kg p.c).

Figura 8: Desenho experimental.

3.4 Eutanásia e Coleta dos Cólons.

Na noite anterior à eutanásia, foram retiradas as rações. Os animais foram anestesiados com éter etílico (Merck, Alemanha). Após o início da anestesia, os ratos foram colocados em decúbito dorsal sobre uma prancha, realizando-se a laparotomia. A morte dos animais ocorreu por secção da aorta abdominal e conseqüente choque hipovolêmico.

O intestino grosso de todos os ratos foi removido e lavado em solução salina gelada 0,9%. A seguir, ele foi colocado em moldura de papel de filtro e aberto longitudinalmente, sendo que para as análises foi considerada a porção do cólon a partir de 1cm do ceco até 1cm do ânus, aproximadamente (DAVIDSON, et al., 2000).

O cólon foi dividido longitudinalmente em dois hemicólons. Um deles foi mantido em moldura de papel de filtro, identificada adequadamente, e conservado em etanol a 70% a 4°C para a pesquisa de FCAs (KOB-EK-JARSEN et al., 2005). Já a partir do outro hemicólon foram coletadas as células da mucosa por raspagem com lâmina de bisturi. O material obtido foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a –80°C (DAVIDSON et al., 2000; WALI et al., 2002).

3.5 Pesquisa de FCAs

Os hemicólons conservados em etanol a 70% foram divididos em porção proximal e distal (WALI et al., 2002). A porção proximal apresentava características morfológicas singulares, como o

espessamento de suas camadas musculares e, com isso, a formação de pregas, facilmente observadas próximas ao ceco. Já a porção distal apresenta morfologia plana e camada muscular menos espessa, exceto na região retal, que foi descartada.

As porções proximal e distal dos hemicólons foram coradas com azul de metileno a 0,02% em PBS (NaCl 137 mM; Na2HPO4 10 mM; KCl 2,68 mM; KH2PO4 1,76 mM e água ultra-pura, pH 7,4) durante 10min. Após a coloração, foram dispostos em lâmina de vidro e medidos quanto ao comprimento e largura para cálculo da área. A seguir foram analisados ao microscópio (Axiovert, Zeiss, Alemanha) nos aumento de 40X e quanto à incidência de FCAs e números de criptas por foco (1, 2, 3 ou ≥ 4 criptas conforme WU et al., 2004).

3.6 Avaliação de Danos no DNA de Células da Mucosa do Cólon.

A avaliação de danos no DNA em amostras da mucosa do cólon previamente armazenadas a – 80° C foi realizada utilizando-se o método do "cometa" descrito por SINGH et al. (1988), com modificações. Esse método avalia quebras nas fitas de DNA e, na versão alcalina, quebras em fitas simples, sítios álcalis lábeis e danos decorrentes principalmente da ação de espécies reativas de oxigênio (COLLINS, 2004).

Assim, amostras de aproximadamente 10 mg de mucosa de cólon foram homogeneizadas delicadamente em PBS a 4ºC. As células isoladas foram, então, imobilizadas em matriz de agarose de baixo ponto de

fusão “low-melting” (Sigma, USA) a 0,08% em PBS sobre lâmina de vidro previamente tratada com a mesma agarose a 0,05%.

Posteriormente, as células imobilizadas foram submetidas à lise durante 1 hora em solução apropriada (NaCl 2,5 M; Trizma base 10 mM; Na_2-EDTA 100 mM; pH 10,0 e adição de Triton X-100 a 1%) e em seguida, lavadas 3 vezes durante 10 min com água ultra-pura gelada. Após as lavagens, as lâminas foram mantidas em repouso por 20 minutos em tampão de eletroforese (NaOH 300 mM e 1 mM de Na2-EDTA, pH $\leq$13,0) para que as fitas de DNA fossem desenroladas. Logo a seguir ocorreu a eletroforese (25 V, por 20 min em cuba Hoefer-HE 99X, EUA). Todas as etapas descritas ocorreram a 4°C e ao abrigo da luz.

Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com solução de Tris (0,4 M, pH 7,5). Os nucleóides resultantes foram fixados em solução de ácido tricloroacético (TCA) a 15% e corados com nitrato de prata a 0,02%.

Amostras da mucosa de cólon de ratos do grupo não iniciado foram sensibilizadas ou não com peróxido de hidrogênio (concentração final 10%, 5 minutos, em temperatura ambiente e sob sonicação) foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

O comprimento dos nucleóides foi avaliado utilizando-se sistema de análise de imagem computadorizada, composto por microscópio (Carl Zeiss Axiostar Plus, Alemanha) ao qual se encontra acoplado uma câmera de vídeo (Pixelink Megapixel FireWier camera 3.2, Alemanha) que se conecta a um microcomputador equipado com o programa Axio Vision 40V 4.5 (Carl Zeiss, Alemanha). Foram analisados aleatoriamente 100

cometas por animal, excluindo aqueles com aparência de nuvem ou com dimensões reduzidas da cabeça ("semelhante a um pino de boliche") (ONG et al., 2005). Os resultados foram expressos em comprimento do cometa, já que há uma relação direta entre esta grandeza e o dano no DNA (McCARTHY et al, 1997).

3.7 Avaliação do Padrão de Metilação Global do DNA nas Células da Mucosa do Cólon.

A avaliação do padrão de metilação global do DNA em amostras da mucosa do cólon previamente armazenadas a – 80° C foi realizada utilizando-se a técnica de "dot-blot" (imobilização do DNA em forma de ponto em uma membrana) de acordo com ALYAQOUB et al., 2006. Para tanto, foram realizados os seguintes procedimentos:

3.7.1 Extração do DNA de Células da Mucosa do Cólon.

Para extração do DNA de células da mucosa do cólon foi utilizado o reagente ChargeSwitch®gDNA Mini Tissue Kit (Invitrogen, EUA), cujo mecanismo é baseado na modulação das condições de pH durante a extração e purificação do DNA, que, em pH ácido, se liga em micro-esferas. Estas apresentam propriedades magnéticas e com auxílio de uma estante para microtubos apropriada (MagnaRack™, Invitrogen, EUA) foi realizada a separação do DNA dos demais contaminantes (proteínas e RNA).

De forma detalhada, foram triturados 10 mg de mucosa de cólon em nitrogênio líquido e adicionado 1 mL tampão de lise do reagente com 20 μL de proteinase K (Invitrogen, EUA). As amostras foram mantidas em Termomixer™ (Eppendorf, Alemanha), a 55 °C durante 1 hora. Logo após, foram adicionados 10 μL de Rnase A (Invitrogen, EUA) seguidos por 2 min de incubação em temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 120 μL de solução contendo esferas magnéticas (Magnetic Beads) e 100 μL do tampão de purificação do reagente. Com auxílio da estante (MagnaRack™ Invitrogen, EUA), a porção que não ficou ligada as esferas magnéticas foi descartada.

O DNA foi eluído com 10 mM Tris-HCL, pH 8.5 e quantificado espectrofotômetro específico (NanoDrop™, modelo ND 1000, EUA).

3.7.2 "Dot Blot".

Amostras de DNA (1 μg) de células da mucosa do cólon foram desnaturadas em 100 μL de solução contendo 0,4 M de NaOH e 10 mM de EDTA a 100ºC durante 10 min e neutralizadas com solução 2 M de acetato de amônio. A seguir, com auxílio de um aparato específico para "dot blot" (Bio-Dot Microfiltration Apparatus (Bio-Rad Laboratories, EUA) que possibilita uma condição de pressão negativa, as amostras de DNA foram imobilizadas em membrana de nitrocelulose (HybondTM, Amersham Bioscicence, Inglaterra).

Posteriormente, a membrana foi mantida em temperatura ambiente por 40 min com a finalidade de secá-la e o DNA foi fixado na

mesma com auxílio de forno de radiação UV (Crosslinker, Hoefer, EUA). Em seguida a membrana foi bloqueada com solução de leite desnatado 5% em PBS-T [1% Tween 20 (Sigma, EUA) em PBS] por uma hora, lavadas três vezes durante 10 min com PBS-T e logo após foi aplicado anticorpo primário monoclonal anti-5-metilcitosina (Serotec, Inglaterra), na diluição 1:1000 em PBS por duas horas. Em seguida, a membrana foi lavada com PBS-T e incubada com anticorpo secundário anti IgG de coelho (Amersham, Inglaterra) por 2 h.

Após a incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi lavada com PBS-T. Para a revelação, foi utilizado reagente ECL [Enhanced Chemiluminescence (Amersham, Inglaterra)] cujo princípio é a reação de uma diacil-hidrazina cíclica com peróxido de hidrogênio, catalizada por peroxidase (presente no anticorpo secundário), cujo produto emite luz no comprimento de onda de 480 nm (IACCSON, WATERMARK, 1974) que foi detectável em filme de auto-radiografia (Kodak, Brasil). A intensidade do sinal foi determinada por leitura em densitômetro (Bio Rad, modelo GS-700, EUA). Para controle da aplicação das amostras de DNA, a membrana foi corada com azul de metileno 0,1% (ALYAQOUB et al., 2006; ONG et al., 2006).

3.8 Análise Estatística

Para a realização da análise estatística utilizou-se o programa GraphPad Instat versão 3.05 (San Diego, EUA). Todos os dados foram testados quanto à distribuição normal (testes de Kolmogorov e Smirnof) e

à homogeneidade de variância (teste de Bartlett). As comparações entre os grupos experimentais, quando os dados apresentavam distribuição normal e homogeneidade de variância, foram realizadas pelo teste one-way ANOVA, seguido de teste de Tukey. Nos casos em que a distribuição não se apresentou normal ou sem homogeneidade de variância, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. Em todos os casos, o nível de confiança adotado foi de 95% ($p < 0,05$).

4- RESULTADOS

4.1 Crescimento dos Animais

As massas corpóreas inicial e final dos ratos submetidos a modelo de carcinogênese de cólon e tratados com óleo de milho (grupo OM), vitamina A (grupo VA), tributirina (grupo TB) e associação da vitamina A com a tributirina (grupo VA+TB) estão apresentadas na **tabela 1**.

Tabela 1: Massa corpórea inicial e final de ratos tratados ou não com vitamina A ou tributirina, isoladamente ou em associação e submetidos a modelo de carcinogênese de cólon.

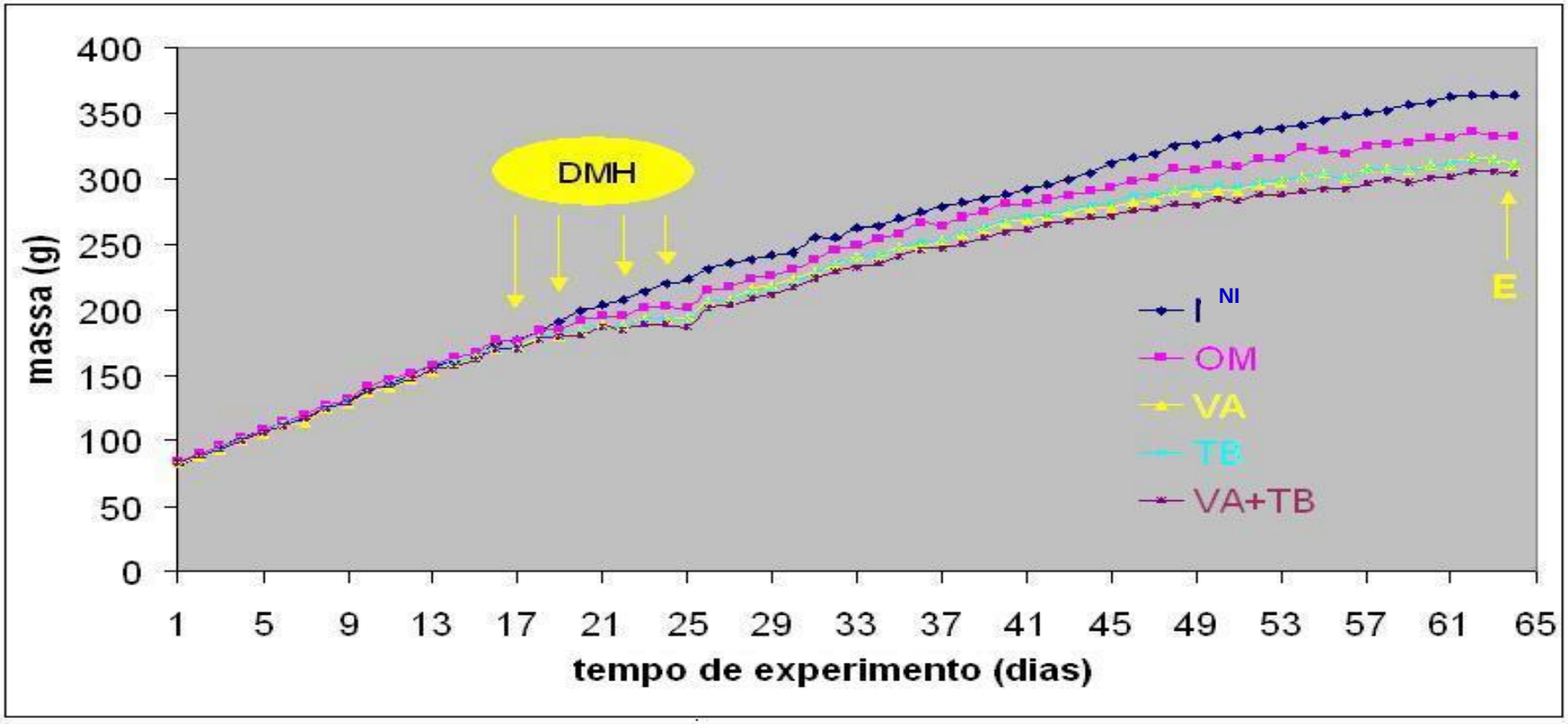
Grupos	Massa Inicial (g)	Massa Final (g)
NI	81,9 ± 8,4	363 ± 14
OM	83,8 ± 5,7	333 ± 26[a]
VA	83,0 ± 4,9	312 ± 21[a]
TB	83,9 ± 5,4	311 ± 21[a]
VA+TB	83,4 ± 3,6	304 ± 15[a]

