UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

LETÍCIA LIMA FALQUETTI

Efeito inibitório da Curcumina na iniciação da carcinogênese colônica experimental

Ribeirão Preto
2022

LETÍCIA LIMA FALQUETTI

Efeito inibitório da Curcumina na iniciação da carcinogênese colônica experimental

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Patologia

Opção: Patologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia

VERSÃO CORRIGIDA

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

Ribeirão Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Lima Falquetti, Letícia.

Efeito inibitório da Curcumina na iniciação da carcinogênese colônica experimental. 2022.

56p. : il. ; 30 cm.

Versão Corrigida.

Orientador: Garcia, Sérgio Britto.

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia experimental.

Letícia Lima Falquetti

Efeito inibitório da Curcumina na iniciação da carcinogênese colônica experimental.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de mestre.
Área de concentração: Patologia Experimental.

Banca Examinadora

1)Prof.(a) Dr.(a).:_____

Instituição: _____

Julgamento:_____Assinatura: _____

2)Prof.(a) Dr.(a).:_____

Instituição: _____

Julgamento:_____Assinatura: _____

3)Prof.(a) Dr.(a).:_____

Instituição: _____

Julgamento:_____Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Sérgio Britto Garcia, que durante os anos de convívio muito me ensinou, contribuindo para meu desenvolvimento crítico e cientifico, sendo um exemplo ético a todos que o cercam.

A Dra Stefânia Minto e a doutoranda Ana Carolina Alvarenga, que foram minhas parceiras em todos os experimentos e etapas realizadas.

A técnica de laboratórios Érika Pontin Delloiagono Gual pelo processamento do material e análises efetuadas.

As secretárias Célia e Camila, pelos anos de auxílio e amizade.

A CAPES, por todo o suporte financeiro e por proporcionar a realização deste trabalho.

“Que seu remédio seja seu alimento, e que seu alimento seja o seu remédio”

(Hipócrates)

FALQUETTI, L.L. **Efeito inibitório da Curcumina na iniciação da carcinogênese colônica experimental**. Dissertação. Departamento de Patologia e Medicina Legal – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2022.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O câncer de cólon é importante causa de morte em humanos e vários compostos naturais reduzem sua incidência tanto em humanos quanto em animais de experimentação. Para otimizar seu uso na nutrição humana e nas estratégias de quimioprevenção, é necessário um entendimento mais profundo dos mecanismos envolvidos em seus efeitos protetores contra o câncer. A curcumina, um composto fenólico natural da cúrcuma (C.longa), é um dos compostos naturais mais potentes que inibe a carcinogênese colônica, exercendo esse efeito por múltiplos mecanismos. Aqui, verificamos, de forma inédita, os efeitos da curcumina na fase de iniciação da carcinogênese do cólon, usando um protocolo que foi desenvolvido especificamente para esse fim.

MATERIAL E MÉTODOS: A curcumina foi administrada em três doses (48h, 24h e 8h) antes da aplicação do enema do carcinógeno MNNG (metil-n-nitro-n-nitrosoguanidina). Dos 60 camundongos C57BL / 6 machos, 30 receberam curcumina por gavagem (0,35mg / kg - 200uL / animal) nos grupos AC (controle adulto), ACM1 e ACM2 (MNNG + Curcumina 72 horas e 6 semanas animais adultos), YC (controle jovem), YCM1 e YCM2 (MNNG + Curcumina 72 horas e 6 semanas animais jovens. Oito horas após a última aplicação de curcumina, o carcinógeno MNNG (60mg/kg) foi administrado por enema em todos os grupos, exceto no controle. A eutanásia ocorreu 72 horas ou 6 semanas após a aplicação do carcinógeno. A indução da carcinogênese foi avaliada através da contagem de criptas colônicas displásicas. A marcação por imunoistoquímica foi utilizada para a contagem de células marcadas pelo antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Para verificação de danos ao material genético, foi feita reação de imuinoistoquímica para histona gama-H2AX (H2AX). A apoptose foi avaliada pela quantificação de corpúsculos apoptóticos (índice apoptótico) e pela marcação de Caspase-3, o sistema antioxidante foi avaliado por marcação de metalotioneínas (MT) e superóxido dismutase (SOD), bem como foi feita a avaliação da expressão da proteína oncomoduladora c-fos.

RESULTADOS: O pré-tratamento (ou tratamento profilático) com curcumina antes da aplicação de MNNG levou a redução significativa no número de lesões pré-neoplásicas no cólon (criptas displásicas) encontradas 6 semanas após a aplicação do carcinógeno. Além disso, o pré-tratamento com curcumina reduziu significativamente a taxa de proliferação celular, aumentou a expressão de enzimas antioxidantes como SOD e MT, diminuiu o dano ao DNA causado por MNNG nas células epiteliais do cólon, conforme demonstrado pela contagem dos núcleos corados com H2AX e c-Fos, aumentando drasticamente os níveis de apoptose celular, como pode-se observar pela elevação do índice apoptótico e marcação de casp-3.

CONCLUSÃO: Conclui-se o tratamento profilático com curcumina inibe a carcinogênese do cólon, sendo que os possíveis mecanismos envolvidos são: indução da apoptose, aumento da expressão das enzimas antioxidantes SOD e MT e a redução do dano ao DNA.

Palavras-chave: Carcinogênese experimental do cólon, Curcumina, H2AX.

FALQUETTI, L.L. . **Curcumin inhibitory effect on the initiation of experimental colonic carcinogenesis**. Dissertation. Department of Pathology and Forensic Medicine - Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2022.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Colon cancer is an important cause of death in humans and several natural compounds reduce its incidence in both humans and experimental animals. To optimize its use in human nutrition and chemoprevention strategies, a deeper understanding of the mechanisms involved in its protective effects against cancer is needed. Curcumin, a natural phenolic compound from turmeric (C.longa), is one of the most potent natural compounds that inhibits colonic carcinogenesis, exerting this effect through multiple mechanisms. Here, we look at the unprecedented effects of curcumin in the initiation phase of colon carcinogenesis, using a protocol that was developed specifically for this purpose.

MATERIAL AND METHODS: Curcumin was administered in three doses (48h, 24h and 8h) before applying the enema of the carcinogen MNNG (methyl-n-nitro-n-nitrosoguanidine). Of the 60 C57BL / 6 male mice, 30 received curcumin by gavage (0.35mg / kg - 200uL / animal) in groups AC (adult control), ACM1 and ACM2 (MNNG + Curcumin 72 hours and 6 weeks adult animals), YC (young control), YCM1 and YCM2 (MNNG + Curcumin 72 hours and 6 weeks young animals. Eight hours after the last application of curcumin, the carcinogen MNNG (60mg/kg) was administered by enema in all groups, except for the control. Euthanasia occurred 72 hours or 6 weeks after carcinogen application.The induction of carcinogenesis was assessed by counting dysplastic colonic crypts.Immunohistochemical labeling was used to count cells labeled by nuclear cell proliferation antigen (PCNA). Verification of damage to genetic material, immunohistochemical reaction for histone gamma-H2AX (H2AX) was performed. Apoptosis was evaluated by quantification of apoptotic bodies and by Caspase-3 labeling, the antioxidant system was evaluated by labeling of metallothioneins (MT) and superoxide dismutase (SOD), as well as the evaluation of the expression of the c-fos oncomodulator protein.

RESULTS: Pretreatment (or prophylactic treatment) with curcumin prior to application of MNNG led to a significant reduction in the number of preneoplastic lesions in the colon (dysplastic crypts) found 6 weeks after application of the carcinogen. Furthermore, pretreatment with curcumin significantly reduced the rate of cell proliferation, increased the expression of antioxidant enzymes such as SOD and MT, decreased DNA damage caused by MNNG in colonic epithelial cells, as demonstrated by counting the nuclei stained with H2AX and c-Fos, dramatically increasing the levels of cell apoptosis, as can be seen by the elevation of the apoptotic index and casp-3 labeling.

CONCLUSION: It is concluded that the possible protective mechanisms performed by Curcumin against cancer initiation are: (i) induction of apoptosis, (ii) increased expression of the antioxidant enzymes SOD and MT. Curcumin potently stimulated apoptosis and caused up-regulation of metallothioneins and SOD expression in colonic mucosa, which likely reduced the DNA damaging effects of the chemical carcinogen.

Key words: Experimental colonic carcinogenesis, Curcumin, H2AX.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fotomicrografia de lâminas coradas com HxE.....34
Figura 2: Criptas displásicas.....34
Figura 3: Fotomicrografias da imunomarcação para PCNA.....34
Figura 4: Expressão imunoistoquímica de PCNA.....35
Figura 5: Fotomicrografias da imunomarcação para MTs.....36
Figura 6: Criptas colônicas inteiras com imuno-marcação para MTs.....36
Figura 7: Fotomicrografias da imunomarcação para SOD.....37
Figura 8: Expressão imunoistoquímica de SOD.....38
Figura 9: Fotomicrografias da análise de imunomarcação para a histona gamma-H2AX.....39
Figura 10: Expressão imunoistoquímica de gamma-H2AX.....40
Figura 11: Fotomicrografias da imunomarcação para c-Fos.....40
Figura 12: Expressão imunoistoquímica de c-Fos.....41
Figura 13: Índice apoptótico.....42
Figura 14: Fotomicrografias da imunomarcação para Caspase-3.....42
Figura 15: Expressão imunoistoquímica de Caspase-3.....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais.....29
Tabela 2 – Marcadores utilizados.....32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FLU -	5-Fluoracil
AKT -	Protein kinase B
AP1 -	Activator protein 1
APC -	Adenomatous polyposis coli
BAX -	B-cell lymphoma 2 associated X protein
Bcl 2 -	B-cell lymphoma 2
CASP3 -	Cystein protease protein
CCR -	Câncer colorretal
C-FOS -	Proto-oncogene FOS
COX-1 -	Ciclooxigenase-1
COX-2 -	Ciclooxigenase-2
DAB -	3,3'- diaminobenzidina
DDR -	Resposta de dano ao DNA
DLCE1 -	Deleted in lung and esophageal cancer 1
DMH -	1,2-dimetilhidrazina
DNA -	Deoxyribonucleic acid
EGFR -	Epitelial grown fator receptor
EGR-1 -	Early growth response protein 1
FASE M -	Meiosis phase
FCA -	Foco de criptas aberrantes
FOLFOX -	Ác. folínico + Fluoracil + Oxaliplatina
G2 -	Growth phase 2
Gamma-H2AX -	Histona gamma 2AX
GRAS -	Generally recognized as safe
H.E. -	Hematoxilina-Eosina
H1F-1 -	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
IA -	Índice apoptótico
IL-1 beta -	Interleucina 1- beta
IL-10 -	Interleucina 10
IL-2 -	Interleucina 2
IL-6 -	Interleucina 6
Ki67 -	Marker of proliferation 67

MMP -	Matrix metalloproteinases
MNNG -	N-Metil-N-nitroso-N-guanidina
MT -	Metalotioneína
mTor -	Mammalian target of rapamycin
NaCl -	Cloreto de Sódio
NfK-β -	Nuclear factor kappa B
P450 -	Citocromo P450
P53 -	Phosphoprotein 53
PAF -	Polipose Adenomatosa Familiar
PCNA -	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PTEN -	Phosphatase and tensin homolog
Rb -	Retinoblastoma protein
SOD -	Superoxide dismutase
Sp-1 -	Specificity protein 1
STAT3 -	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
TCD3 -	Linfócito TCD3
THC -	Tetrahidrocurcumina
TNF-α -	Tumoral Necrosis Factor – alfa
TNF-β -	Tumoral Necrosis Factor – beta
TNF-β -	Tumoral Necrosis Factor – beta
VEGF -	Vascular Endolthelial Growth Factor
Wnt -	Wingless-type

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO**.....15
1.1 CARCINOGÊNESE DO CÓLON – DA INICIAÇÃO AO TUMOR.....15
1.1.2 **Inflamação, lesão ao DNA e marcadores da carcinogênese**.....17
1.1.3 **Carcinogênese experimental**.....19
1.2 CÚRCUMA E CURCUMINA.....19
1.2.1 **Cúrcuma**.....19
1.2.2 **Cúrcumina**.....20
1.2.3 **Mecanismo envolvido na atuação da curcumina intracelular**.....21
1.3 CURCUMINA E LESÕES PRÉ NEOPLÁSICAS DO CÓLON.....22
1.4 CURCUMINA NO TRATAMENTO DO CCR.....25
1.5 CURCUMINA, CCR E IDADE.....26
2. **JUSTIFICATIVA**.....26
3. **OBJETIVO.....**.....26
3.1 OBJETIVO GERAL.....26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....26
4. **MATERIAIS E MÉTODOS**.....28
4.1 ANIMAIS.....28
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....28
4.3 MATERIAIS.....30
4.4 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL.....30
4.5 AVALIAÇÃO DAS CRIPTAS DISPLÁSICAS.....30
4.6 REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS.....30
4.7 ANÁLISES IMUNOISTOQUÍMICAS.....31
4.8 AVALIAÇÃO DOS CORPÚSCULOS APOPTÓTICOS.....32
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....32
5. **RESULTADOS**.....33
5.1 INIBIÇÃO DA INICIAÇÃO DA CARGINOGÊNESE DO CÓLON.....33
5.2 EXPRESSÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....35

5.3 PARÂMETROS DE DANO AO DNA.....38

5.4 INDUÇÃO DA APOPTOSE.....41

6. **DISCUSSÃO...**.....43

7. **CONCLUSÃO**.....47

8. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.**.....48

1. INTRODUÇÃO

1.1 Carcinogênese do cólon – da iniciação ao tumor

As neoplasias colônicas são o terceiro tipo de câncer mais comum diagnosticado no mundo, sendo um dos principais problemas de saúde pública devido à sua prevalência e alta taxa de mortalidade. Variáveis como idade, antecedentes pessoais e familiares, etnia, hábitos alimentares e interações ambientais são os principais fatores de risco; pode-se afirmar que a maioria dos casos de câncer colorretal está associada ao estilo de vida e ao avanço da idade do que propriamente com fatores genéticos, que propiciam a potencialização da carcinogênese (Gulbake et al, 2016).