Média das massas (em gramas) ± desvio padrão.
NI: grupo não iniciado.
OM : grupo óleo de milho + maltodextrina.
VA: grupo vitamina A.
TB: grupo tributirina.
VA+TB: grupo associação da vitamina A com tributirina.

[a]diferença estatisticamente significante em relação ao grupo não tratado ($p<0,05$), segundo o teste ANOVA seguido do teste de Tukey.

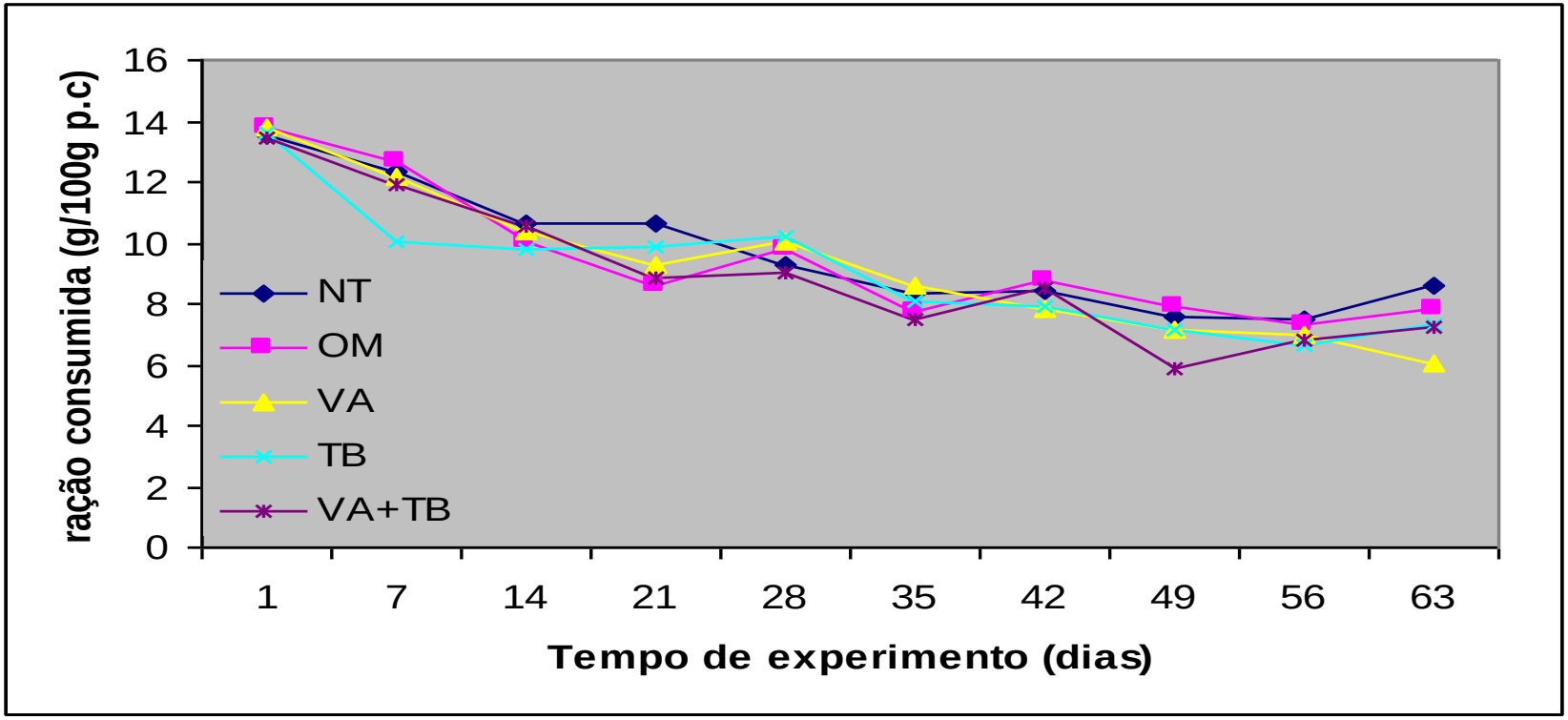
Dessa forma, é possível se verificar que as massas corpóreas iniciais dos diferentes grupos foram semelhantes, o que indica que a distribuição dos animais foi realizada de forma adequada e aleatória. Em comparação ao grupo de animais não iniciados, observou-se nos grupos experimentais (OM, VA, TB e VA+TB) menores ($p<0,05$) massas corporais finais.

Na **figura 9** está apresentada a evolução da massa corpórea dos ratos não iniciados (grupo NI) e dos submetidos a modelo de carcinogênese de cólon (grupos OM, VA, TB e VA+TB) em período compreendendo as etapas de iniciação e pós-iniciação. Pode-se observar que os animais de todos os grupos experimentais ganharam massa corpórea de forma homogênea durante todo o experimento.



DMH: 1,2 dimetilhidrazina; E: eutanásia; NI: não iniciado; OM: óleo de milho+ maltodextrina; VA: vitamina A; TB: tributirina; VA+TB: associação de vitamina A com tributirina.

Figura 9: ***Evolução da massa corpórea de ratos Wistar tratados ou não com vitamina A e tributirina, isoladamente ou em associação e submetidos a modelo de carcinogênese de cólon.***



NI: não iniciado; OM: óleo de milho + maltodextrina; VA: vitamina A; TB: tributirina; VA+TB: associação entre VA e TB.

Figura 10: ***Evolução do consumo de ração de ratos tratados ou não com vitamina A e tributirina, isoladamente ou em associação e submetidos a modelo de carcinogênese de cólon.***

A **Figura 10** apresenta a evolução do consumo de ração dos animais não iniciados (grupo NI), e dos submetidos à modelo de carcinogênese de cólon (grupos OM, VA, TB e VA+TB). Não foi observada diferença estatisticamente significante entre o consumo de ração dos animais iniciados com DMH e tratados ou não com vitamina A ou tributirina, isoladamente ou em conjunto e os animais que não que não foram iniciados.

4.2 Pesquisa de Focos de Criptas Aberrantes.

A análise dos hemicólons corados com azul de metileno mostrou que FCAs foram observados somente nos animais que receberam DMH. Grande parte dos focos de criptas aberrantes estava localizado na porção distal dos hemicólons.

A **tabela 2** apresenta os dados referentes à pesquisa de focos de criptas aberrantes localizados em toda a extensão dos hemicólons, incluindo a relação FCAs/cm^2 e FCAs $\geq$ 4 cm^2 dos ratos submetidos a modelo de carcinogênese de cólon e tratados ou não com vitamina A ou tributirina, isoladamente ou em associação.

Tabela 2: Quantidade média de FCAs, FCAs ≥ 4 e relações FCAs/cm^2 e FCAs ≥ 4/cm^2 em toda a extensão dos hemicólons de ratos submetidos a modelo de carcinogênese e tratados ou não com vitamina A ou tributirina, isoladamente ou em associação.

Grupos	N	FCAs	FCAs ≥ 4	FCAs/cm^2	FCAs ≥ 4/cm^2
OM	14	45 ± 17	4,6 ± 2,1	6,6 ± 3,0	0,68 ± 0,05
VA	15	44 ± 19	4,2 ± 2,9	5,5 ± 2,3	0,51 ± 0,35
TB	15	38 ± 14	2,3 ± 2,1	4,2 ± 1,8	0,25 ± 0,22[a]
VA+TB	13	53 ± 30	5,0 ± 3,6	5,9 ± 3,2	0,53 ± 0,33

OM : grupo óleo de milho + maltodextrina (controle).
VA: grupo vitamina A.
TB: grupo tributirina.
VA+TB: grupo associação entre vitamina A e tributirina.
N: número de animais.
FCAs: Focos de criptas aberrantes.
FCAs ≥ 4: Focos com 4 ou mais criptas aberrantes.

[a]diferença estatisticamente significante em relação ao grupo OM (p<0,05), segundo o teste Kruskal-Wallis.

Analisando-se toda a extensão dos hemicólons não foram observadas diferenças significativas entre a quantidade de FCAs nos grupos experimentais, conforme demonstrado na **tabela 2**. A quantidade de FCAs com 4 ou mais criptas também não apresentou diferença significativa.

Considerando a relação dos FCAs pela área dos hemicólons, não foram observadas diferenças estatísticas significantes. Quando são considerados os focos com 4 ou mais criptas aberrantes, que são considerados mais agressivos, o grupo TB apresentou menor número (p<0,05) em relação ao grupo OM.

A **tabela 3** apresenta os dados referentes à pesquisa dos focos de criptas aberrantes localizados na porção proximal dos hemicólons, incluindo a relação FCAs/cm^2 e FCAs $\geq$ 4/cm^2 dos ratos submetidos a modelo de carcinogênese de cólon e tratados ou não com vitamina A ou tributirina, isoladamente ou em associação.

Tabela 3: Quantidade média de FCAs, FCAs ≥ 4 e relações FCAs/cm^2 e FCAs ≥ 4/cm^2 na porção proximal dos hemicólons de ratos submetidos a modelo de carcinogênese e tratados ou não com vitamina A ou tributirina, isoladamente ou em associação.

Grupos	N	FCAs	FCAs ≥ 4	FCAs/cm^2	FCAs≥4/cm^2
OM	14	12 ± 5	1,0 ± 1,0	3,53 ± 2,00	0,32 ± 0,05
VA	15	9 ± 4	0,5 ± 0,7	2,09 ± 0,86	0,11 ± 0,15
TB	15	10 ± 6,5	0,3 ± 0,6	2,34 ± 1,50	0,05 ± 0,11[a]
VA+TB	13	17,7 ± 14	1,2 ± 1,3	4,04 ± 3,20	0,28 ± 0,31

OM: grupo óleo de milho + maltodextrina (controle).
VA: grupo vitamina A.
TB: grupo tributirina.
VA+TB: grupo associação entre vitamina A e tributirina.
N: número de animais.
FCAs: Focos de criptas aberrantes.
FCAs ≥ 4: Focos com 4 ou mais criptas aberrantes.

[a]diferença estatisticamente significante em relação ao grupo OM (p<0,05), segundo o teste Kruskal-Wallis.

Não foram observadas diferenças significativas na quantidade de FCAs na porção proximal dos hemicólons entre os grupos experimentais, conforme os dados apresentados na **tabela 3**. A quantidade de FCAs com 4 ou mais criptas também não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais.

Considerando a relação dos FCAs pela área, não foram observadas diferenças estatísticas significantes. Quando são considerados os FCAs com 4 ou mais criptas, o grupo TB apresentou menor número (p<0,05) em relação ao grupo OM.

A **tabela 4** apresenta os dados referentes à pesquisa dos focos de criptas aberrantes localizados na porção distal dos hemicólons, incluindo a relação FCAs/cm^2 e FCAs ≥ 4cm^2 dos ratos submetidos a modelo de carcinogênese de cólon e tratados ou não com vitamina A ou tributirina, isoladamente ou em associação.

Tabela 4: Quantidade média de FCAs, FCAs ≥ 4, área média analisada e relações FCAs/cm^2 e FCAs ≥ 4/cm^2 na porção distal dos hemicólons de ratos submetidos a modelo de carcinogênese e tratados ou não com vitamina A ou tributirina, isoladamente ou em associação.

Grupos	N	FCAs	FCAs ≥ 4	FCAs/cm^2	FCAs≥4/cm^2
OM	14	34 ± 18	4,0 ± 1,2	9,8 ± 5,1	1,04 ± 0,41
VA	15	35 ± 18	3,7 ± 3,0	9,9 ± 5,7	1,00 ± 0,80
TB	15	27 ± 13	2,1 ± 2,1	6,3 ± 3,6	0,47 ± 0,50[a]
VA+TB	13	35 ± 22	3,8 ± 3,2	7,9 ± 4,4	0,75 ± 0,50

OM: grupo óleo de milho + maltodextrina (controle).
VA: grupo vitamina A.
TB: grupo tributirina.
VA+TB: grupo associação entre vitamina A e tributirina.
N: número de animais.
FCAs: Focos de criptas aberrantes.
FCAs ≥ 4: Focos com 4 ou mais criptas aberrantes.

[a]diferença estatisticamente significante em relação ao grupo OM (p<0,05), segundo o teste Kruskal-Wallis.

Não foram observadas diferenças significativas na quantidade de FCAs na porção distal dos hemicólons entre os grupos experimentais, conforme os dados apresentados na **tabela 4**. A quantidade de FCAs com

4 ou mais criptas também não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais.

Considerando a relação dos FCAs pela área, não foram observadas diferenças estatísticas significantes. Quando são considerados os FCAs com 4 ou mais criptas, o grupo TB apresentou menor número ($p<0,05$) em relação ao grupo OM.

Na **figura 11** está representada a digitalização de uma fotomicrografia de um foco de cripta aberrante localizado na porção distal do hemicólon de um rato tratado com óleo de milho + maltodextrina. O foco apresenta 4 criptas aberrantes.

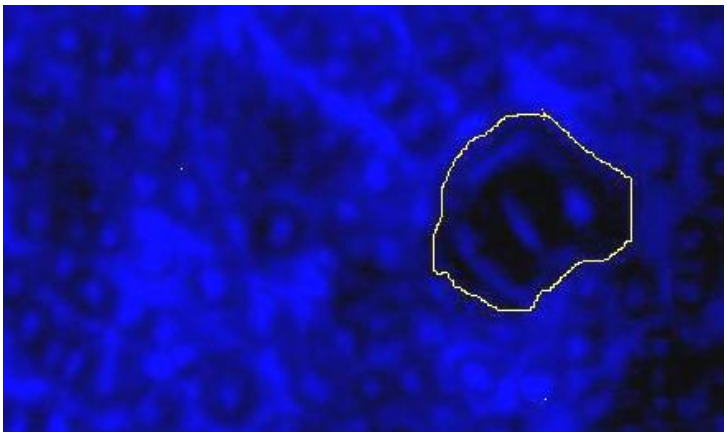


Figura 11: ***Exemplo de fotomicrografia de foco (contorno amarelo) com 4 criptas aberrantes corado com azul de metileno a 0,02% localizado na porção distal do hemicólon de um rato pertencente ao grupo OM (objetiva de 10X).***

4.3 Quantificação de Danos no DNA da Mucosa do Cólon.

Para a quantificação de danos no DNA foi utilizado o método do "cometa", que, em sua versão alcalina avalia quebras em fitas simples, sítios álcalis lábeis e danos decorrentes principalmente da ação de espécies reativas de oxigênio. Os comprimentos dos nucleóides formados estão apresentados na **tabela 5**.

Tabela 5: Comprimento dos "nucleóides" de células da mucosa colônica de ratos Wistar submetidos a modelo de carcinogênese e tratados ou não com vitamina A ou tributirina, isoladamente ou em associação e também da mucosa de ratos não iniciados, tratados ou não com peróxido de hidrogênio (PH).

Grupos	N	Comprimento dos nucleóides (µm)
NI	10	80,5 ± 4,5
NI+H_2O_2	10	175,0 ± 7,0[a]
OM	14	109,0 ± 5,2[a]
VA	15	83,0 ± 5,0[b]
TB	15	102,1 ± 5,1[a,b]
VA+TB	13	94,3 ± 4,4[a,b,c,d]

NI: amostras de mucosa do colônica de ratos não iniciados e não tratados com PH.
NI+H_2O_2: amostras de mucosa colônica de ratos não iniciados tratados com PH.
OM: grupo óleo de milho + maltodextrina (controle).
VA: grupo vitamina A.
TB: grupo tributirina.
VA+TB: grupo associação entre vitamina A e tributirina.
N: número de animais de cada grupo.

[a]diferença estatisticamente significante em relação ao grupo NI (p<0,05), segundo o teste ANOVA, seguido do teste de Tukey.
[b]diferença estatisticamente significante em relação ao grupo OM (p<0,05), segundo o teste ANOVA, seguido do teste de Tukey.
[c]diferença estatisticamente significante em relação ao grupo VA (p<0,05), segundo o teste ANOVA, seguido do teste de Tukey.
[d]diferença estatisticamente significante em relação ao grupo TB (p<0,05), segundo o teste ANOVA, seguido do teste de Tukey.

Amostras da mucosa de cólon de ratos não iniciados tratados com peróxido de hidrogênio (grupo NI + H_2O_2); controle positivo da técnica do "cometa" apresentaram "nucleóides" de maior comprimento (p<0,05)

quando comparados com as que não foram tratadas com o agente oxidante em questão (grupo NI, controle negativo da técnica) e com os demais grupos experimentais conforme os dados apresentados na **tabela 5**.

O grupo OM, quando comparado com o grupo NI, apresentou "nucleóides" de maior comprimento ($p<0,05$).

O grupo VA, assim como também VA+TB, quando comparados com o grupo OM, apresentaram nucleóides de menor ($p<0,05$) comprimento. Além disso, o grupo VA apresentou nucleóides menores ($p<0,05$) quando comparado com o grupo VA+TB. Quando comparado com o grupo NI, o grupo VA não apresentou diferença significante.

Da mesma forma, o grupo TB, quando comparado com o grupo OM, apresentou nucleóides de menor ($p<0,05$) comprimento. Comparando esse mesmo grupo com VA+TB, verifica-se uma diferença significante ($p<0,05$), onde a tributirina apresenta maiores comprimentos de nucleóides.

O grupo VA+TB apresentou nucleóides menores ($p<0,05$) de que o grupo OM e também menores ($p<0,05$) do que o grupo NI.

A **figura 12** apresenta a digitalização de fotomicrografias de nucleóides analisados.

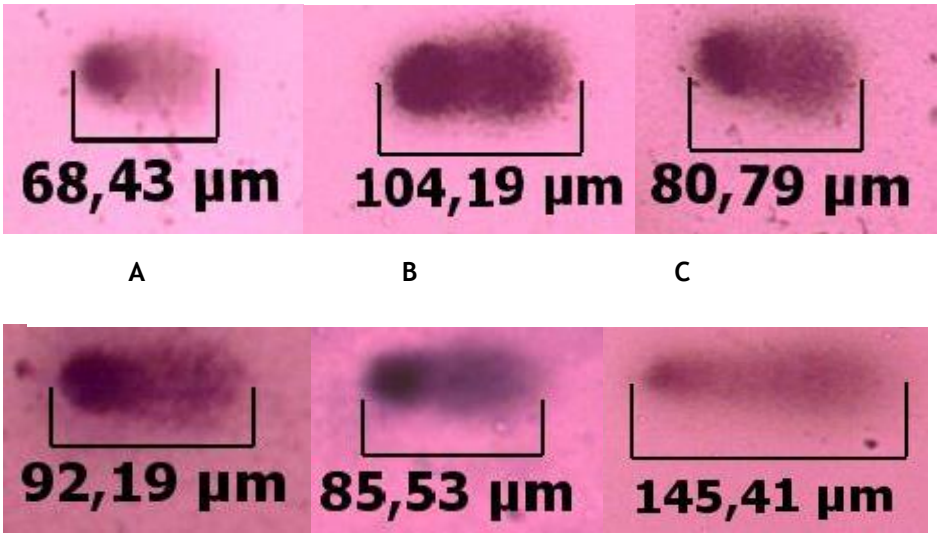


Figura 12: *Exemplo de nucleóides observados com objetiva de 10X. A: ratos não iniciados (NI); B: grupo OM; C: grupo VA; D: grupo TB; grupo VA+TB; F: controle positivo (NI+H_2O_2).*

4.4 Avaliação do Padrão de Metilação Global do DNA.

Para a avaliação do padrão de metilação do DNA foi realizado o "dot blot", onde o anticorpo primário anti-5-metilcitosina reconhece seqüências de DNA metiladas. Os resultados estão ilustrados na **figura 13**.

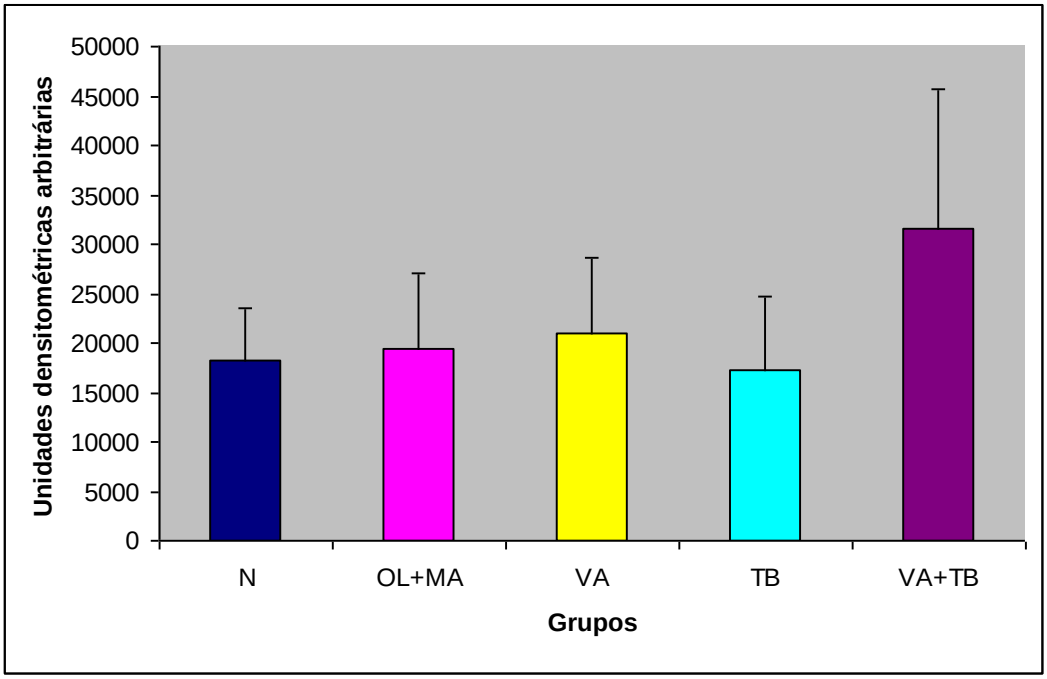


Figura 13: *Densitometria do "dot blot" para seqüências de DNA metiladas de animais tratados ou não com vitamina A e tributirina, isoladamente ou em associação e submetidos a modelo de carcinogênese de cólon. Foram analisados 6 ratos em cada grupo.Os resultados referem-se à média e desvio padrão.*

NI: ratos não iniciados
OM : grupo óleo de milho + maltodextrina (controle).
VA: grupo vitamina A.
TB: grupo tributirina.
VA+TB: grupo associação entre vitamina A e tributirina.

Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos experimentais. Pode-se observar na **figura 14** a fotografia do filme de raios x referente ao "dot blot", assim como a membrana corada com azul de metileno.