Estudos epidemiológicos apontam que uma alimentação desbalanceada com alto consumo de carnes vermelhas e embutidos, alimentos industrializados ultra processados, preparações culinárias queimadas e defumadas (nas quais há formação de aminas heterocíclicas) é considerada fator de risco para o desenvolvimento do câncer de cólon. Esse se relaciona intimamente à ocorrência de Obesidade e Síndrome Metabólica – questões de saúde ligadas ao surgimento de tumores, sendo considerada fator preditor da pouca ingestão de alimentos in natura ricos em fibras como frutas, verduras e legumes, além do baixo consumo de antioxidantes (Tarasiuk et al, 2018).

Como exemplo de lesões pré-neoplásicas colônicas pode-se citar os focos de Criptas Aberrantes (FCA) - lesões possivelmente precursoras de adenomas e carcinomas que podem se desenvolver no cólon. Assim, geralmente são utilizadas como um marcador neoplásico precoce do processo maligno da carcinogênese do cólon (Saad, 2006). Essas lesões foram observadas pioneiramente em 1987 por Bird, em mucosas de camundongos C57BL/6 tratados com o carcinógeno azoximetano. A confirmação clínica deste achado ocorreu posteriormente em 1991, quando estruturas semelhantes foram identificadas em montagens de cólon humano, podendo ser classificadas em lesões hiperplásicas ou displásicas. Atualmente, o exame de imagem colonoscopia cromoscópica de alta ampliação pode detectar FCA in vivo (Clapper et al, 2020; Gupta et al, 2007).

Os FCAs displásicos (micro adenomas) exibem alterações que são neoplásicas por natureza e idênticas às observadas em adenomas tubulares e vilosos, sendo caracterizados por células epiteliais com núcleos aumentados, aglomerados e estratificados, que podem perder sua polaridade e frequentemente apresentar

depleção de mucina; o nível de aumento nuclear, estratificação e perda de polaridade determina a gravidade da displasia (positividade de Ki67 e PCNA). Em relação a genética, o gene APC (Polipose adenomatosa do colo) é considerado o “start” do câncer colorretal, e mutações da sua linha germinativa, geralmente resultam em uma condição conhecida por Polipose Adenomatosa Familiar (PAF), uma síndrome hereditária em que os indivíduos desenvolvem centenas de pólipos (FCA) que culminam em câncer colorretal (Clapper et al, 2020; Gupta et al, 2007).

Mutações somáticas APC são encontradas em cerca de 60% dos adenomas e carcinomas intestinais, com características clássicas das FCA, como tamanho e multiplicidade de criptas, se mostrando preditores da incidência de CCR em animais tratados experimentalmente com carcinógeno. A grande maioria dos pacientes (93%) com mutação de APC desenvolve FCA displásico, enquanto essas lesões foram detectadas em apenas 7% dos pacientes que não apresentavam a mutação (Clapper et al, 2020; Gupta et al, 2007).

Independentemente da displasia, o número total de FCA aumenta com a idade, e focos únicos são encontrados predominantemente em pacientes jovens (abaixo de 40 anos), enquanto as contagens mais elevadas são observadas em indivíduos entre 50 a 70 anos de idade. Apesar de serem reconhecidas como lesões precoces, sabe-se que os FCA podem regredir ao longo do tempo naturalmente. Mesmo assim, pelo conhecimento da capacidade potencial de apenas uma única lesão displásica evoluir para câncer colorretal, que reiteramos a importância clínica da prevenção e tratamento precoce das FCA (Clapper et al, 2020).

De acordo com o Robbins e Cotran pode-se definir a fase de iniciação como “Resultado da exposição das células a uma dose suficiente de agentes carcinogênicos (iniciadores); uma célula iniciada está alterada, tornando-a potencialmente capaz de dar origem a um tumor. A iniciação isoladamente, contudo, não é geralmente considerada suficiente para a formação do tumor. ”; sendo seguida pela fase de promoção “É o segundo estágio da carcinogênese. Nele, as células geneticamente alteradas, sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor. A suspensão do contato com agentes promotores muitas vezes interrompe o processo nesse estágio. Alguns componentes da alimentação, como agrotóxicos, são exemplos de fatores que promovem a

transformação de células iniciadas em malignas” (Robbins e Cotran, 2010; INCA, 1996).

1.1.2 Inflamação, lesão ao DNA e marcadores da carcinogênese

Inflamação é definida como um processo fisiológico desencadeado em reposta a alguma injúria – podendo ser física, isquêmica, infecciosa, causando mudanças no metabolismo celular e desencadeando uma sequência de reações imunológicas que visam o combate ao agente causador, reparo tecidual, e proliferação celular. Ela pode se tornar crônica caso o estímulo base não cesse ou os mecanismos de controle da cascata pró-inflamatória falhem, exacerbando a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio gerando um quadro propício ao desenvolvimento tumoral (Singh et al, 2019).

Esse estado constante de dano tecidual causado pelo processo inflamatório, está intimamente relacionado a mutagênese do DNA e desenvolvimento do microambiente tumoral – levando ao aparecimento de displasias, além dos infiltrados de células imunológicas (principalmente macrófagos), que na tentativa de reparação produzem fatores como necrose tumoral alfa (TNF-α) e fator inibidor da migração de macrófagos, altamente danosos ao material genético com efeito direto sobre as vias dependentes de p53 e Rb-E2F, acumulando mutações oncogênicas que contribuem para iniciação e desenvolvimento do câncer e da imunossupressão típica da condição maligna (Singh et al, 2019).

Quando há presença de quadros intestinais oriundos de inflamação como Colite, Colite Ulcerativa e Doença de Crohn há um aumento da incidência de tumores nesses pacientes, isso se deve justamente a esses compostos genotóxicos produzidos localmente que causam lesões ao DNA, exacerbação por meio de citocinas que modulam a produção de radicais livres e também aumentando a permeabilidade da barreira intestinal, permitindo o contato de substâncias mutagênicas resultantes do processo alimentar com o epitélio, piorando a resposta imunológica do órgão como um todo, envolvendo principalmente as vias proliferativas - como Akt, STAT3 e NF-κB, bem como aumento da sinalização Wnt / β-catenina fundamental para a formação e crescimento de adenoma (Grivennikov, 2013).

Alguns parâmetros que podem ser considerados para quantificação do dano ao DNA são H2AX, índice apoptótico, criptas displásicas e expressão de metalotioneína. Esses indicadores são diretamente relacionados com a injúria tecidual provocada pela

inflamação, além de serem marcadores da iniciação tumoral que foi estudada nesse trabalho.

A histona gamma-H2AX é um indicador sensível do dano ao DNA, sendo utilizada como parâmetro para monitoração de eventos genotóxicos relacionados ao desenvolvimento e progressão de cânceres – aqui incluídos fármacos para indução experimental ou tratamento com rádio e quimioterapias; está envolvida com o mecanismo de reparo à dupla fita e supressão tumoral, acumulando-se nuclearmente nas células que apresentam falhas nesse processo, podendo ser mensuradas por técnicas adequadas. Também há evidências no aumento de sua expressão em tecidos e indivíduos com o processo de envelhecimento mais acentuado independente de danos teloméricos pré-existentes, tendo sua taxa elevada em doenças intestinais inflamatórias crônicas, que aumentam as chances do desenvolvimento de tumores, se mostrando válida para o rastreamento dos mesmos (Dickey et al, 2009).

A apoptose é um dos sistemas de morte celular programada, que entra como mecanismo de reparação tecidual quando constatada alguma mutação incompatível com o padrão genético do indivíduo; assim o índice apoptótico (IA) é utilizado para mensurar a taxa de apoptose ocorrida na região tumoral, esperando-se redução no caso de promoção e progressão do mesmo. Já as criptas displásicas são estruturas precursoras e precoces do câncer colorretal, caracterizadas por estrutura celular alargada e desigual sendo associada seu surgimento com mutações no gene APC e na via codificadora da β-catenina (Ogata et al, 2010).

Como último marcador podemos destacar a metalotioneína (MT), metaloproteína de baixo peso molecular rica no aminoácido cisteína, que em condições fisiológicas liga-se aos metais cobre e zinco e nas patológicas ao mercúrio e cádmio. Sua expressão pode ser modulada por citocinas, glicocorticoides e fatores de crescimento sendo sua atuação associada a manutenção da homeostase durante episódios de intoxicações. Em tumores colorretais há o aumento dos níveis de metalotioneína tipos I e II, sendo utilizadas como marcador de proliferação celular (Nagel e Vallee, 1995). Além dos reguladores tradicionais, a curcumina se mostrou eficiente modulador da expressão de metalotioneínas em tecidos hepáticos, renais e sanguíneos no pré e pós tratamento de intoxicação por mercúrio, resultando em proteção completa ao estresse oxidativo causado (Agarwal et al, 2010), demostrando-se a possibilidade de aplicação desse parâmetro na carcinogênese.

1.1.3 Carcinogênese experimental

Para mimetizar a tumorigênese humana a fim de facilitar seu estudo, utilizamos modelos animais de carcinogênese quimicamente induzida.

No primeiro grupo destacam-se as drogas 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e Metil-n-nitro-n-nitrosoguanidina (MNNG), sendo essa última a escolhida para a realização desse trabalho, pois sua atuação quando administrada via retal ocasiona uma alta incidência de tumores colônicos e focos de criptas aberrantes, comprovadamente gerando danos ao DNA celular.

1.2 Cúrcuma e Curcumina

1.2.1 Cúrcuma

Cúrcuma, conhecida no meio cientifico como *Curcuma longa L.*, tem seu nome muitas vezes regionalizado como açafrão da terra, falso açafrão, gengibre dourada, turmeric ou haldi (na tradicional medicina ayurvédica indiana). Classifica-se como uma planta herbácea e perene pertencente à família *Zingiberaceae* no qual seu rizoma é a parte comercialmente utilizada. Nativa do sudeste asiático mais precisamente das encostas de morros das florestas tropicais indianas e Ilha de Java, tem sua utilização amplamente difundida no Japão e China além da Índia; na farmacopeia tradicional asiática tem seu uso destacado como anti-inflamatório, analgésico, estimulador das funções hepáticas, expectorante, carminativa e estomáquico, dentre outros (Cecílio Filho, 2000). Tem sido utilizada amplamente na indústria têxtil, perfumista, medicinal e obtendo destaque na parte alimentícia para fabricação de condimentos como o curry ou carril, tempero tipicamente indiano (Esalq, 1994).

Possui cerca de 235 compostos isolados e identificados – 109 sesquiterpenos, 68 monoterpenos, 22 diariheptanóides e diarypentanóides, 8 fenilpropeno e outros fenólicos, 5 diterpenos, 4 esteróides, 3 triterpenóides, 2 alcalóides e 14 outros compostos (Bandyopadhyay, 2014). Destaca-se a curcumina como principal ativo presente, possuindo também compostos voláteis como a tumerona, atlantona e zingiberona (Bandyopadhyay, 2014; Sant'Anna, 2012).

Geralmente é comercializada em extrato seco, pois seus pigmentos curcuminóides (classe de pigmentos amarelos) estão mais concentrados, mas podendo também ser encontrada in natura para utilização predominantemente na culinária, como corante e conservante há mais de 6000 anos. No *Food and Drug Administration*, entidade reguladora estadunidense, é registrada como aditivo GRAS

(*Generally Recognized As Safe*) e seu número de aprovação é GRN 460 (Bandyopadhyay, 2014).

1.2.2 Curcumina

Curcumina (diferuloilmetano) na concentração de 71,5% é o principal ativo farmacológico presente na *Curcuma longa L*., pertencente a classe Diarileptanóides juntamente com outros dois compostos desmetoxicurcumina (19,4%) e bis-demethoxicurcumina (9,1%), constituem a curcumina comercial (Gupta, 2013; Bandyopadhyay, 2014; Kunnumakkara, 2009), embora esses valores variem conforme a literatura entre 70-80%, 15-25% e 7-10%, respectivamente (Bandyopadhyay, 2014; Shanmugam, 2015; Sant'Anna, 2012).

Caracteriza-se como composto polifenólico (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona) (Shanmugam, 2015) com caráter lipofílico, tendo sua solubilidade e estabilidade em água prejudicadas (Rahamani, 2014); propriedade essa que permite a travessia pela membrana celular, facilitando sua atuação intracelular. Acredita-se que seus principais metabólitos *in vivo* sejam curcumina-glucuronosideo, dihidrocurcumina-glucuronosideo, THC-glucuronosideo, e THC (tetra-hidrocurcumina) (Pan, 1999).

Muitos estudos foram desenvolvidos baseando-se nas propriedades anti-inflamatórias, anti-carcinogênicas e antioxidantes que a Curcumina possui. É pertinente destacar que essa alta atividade antioxidante é relacionada com a presença de grupamentos hidroxila em seu anel aromático, e sua capacidade de inibir a formação e propagação de radicais livres, além de induzir a expressão de proteínas citoprotetoras contra o estresse oxidativo como as heme-oxigenases (Sant'Anna, 2012; Mishrae, 2008).

Pode-se destacar o papel desse ativo na Doença de Alzheimer, no qual foi observado que a Curcumina age auxiliando no processo de fagocitose das placas beta-amiloides pelos macrófagos, desenvolvendo importante papel modulador do sistema imune (Mishrae, 2008). Outro papel de destaque é na interação com genes supressores de tumor, regulando negativamente a expressão de p53 e se mostrando um composto altamente tóxico na interação com PTEN (aumentando a apoptose induzida em neoplasias pancreáticas), além de provocar a diminuição da hiperfosforilação de Rb – modulando sua ativação em tumores de próstata (Rahamani, 2014).

Em estudo realizado com fibroblastos pulmonares foi possível observar a ação da Curcumina em genes relacionados à apoptose, no qual foi induzido a esse mecanismo celular em fibroblastos esclerodermáticos pulmonares sem que os fibroblastos normais fossem afetados (Tourkina, 2004). A Curcumina também tem efeito inibitório de VEGF, fator angiogênico vital para a sobrevivência e proliferação tumoral, além de regular fatores como AP62 e HIF-1 suprimindo sua expressão. Importante estudo também demonstrou que o ativo natural efetua regulação negativa dos fatores de transcrição NF-κB, AP-1 e Egr-1, considerando-a alternativa para tratamento de neoplasias (Rahamani, 2014; Kunnumakkara, 2009). A Curcumina também se mostra eficaz na inativação de oncogenes, fator chave para o desenvolvimento e progressão de neoplasias (Chen, 2006; Rahamani, 2014).

Outros alvos moleculares importantes que a Curcumina atua são fatores de transcrição como β-catenina, enzimas como COX-2 e MMP, citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-1β, e IL-6 e moléculas de adesão da superfície celular como as caderinas e integrinas (Buhrmann, 2014).

Através desses estudos foi possível classificar a Curcumina como pleiotrópica, pois possui diversos alvos moleculares que podem ser regulados por ação direta, nos quais liga-se modulando sua atividade, ou indiretamente regulando suas funções (Zhou, 2011).

1.2.3 Mecanismos envolvidos na atuação da curcumina intracelular

Apesar da mistura de curcuminóides usualmente utilizados em pesquisas ter baixa biodisponibilidade confirmada, sua concentração no trato gastrointestinal é alta, gerando uma expressiva modulação da microbiota colonica e uma satisfatória atuação intracelular do composto nos tecidos intestinais, principalmente com função anti-inflamatória devendo-se em especial à sua constituição química rica em grupamentos fenólicos, que proporcionam propriedade receptora de elétrons a estrutura neutralizando os radicais livres teciduais, justificando sua potente atividade antioxidante na redução de compostos carcinogênicos (Willenbacher et al, 2019; Erk et al, 2004).

A curcumina possui alguns alvos moleculares como isoformas do citocromo P450 com influência direta sob os metabolismos de fase I e II, inibindo a geração de compostos potencialmente carcinogênicos atuando de forma protetora na iniciação, promoção e progressão da tumorigênese. Há o estímulo do mecanismo de apoptose por meio da inibição das vias de imortalização celular, regulação de proteínas no

STAT-3, HIF1 (fator 1 induzível por hipóxia), vias Wnt / β-catenina e Sp-1 (proteína de especificidade 1), induzindo também as caspases, principalmente com a ativação das caspases 3 e 8, retículo endoplasmático e estresse mitocondrial; regula negativamente os genes anti-apoptose Bcl-2 e Bcl-X, contra regulando fatores de crescimento como EGFR (receptor do fator de crescimento epitelial) e ciclina D1, resultando na eficácia do processo apoptótico devido ao aumento da vulnerabilidade celular. Há ainda atuação direta do composto sobre o processo de autofagia e exacerbação do efeito Warburg (inibição da glicólise aeróbia em condição anaeróbia) por meio de ativação da via de mTOR e HIF1α, diminuindo os níveis intracelulares e a captação de glicose, estimulando por outro mecanismo além do citado acima, a apoptose (Willenbacher et al, 2019).

A atuação da curcumina sobre citocinas pró-inflamatórias como TNF-α é direta, inibindo os genes COX2 (ciclooxigenase-2) e NF-κB, além das interleucinas IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-6 e IL-10 reduzindo seus níveis quase à normalidade em células tumorais. Com a diminuição das metaloproteinases e de vias angiogênicas ligadas ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ocorre uma diminuição da taxa metastática dos tumores, regulando sua capacidade de migração e invasão celular (Willenbacher et al, 2019).

1.3 Curcumina e lesões pré neoplásicas de cólon

A literatura é vasta quanto as associações entre lesões no cólon (FCA), e administração de Curcumina. Sua utilização varia desde terapia, quimopreventiva, modulador do sistema imune e da microbiota intestinal.

Um estudo com modelo animal sobre Ileíte aguda relatou que a Curcumina atuou diminuindo a inflamação aguda intestinal generalizada, diminuindo a presença de linfócitos TCD3 e modulando o perfil de citocinas no intestino delgado, apontando para uma resposta pró inflamatória reduzida e anti-inflamatória aumentada. Também foi demonstrado efeito interessante na diminuição da translocação bacteriana da microbiota comensal com órgãos adjacentes e posterior bacteremia, episódios frequentes nesse quadro agudo; além de diminuir carga de bactérias potencialmente pró-inflamatórias como *E. coli* e Enterococos, preservando a população bacteriana anti-inflamatória como Lactobacilos e Bifidobactérias comparado ao controle (Bereswill, 2010).

É relevante o destaque relacionado ao tratamento de câncer colorretal em obesos, no qual foi demonstrado que por inibir a inflamação crônica e reequilibrar

níveis de adiponectinas mostra-se como interessante tratamento de câncer intestinal em obesos (Kubota, 2012). Outro ensaio demonstrou que modelos obesos, com dieta hiperlipídica e hipercalórica tem mais chance de desenvolver FCA do que modelos eutróficos, com dieta balanceada (Qi, 2015).

A Curcumina aumenta a sensibilidade à quimioterápicos influenciando diretamente as células tronco tumorais do cólon, aumentando a efetividade terapêutica do tratamento. Em ensaio *in vitro*, ela demostrou-se altamente eficaz na sensibilização dos aglomerados de células tronco, inibição e desintegração das esferas de alta densidade tumoral em comparação com os controles correspondentes. Também houve considerável modulação do microambiente tumoral, potencializando o seu efeito quimioterápico e mediando a interação parácrina entre células tumorais e estromais, exercendo forte efeito quimiossensibilizador, sendo importante na prevenção de metástases (Buhrmann, 2014).

Diversos estudos destacam a possibilidade de incluir a Curcumina nos esquemas quimioterápicos convencionais adotados para o câncer colorretal, por sua capacidade de atuar sinergicamente com os fármacos como 5-fluorouracilo (5-FU), 5-FU mais oxaliplatina (FOLFOX) e gemcitabina contribuindo para a não formação de linhagens celulares quimiorresistentes, sendo bem sucedida evitando metástases e inibindo a iniciação, promoção e progressão da carcinogênese com o mínimo de toxicidade (Patel, 2009; Patel, 2010).

Há evidencias que relacionam a atuação do ativo em combater FCA com a idade dos modelos. Demonstrou-se mais eficaz na inibição das lesões em ratos idosos (22 semanas) do que em ratos jovens (6 semanas), com taxa de 55% contra 49%, respectivamente. No entanto, a idade do animal não alterou significativamente os resultados referentes a inibição da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) de expressão do mRNA no fígado do animal, demonstrando mais uma vez seu potente efeito anti-inflamatório e anticarcinogênico (Kwon, 2004; Goel, 2001).

É cada vez mais estabelecida a tendência em procurar alternativas às quimioterapias para combate ao tumor, já que uma porcentagem considerável de pacientes se tornam resistentes aos tratamentos disponíveis. Assim, destaca-se a importante modulação que o ativo Curcumina apresenta em relação às neoplasias e lesões pré neoplásicas já que é atribuído efeito quimiopreventivo para vários tipos de tumor (Rahamani, 2014; Kunnumakkara, 2009).

Assim, é possível argumentar que a cúrcuma inibe a formação e atua no tratamento de lesões pré neoplásicas pois além de regular moléculas alvo que atuam na tumorigênese como fator antiangiogênico VEGF, NFkB, indutores de apoptose como Bax da via mitocondrial, ela ainda atua promovendo ou inibindo outros eventos celulares importantes para a carcinogênese do cólon (Heger et al, 2013; Singh, 2006; Volate, 2005; Kwon, 2004; Kim, 1998; Rao, 1993).

A grande maioria dos estudos sobre a inibição da carcinogênese por compostos naturais visa avaliar seus efeitos enquanto são coadministrados com um determinado carcinógeno químico, como tem sido descrito como os estudos que mostram os efeitos da curcumina contra a carcinogênese colônica. (Davesena et al., 2006; Kubota et al., 2012). No entanto, a possibilidade de um eventual efeito anti-iniciação da curcumina administrada anteriormente, ou seja, não simultaneamente com um carcinógeno químico, ainda não foi avaliada. A hipótese da existência de um efeito benéfico em tal situação pode ser levantada pelas observações de estudos toxicológicos. Assim, foi demonstrado que o pré-tratamento de ratos com curcumina protege contra a toxicidade hepática induzida pela exposição de ratos ao mercúrio (Agarwal et al., 2010) e cádmio (Terasub et al., 2012). Curiosamente, um aumento na expressão de metalotioneínas (MT) foi observado em ambos os estudos. MTs são proteínas ubíquas que desempenham um importante papel biológico na eliminação de metais tóxicos como cádmio e mercúrio, bem como na homeostase de zinco e cobre e na proteção de células contra espécies reativas de oxigênio (Jacob et al., 1999). A superexpressão de MTs protege as células contra agentes que danificam o DNA, incluindo estresse oxidativo (Schwarz et al., 1995). Observou-se que a MT inibe o início da carcinogênese cutânea induzida quimicamente, uma vez que foi demonstrado um aumento marcante no número de tumores em camundongos nulos para MT em comparação com os controles do tipo selvagem (Suzuki et al., 2003), mas o os mecanismos envolvidos nos efeitos anti-iniciação da MT na carcinogênese permanecem apenas parcialmente conhecidos.

Assim, no presente estudo verificamos se a curcumina possui efeito preventivo contra o início da carcinogênese colônica, utilizando um protocolo especificamente desenhado para este fim.

O agente alquilante N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) foi escolhido para induzir a carcinogênese química porque tem efeito direto nas células epiteliais do cólon ao adicionar grupos alquil à Guanina e Timina, levando a mutações

transitórias entre GC e AT no DNA, não dependendo da metabolização sistêmica que pode ser influenciada pela curcumina (Mukherjee et al., 2001). Também avaliamos a expressão da superóxido dismutase no presente estudo, porque a curcumina também mostrou elevar as atividades da superóxido dismutase (SOD) e outras enzimas antioxidantes durante o cólon quimicamente induzido (Davesena et al., 2006) e carcinogênese pulmonar (Liu et al., 2015-2).

1.4 Curcumina no tratamento do câncer colorretal

Esse tipo de câncer destaca-se por sua alta taxa de recorrência e metástases. Há suspeita de que essas características estejam relacionadas à modulação epigenética do microambiente tumoral e sua resposta inflamatória, a conexão entre as células tumorais e as estromais, que compõe esse microambiente. Assim, os agentes que são capazes de suprimir essa interação podem ser estratégias interessantes para conter o potencial metastático e a progressão tumoral (Buhrmann, 2014).

A literatura mostra diversos estudos bem conduzidos em que a cúrcuma é uma eficaz protagonista, em sinergia ou não com outras substâncias, auxiliando no tratamento do tumor. Seja potencializando o efeito do quimioterápico ou sensibilizando linhagens de células resistentes, ela age em diversos alvos inibindo o avanço da doença.

Seus principais efeitos estão relacionados ao aumento da taxa de apoptose tumoral, anti-proliferativo celular significativo e modulação da capacidade de invasão do tumor, influenciando diretamente a taxa de metástases; é válido destacar que a densidade dos vasos sanguíneos e linfáticos no microambiente tumoral é reduzido no tratamento com a cúrcuma e que a inibição do crescimento passa pela paragem do ciclo celular em G2/Fase M, subregulando a expressão de enzimas da via glicolítica, bloqueando assim o crescimento celular. A combinação de cúrcuma com 5-FU e Oxaliplatina inibiu o crescimento de tumores advindos de um xenoenxerto em modelo animal de câncer de cólon (Zheng, 2016).

Além disso, um estudo evidenciou que Curcumina inibe o crescimento de linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon humano e a promoção da apoptose ficou evidenciada pela fragmentação nuclear e do material genético da mesma; já outro trabalho traz que a substância natural atua na regulação negativa da expressão da Hexoquinase II e isso levou a apoptose celular por via mitocondrial da célula

doente, pois ela atua indiretamente regulando o citocromo c que é o responsável efetivo pela diminuição da expressão da Hexo II (Elmore, 2007).

A desmetilação epigenética se dá pela regulação do gene supressor de tumor DLCE1 (quando deletado, está envolvido nos cânceres de pulmão e esôfago) pode estar envolvido com o efeito inibitório da Curcumina no crescimento da ancoragem independente das células de câncer de cólon humano (Zheng, 2016).

1.5 Curcumina, câncer de cólon e idade

A associação entre a taxa de ocorrência dos tipos de cânceres mais prevalentes – principalmente o colorretal, e a idade dos indivíduos acometidos já é bem estabelecida. Porém, a maioria dos estudos envolvendo fitocompostos, incluindo os que utilizaram curcumina, não consideraram o envelhecimento como fator crucial para seu efeito quimiopreventivo e possíveis variações relacionadas (Kwon, 2009).

Há relatos preliminares na literatura que a eficácia da quimioprevenção relacionada ao câncer de cólon exercida pela curcumina, é inversamente proporcional ao aumento da idade do animal. Esse efeito é associado a diminuição na indução da apoptose por esse composto em animais mais velhos – um dos principais mecanismos de inibição da iniciação da carcinogênese, devido às alterações fisiológicas da regulação da apoptose em tecidos pós mitóticos, limitando assim a ação do composto. (Kwon, 2009).

2. Justificativa

Com base nas argumentações expostas, e ausência de literatura focando especificamente no efeito da Curcumina utilizada na fase de iniciação da carcinogênese colônica, espera-se comprovar sua atuação como quimiopreventiva nesta etapa do câncer de cólon.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo averiguar os efeitos da Curcumina na fase de iniciação da carcinogênese do cólon, utilizando análises histológicas e imunoistoquímicas da mucosa.

3.2 Objetivos específicos

I. Avaliar a influência da curcumina na carcinogênese colônica, através da imunomarcação de H2AX, C-fos, PCNA e Casp-3, que conhecidamente apresentam-se aumentadas no câncer;
II. Determinar a presença de células mutadas pelo carcinógeno químico MNNG, através da contagem de criptas displásicas;
III. Analisar a expressão por imunoistoquímica da gamma-H2AX e C-fos para identificar se há presença de danos severos ao DNA, devido administração do carcinógeno MNNG, além de avaliar a expressão de PCNA (marcador relacionado com a taxa de prolifereção celular colonica);
IV. Verificar se há diferença do dano ao DNA de acordo com a idade do modelo animal, e também o efeito protetor da curcumina;
V. Checar o possível mecanismo de proteção antioxidante da curcumina (crônica e agudamente), pela mensuração da imunomarcação da SOD e MT.

4.MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Um total de 60 camundongos machos C57BL / 6 foram utilizados no experimento.