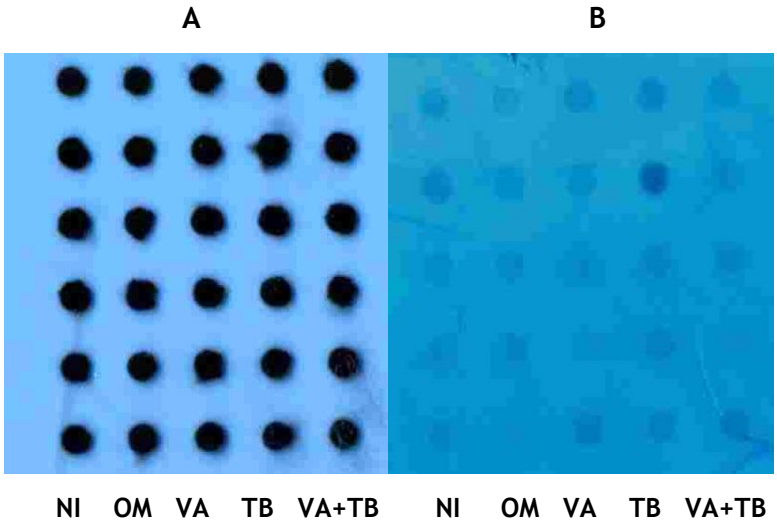


Figura 14: A) *Digitalização de fotografia do filme de raios x do "dot blot". Cada coluna corresponde a seis ratos do mesmo grupo.*

B) *Digitalização de fotografia da membrana corada com azul de metileno utilizada para a normalização dos resultados.*

NI: ratos não iniciados
OM : grupo óleo de milho + maltodextrina (controle).
VA: grupo vitamina A.
TB: grupo tributirina.
VA+TB: grupo associação entre vitamina A e tributirina

5- DISCUSSÃO

A quimioprevenção destaca-se como importante medida de controle das neoplasias (SPORN; SUH, 2002). Dentre os diversos compostos bioativos presentes nos alimentos, a vitamina A e o ácido butírico são considerados agentes quimiopreventivos promissores contra o câncer (KELLOFF et al., 1994; FONSECA et al., 2005; LIU, 2004). Entretanto, como o ácido butírico apresenta meia vida curta, torna-se inconveniente a sua administração por via oral e, com isso, descaracteriza-o como agente quimiopreventivo ideal. Assim, a utilização da tributirina, um pró-fármaco do ácido butírico, parece ser a opção mais adequada em estudos de quimioprevenção de neoplasias (EGORIN et al., 1999). O mesmo pertence a classe de HDACis, estudados como potenciais agentes antineoplásicos (MUNDHI et al., 2005). Além disso, a associação entre HDACi com retinóides vem sendo recentemente utilizada como importante estratégia na prevenção e terapia do câncer (JING et al., 2002; SANTOS et al., 2007).

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial quimiopreventivo da vitamina A e da tributirina quando administrados isoladamente ou, de forma inédita, em associação a ratos Wistar durante as fases de iniciação e pós-iniciação da carcinogênese de cólon. A fim de caracterizar possíveis mecanismos de ação foram avaliados, também, neste estudo, os efeitos da vitamina A, tributirina e da associação entre os mesmos na modulação de danos e do padrão de metilação global do DNA.

Inicialmente, observa-se na tabela 1, que os ratos não iniciados apresentaram maior massa média corpórea quando comparado com os demais grupos. Dessa forma, a administração intraperitonial do agente carcinogênico pode ter contribuído para essa diferença. Vale ressaltar que o estresse da entubação, que foi realizada diariamente no período da manhã e à tarde em dias alternados não influenciou o ganho de massa dos ratos, pois a curva de crescimento foi semelhante para todos os grupos experimentais até o momento da administração da DMH.

Além disso, entre os grupos experimentais, não foram observadas diferenças entre as massas corpóreas finais e nem em relação ao consumo de ração (figura 10) o que mostra que as substâncias, nas doses administradas, não apresentaram indícios de toxicidade. Dessa forma, as ações da VA, TB ou VA+TB no modelo de carcinogênese de cólon utilizado não devem ser relacionadas, ainda, a um menor consumo calórico.

Vale ressaltar que a dose administrada de tributirina, no presente estudo, foi de 200 mg/100 g de p.c., mesma utilizada em trabalho do nosso grupo em modelo de hepatocarcinogênese, onde foi observada atividade quimiopreventiva (KUROIWA-TRZMIELINA, 2007), assim como a dose de vitamina A [1 mg/100 g p.c,(SILVEIRA et al., 2005)]. Nestes trabalhos também não foram encontrados índicios de toxicidade por parte da tributirina e da vitamina A.

Os FCAs estão presentes em roedores tratados com DMH e também em humanos com adenomas e/ou adenocarcinomas de cólon e, dessa

forma, são amplamente aceitos como lesões pré-neoplásicas (BIRD, GOOD, 2000; STEVENS, SWEDE, ROSENBERG, 2007). Assim, considera-se que FCA precede o desenvolvimento de adenomas e acredita-se que essas lesões representam estágio inicial da carcinogênese de cólon. A transição FCA-adenoma é bem caracterizada devido à presença das mutações genéticas em comum entre as duas lesões. Além disso, a displasia, um marcador que identifica maior risco de progressão de neoplasias e alterações bioquímicas, foi observada tanto em FCAs induzidos por DMH como também em FCAs humanos (MAURIN et al., 2006; FEMIA et al., 2007). A indução e desenvolvimento dessas lesões podem ser inibidos por agentes quimiopreventivos e, com isso, oferecer informações importantes que possibilitem que sejam identificados moduladores da carcinogênese (BIRD, 1995; DASHWOOD, 1999; BIRD, GOOD, 2000).

Modelos de carcinogênese química de cólon revelam que o número de FCAs aumenta com decorrer do tempo (BIRD, 1995). Isso sugere que alguns focos apresentam desenvolvimento mais rápido do que outros e que também podem sofrer processo de remodelação. Dessa forma, acredita-se que os focos menores (contendo 1, 2 ou 3 criptas) possam regredir e os maiores (contendo 4 ou mais criptas) progridam para adenomas (MCLELLAN, BIRD, 1991). Os FCAs com maior número de criptas por foco representam lesões mais avançadas e agressivas, com menor capacidade em responder a agentes quimiopreventivos ou quimioterapêuticos (RONCUCCI, 2000).

Os focos de criptas aberrantes surgem precocemente no cólon distal quando comparado com a porção proximal (BIRD, 1995). Assim, tanto a formação dos FCAs quanto o desenvolvimento de neoplasias de cólon ocorrem em maior proporção na região distal do cólon de ratos iniciados com DMH, o que pode representar os mesmos eventos biológicos observados em seres humanos (RODRIGUES et al., 2002).

No presente estudo foi avaliada a quantidade de FCAs nos hemicólons de ratos submetidos ao modelo de carcinogênese iniciado por DMH. De acordo com as tabelas 2, 3 e 4, o tratamento com tributirina reduziu a formação de focos com 4 ou mais criptas aberrantes em relação à área analisada, tanto em toda a extensão do hemicólon, como nas porções distal e proximal.

Atualmente, existem poucos estudos in vivo com o ácido butírico, metabólito da tributirina, na carcinogênese de cólon. Uma das exceções é o estudo de Medina et al. (1998) que relatam a aplicação de uma infusão intracecal contínua de ácido butírico durante 4 semanas em ratos iniciados com DMH. Ao final do ensaio (11 semanas), houve redução na incidência de FCAs e carcinomas no grupo que recebeu ácido butírico, porém, sem redução no número dessas lesões. Além disso, pela análise histopatológica, os autores relacionaram o tratamento com ácido butírico à inibição da transformação maligna.

Em outro estudo, Wong et al. (2005) administraram ácido butírico por infusão no cólon (40 µmol/mL/2 vezes ao dia ou 400 µmol/mL, 5 vezes ao dia) de ratos iniciados com AOM durante 4 semanas. Ambos os tratamentos reduziram o número de FCAs ao final do experimento, mas

de forma mais pronunciada com o protocolo de administração 5 vezes ao dia. No mesmo sentido, a instilação intraretal de ácido butírico (50 e 100 mM) em ratos submetidos ao modelo de carcinogênese de cólon induzida por DMH resultou em menor número de FCAs (AVIVI-GREEN et al., 2000).

A administração oral de ácido butírico não apresentou atividade quimiopreventiva na maioria dos estudos in vivo. Caderni et al. (1998; 2001) forneceram ácido butírico (150 mg/dia) em "pellets" de liberação lenta em uma ração de elevado teor lipídico por 10 ou 33 semanas, a ratos submetidos ao modelo de carcinogênese de cólon induzido por AOM. Ao final dos experimentos, não houve redução do número e multiplicidade de FCAs e carcinomas em decorrência do tratamento com ácido butírico. No mesmo modelo de carcinogênese, Wargovich et al. (1996) administraram ácido butírico (12,5 ou 25 mg/100 g de peso corpóreo) na ração de ratos por 5 semanas, e observaram discreta redução do número de FCAs com a maior dose de ácido butírico. Freeman (1986) administrou ácido butírico (1 a 2%) na água de beber e não constatou atividade quimiopreventiva no modelo de carcinogênese de cólon iniciada com DMH.

Os resultados obtidos nos estudos com ácido butírico em modelos de carcinogênese de cólon são conflitantes. Assim, o ácido butírico exerce a sua atividade quimiopreventiva quando administrado diretamente no cólon, ao invés da via oral e a sua meia vida curta parece ter influenciado esses resultados. Assim, a utilização da tributirina (200mg/100g p.c), seu pró-fármaco, parece ser a melhor opção em estudos de quimioprevenção.

O único estudo, até o momento, com tributirina em modelo in vivo de carcinogênese de cólon é o de Deschner et al., (1990). Após 48 semanas da iniciação com AOM e de tratamento dos animais com tributirina (500 mg/100 g de peso corpóreo) adicionada à ração de camundongos, não houve redução da incidência, número e tamanho de focos displásicos. Dessa forma concluíram que a tributirina não apresentou atividade quimiopreventiva. Deve-se considerar que este estudo foi de longa duração, ou seja, até a fase de progressão da carcinogênese e que não foram utilizados os FCAs como biomarcadores.

Dessa forma, a atividade quimiopreventiva obtida no presente estudo com a administração de tributirina em ratos durante as fases de iniciação e de pós-iniciação da carcinogênese de cólon é inédita na literatura até o momento.

O tratamento com vitamina A em ratos submetidos ao modelo de carcinogênse de cólon não reduziu o número de focos de criptas aberrantes. A utilização da vitamina A em modelos experimentais de carcinogênese de cólon é limitada na literatura. Alguns estudos demonstraram efeitos quimiopreventivos de análogos sintéticos da vitamina A em modelos de carcinogênese de cólon. Dessa forma, Pereira et al. (1999), administraram ácido retinóico 9-cis e 4-hidroxifenilretinamida [(4-HPR), retinóide sintético] em ratos iniciados com AOM e, após 28 semanas de tratamento, observaram redução na incidência de adenomas e indução da apoptose em ratos tratados com os retinóides. Em outro estudo, novamente o ácido retinóico 9-cis inibiu de forma significante a ocorrência de FCAs em ratos F344 iniciados com

AOM, na fase de iniciação; além disso, o retinol e os ácidos retinóicos todo trans e 13-cis apresentaram atividade quimiopreventiva durante a fase de pós-iniciação (WARGOVICH et al., 2000).

Delage et al., (2004) suplementaram rações que apresentavam diferentes concentrações de óleo de girassol com 200 UI de vitamina A. Os ratos foram iniciados com uma única dose de DMH (15 mg/Kg de p.c.) e durante todo o período experimental (5 meses), foram alimentados com as rações modificadas. Os animais que receberam vitamina A apresentaram redução no número de FCAs quando comparados com os controles. Em outro estudo do mesmo grupo (DELAGE et al., 2005) a atividade quimiopreventiva da vitamina A na carcinogênese de cólon foi confirmada com a redução do número de FCAs e modulação dos receptores nucleares RARβ e RARα.

Maziere et al., (1998) avaliaram os efeitos de uma ração com concentrações elevadas de amido resistente e suplementada com vitamina A ou E em ratos submetidos a modelo de carcinogênese de cólon por uma única dose DMH (15 mg/Kg de p.c.). Os ratos que receberam as rações suplementadas com vitamina A apresentaram menor incidência de FCAs.