Foram utilizados animais de diferentes idades, sendo o primeiro grupo animais jovens desmamados de três semanas (21 dias), pesando aproximadamente 9 gramas. O segundo grupo são animais de sete semanas de idade (49 dias) com aproximadamente 25g. Os animais são provenientes do Biotério Central da Prefeitura do Campus da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) e foram mantidos no biotério do Departamento de Patologia, em condições de temperatura ambiente constante e temperatura de 12 horas, ciclo noturno-dia. Eles foram alimentados com uma dieta padrão Purina® para ratos e água da torneira *ad libitum*. Os animais foram mantidos de acordo com as regras do Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP.

Projeto aprovado na CEUA-FMRP-USP sob o protocolo 004/2017 em 24/04/2017.

4.2 Desenho experimental

Após um período de adaptação de uma semana, os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos para cada idade, totalizando doze.

Foram realizados dois grupos controle absolutos, um jovem e um adulto; quatro grupos de controle para o carcinógeno MNNG sendo crônicos e agudos para cada idade distinta; e dois grupos controle de curcumina, um para animais jovens e outro para adultos.

Para o tratamento, havia quatro grupos associando curcumina por gavagem com a aplicação prévia de carcinógeno MNNG, e sua eficácia foi medida aguda e cronicamente, em camundongos jovens e adultos.

As aplicações de curcumina ocorreram com um esquema de doses a cada 24 horas, por 3 dias (72 horas). Após esse período, o carcinogênico MNNG (metil-n-nitro-n-nitrosoguanidina) foi administrado via enema nos respectivos grupos, 80 horas após a primeira aplicação de curcumina, nos grupos que receberam o pré-tratamento. A eutanásia ocorreu nos seguintes horários: 3 dias (72 horas) após a aplicação do agente cancerígeno e 6 semanas.

Tabela 1. Grupos experimentais

Grupos	Idade	N	Intervenção	Eutanásia
A	Adulto	5	Controle	6 semanas
AC	Adulto	5	Curcumina	6 semanas
AM1	Adulto	5	MNNG	72 horas
AM2	Adulto	5	MNNG	6 semanas
ACM1	Adulto	5	Curcumina + MNNG	72 horas
ACM2	Adulto	5	Curcumina + MNNG	6 semanas
Y	Jovem	5	Controle	6 semanas
YC	Jovem	5	Curcumina	6 semanas
YM1	Jovem	5	MNNG	72 horas
YM2	Jovem	5	MNNG	6 semanas
YCM1	Jovem	5	Curcumina + MNNG	72 horas
YCM2	Jovem	5	Curcumina + MNNG	6 semanas

4.3 Materiais

- Carcinógeno MNNG (metil-n-nitro-n-nitrosoguanidina - Sigma®): 60mg/kg, reconstituído em água destilada e aplicado via enema 100 microl./animal.
- Curcumina em pó (extraída da *Curcuma longa* – Sigma®): reconstituída em água destilada a 0,35 mg/kg, aplicado via gavagem 200microL/animal/dia.
- Água destilada para solução.

4.4 Coleta e Processamento do material

Os animais foram sacrificados seguindo o protocolo anestésico utilizado pelo laboratório e submetidos à laparotomia mediana com posterior isolamento e remoção do cólon distal. Assim, o cólon foi aberto a partir de sua borda mesentérica, limpo com solução salina (NaCl 0,9%) e cuidadosamente espalhado em uma placa de vidro para fazer os cortes para armazenamento nas cassetes. Os dois pontos foram então colocados entre papéis de filtro dentro de cassetes previamente identificadas, que foram imediatamente imersas em uma solução de formaldeído a 10% para fixar o material em um período de 48 a 72 horas. Após fixadas, as amostras foram submetidas à desidratação por submersão em concentrações crescentes de álcoois. Os materiais foram então submetidos a banhos de xilol a 100% para permitir a limpeza. Os dois pontos processados foram embebidos em parafina para realizar as seções histológicas para a confecção das lâminas. Usando um micrótomo rotativo, os blocos de parafina contendo as amostras do cólon foram cortados com uma espessura de 4 µm (micrômetros), aderidos a folhas silanizadas e levados a um forno aquecido a 60 ° C para otimizar a adesão do material à folha. Antes da imuno-histoquímica ou H.E. técnica de coloração, as lâminas foram desparafinadas e hidratadas. Finalmente, a recuperação antigênica do material foi realizada por método físico-químico, expondo o material à vaporização em solução tampão de citrato, com pH 6,0.

4.5 Avaliação de Criptas Displásicas

Na análise microscópica as criptas displásicas foram identificadas, qualificadas, e calculada a frequência por unidade de área em cm^2, além da análise de corpos apoptóticos.

4.6 Reações imunoistoquímicas

A técnica de imunoistoquímica foi realizada em cortes histológicos colônicos transversais, aquecidos a 60ºC durante 75 minutos, e ocorreu através da reação antígeno-anticorpo, seguida da reação com marcador visível ao microscópio. Para a marcação dos cortes histológicos, estes foram aderidos em lâminas silanizadas,

desparafinizados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de etanol até água. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato pH 6,0 (em panela de vapor) por 20 minutos. Para inibir reações com peroxidases teciduais, peróxido de hidrogênio a 3% foi adicionado sobre as lâminas. Para a realização do bloqueio de ligações teciduais inespecíficas – o que poderia causar marcação inespecífica, utilizou-se soro normal de cavalo diluído em solução-tampão de fosfato (PBS) pH 7,4 (PBS), em uma concentração de 10%. Entre cada etapa as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS para evitar formação de precipitados. As lâminas foram incubadas com seu respectivo anticorpo primário: H2AX (anti-gammaH2AX phospho S140 [3F2] Abcam®; 1:200), MT (anti-MT monoclonal mouse - clone E-9; DAKO®; 1:200), SOD (superóxido dismutase-1; sod-1(24) sc-101523; Santa Cruz Biotechnology®; 1:400), c-Fos (c-Fos D-1 mouse monoclonal antibody – sc-8047; Santa Cruz Biotechnology®; 1:200), PCNA (proliferating cell nuclear antigen NCL-PCNA – mouse monoclonal antibody; NovoCastra Laboratory®; 1:200), Caspase-3 (cysteine protease protein – CPP32; NovoCastra Laboratory®; 1:300) em câmara úmida e escura, durante 2 horas. Após lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário biotinilado durante 30 minutos e, após nova lavagem, foram incubadas com polímero conjugado também por 30 minutos. Para revelação, as lâminas receberam solução reagente contendo o cromógeno DAB (3,3'- diaminobenzidina), durante 1 a 3 minutos, até o aparecimento de precipitado de coloração marrom – atribuída à redução do DAB pela reação. Todos os reagentes são disponibilizados com PicTureTM Max PolymerDetection Kit (Invitrogen). As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris diluída por cerca de 1 minuto e desidratadas e diafanizadas novamente. Para montagem das lâminas, utilizou-se Entelan.

4.7 Análises imunoistoquímicas

A contagem das células positivamente marcadas (que apresentavam coloração marrom) foi feita com uso de microscópio óptico da marca Zeiss, em objetiva de aumento de 400x, e considerou-se toda a extensão de cada corte.

Para o antígeno de proliferação nuclear (PCNA), o resultado foi expresso pela porcentagem de células marcadas por cripta colônica, sendo denominado índice de PCNA.

Para a quantificação da marcação de metalotioneínas (MT) foram contadas as as células positivas encontradas a cada 100 criptas colônicas.

O resultado foi expresso pela média do número de células marcadas por cripta colônica, para os anticorpos para SOD, H2AX, C-fos e Caspase-3.

Para todos os marcadores foram avaliadas de 20 a 100 criptas colônicas por animal, sendo que o número de criptas utilizadas dependeu do achado de criptas bem preservadas e marcadas, com ausência de *back ground*, para serem utilizadas na quantificação.

Tabela 2. Marcadores utilizados

Marcadores	**Estrutura corada**
PCNA	Núcleo celular
MT	Citoplasma e núcleo celular
SOD	Citoplasma celular
H2AX	Núcleo celular
c-Fos	Núcleo celular
Casp3	Citoplasma celular

4.8 Avaliação dos Corpúsculos Apoptóticos

Os Corpúsculos apoptóticos foram identificados e quantificados em cortes histológicos corados por Hematoxilina e Eosina. Os resultados foram expressos pela média do número de corpúsculos por 20 criptas colônicas, sendo avaliadas pelo menos 100 criptas por animal.

4.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através da utilização do software GraphPadPrism 5.0 (San Diego, Califórnia). Os resultados foram submetidos à análise de variância por ANOVA de uma via (One-Way) e expressos em média ± desvio padrão da média. Para confirmação do resultado, foi aplicado o Teste T de Student para comparação entre dois grupos distintos e isolados, entre si. Foram considerados estatisticamente significantes valores com $p<0,05$.

5. RESULTADOS

Durante a realização de todos os procedimentos nenhum animal apresentou sinais clínicos de doença, dor ou alterações comportamentais. Nenhuma diferença no peso corporal ocorreu ao final de nossos experimentos (dados não mostrados).

Macroscopicamente, os cólons dos animais tratados com Curcumina não apresentavam alterações em espessura e coloração quando em comparação aos demais grupos.

5.1 Inibição da iniciação da carcinogênese do cólon

Conforme mostrado nas figuras 1 e 2, foi observada 6 semanas após o tratamento com o carcinógeno MNNG a formação de criptas displásicas do cólon (Fig. 2) e um aumento significativo na proliferação de células epiteliais, observadas pela contagem de núcleos imunocorados de PCNA (Fig. 3). Esses achados foram mais intensos nos animais jovens (YM2 e YCM2) em comparação com os adultos (AM2 e ACM2). Os animais pré-tratados com curcumina (ACM2 e YCM2) mostraram uma redução acentuada de ambos os parâmetros da carcinogênese do cólon, que foi mais pronunciada em camundongos jovens (YCM2).

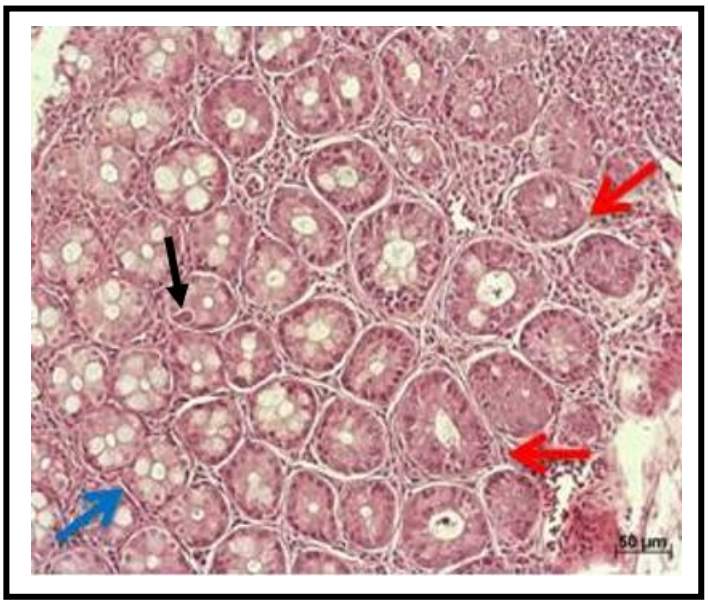

Figura 1 - Fotomicrografias de lâminas coradas com HxE. Na imagem 1 observamos o grupo AM2 (MNNG – 6 semanas), com criptas normais (seta azul) e criptas displásicas (seta vermelha) e corpúsculo apoptótico (seta negra).

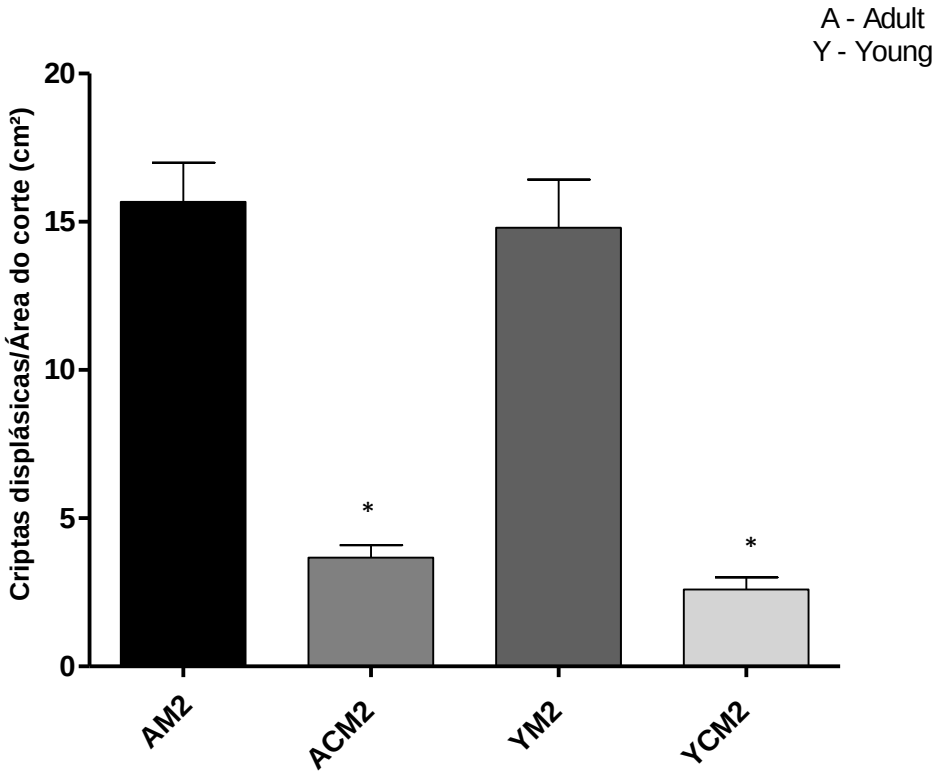

Figura 2 – Criptas displásicas. Número de células positivas/cm². Análise por one-way ANOVA. Houve diminuição na contagem de criptas displásicas no grupo ACM2 e YCM2, em relação aos seus pares apenas com uso de MNNG prévio, destacando o grupo jovem tratado com curcumina, no qual o número de criptas displásicas foi menor quando comparado aos adultos (P<0.0001).