Por outro lado, camundongos Min, que desenvolvem espontaneamente adenomas intestinais, receberam rações com adição de ácido retinóico *todo trans* (5 mg/kg de p.c ou 10 mg/kg de p.c); além de não ter sido observado qualquer efeito protetor por parte dos

retinóides, verificou-se que a sua administração estimula a formação de neoplasias (Møllersen et al., 2004).

Um dos motivos que parece ter relação com a ausência de atividade quimiopreventiva do tratamento com a vitamina A isoladamente ou em associação com a tributirina no presente estudo é a dose utilizada de DMH que, no total, foi de 160 mg/Kg de peso corpóreo. Trabalhos que relatam atividade quimiopreventiva da vitamina A em modelos experimentais em ratos utilizaram 15 mg/kg por peso corpóreo em dose única (DELAGE et al., 2005; DELAGE et al., 2004; MAZIERI et al., 1998). Porém, deve-se ainda considerar que nos trabalhos do grupo de Delage foram utilizadas rações com elevado teor de gorduras, classicamente reconhecidos promotores da carcinogênese experimental de cólon (LAFAVE, KUMARATHASAN; BIRD, 1994).

Outro motivo que poderia explicar a ausência de quimioprevenção do tratamento com vitamina A isoladamente ou em associação com a tributirina é a total hidrólise do retinóide no lúmen intestinal por enzimas pancreáticas ou da bordadura em escova do enterócito (SILVEIRA, MORENO, 1998). Quando adicionada em uma ração com elevado teor de fibras alimentares, a vitamina A pode permanecer adsorvida e exercer um efeito tópico nos colonócitos. Assim, quantidades significativas de vitamina A foram encontradas, através de cromatografia líquida de alta eficiência, no cólon de ratos que receberam este composto em uma ração com elevado teor de fibras alimentares. Dessa forma, a atividade quimiopreventiva pela vitamina A poderia estar

relacionada a sua ação tópica no cólon (MAZIERI et al., 1998), que, no presente estudo, pode não ter ocorrido.

Os ratos tratados com associação da vitamina A com a tributirina e submetidos ao modelo de carcinogênese de cólon iniciado com DMH também não apresentaram atividade quimiopreventiva, e, surpreendentemente, tiveram, até mesmo, um discreto aumento dos FCAs.

Sabe-se que tanto a vitamina A como o ácido butírico, metabólito do pró-fármaco tributirina, podem modular a via metabólica Wnt, onde, na carcinogênse de cólon, ocorre o acúmulo de β-catenina no núcleo dos colonócitos (BORDONARO, et al. 2002; DILLARD, LANE, 2007). Esse acúmulo de β-catenina induz a expressão do complexo de transcrição TcF [T cell Factor (fator de célula T)] que modula a transcrição de genes envolvidos na proliferação celular, como c-myc (CRAWFORD, et al., 1999).

Vitamina A, na forma de seus análogos ácidos retinóicos, pode induzir a expressão de RAR e de RXR e, através destes receptores nucleares, impedir o acúmulo de β-catenina no núcleo celular (DILLARD; LANE, 2007).

Os receptores nucleares podem reduzir os níveis citoplasmáticos de β-catenina, como no caso dos RXR ou inibir a sua transcrição, como no caso dos RAR. Assim, Xiao et al., (2003) mostrou, in vitro, que RXR interage e degrada a β-catenina. O ácido retinóico 9-cis, por sua vez,

pode mediar a expressão de β-catenina em diversas linhagens celulares, como SKBR3, Caco2, HS578t e MCF7 (EASWARAN, et al., 1999).

Porém, nem todas as linhagens celulares respondem a essa inibição de forma uniforme. Assim, células das linhagens SW620 e HCT-116 (resistentes à ação do ácido retinóico todo trans) apresentaram diferentes respostas quanto a ativação da via Wnt (HEERDT, HOUSTON, AUGENLICHT, 1994).

Por sua vez, o ácido butírico modula a ativação do complexo de transcrição TcF. Porém, essa modulação é dependente do tipo celular. Em células SW620, em que apresentam mutação no gene APC, o ácido butírico promove a formação do complexo β-catenina-TcF, levando a proliferação celular. Já em células HCT-116, que não apresentam mutação no gene APC, o ácido butírico diminui a formação do complexo de transcrição β-catenina-TcF (BORDONARO et al., 2002).

Assim, como a vitamina A e a sua associação com a tributirina não apresentaram atividades quimiopreventivas no presente estudo, os colonócitos podem ser resistentes a ação do ácido retinóico e terem respondido a ação do butírico quanto ao mecanismo de regulação da β-catenina de forma semelhante a linhagem celular HCT-116. Essa hipótese poderia ser confirmada com a análise da proteína β-catenina no núcleo e no citoplasma.

Descreve-se que o estresse oxidativo apresenta papel importante na carcinogênese (SHIOTA et al., 2002). Assim verifica-se que já nas fases iniciais desse processo ocorre intensa peroxidação lipídica (Sarkar

et al., 1995), que poderia estar associada a uma inibição da expressão da enzima superóxido dismutase (BÁRTOLI et al., 1988). Por serem capazes de danificar biomoléculas como o DNA, espécies reativas de oxigênio (EROS) podem ser genotóxicas e causar mutações em genes importantes tais como os supressores de tumor e/ou proto-oncogenes e, dessa forma, estimular a formação de neoplasias (SHEN; OND, 1996).

A oxidação de lipídios por EROs e radicais livres, especialmente a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados resulta na produção de compostos reativos como o 4-hidroxinomenal, malondialdeído e crotonaldeído que estão envolvidos na etiologia de neplasias de cólon. Estes compostos podem reagir com bases nitrogenadas de ácidos nucléicos formando adutos de DNA (CHUNG et al., 1996).

O método do cometa é utilizado para verificar danos no DNA, considerados um biomarcador do estado oxidativo. Dessa forma, esse método se presta a avaliar quebras em fita simples e dupla, sítios com reparo incompleto e álcali lábeis e possivelmente também, ligações cruzadas do DNA com proteínas ou com o próprio DNA (LOFT et al., 1998; BURLINSON et al., 2007).

Nesse estudo, optou-se por corar os nucleóides formados com nitrato de prata (figura 12) devido às vantagens do método como, por exemplo, permitir o registro permanente do experimento e verificação independente dos resultados, bem como evitar problemas associados à fluorescência, tais como seu decaimento. Além disso, a coloração com prata possibilita que os cometas sejam analisados utilizando-se simples microscópios de luz, ao invés de equipamentos caros e complexos como

microscópios de fluorescência e seus respectivos sistemas de análise de imagem (TOLEDO et al., 2003).

Inicialmente, procurando-se conferir maior confiabilidade analítica aos dados em questão, tomou-se a precaução de introduzir aqui controles positivo e negativo representados, respectivamente, por amostras de fígados de ratos não iniciados tratados ou não com peróxido de hidrogênio (TOLEDO et al., 2003). Nesse sentido, os resultados obtidos em relação a esses dois controles indicam que a metodologia utilizada se apresentou adequada ao permitir que se fizesse clara distinção entre amostras de ratos não iniciados e aquelas tratadas com peróxido de hidrogênio, em que por outro lado foram observados cometas de comprimento considerado.

No teste do cometa, quando realizado in vitro, é comum a verificação da viabilidade celular, através do teste com coloração de azul de Tripan. O mesmo não foi realizado no presente devido ao isolamento celular tem sido realizado por desagregação mecânica o que torna inviável a avaliação da viabilidade celular por integridade da membrana plasmática (GONTIJO et al., 2003).

Desta forma, é possível constatar que os comprimentos dos nucleóides observados no grupo OM (grupo controle) foram maiores do que os do grupo NI (Tabela 5). Nesse sentido, esse dado sugere, portanto, que a ocorrência de danos no DNA, induzidos possivelmente por EROS, por exemplo, represente evento precoce na carcinogênese de cólon.

Em comparação ao grupo OM, foi observado nos grupos tratados com vitamina A e tributirina ou associação entre essas substâncias diferenças de comprimento de nucleóides. Esse dado sugere que a administração de vitamina A e tributirina, ou a associação entre essas substâncias durante 9 semanas em ratos submetidos ao modelo de carcinogênese de cólon com DMH diminui a quantidade de danos no DNA.

Vitamina A apresenta propriedades antioxidantes (PALACE et al., 1999). Dessa forma o grupo VA apresentou nucleóides de menor comprimento quando comparados ao controle OM, de forma semelhante ao observado em trabalhos que utilizaram ß-caroteno (FONSECA et al., 2005) ou licopeno e luteina (FONSECA et al., 2003) em modelos de hepatocarcinogênese.

Trabalhos relatam que o ácido butírico diminuiu a intensidade de danos no DNA induzidos por peróxido de hidrogênio em células isoladas de cólon distal de ratos (ABRAHAMSE et al.,1999) e também em células neoplásicas humanas HT29 (ROSIGNOLI et al., 2001). Foi também demonstrado que o butirato reduz danos no DNA em células HT29 tratadas com 4-hidroxi-2-nonenal, produto endógeno de peroxidação lipídica causada por estresse oxidativo (KNOLL et al., 2005). Já em linhagens de células SAS de câncer de língua, o tratamento com butirato de sódio aumentou os níveis celulares de EROS (JENG et al., 2006). Em linhagens células K562 a diferenciação induzida pelo ácido butírico foi mediada por EROS (CHENAIS et al., 2000).

Uma possível explicação para os comprimentos dos nucleóides presentes na mucosa do cólon de ratos tratados com tributirina seria que

esse ácido graxo de cadeia curta poderia ter induzido apoptose nas células da mucosa colônica. As quebras de fita simples observadas pelo método do cometa podem ou não ser de células apoptóticas. Entretanto, uma excessiva fragmentação do DNA não pode ser detectada por essa técnica, já que ocorreria difusão do ácido nucléico pelo gel de agarose, tornando impossível a sua visualização (ABRAHAMSE et al., 1999).

De forma interessante, os comprimentos dos nucleóides da mucosa de ratos tratados com a associação entre vitamina A e tributirina apresentaram valores intermediários entre os encontrados nos grupos VA e TB. Novamente, esse dado pode ser interpretado como antagonismo competitivo. A atividade da vitamina A como antioxidante foi reduzida, ou insuficiente para diminuir o comprimento dos nucleóides, quando administrada em conjunto com a tributirina.

A hipometilação do DNA é uma alteração epigenética comum na carcinogênese (GAMA-SOSA et al., 1983; FEINBERG et al., 1988; WAINFAN, POIRIER; 1992), inclusive na de cólon (TOYOTA et al., 1999). Este evento pode ter várias conseqüências, como o aumento da instabilidade cromossômica, da acetilação de histonas e da expressão de proto-oncogenes (TAO et al., 2004). A acetilação de histonas também é proposta como mecanismo ao permitir que regiões promotoras não metiladas de alguns genes, como os supressores de tumor, sejam hipermetiladas, o que causaria o seu silenciamento (ESTELLER, 2000).

Desde que a hipometilção global do DNA é uma alteração reversível, acredita-se que esta possa ser modulada por agentes quimiopreventivos e, dessa forma, ser utilizada como biomarcador da

carcinogênese de cólon. Outra alteração epigenética é a hipermetilação de genes supressores de tumor, que também pode ser utilizado como biomarcador do desenvolvimento de neoplasias colônicas. Entretanto a hipometilação global apresenta a vantagem de ser um evento precoce e de estar presente em praticamente em todas as neoplasias. (TAO, et al., 2004).

No atual de estudo, porém, o padrão de metilação global do DNA não foi modificado nos ratos tratados ou não com vitamina A, tributirina ou associação entre esses compostos e submetidos ao modelo de carcinogênese de cólon iniciado com DMH.

Tao et al., (2004) avaliaram o padrão de metilação global do DNA em ratos tratados com rações suplementadas com cloreto de cálcio [50000 ppm (partes por milhão)], α-difluorometilornitina (3000 ppm), piroxicam (200 ppm) ou sulindac (280 ppm) durante 49 dias, após 47 semanas da administração com AOM. Os autores observaram maior intensidade de marcação para o anticorpo anti-5 metilcitosina nos cólons dos ratos tratados com os agentes quimiopreventivos acima quando comparado com o controle. Dessa forma, foi verificado que a metilação do DNA é um biomarcador para avaliação da atividade quimiopreventiva.