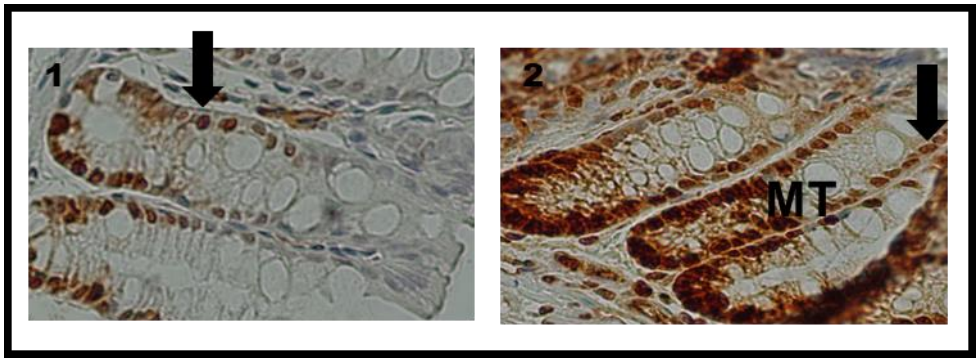

Figura 3 - Fotomicrografias da análise de imunomarcação para PCNA– demonstrada pela coloração marrom. Na imagem 1 observamos o grupo A (controle), com pouca marcação de proliferação celular. Na

imagem 2, observamos o grupo AM2 (MNNG – 6 semanas), com marcação maior dos núcleos celulares indicando uma taxa proliferativa maior.

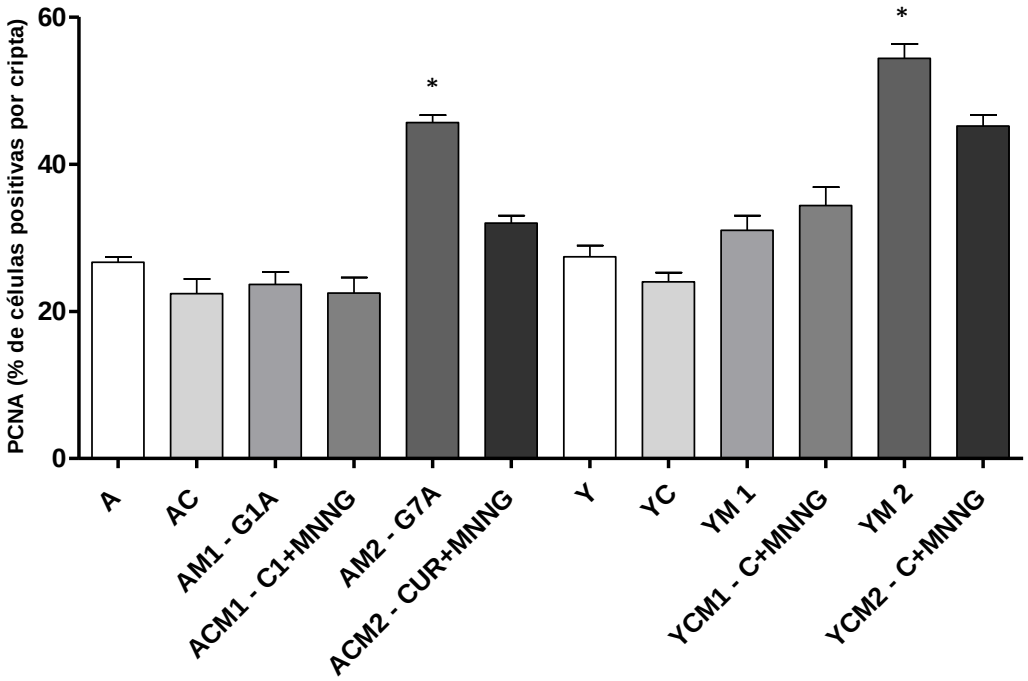

Figura 4 - Expressão imunoistoquímica de PCNA. Porcentagem de células positivas/cripta colônica. Análise por one-way ANOVA. É possível observar a proliferação celular diminuída nos grupos ACM2 e YCM2, quando comparados a seus respectivos controles tratados com MNNG (AM2 e YM2) e também dos grupos AC e YC quando comparado com seus controles absolutos (grupos A e Y) (P<0,0001).

5.2 Expressão de enzimas antioxidantes

A análise imunohistoquímica quantitativa demostrou que o pré-tratamento com curcumina causou aumento importante na expressão das enzimas antioxidantes MT e SOD apenas nos animais tratados com MNNG, até 72 horas após a aplicação do carcinógeno (ACM1 e YCM1). Este efeito foi mais intenso em animais jovens (YCM1). A expressão dessas enzimas não foi aumentada nos animais eutanizados em 6 semanas.

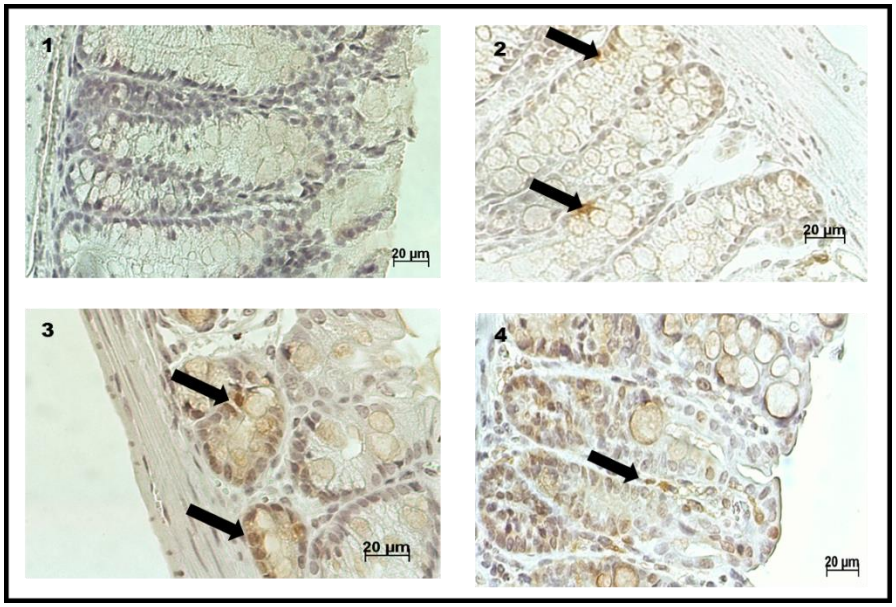

Figura 5: Fotomicrografias da imunomarcação para MTs. Marcação citoplasmática/nuclear de células epiteliais das criptas colônicas, representada pela coloração marrom. Na imagem 1 Grupo controle adulto (A) não apresenta marcação para MTs. Na imagem 2 o grupo AM2 (MNNG – 6 semanas); nas imagens 3 e 4 os grupos AMC1 e AM1 apontam imunomarcação difusa para MTs indicada pelas setas.

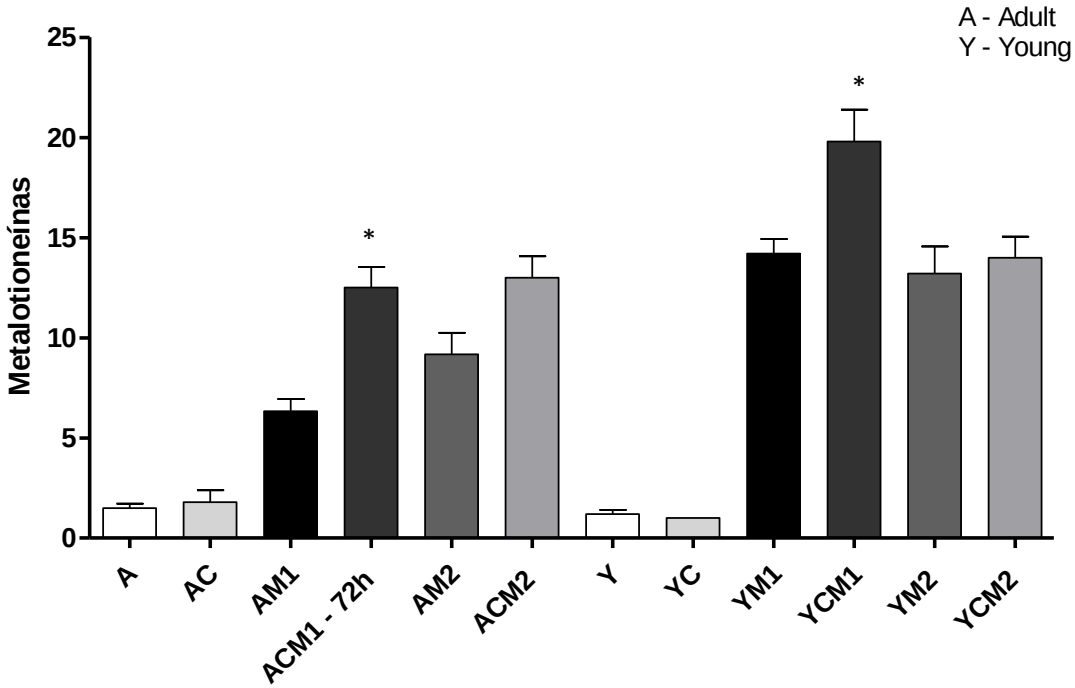

Figura 6 - Criptas colônicas inteiras com imuno-marcação para metalotioneínas. Média de células positivas/cripta. Análise por one-way ANOVA. Os grupos jovens agudos (tratados com MNNG e Curcumina eutanasiados após 72 horas) significativamente apresentaram maior expressão de MT em comparação ao grupo controle (P<0,0001).

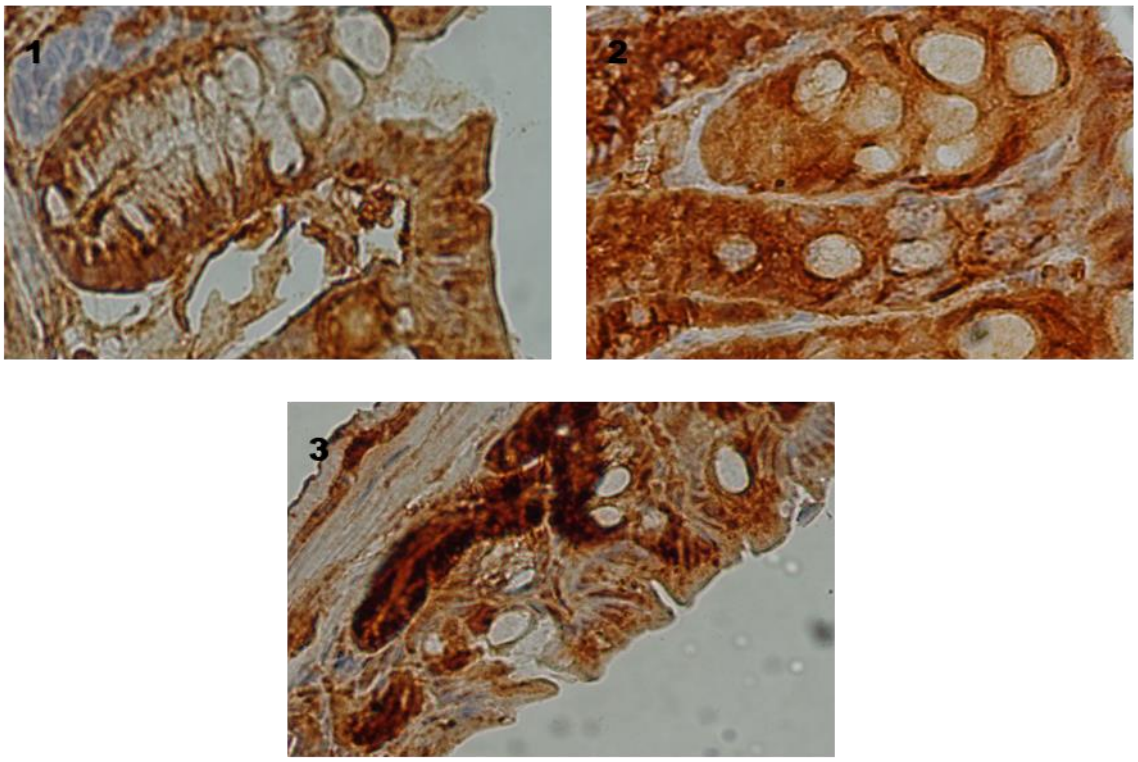

Figura 7 - Fotomicrografias da análise de imunomarcação para SOD – demonstrada pela coloração marrom. Na imagem 1 observamos o grupo A (controle), com pouca imunomarcação referente a enzima superóxido dismutase. Nas imagens 2 e 3, observamos o grupo AMC1 (MNNG + Cúrcuma – 72horas) e AM1 (MNNG – 72horas) respectivamente, com aumento na marcação da proteção antioxidante mediada por essa via no grupo AMC1.

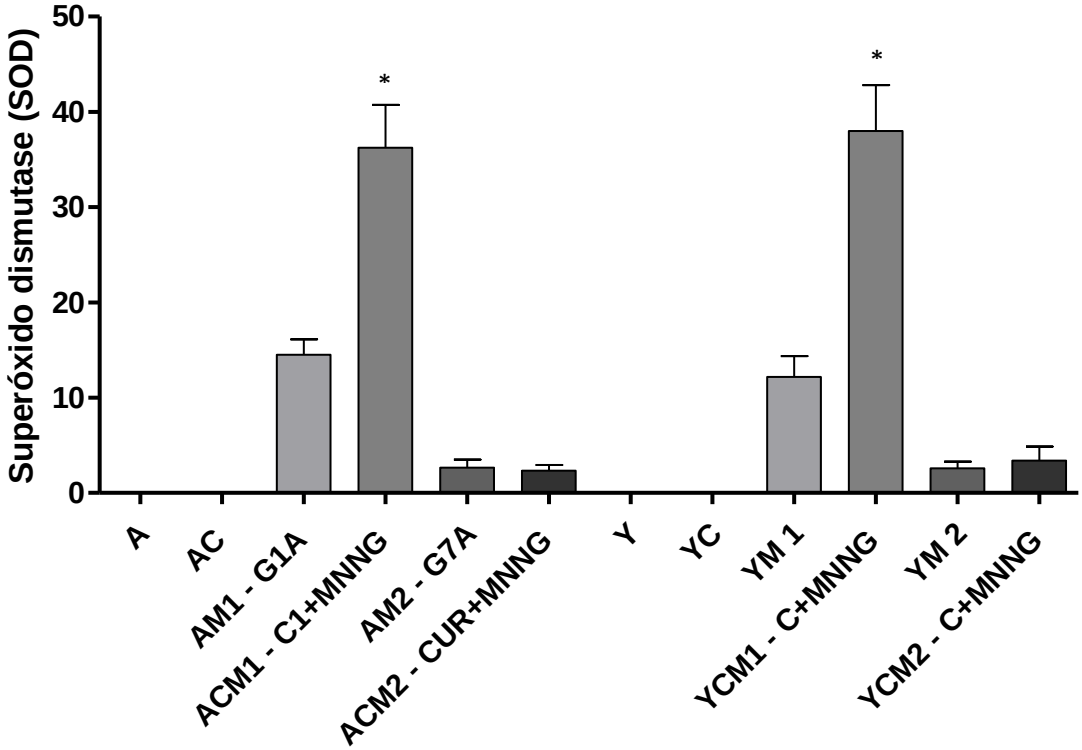

Figura 8 - Expressão imunoistoquímica de Superóxido dismutase (SOD). One-way ANOVA analysis. Houve grande aumento na expressão da enzima antioxidante nos grupos ACM1 e YCM1 em relação aos seus controles tratados com MNNG (AM1 e YM1), reforçando a modulação antioxidante da curcumina (P< 0.0001).