Em outro estudo, realizado por Pereira et al., (2004) verificou-se que agentes promotores da carcinogênese de cólon também alteram o padrão de metilação do DNA. Assim, ratos foram tratados com rutina (3,0 mg/Kg), ácidos deoxicólico (4,0 mg/kg), quenodeoxicólico (4,0 mg/kg), cólico (4,0 mg/kg) ou litocólico (4,0 mg/kg) durante 14 dias e observou-se reduzida marcação para o anticorpo anti-5 metilcitosina

quando comparado ao controle, que indica a hipometilação global do DNA.

Os grupos metila, provenientes da alimentação ou do metabolismo do folato, são essenciais para a prevenção de diversas condições patológicas. A deficiência destes pode ocasionar uma alteração nas reações de transmetilação e pode levar ao desenvolvimento de neoplasias (SALMON, COPELAND, 1954; GHOSHAL, FARBER, 1984).

A regulação da S-adenosilmetionina (SAM) e da SAH (S-adenosil-homocisteína) razão SAM/SAH (S-adenosil-homocisteína) é realizada através da enzima glicina N-metiltransferase (GNMT). Esta controla a razão SAM/SAH, apresentando um papel essencial para o suplemento de grupos metil e conseqüentemente para atividade das DNA metiltransferases (DNMTs) (MATTHEW, McMULLEN, SCHALINSKE, 2002).

O tratamento com vitamina A pode ativar e induzir a GNMT, aumentando o catabolismo da SAM (SCHALINSKE, STEELE, 1991; ROWLING et al., 2002) e dessa forma, o DNA pode apresentar-se hipometilado (MATTHEW, McMULLEN; SCHALINSKE, 2002). Convém ressaltar que o mecanismo proposto para a hipometilação do DNA foi verificado no fígado de ratos não submetidos a modelo de carcinogênese.

Entretanto, em modelo de carcinogênese de cólon, Tao et al. (2004) administraram em ratos F 344, ácido retinóico 9-cis (30 ppm na ração) durante 7 dias após 47 semanas da iniciação com AOM. Não foram encontradas modificações significativas no padrão de metilação global do DNA.

São escassos os relatos na literatura a respeito da modulação do padrão de metilação global do DNA na carcinogênese por parte da tributirina ou do ácido butírico, ou de associações destes com a vitamina A ou seus análogos.

Dessa forma, em um desses estudos, várias linhagens celulares foram tratadas com ácido butírico e tiveram o padrão de metilação global do DNA avaliado. Assim, células de glioblastoma foram tratadas com 2 mM de ácido butírico por 48h. No final desse período, foi observada a hipometilação global do DNA. Após a remoção do ácido butírico, os níveis de 5-metilcitosina foram rapidamente (24h) restaurados. De forma contrária, células de carcinoma cervical foram tratadas com 3mM de ácido butírico durante 48h. No final desse período, o DNA genômico encontrava-se hipermetilado em comparação ao controle e esse padrão de metilação assim permaneceu por mais de 180 gerações (GOSGROVE, COX, 1990).

O padrão de metilação global do DNA também foi analisado em células de câncer de pulmão tratadas com 5 mM de ácido butírico onde foi observada a hipermetilação do DNA (HAAN, GEVERS, PARKER, 1986) Em fibroblastos tratados com diversas concentrações milimolares de ácido butírico, foi observada também a hipermetilação do DNA. Mesmo após o tratamento, não ocorreram modificações no padrão de metilação do DNA (BOFFA, MARIANI, PARKER, 1994).

Dessa forma, nos estudos in vivo, a modulação do padrão de metilação global pelo ácido butírico é dependente da linhagem

estudada. Não há, na literatura relatos a respeito da modulação do padrão de metilação global do DNA pelo ácido butírico ou pelo seu pró-fármaco tributirina quando administrados isoladamente ou em associação com a vitamina A in vivo. Como a tributirina apresenta atividade de HDACi (DRUMMOND et al., 2005; MUNSHI et al., 2005), a acetilação de histonas poderia alterar o padrão de metilação do DNA na carcinogênese de cólon em genes específicos, como o proto-oncogene c-myc e os supressores de tumor p16INK4A e p27Kip1(TAO et al., 2002). Assim, parece que a tributirina não alterou o padrão de metilação global do DNA. Entretanto, talvez por outros mecanismos epigenéticos, como a metilação de genes específicos e a acetilação de histonas, a tributirina exerceu a sua atividade quimiopreventiva no presente estudo.

6- CONCLUSÕES

- A administração de tributirina em ratos submetidos a modelo de carcinogênese de cólon durante as fases de iniciação e pós-iniciação resultou em atividade quimiopreventiva.

- A administração de vitamina A isoladamente ou em associação com a tributirina em ratos submetidos a modelo de carcinogênese de cólon durante as fases de iniciação e pós-iniciação resultou em menores comprimentos de nucleóides, que pode estar relacionado com a sua atividade antioxidante, porém insuficiente para apresentar atividade quimiopreventiva no presente estudo.

- Os ratos tratados com a associação da tributirina com a vitamina A e submetidos à modelo de carcinogênese de cólon não apresentaram atividade quimiopreventiva.

- A hipometilação do DNA não foi verificada, sugerindo que tal modificação epigenética seja um evento tardio no modelo experimental utilizado.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, B.B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochem Pharmacol**, v. 71, p. 1397-1421, 2006.

ALCANTARA, E.N.; SPECKMANN, E.W. Diet, nutrition, and cancer. **Am J Clin Nutr**, v. 29, p. 1035-1047, 2006.

ALYAQOUB, FS.; TAO, L.; KRAMER, P.M.; STEELE, V.E.; LUBET, R.A.; GUNNING, W.T.; PEREIRA, M.A. Prevention of mouse lung tumors and modulation of DNA methylation by combined treatment with budesonide and R115777 (ZarnestraMT). **Carcinogenesis**, v. 27, p. 2442-2447, 2006.

AMBRAHAMSE, S. L.; POOL-ZOBEL, B. L.; RECHKEMMER, G. Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 629-634, 1999.

AMES, B.N.; GOLD, L.S.; WILLETT, W.C. The causes and prevention of cancer. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, p. 5258-5265, 1995.

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, p. 83-95, 2000.

BANNASCH, P. Pre-neoplastic lesions as end points in carcinogenesis testing. I. Hepatic Preneoplasia. **Carcinogenesis**, v. 7, p. 689-695, 1986.

BANNASCH, P.; ZERBAN, H. Tumors of the liver. *In*: TURUSOV, V.S.; MOHR, U. **Pathology of Tumors in laboratory Animals**. v. 1, n. 99. Lyons: IARC Sci. Publ., 1990. p.199-240.

BARTOLI, G. M.; GIANNATTASIO, B.; PALOZZA, P.; CITTADINI, A. Superoxide dismutase depletion and lipid peroxidation in rat liver microsomal membranes: correlation with liver carcinogenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 966, p. 214-221, 1988.

BEAN, G.R.; SCOTT, V.; YEE, L.; RATLIFF-DANIEL, B.; TROCH, M.M.; SEO, P.; BOWIE, M.L.; MARCOM, P.K.; SLADE, J.; KIMLER, B.F.; FABIAN, C.J.; ZALLES, C.M.; BROADWATER, G.; BAKER, J.C., WILKE, L.G.;SEEWALDT, V.L. Retinoic acid receptor-beta2 promoter methylation in random periareolar fine needle aspiration. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,** v. 14, p. 790-798, 2005.

BERRIEL, E.; HILL, M.; BARCIA, J.J.; UBILLOS, L.; GONZALEZ, M.; DETJEN, G.; RONDAN, M.; NAVARRETE, H.; OSINAGA, E. Simple mucin-type cancer associated antigens are pre-cancerous biomarkers during 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Oncol Rep**, v. 14, p. 219-227, 2005.

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.

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.

BIRT, D.F. Fat and calorie effects on carcinogenesis at sites other than the mammary gland**. Am J Clin Nutr**, v. 45, p. 203-209, 1987.

BLAKEY, D.H.; DUNCAN, A.M.; WARGOVICH, M.J.; GOLDBERG, M.T.; BRUCE, 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.; MARIANI, M.R.; PARKER, M.I. Selective hypermethylation of transcribed nucleosomal DNA by sodium butyrate. **Exp Cell Res**, v. 211, p. 420-423, 1994.

BORDONARO, M.; LAZAROVA, D.L.; AUGENLICHT, L.H.; SARTORELLI, A.C. **Int J Cancer,** v. 97, p. 42-51, 2002.

BRAMBILLA, G.; CAVANNA, M.; PARODI, S.; SCIABA, L.; PINO, A.; ROBBIANO, L. DNA damage in liver, colon, stomach, lung and kidney of

BALB/c mice treated with1,2-dimethylhydrazine. **Int J Cancer**, v. 22, p. 174-180, 1978.

BURLINSON, B.; TICE, R.R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S.Y.; COLLINS, A.R.; ESCOBAR, P.; HONMA, M.; KUMARAVEL, T.S.; NAKAJIMA, M.; SASAKI, Y.F.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. **Mutat Res** v. 627, p. 31-35, 2007.

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, p. 2388-2392, 2003.

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.; LUCERI, C.; SPAGNESI, M.T.; GIANNINI, A.; BIGGERI, A.; DOLARA, P. Dietary carbohydrates modify azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. **J Nutr,** v. 124, p. 517-523, 1994.

CAMPBELL, J.K.; CANENE-ADAMS, K.; LINDSHIELD, B.L.; BOILEAU, T.W.; CLINTON, S.K.; ERDMAN, J.W. JR. Tomato phytochemicals and prostate cancer risk. **J Nutr**, v. 134, p. 3486S-3492S, 2004.

CAPASSO, L. Antiquity of cancer. **Int J Cancer**, v. 113, p. 2-13, 2005.

CARBONE, M.; KLEIN, G.; GRUBER, J.; WONG, M. Modern criteria to establish human cancer etiology. **Cancer Res**, v. 64, p. 5518–5524, 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.

CHENAIS, B.; ANDRIOLLO, M.; GUIRAUD, P.; BELHOUSSINE, R.; JEANNESSON, P. Oxidative stress involvement in chemically induced diferentiation of K562 cells. **Free Radical Biol Med**, v. 28, p. 18-27, 2000.

CHUNG, D. Histone modification: the 'next wave' in cancer therapeutics. **Trends Mol Med**, v.8, p. S10-11, 2002.

CHUNG, Y.J.; SONG, J.M.; LEE, J.Y.; JUNG, Y.T.; SEO, E.J.; CHOI, S.W.; RHYU, M.G. Microsatellite instability-associated mutations associate preferentially with the intestinal type of primary gastric carcinomas in a high-risk population. **Cancer Res**, v. 56, p. 4662-4665, 1996.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations**. Mol Biotechnol**, v. 26, p. 249-261, 2004.

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, p. 1911-1922, 2005.

COSGROVE, D.E.; COX, G.S. Effects of sodium butyrate and 5-azacytidine on DNA methylation in human tumor cell lines: variable response to drug treatment and withdrawal. **Biochim Biophys Acta,** v. 1087, p. 80-86, 1990.

CRAWFORD, H.C.; FINGLETON, B.M.; RUDOLPH-OWEN, L.A.; GOSS, K.J.; RUBINFELD, B.; POLAKIS, P.; MATRISIAN, L.M. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. **Oncogene,** v. 18, p. 2883-2891,1999.

DASHWOOD, R.H. Early detection and prevention of colorectal cancer. **Oncol Rep,** v. 6, p. 277-281, 1999.

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

DAVIE, J.R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. **J. Nutr**, v. 133, p. 2485S–2493S, 2003.

DAVIES, M.; GUPTA, S.; GOLDSPINK, G.; WINSLET, M. The insulin-like growth factor system and colorectal cancer: clinical and experimental evidence. **Int J Colorectal Dis**, v. 21, p. 201-208, 2006.

DAVIES, R.J.; MILLER, R.; COLEMAN, N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. **Nat Rev Cancer**, v.5, p. 199-209, 2005.

DAVIS, C.D.; MILNER, J. Frontiers in nutrigenomics, proteomics, metabolomics and cancer prevention. **Mutat Res**, v. 551, p. 51-64, 2004.

DE FLORA S.; FERGUSON, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutat Res**, v. 591, p. 8-15, 2005.