5.3 Parâmetros de dano ao DNA

Foi observado que o MNNG causou uma fosforilação de H2AX dramaticamente melhorada, que foi anulada pelo pré-tratamento com curcumina (ACM1 e YCM1) (Fig. 10). Descobertas semelhantes foram observadas em relação à expressão de c-Fos (Fig.12). Esses achados reiteram o efeito de diminuição ao dano do DNA na célula colônica.

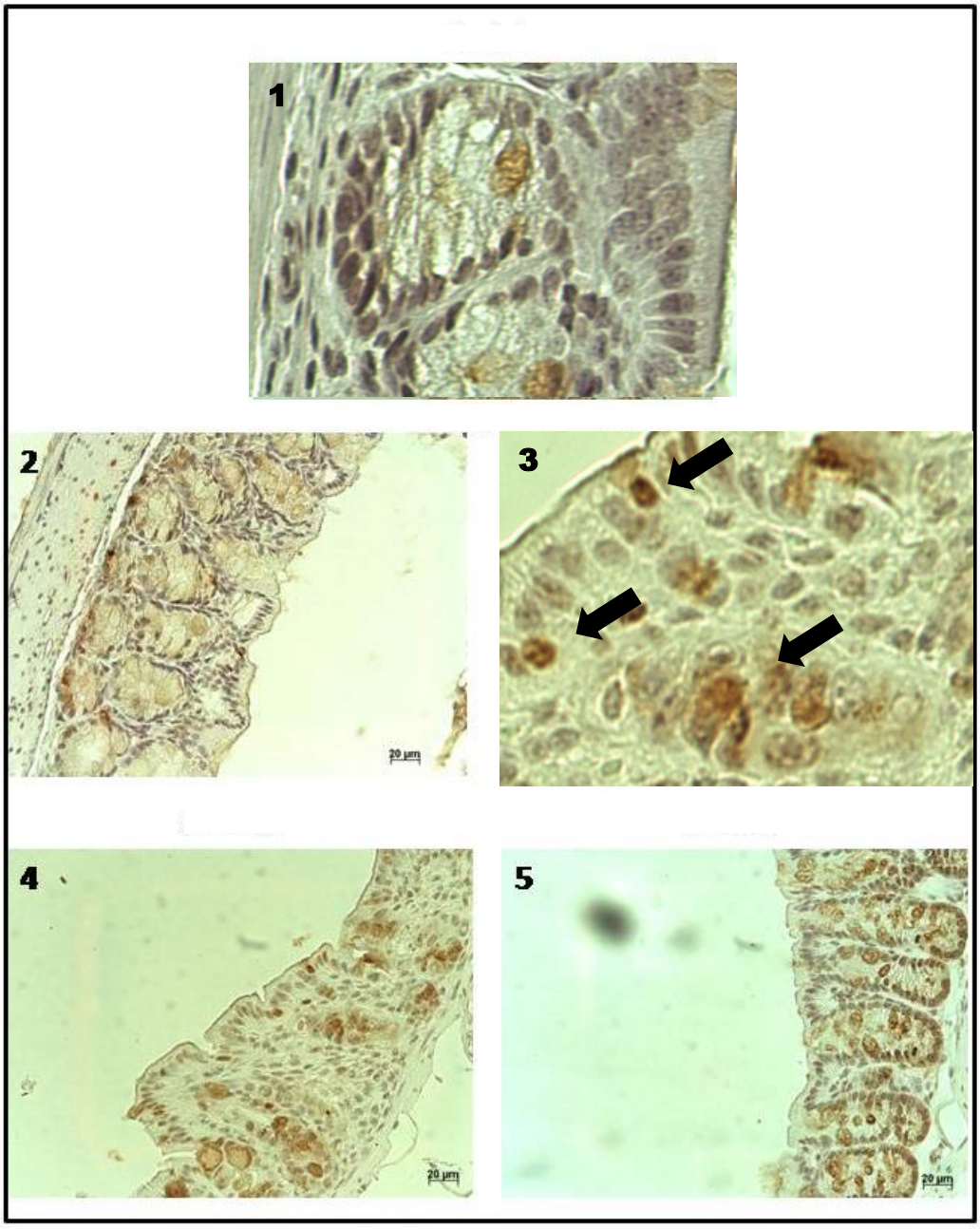

Figura 9 - Fotomicrografias da análise de imunomarcação para a histona gamma-H2AX – demonstrada pela coloração marrom. Na imagem 1 observamos o grupo A (controle), com pouca imunomarcação para gamma—H2AX. Nas imagens 2 e 3, observamos o grupo AM1 (MNNG – 72horas), com marcação maior de células das criptas colônicas para essa histona. Nas imagens 4 e 5, observamos os grupos de tratamento com curcumina ACM1 e ACM2, respectivamente, com menor marcação de H2AX, quando em comparação ao grupo AM1.

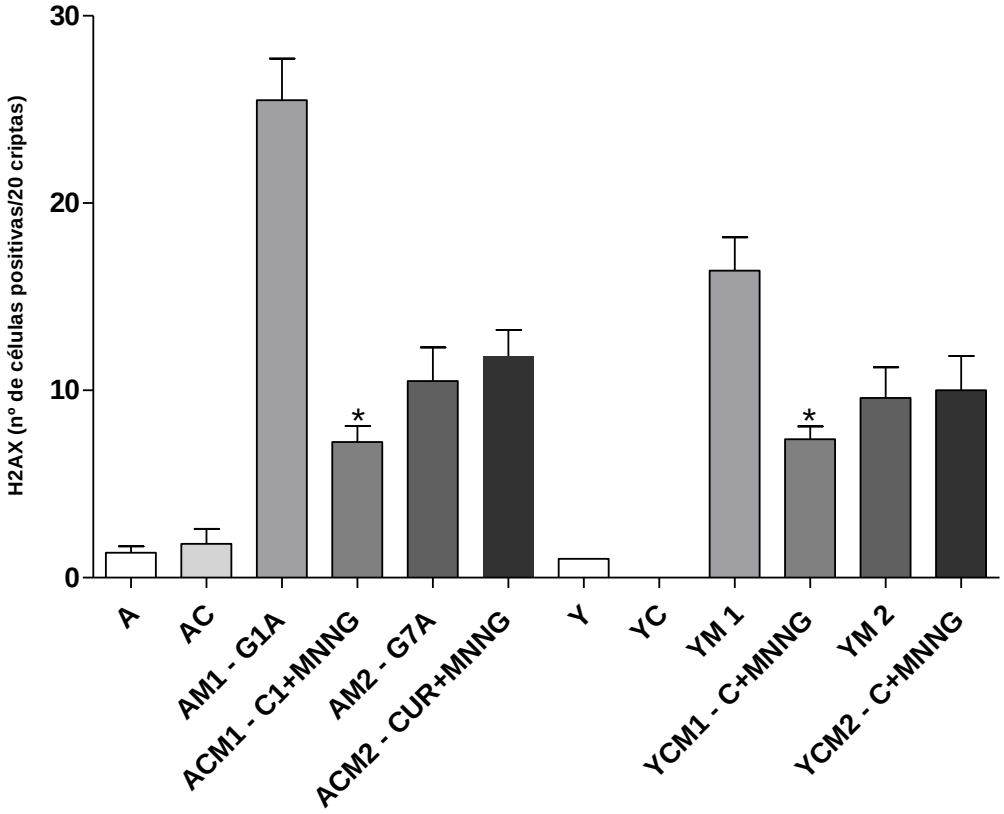

Figura 10 - Expressão imunoistoquímica de gamma-H2AX. Número de células positivas/20 criptas. Análise por one-way ANOVA. Há aumento na expressão de gamma-H2AX nos grupos ACM1 e YCM1, sinalizando a diminuição do dano ao DNA nos grupos tratados previamente com curcumina (P<0,0001).

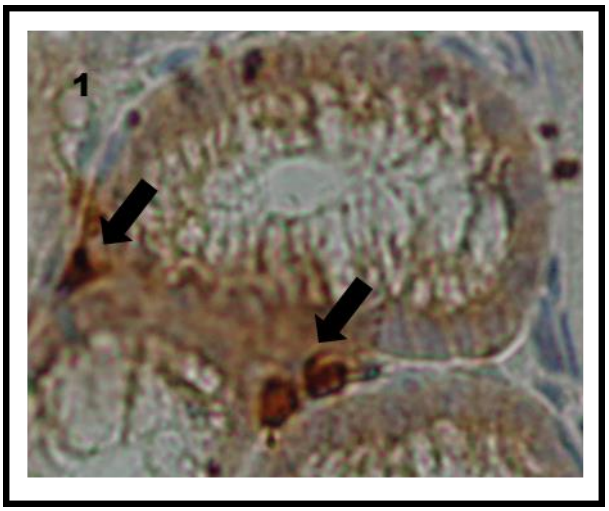

Figura 11 - Fotomicrografias da análise de imunomarcação para c-Fos – demonstrada pela coloração marrom. Na imagem 1, observamos no grupo AM1 núcleos corados indicando dano ao DNA.

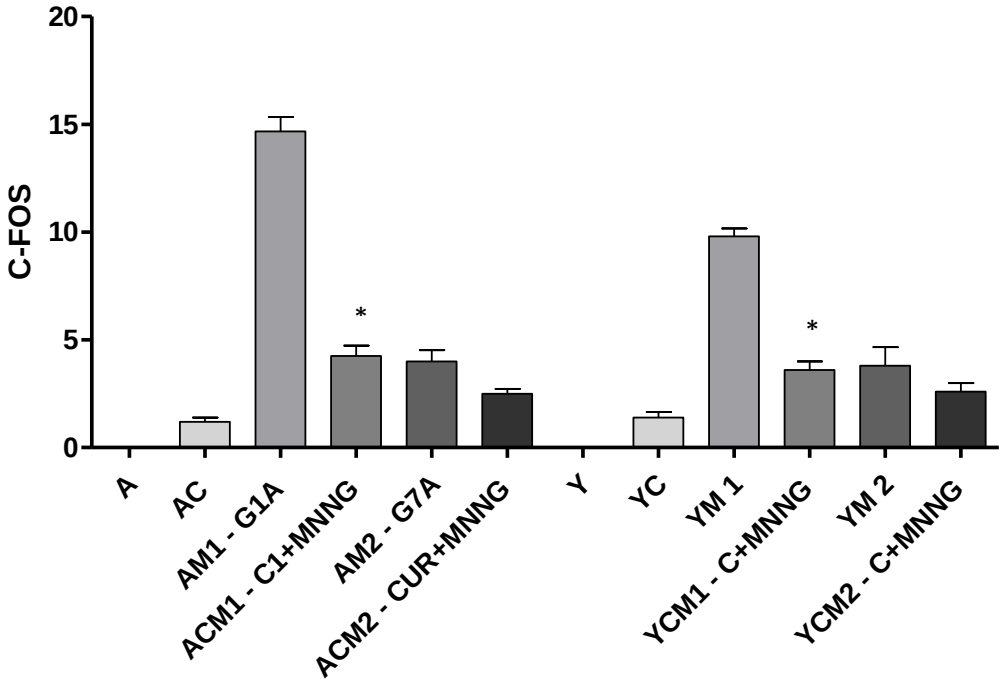

Figura 12 - Expressão imunoistoquímica de C-FOS. One-way ANOVA analysis. Houve supressão na expressão do proto-oncogene nos grupos tratados com curcumina prévia em relação aos seus controles tratados apenas com MNNG, reforçando seu papel na modulação de fator transcricional nuclear (P< 0.0001).

5.4 Indução da apoptose

A contagem de ambos os corpos apoptóticos (Figura 13) e células imunocoradas com caspase-3 revelou que o pré-tratamento com curcumina induziu apoptose fortemente apenas nos animais tratados com MNNG 72h (ACM1 e YCM1) após a aplicação do carcinógeno, como mostrado nas figuras 13 e 15. Diminuindo o número de células intestinais iniciadas.