DELAGE, B.; GROUBET, R.; PALLET, V.; BAIRRAS, C.; HIGUERET, P.; CASSAND, P. Vitamin A prevents high fat diet-induced ACF development

and modifies the pattern of expression of peroxisome proliferator and retinoic acid receptor m-RNA. **Nutr Cancer,** v. 48, p. 28-36, 2004.

DELAGE. B.; BAIRRAS, C.; BUAUD, B.; PALLET, V.; CASSAND, P. A high-fat diet generates alterations in nuclear receptor expression: prevention by vitamin A and links with cyclooxygenase-2 and beta-catenin. **Int J Cancer,** v. 116, p. 836-846, 2005.

DESCHNER, E.E. Experimentally induced cancer of the colon. **Cancer,** v. 34, p. 824-828, 1974.

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, p. 79-82, 1990.

DILLARD, A.C.; LANE, M.A. Retinol decreases beta-catenin protein levels in retinoic acid-resistant colon cancer cell lines. **Mol Carcinog,** v. 46, p. 315-329, 2007.

DIPPLE, A. DNA adducts of chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, v.16., n.3, p. 437-41, 1995.

DOLL, R. Symposium on “Diet and cancer”. **Proc Nutr Soc**, v. 49, p. 119-131, 1990.

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, p. 1191-1308, 1981.

DRAGNEV, K.H.; RIGAS, J.R.; DMITROVSKY, E. The retinoids and cancer prevention mechanisms. **Oncologist,** v. 5, p. 361-365, 2000.

DRUMMOND, D.C.; NOBLE, C.O.; KIRPOTIN, D.B.; GUO, Z.; SCOTT, G.K.; BENZ, C.C. Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 45, p. 495–528, 2005.

EASWARAN, V.; PISHVAIAN, M.; SALIMUDDIN, BYERS, S. Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways. **Curr Biol** v. 9, p. 1415-1418, 1999.

EGORIN, M.J.; YUAN, Z.M.; 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.

ESTELLER, M. Cancer epigenetics: DNA methylation and chromatin alterations in human cancer. **Adv Exp Med Biol**, v. 532, p. 39-49, 2003.

FARBER, E. Clonal adaptation during carcinogenesis. **Biochem Pharmacol**, v. 39, p. 1837-1846, 1990.

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

FEINBERG, A.P.; GEHRKE, C.W.; KUO, K.C.; EHRLICH, M. Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. **Cancer Res**, v. 48, p. 1159-1161,1988.

FEINBERG, A.P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nat Rev Cancer**, v. 4, p. 143-153, 2004.

FEINBERG, A.P.; VOGELSTEIN B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. **Nature**, v. 6 p. 89-92, 1983.

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 Cancer,** v. 41, p. 107-110, 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, p.445-449, 2007.

FISCHLE, W.; WANG, Y.; ALLIS, C.D. Histone and chromatin cross-talk. **Curr Opin Cell Biol**, v. 15, p. 172-183, 2003.

FLORYK, D.; HUBERMAN, E. Differentiation of androgen-independent prostate cancer PC-3 cells is associated with increased nuclear factor-κB activity. **Cancer Res**, v. 65, p. 11588-11596, 2005.

FONSECA, E.M.A.V.; CHAGAS, C.E.; MAZZANTINI, R.P.; HEIDOR, R.; ONG, T.P.; MORENO, F.S. All-trans and 9-cis retinoic acids, retinol and beta-carotene chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve distinct actions on glutathione S-transferase positive preneoplastic lesions remodeling and DNA damage. **Carcinogenesis**, v. 26, p. 1940-1946, 2005.

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.; PEREZ-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.

FRIEDBERG, E.C. DNA damage and repair. **Nature**, v. 421, p. 436–440, 2003.

GAMA-SOSA, M.A.; SLAGEL, V.A.; TREWYN, R.W.; OXENHANDLER, R.; KUO, K.C.; GEHRKE, C.W.; EHRLICH, M. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. **Nucleic Acids Res**, v. 11, p. 6883-6894, 1983.

GHOSHAL, A.K.; FARBER, R. The induction of liver cancer by dietary deficiency of choline and methionine without added carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 5, p. 1367-1370, 1984.

GIOIELLI, L.A. Lipídios estruturados. In: **Entendendo a Gordura.** ***Os Ácidos Graxos***; R. CURI, C. POMPÉIA, C.K.; MIYASAKA, J.; PROCÓPIO (ed.), Editora Manole Ltda., Barueri, SP, Brasil, p. 455-465, 2002.

GONTIJO, A.; TICE, R. Teste do cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In **Mutagênese Ambiental** – RIBEIRO, L.R.; SALVADOR, D.M.F.; MARQUES, E.K., 2003.

GRUNSTEIN, M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. **Nature**, v. 389, p. 349-352, 1997.

HAAN, J.B.; GEVERS, W.; PARKER, M.I. Effects of sodium butyrate on the synthesis and methylation of DNA in normal cells and their transformed counterparts. **Cancer Res** v. 46, p. 713-716, 1986.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. p. 57–70, 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 n human colonic carcinoma cell lines. **Cancer Res**, v. 54, p. 3288-3293, 1994.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HERMAN, J.G. Hypermethylation pathways to colorectal cancer. Implications for prevention and detection. **Gastroenterol Clin North Am** v. 31, p. 945-58, 2002.

HU, X.; WASHINGTON, S.; VERDERAME, M.F.; MANNI A. Interaction between Polyamines and the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in the Regulation of Cell Cycle Variables in Breast Cancer Cells. **Cancer Res,** v. 65, p. 11026-11033, 2005.

HURSTING, S.D.; SLAGA, T.J.; FISCHER, S.M.; DIGIOVANNI, J.; PHANG, J.M. Mechanism-based cancer prevention approaches: targets, examples, and the use of transgenic mice. **J Natl Cancer Inst**, v. 91, p. 215-225, 1999.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Câncer no Brasil: dados dos registros de câncer de base populacional.** v.3, 2006.

ISSA, J.P. CpG island methylator phenotype in cancer**. Nat Rev Cancer**, v. 4, p. 988-93, 2004.

JENAB, M.; CHEN, J.; THOMPSON, L.U. Sialomucin production in aberrant crypt foci relates to degree of dysplasia and rate of cell proliferation. **Cancer Lett.** v. 165, p. 19-25, 2001.

JENG, J.H.; KUO, M.Y.; LEE, P.H.; WANG, Y.J.; LEE, M.Y.; LEE, J.J.; LIN, B.R.; TAI, T.F.; CHANG, M.C. Toxic and metabolic effect of sodium butyrate on SAS tongue cancer cells: role of cell cycle deregulation and redox changes. **Toxicology**, v. 223, p. 235-247, 2006.

JING, Z.; NAN, K.; HU, M. Cell proliferation, apoptosis and the related regulators p27, p53 expression in hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 11, p. 1910-1916, 2005.

JING, Y.; XIA, L.; WAXMAN, S. Targeted removal of PML-RARalpha protein is required prior to inhibition of histone deacetylase for overcoming all-trans retinoic acid differentiation resistance in acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 100, p. 1008-13, 2002.

JU, J.; LIU, Y.; HONG, J.; HUANG, M.T.; CONNEY, A.H.; YANG, C.S. Effects of green tea and high-fat diet on arachidonic acid metabolism and aberrant crypt foci formation in an azoxymethane-induced colon carcinogenesis mouse model. **Nutr Cancer**, v. 46, p. 172-178, 2003.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, p. 392-401, 2006.

KAMALEESWARI, M.; DEEPTHA, K.; SENGOTTUVELAN, M.; NALINI, N. Effect of dietary caraway (*Carum carvi L.*) on aberrant crypt foci development, fecal steroids, and intestinal alkaline phosphatase activities in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. **Toxicol Appl Pharmacol,** v. 214, p. 290-296, 2006.

KAMANGAR, F.; DORES, G.M.; 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. 10, p. 2137-2150, 2006.

KATSUKI, T.; HIRATA, K.; ISHIKAWA, H.; MATSUURA, N.; SUMI, S., ITOH, H. Aged garlic extract has chemopreventive effects on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumors in rats. **J. Nutr**, v 136, p. 847S-851S, 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.

KNOLL, N., RUHE, C., VEERIAH, S., SAUER, J., GLEI, M. Genotoxicity of 4-Hydroxy-2-Nonenal in human colon tumor cells is associated with cellular levels of glutathione and the modulation of glutathione-s-transferase A4 expression by butyrate. **Toxicol. Sciences**, v. 86, p. 27-35, 2005.

KOBAEK-LARSEN, M.; CHRISTENSEN, L.P.; VACH, W.; RITSKES-HOITINGA, J.; BRANDT, K. Inhibitory effects of feeding with carrots or (-)-falcarinol on development of azoxymethane-induced preneoplastic lesions in the rat colon. **J Agric Food Chem** v. 53, p. 1823-1827, 2005.

KONG, T.A.; YU, R.; HEBBAR, V.; CHEN, C.; OWUOR, E.; HU, R.; EE, R.; MANDLEKAR, S. Signal transduction events elicited by cancer prevention compounds. **Mutat Res**, v. 480-481, p. 231-241, 2001.

KROEMER, G.; EL-DEIRY, W.S.; GOLSTEIN, P.; PETER, M.E.; VAUX, D.; VANDENABEELE, P.; ZHIVOTOVSKY, B.; BLAGOSKLONNY, M.V.; MALORNI, W.; KNIGHT, R.A.; PIACENTINI, M.; NAGATA, S.; MELINO, G. Nomenclature Committee on Cell Death. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death Differ**, v. 12, p. 1463-1467, 2005.

KUEFER, R.; HOFER, M.D.; ALTUG, V.; ZORN, C.; GENZE, F.; KUNZI-RAPP, K.; HAUTMANN, R.E.; GSCHWEND, J.E. Sodium butyrate and tributyrin 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. 161f. **Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)**- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

KWON, H.S.; HUANG, B.; HO J.N.; WU, P.; STEUSSY, C.N.; HARRIS, R.A. Retinoids and trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor, induce human pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) gene expression. **Biochim Biophys Acta**, v. 1759, p. 141-151, 2006.

LAFAVE, L.M.; KUMARATHASAN, P.; BIRD, R.P. Effect of dietary fat on colonic protein kinase C and induction of aberrant crypt foci. **Lipids,** v.10, p. 693-700, 1994.

LAI, D.T.; MACKENZIE, A.D.; O'CONNOR, C.J.; TURNER, K.W. Hydrolysis characteristics of bovine milk fat and monoacid triglycerides mediated by pregastric lipase from goats and kids. **J Dairy Sci**, v. 80, p. 2249-2257, 1997.

LOFT, S.; DENG, X.S.; TUO, J.; WELLEJUS, A.; SØRENSEN, M.; POULSEN, H.E. Experimental study of oxidative DNA damage. **Free Radic Res,** v. 29, p. 525-539, 1998.

LOLLINI, P.L.; CAVALLO, F.; NANNI, P.; FORNI, G. Vaccines for tumour prevention. **Nat Rev Cancer**, v. 6, p. 204-216, 2006.

LOTAN, R. Retinoids in cancer chemoprevention. **FASEB J.** v. 10 p. 1031-9. 1996.

MARK, M.; GHYSELINCK, N.B.; WENDLING, O.; DUPÉ, V.; MASCREZ, B.; KASTNER, P.; CHAMBON, P. A genetic dissection of the retinoid signalling pathway in the mouse. **Proc Nutr Soc**, v. 58, p. 609-613, 1999.

MARKS, P.A; RIFKIND, R.A.; RICHON, V.M.; BRESLOW, R.; MILLER, T.; KELLY, W.K. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. **Nat Rev Cancer**, v. 1, p. 194-202, 2001.

MARTINEZ, G.R.; LOUREIRO, A.P.M.; MARQUES, S.A.; MIYAMOTO, S.; YAMAGUCHI, L.F.; ONUKI, J.; ALMEIDA, E.A.; GARCIA, C.C.M.; BARBOSA, L.F.; MEDEIROS, M.H.G.; DI MASCIO, P. Oxidative and alkylating damage in DNA. **Mutat Res**, v. 544, p. 115–127, 2003.

MAZIERERE, S.; MEFLAH, K.; TAVAN, E.; CHAMP, M.; NARBONNE, J.F.; CASSAND, P. Effect of resistant starch and/or fat-soluble vitamins A and

E on the initiation stage of aberrant crypts in rat colon. **Nutr Cancer** v. 31, p.168-177, 1998.