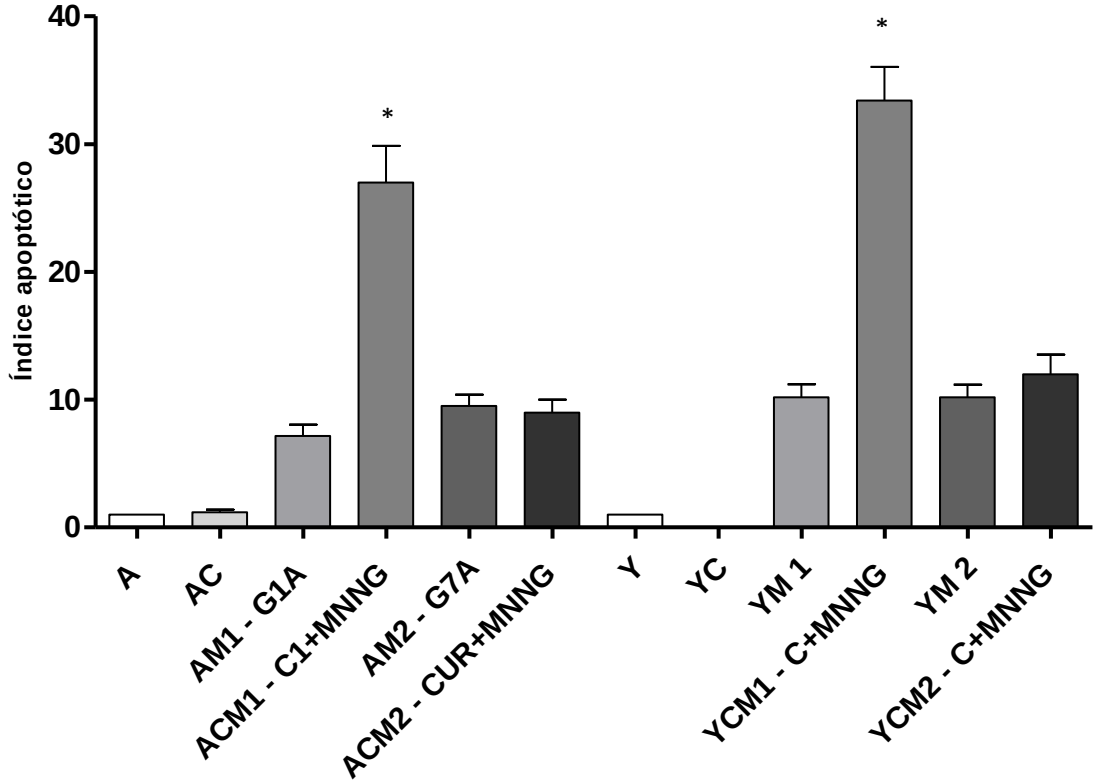

Figura 13 - Índice apoptótico. Número de células positivas / 20 criptas. Análise por one-way ANOVA. Podemos observar aumento estatístico no aumento do índice apoptótico das criptas intestinais tratadas com curcumina previamente ao MNNG, destacando os animais jovens (YCM1) que tiveram os resultados mais significativos em comparado aos animais adultos (P<0,0001).

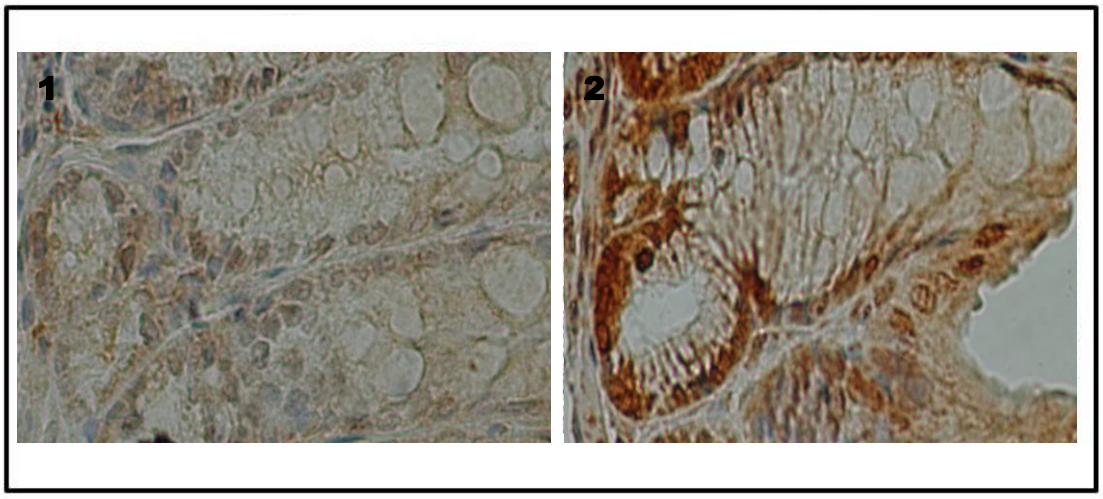

Figura 14 - Fotomicrografias da análise de imunomarcação para Caspase-3– demonstrada pela coloração marrom. Na imagem 1 observamos o grupo A (controle), com pouca imunomarcação para Caspase-3. Na imagem 2, observamos o grupo AM1 (MNNG – 72horas), com marcação maior de células no processo apoptótico mediado via Casp-3.

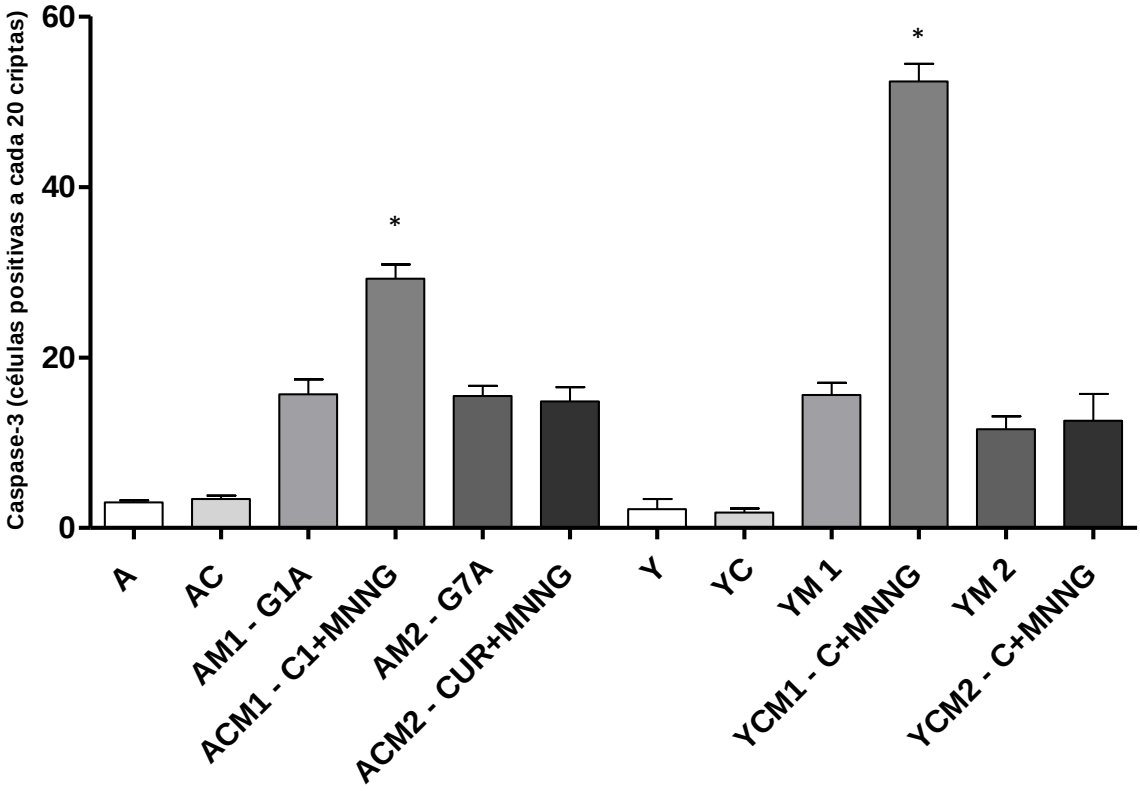

Figura 15 - Expressão imunoistoquímica de Caspase-3. Células positivas/20 criptas. One-way ANOVA analysis. Houve grande aumento na indução da apoptose mediada pela caspase-3 nos grupos ACM1 e YCM1 em relação aos seus controles tratados apenas com MNNG (AM1 e YM1), reforçando o resultado obtido através da contagem do índice apoptótico (P< 0.0001).

6. DISCUSSÃO

Observa-se um potente efeito inibitório profilático da curcumina contra o início da carcinogênese colônica, sendo que um pré-tratamento com curcumina foi capaz de causar, após seis semanas, uma redução acentuada da formação de criptas displásicas do cólon e uma atenuação do aumento da proliferação celular induzido pela aplicação do carcinógeno MNNG, que estão muito bem parâmetros estabelecidos de carcinogênese do cólon. Curiosamente, esses efeitos não podem ser atribuídos a nenhuma ação direta da curcumina, uma vez que não foi administrada simultaneamente com o carcinógeno. Um efeito profilático de um composto natural

contra o início da carcinogênese foi relatado anteriormente: um pré-tratamento com eugenol levou à redução da multiplicidade do tumor e atrasou o aparecimento de tumores em camundongos com carcinogênese mamária induzida quimicamente (Kaur et al., 2010). Esse modelo experimental foi denominado “protocolo de anti-iniciação”, mas os mecanismos que poderiam explicar esses achados não eram conhecidos. Nesse sentido, aqui observa-se que o pré-tratamento com curcumina anterior a indução feita por um potente carcinógeno ativou duas categorias importantes de mecanismos anticâncer: a expressão de algumas enzimas antioxidantes, com redução do marcador de dano do estresse oxidativo (H2AX) e a indução de apoptose, se prolongando com o tempo.

Como muitos outros compostos naturais, os efeitos anticancerígenos mais conhecidos da curcumina estão relacionados às suas potentes propriedades antioxidantes e antiinflamatórias (Gupta et al, 2012; Buhrmann, 2014; Patel et al, 2010). Considerando que a curcumina não foi administrada simultaneamente com o carcinógeno em nosso modelo experimental, o mecanismo de quimioprevenção do câncer não pode ser atribuído às suas propriedades antioxidantes diretas, mas apenas pode estar relacionado ao aumento das defesas antioxidantes. É demonstrado que a curcumina induziu potentemente a expressão de dois sistemas enzimáticos celulares antioxidantes: metalotioneínas e superóxido dismutase. Na verdade, já havia sido observado que a curcumina induz várias enzimas antioxidantes em outras situações experimentais, incluindo MT e SOD. Nossos achados estão de acordo com estudos *in vitro* que mostraram que a MT é induzida e protege contra a toxicidade do mercúrio (Agarwal et al., 2010) e que a indução da síntese de MT pela exposição a hepatócitos de ratos protegidos com zinco contra doses letais do metal (Liu et al., 1991). Observou-se também que a MT protege as células em cultura contra os efeitos citotóxicos do MNNG, com uma alta correlação entre os níveis de MT e a extensão da sobrevivência celular (Moffatt et al., 1996). Recentemente, foi descrito que a curcumina aumenta a expressão de SOD, exercendo uma redução na carcinogênese colônica relacionada ao estresse oxidativo (Gupta et al., 2020), principalmente induzido pela Narf2.

Observamos que a maior expressão de MT e SOD se correlacionou inversamente com dois marcadores indiretos de dano ao DNA: H2AX e expressão de c-fos, no mesmo momento do estudo, ou seja, 72h após a aplicação do carcinógeno. A melhoria das defesas antioxidantes é coerente com a redução do dano oxidativo ao

DNA. A expressão de MT foi previamente associada à proteção contra danos ao DNA, estresse oxidativo e carcinogênese (Cherian et al., 2003). Além disso, a superexpressão de MT é especificamente desencadeada pelo tratamento com um carcinógeno genotóxico e desempenha um importante papel supressor nas fases iniciais da carcinogênese da bexiga urinária de rato (Takaba et al., 2000). Recentemente, também foi demonstrado que a expressão de SOD é induzida por um tratamento prévio com um composto natural antes do estresse oxidativo induzido por radiação e relacionado à atenuação de danos ao DNA induzidos por radiação (Liu et al., 2020). Há também o aumento da exprede Nrf2 e Pinbar, que indiretamente potencializam a expressão de MT e SOD, promovendo a biogênese mitocondrial e o estímulo de sobrevivência celular.

Em relação ao presente achado de redução do dano ao DNA pelo tratamento profilático com curcumina, deve-se considerar que dois possíveis mecanismos de proteção não foram avaliados neste estudo. Primeiro, um aumento na capacidade de reparo do DNA por MT (Robson et al., 1994) e, segundo, uma indução da expressão de enzimas envolvidas na desintoxicação de MNNG, de forma semelhante aos efeitos anti-iniciação relatados da curcumina via modulação de fase Enzimas I e fase II em camundongos com aumento da desintoxicação de carcinógenos (Garg et al., 2008). Esses mecanismos poderão ser avaliados em estudos futuros.

Observamos que o MNNG induziu um aumento da taxa de apoptose, como visto tanto pela contagem de corpos apoptóticos em seções coradas com H&E quanto pela expressão imune do marcador de apoptose Caspase-3 (Fig. 15). Isso está de acordo com a literatura, que descreve a indução de apoptose após exposição a carcinógenos como mecanismo de depuração para eliminar células danificadas no DNA (Carotenuto, et al., 2016). Inclusive, é pertinente destacar que uma possível via de atuação da curcumina é modulando positivamente Bax e Bid e negativamente Bcl2, preparando a célula para iniciar o processo apoptótico estimulado pela ação da curcumina.

A capacidade dos compostos naturais de induzir a apoptose tem sido o tema de muitas pesquisas e tem sido proposto como um biomarcador confiável para a avaliação de agentes potenciais para a prevenção do câncer (Samaha et al., 1997; Thatte et al., 2000). A este respeito, a curcumina é altamente eficaz em induzindo apoptose em células cancerosas, mas não tem efeito em células normais (Jiang et al., 1996; Syng-Ai et al., 2004). Além disso, a curcumina induz diretamente a apoptose

durante a fotocarcinogênese da pele do camundongo (Tsai et al., 2012) e durante o desenvolvimento quimicamente induzido de carcinogênese no pulmão (Malhotra et al., 2012; Nair et al., 2015) e no cólon de camundongos (Majumdar et al., 2009) e ratos (Volate et al., 2005; Alizadeh et al., 2012). É importante mencionar que em todos esses experimentos relatados a curcumina foi administrada simultaneamente ou após a aplicação de um determinado carcinógeno, e apesar das baixas absorção e biodisponibilidade relatadas na literatura, observamos que o pré tratamento foi efetivo ao sensibilizar as células nos processos aqui observados, que mediam a iniciação da carcinogênese. Curiosamente, observamos que o pré-tratamento com curcumina também causou um aumento adicional e marcante na taxa de apoptose nos animais tratados com MNNG. Para explicar esse achado, só se pode hipotetizar que o pré-tratamento com curcumina facilitou a entrada na apoptose de células parcialmente danificadas por MNNG, por meio da ativação de sistemas enzimáticos celulares (via aumento de Bax e redução de Bcl2, preparando a célula para o processo apoptótico) que podem ter sensibilizado as células a sofrer apoptose após uma quantidade de dano ao DNA que seria não ser suficiente para acionar esse mecanismo de defesa em situações normais (de controle). Esta hipótese é apoiada pelas observações de que a curcumina aumenta a sensibilidade das células cancerosas à apoptose induzida por quimioterapia e radioterapia por meio de vias apoptóticas extrínsecas e intrínsecas (Limtrakul, 2007; Ngai 2020; El Feky et al., 2021). Até onde sabemos, não há descrição prévia de tal efeito no estágio inicial da carcinogênese, como descobrimos aqui.