MCCARTHY, P.J.; SWEETMAN, S.F.; MCKENNA, P.G.; MCKELVEY-MARTIN, VJ. Evaluation of manual and image analysis quantification of DNA damage in the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v. 12, p. 209-214, 1997.

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, p. 14-17, 1998.

MOLLERSEN, L.; PAULSEN, J.E.; OLSTÃRN, H.B.; KNUTSEN, H.K.; ALEXANDER, J. Dietary retinoic acid supplementation stimulates intestinal tumour formation and growth in multiple intestinal neoplasia (Min)/+ mice. **Carcinogenesis,** v. 25, p. 53-60, 2004.

MUNSHI, A.; KURLAND, J.F.; NISHIKAWA, T.; TANAKA, T.; HOBBS, M.L.; TUCKER, S.L.; ISMAIL, S.; STEVENS, C.; MEYN, R.E. Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. **Clin Cancer Res**, v. 11, p. 4912-4922, 2005.

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

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. **Am J Pathol,** v. 163, p. 1607-1614, 2003.

OCHIAI, M.; WATANABE, M.; NAKANISHI, M.; TAGUCHI, A.; SUGIMURA, T.; NAKAGAMA, H. Differential staining of dysplastic aberrant crypt foci in the colon facilitates prediction of carcinogenic potentials of chemicals in rats. **Cancer Lett**, v. 220, p. 67-74, 2005.

OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**, v. 4, p. 592-603, 2004.

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

PALACE, V.P.; KHAPER, N.; QIN, Q.; SINGAL, P.K. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. **Free Radic Biol Med**, v. 26, p. 746-761, 1999.

PANG, R.; TSE, E.; POON, R.T. Molecular pathways in hepatocellular carcinoma. **Cancer Lett,** v. 240, p. 157-169, 2006.

PARK, H.S.; GOODLAD, R.A.; WRIGHT, N.A. The incidence of aberrant crypt foci and colonic carcinoma in dimethylhydrazine-treated rats varies in a site-specific manner and depends on tumor histology. **Cancer Res,** v. 57, n. 20, p. 4507-4510, 1997.

PARODI, P.W. Cow's 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, p. 121-129, 2005.

PAULSEN, J.E.; STEFFENSEN, I.L.; OLSTØRN, H.B.; ALEXANDER, J. Prevalent location of flatdysplastic aberrant crypt foci near lymphoid follicles in the colon of azoxymethane-treated rats. **Anticancer Res,** v. 26, p. 1803-1807, 2006.

PELENGARIS, S.; KHAN, M. The many faces of c- MYC. **Archives of Bioch Bioph,** v. 416, p. 129-136, 2003.

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

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

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

PRETLOW, T.P.; PRETLOW, T.G. Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): initiation of colorectal cancer? **Biochim Biophys Acta,** v. 1756, p. 83-96, 2005.

REYNOLDS, S.; RAJAGOPAL, S.; CHAKRABARTY S. Differentiation-inducing effect of retinoic acid, difluoromethylornithine, sodium butyrate and sodium suramin in human colon cancer cells. **Cancer Lett**., v. 134, p. 53-60, 1998.

ROBERTSON, K.D.; JONES, P.A. DNA methylation: past, present and future directions. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 461-467, 2000.

RODRIGUES, M.A.; SILVA , L.; SALVADORI, D.M.; DE CAMARGO, J.L.; 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.

ROSIGNOLI, P., FABIANI, R., DE BARTOLOMEO, A., SPINOZZI, F., AGEA, E. Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumor cells. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 1675-1680, 2001.

ROWLING, M.J.; MCMULLEN, M.H.; SCHALINSKE, K,L. Vitamin A and its derivatives induce hepatic glycine N-methyltransferase and hypomethylation of DNA in rats. **J Nutr**, v. 132, p. 365-366, 2002.

SALMON, W.D.; COPELAND, D.H. Liver carcinoma and related lesion in chronic choline deficiency. **Ann N Y Acad Sci**, v. 57, p. 664-667, 1954.

SANTOS, M.D.; ZAMBRANO, A.; ARANDA, A. Combined effects of retinoic acid and histone deacetylase inhibitors on human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Mol Cancer Ther**, v. 6, p. 1425-1432, 2007.

SANTOS-ROSA, H.; CALDAS, C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. **Eur J Cancer**, v. 41, p. 2381-2402, 2005.

SARKAR, A.; BISHAYEE, A.; CHATTERJEE, M. ß-Carotene prevents lipid peroxidation and red blood cell membrane protein damage in experimental hepatocarcinogenesis. **Cancer Biochem Biophys**, v. 15, p. 111-125, 1995.

SCHALINSKE, K.L.; STEELE, R.D. 13-cis-retinoic acid alters methionine metabolism in rats. **J Nutr,** v. 121, p. 1714-1719, 1991.

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.

SENGUPTA, S.; MUIR, J.G.; GIBSON, P. Does butyrate protect from colorectal cancer? **J Gastroen Hepatol**, v. 21, p. 209-218, 2006.

SHIH, I.M.; WANG, T.L.; TRAVERSO, G.; ROMANS, K.; HAMILTON, S.R.; BEN-SASSON, S.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. Top-down morphogenesis of colorectal tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 98, p. 2640-2645, 2001.

SHIOTA, G.; MAETA, Y.; MUKOYAMA, T.; YANAGIDANI, A.; UDAGAWA, E.; Effects of sho-saiko-to on hepatocarcinogenesis and 8-hidroxy-2`-deoxyguanosine formation. **Hepatology**, v. 35, p. 1125-1133, 2002.

SHIVAPURKAR, N.; HUANG, L.; RUGGERI, B.; SWALSKY, P.A.; BAKKER, A.; FINKELSTEIN, S.; FROST, A.; SILVERBERG, S. K-ras and p53 mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors from coloncancer patients. **Cancer Lett**, v. 115, p. 39-46, 1997.

SILVEIRA, E.R.; NAVES, M.M.; VANNUCCHI, H.; JORDAO, A.A.; DAGLI, M.L.; MORENO, F.S. Vitamin A and all-trans and 9-cis retinoic acids inhibit cell proliferation during the progression phase of hepatocarcinogenesis in Wistar rats. **Nutr Cancer.** v. 39, p. 244-251, 2001.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SIU, I.M.; PRETLOW, T.G.; AMINI, S.B.; PRETLOW, T.P. Identification of dysplasia in human colonic aberrant crypt foci. **Am J Pathol**, v. 150, p. 1805-1813, 1997.

SPORN, M.B. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. **Cancer Res**, v. 36, p.2699-2702, 1976.

SPORN, M.B.; LIBY, K.T. Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 2, 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.

STEVENS, R.G.; SWEDE, H.; ROSENBERG, D.W. Epidemiology of colonic aberrant crypt foci: review and analysis of existing studies. **Cancer Lett**, v. 252, p. 171-83, 2007.

STONER, G.D.; MORSE, M.A.; KELLOFF, G.J. Perspectives in cancer chemoprevention. **Environ Health Perspect**, v. 105, p. 945-954, 1997.

TAKAI, D.; JONES, P.A. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v.99, p. 3740-5. 2002.

TAO, L.; KRAMER, P.M.; WANG, W.; YANG, S.; LUBET, R.A.; STEELE, V.E.; PEREIRA, M.A. Altered expression of c-myc, p16 and p27 in rat colon tumors and its reversal by short-term treatment with chemopreventive agents. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 1447-1454, 2002.

TAO, L.; WANG, W.; KRAMER, P.M.; LUBET, R.A.; STEELE, V.E.; PEREIRA, M.A. Modulation of DNA hypomethylation as a surrogate endpoint

biomarker for chemoprevention of colon cancer. **Mol Carcinogenesis**, v.39, p. 79-84, 2004.

TESSEMA, M.; LEHMANN, U.; KREIPE, H. Cell cycle and no end. **Virchows Arch.**, v. 444, p. 313–323, 2004.

THORUP, I. Histomorphological and immunohistochemical characterization of colonic aberrant crypt foci in rats: relationship to growth factor expression. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 465-472, 1997.

TOLEDO, L.P.; ONG, T.P.; PINHO, A.L.; JORDÃO, A.JR.; VANUCCHI, H.; MORENO, F.S. Inhibitory effects of lutein and lycopene on placental glutathione S-transferase-positive preneoplastic lesions and DNA strand breakage induced inWistar rats by the resistant hepatocyte model of hepatocarcinogenesis. **Nutr Cancer**, v. 47, p. 62-69, 2003.

TOYOTA, M.; AHUJA, N.; OHE-TOYOTA, M.; HERMAN, J.G.; BAYLIN, S.B.; ISSA, J.P. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, p. 8681-8686, 1999.

TOYOTA, M.; ITOH, F.; KIKUCHI, T.; SATOH, A.; OBATA, T.; SUZUKI, H.; ISHII, S.; ENDO, T.; TOKINO, T.; IMAI, K. DNA methylation changes in gastrointestinal disease. **J Gastroenterol**, v. 37 Suppl 14, p. 97-101, 2002.

TURNER, B.M. Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. **Nat Struct Mol Biol**, v. 12, p. 110-112, 2005.

VINEIS, P.; ALAVANJA, M.; BUFFLER, P.; FONTHAM, E.; FRANCESCHI, S.; GAO, Y.T.; GUPTA, P.C.; HACKSHAW, A.; MATOS, E.; SAMET, J.; SITAS, F.; SMITH, J.; STAYNER, L.; STRAIF, K.; THUN, M.J.; WICHMANN, H.E.; WU, A.H.; ZARIDZE, D.; PETO, R.; DOLL, R. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. **J Natl Cancer Inst**, v. 96, p. 99-106, 2004.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Cancer genes and the pathways they control. **Nat Med**, v. 10, p. 789-99, 2004.

WAINFAN, E.; POIRIER, L.A. Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. **Cancer Res**, v. 52, p. 2071-2077, 1992.

WALI, R.K.; STOIBER, D.; NGUYEN, L.; HART, J.; SITRIN, M.D.; BRASITUS, T.; BISSONNETTE, M. Ursodeoxycholic acid inhibits the initiation and postinitiation phases of azoxymethane-induced colonic tumor development.**Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,** v. 11, p. 1316-1321, 2002.

WARD, J.M. Morphogenesis of chemically induced neoplasms of the colon and small intestine in rats. **Lab Invest,** v. 30, p. 505-513, 1974.

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.

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 cryptformation and progression. **Carcinogenesis** v. 21, p. 1149-1155, 2000.

WATKINS, S.M.; CARTER, L.C.; MAK, J.; TSAU, J.; YAMAMOTO, S.; GERMAN, B. Butyric acid and tributyrin induce apoptosis in human hepatic tumor cells. **J. Dairy Res,**, v. 66, p. 559-567, 1999.

WATTENBERG, L.W. An overview of chemoprevention: current status and future prospects. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 216, p. 133-141, 1997.

WILLIAMS, G. M. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. **Toxicology**, v. 166, p. 3-10, 2001.

WOLBACH, S.B.; HOWE, P.R. Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. **J Exp Med,** v. 42, p. 753-7, 1925.

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, p. 549-559, 2005.

WRIGHT, N.A.; POULSOM, R. Top down or bottom up? Competing management structures in the morphogenesis of colorectal neoplasms. **Gut**, v. 51, p. 306-308, 2002.

XIAO, J.H.; GHOSN, C.; HINCHMAN, C.; FORBES, C.; WANG, J.; SNIDER, N.; CORDREY, A.; ZHAO, Y.; CHANDRARATNA, R.A. Adenomatous polyposis coli (APC)-independent regulation of beta-catenin degradation via a retinoid X receptor-mediated pathway. **J Biol Chem,** v. 278, p. 29954-29962, 2003.

YAMADA, Y.; YOSHIMI, N.; HIROSE, Y.; KAWABATA, K.; MATSUNAGA, K; SHIMIZU, M.; HARA, A.; MORI, H. Frequent beta-catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. **Cancer Res,** v. 60, p. 3323-3327, 2000.

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

YOUNG, M.R.; YANG, H-S.; COLBURN, N.H. Promising molecular targets for cancer prevention: AP-1, NF-κB and Pdcd4. **Trends Mol Med**, v. 9, p. 36-41, 2003.

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