Um possível mecanismo para explicar a facilitação da indução de apoptose pela curcumina é que esse composto natural causou uma atenuação da expressão de c-fos causada pela administração de MNNG (Fig. 12), o que é coerente com a possível redução do dano ao DNA pela curcumina pré-tratamento. C-fos é um proto-oncogene que regula a transcrição de muitos genes relacionados à proliferação, diferenciação e apoptose celular. Por exemplo, c-fos foi altamente relacionado à agressividade do câncer de esôfago e sua ablação em células de carcinoma de células escamosas do esôfago aumentou a apoptose por meio do aumento da atividade da caspase 3 (Zhao et al., 2016). Foi relatado anteriormente que a curcumina inibiu a carcinogênese induzida quimicamente na pele de camundongos, enquanto também reduzia a expressão do gene c-fos (Kakar & Roy, 1994; Limptrakull et al., 2001).

Também é possível que a redução na expressão de c-fos possa estar relacionada ao aumento da expressão de SOD que encontramos (Fig.8), pois foi observado em camundongos transgênicos que a superexpressão de SOD1 previne precocemente ativação de c-fos na isquemia cerebral (Huang et al., 2001). Possivelmente, o aumento da taxa de apoptose em animais administrados com curcumina pode estar relacionado ao aumento da expressão de MT, conforme observado em tumores mamários em camundongos (Yamamura et al., 2001). No entanto, os mecanismos de modulação e eventual correlação das expressões de MT, c-fos e SOD pela curcumina podem ser estudados em experimentos futuros.

Também observamos que os efeitos anti-iniciação da curcumina são mais intensos em camundongos jovens do que em animais adultos. Uma maior suscetibilidade de ratos velhos em comparação com ratos jovens à indução de lesões pré-neoplásicas pelo carcinógeno azoximetano foi previamente descrita (Magnuson et al., 2000). Nosso estudo confirma essas observações e aponta que a indução mais potente de apoptose pode ser um mecanismo causal porque foi encontrado para ocorrer mais intensamente em animais jovens do que em adultos tratados com curcumina antes da aplicação de MNNG (Fig.13). Isso está de acordo com um estudo recente que mostrou que a competência da resposta ao dano ao DNA (DDR), que inclui mecanismos de reparo de DNA e indução de apoptose em células-tronco intestinais, diminui com a idade in vivo (Watanabe et al., 2019). Por outro lado, o aumento da expressão de SOD-1 e MT pela curcumina foi semelhante em camundongos adultos e jovens em nossos experimentos, sugerindo que esses sistemas enzimáticos podem não estar envolvidos na modulação da idade da carcinogênese. Em estudo prévio, foi levantada a hipótese de que a diferença na indução da apoptose relacionada a idade pode estar interligada com mecanismos (prováveis relacionados a biogênese mitocondrial) envolvendo a via mitocondrial mediada pela expressão de Caspase-9 (Kwon, 2009), diminuindo gradativamente a sensibilidade mitocondrial com o decorrer da idade do modelo e com isso os efeitos dos curcuminóides; corroborando com os achados desse estudo, de que a curcumina é mais efetiva na prevenção de CCR em modelos jovens por aumentar a indução da apoptose mediada por Caspase 3 (efetora), que fisiologicamente é iniciada por Caspase-9 (não investigada nesse estudo) no processo de morte celular programada, justificando essa diferença durante a iniciação da carcinogênese do cólon.

Ao todo, nossos resultados reforçam o papel da curcumina para evitar o câncer de cólon e lançam luz sobre um novo mecanismo ainda não descrito para isso, que é a profilaxia da iniciação da carcinogênese.

Como a comparação entre animais jovens e adultos mostrou, quanto maior a expressão de MT induzida pela curcumina, maior foi a redução no número de criptas displásicas.

7. CONCLUSÃO

No presente estudo foi encontrado que a curcumina, administrada anteriormente à aplicação de um carcinógeno químico no cólon:

(1) Inibiu a iniciação da carcinogênese do cólon, reduzindo a formação de criptas displásicas;

(2) Combate os danos da dupla fita do DNA;

(3) Induz a apoptose pela diminuição do número de células iniciadas, principalmente em criptas displásicas - que também foram reduzidas nos grupos tratados, sendo sua ação relevante na fase inicial da carcinogênese colônica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, R. *et al*. Detoxification and antioxidant effects of curcumin in rats experimentally exposed to mercury. **J Appl Toxicol**. v. 30, n. 5, p. 457-468, Jul. 2010. Disponível em: doi: 10.1002/jat.1517.

ALIZADEH, A. M. *et al*. Chemoprevention of azoxymethane-initiated colon cancer in rat by using a novel polymeric nanocarrier–curcumin. **European Journal Of Pharmacology**, v. 689, n. 1-3, p. 226-232, Ago. 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.06.016.

ANDRADE, S. M. *et al*. Câncer colorretal sincrônico: relato de caso e revisão de literatura. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 27, n. 1, p. 69-79, Mar. 2007. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/s0101-98802007000100010.

BANDYOPADHYAY, D. Farmer to pharmacist: curcumin as an anti-invasive and antimetastatic agent for the treatment of cancer. **Front Chem**. v. 23, n. 2, p. 113. Dec. 2014. Disponível em: doi: 10.3389/fchem.2014.00113.

BERESWILL, S. *et al*. Anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin and simvastatin in acute small intestinal inflammation. **PLoS One**. v. 5, n. 12, p. 15099, Dec. 2010. Disponível em: doi: 10.1371/journal.pone.0015099.

BUHRMANN, C. *et al*. Curcumin suppresses crosstalk between colon cancer stem cells and stromal fibroblasts in the tumor microenvironment: potential role of EMT. **PLoS One**. v. 9, n. 9, p. 107514. Sep. 2014. Disponível em: doi: 10.1371/journal.pone.0107514.

CAROTENUTO, F. *et al*. How Diet Intervention via Modulation of DNA Damage Response through MicroRNAs May Have an Effect on Cancer Prevention and Aging, an in Silico Study. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, p. 752, Mai. 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.3390/ijms17050752.

CECILIO FILHO, A. B. *et al*. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 171-177, Mar. 2000. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782000000100028.

CHEN, A. *et al*. Curcumin inhibits human colon cancer cell growth by suppressing gene expression of epidermal growth factor receptor through reducing the activity of the transcription factor Egr-1. **Oncogene**, v. 25, n. 2, p. 278-287, Set. 2005. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1209019.

CHERIAN, M. *et al*. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 533, n. 1-2, p. 201-209, Dez. 2003. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.07.013.

CLAPPER, M. L. *et al*. Dysplastic Aberrant Crypt Foci: Biomarkers of Early Colorectal Neoplasia and Response to Preventive Intervention. **Cancer Prev Res (Phila)**. v. 13, n. 3, p. 229-240, Mar. 2020. Disponível em: doi: 10.1158/1940-6207.

DEVASENA, T. *et al.* Prevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced circulatory oxidative stress by bis-1,7-(2-hydroxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione during colon carcinogenesis. **Pharmacol Rep**, v. 58, n. 2, p. 229-235, Mar. 2006. Disponível em: PMID: 16702625.

DICKEY, J. S. *et al*. H2AX: functional roles and potential applications. **Chromosoma**, v. 118, n. 6, p. 683-692, Ago. 2009. Disponível em:. http://dx.doi.org/10.1007/s00412-009-0234-4.

EL FEKY, S. E. *et al*. Cytotoxic, chemosensitizing and radiosensitizing effects of curcumin based on thioredoxin system inhibition in breast cancer cells: 2D vs. 3D cell culture system. **Experimental and Therapeutic Medicine**, n. 21, p. 506. 2021. Disponível em: https://doi.org/10.3892/etm.2021.9937

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v. 4, n 35, p. 495- 516. 2007. Disponível em: doi: 10.1080/01926230701320337.

ESALQ. Açafrão. 1994. Disponível em: http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/acafrao/INTROD.pdf

GARG, R. *et al*. Dietary curcumin modulates transcriptional regulators of phase I and phase II enzymes in benzo[a]pyrene-treated mice: mechanism of its anti-initiating action. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 5, p. 1022-1032, Mar. 2008. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgn064.

GOEL, A. *et al*. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by dietary curcumin in HT-29 human colon cancer cells. **Cancer Letters**, v. 172, n. 2, p. 111-118, Out. 2001. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3835(01)00655-3.

GRIVENNIKOV, S. I. *et al*. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. **Seminars In Immunopathology**, v. 35, n. 2, p. 229-244, Nov. 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/s00281-012-0352-6.

GULBAKE, A. *et al*. Insight to drug delivery aspects for colorectal cancer. **World Journal Of Gastroenterology**, v. 22, n. 2, p. 582, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.582.

GUPTA, A. K. *et al*. Aberrant Crypt Foci: what we know and what we need to know. **Clinical Gastroenterology And Hepatology**, v. 5, n. 5, p. 526-533, Mai. 2007. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2007.02.014.

GUPTA, N. *et al*. Free Radicals as a Double-Edged Sword: the cancer preventive and therapeutic roles of curcumin. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5390, Nov. 2020. Disponível em: http://dx.doi.org/10.3390/molecules25225390.

GUPTA, S. C. *et al*. Multitargeting by turmeric, the golden spice: from kitchen to clinic. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, n. 9, p. 1510-1528, Ago. 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201100741.

HEGER, M. *et al*. The Molecular Basis for the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Curcumin and Its Metabolites in Relation to Cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 1, p. 222-307, Dez. 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1124/pr.110.004044.

HUANG, C. Y. *et al*. Overexpression of Copper-Zinc Superoxide Dismutase Attenuates Acute Activation of Activator Protein-1 After Transient Focal Cerebral Ischemia in Mice. **Stroke**, v. 32, n. 3, p. 741-747, Mar. 2001. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1161/01.str.32.3.741.

Instituto Nacional do Câncer – INCA. Como é o processo de carcinogênese? Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319. Acesso em: 23 Jun. 2021.

JIANG, M. C. *et al*. Curcumin induces apoptosis in immortalized NIH 3T3 and malignant cancer cell lines. **Nutrition And Cancer**, v. 26, n. 1, p. 111-120, Jan. 1996. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1080/01635589609514468.

JOHNSON, R. L.; FLEET, J. C. Animal models of colorectal cancer. **Cancer And Metastasis Reviews**, v. 32, n. 1-2, p. 39-61, Out. 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/s10555-012-9404-6.

JONES-MCLEAN, E. *et al*. A DASH dietary pattern and the risk of colorectal cancer in Canadian adults. **Health Promotion And Chronic Disease Prevention In Canada**, v. 35, n. 1, p. 12-20, Mar. 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.24095/hpcdp.35.1.03.

KAKAR, S. S. *et al*. Curcumin inhibits TPA induced expression of c-fos, c-jun and c-myc proto-oncogenes messenger RNAs in mouse skin. **Cancer Letters**, v. 87, n. 1, p. 85-89, Nov. 1994. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/0304-3835(94)90413-8.

KASDAGLY, M. *et al*. Colon carcinogenesis: influence of western diet-induced obesity and targeting stem cells using dietary bioactive compounds. **Nutrition**, v. 30, n. 11-12, p. 1242-1256, Nov. 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2014.02.016.

KAUR, G. *et al*. Eugenol precludes cutaneous chemical carcinogenesis in mouse by preventing oxidative stress and inflammation and by inducing apoptosis. **Molecular Carcinogenesis**, v. 49, n. 3, p. 290-301, Dez. 2009. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1002/mc.20601.

KIM, J. *et al*. Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2-dimethylhydrazine initiation. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 1, p. 81-85, Jan. 1998. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1093/carcin/19.1.81.

KUBOTA, M. *et al*. Preventive Effects of Curcumin on the Development of Azoxymethane-Induced Colonic Preneoplastic Lesions in Male C57BL/KsJ-db/dbObese Mice. **Nutrition And Cancer**, v. 64, n. 1, p. 72-79, Jan. 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2012.630554.

KUNNUMAKKARA, A. B. *et al*. Curcumin sensitizes human colorectal cancer to capecitabine by modulation of cyclin D1, COX-2, MMP-9, VEGF and CXCR4 expression in an orthotopic mouse model. **International Journal Of Cancer**, v. 125, n. 9, p. 2187-2197, Jul. 2009. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1002/ijc.24593.

KWON, Y. *et al*. Age-related differential responses to curcumin-induced apoptosis during the initiation of colon cancer in rats. **Food And Chemical Toxicology**, v. 47, n. 2, p. 377-385, Fev. 2009. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2008.11.035.

KWON, Y. *et al*. Inhibition of Colonic Aberrant Crypt Foci by Curcumin in Rats Is Affected by Age. **Nutrition And Cancer**, v. 48, n. 1, p. 37-43, Jan. 2004. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1207/s15327914nc4801_6.

LIMTRAKUL, P. *et al*. Inhibition of carcinogen induced c-Ha-ras and c-fos proto-oncogenes expression by dietary curcumin. **BMC Cancer**. v. 1, n. 1, p. 1, Jan. 2001. Disponível em: doi: 10.1186/1471-2407-1-1.

LIMTRAKUL, P. *et al*. Curcumin as chemosensitizer. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, p. 269-300, 2007. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_12.

LIU, J. The protective effect of metallothionein on the toxicity of various metals in rat primary hepatocyte culture*1. **Toxicology And Applied Pharmacology**, v. 107, n. 1, p. 27-34, Jan. 1991. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/0041-008x(91)90327-b.

LIU, L. *et al*. The Combination of Three Natural Compounds Effectively Prevented Lung Carcinogenesis by Optimal Wound Healing. **Plos One**, v. 10, n. 11, p. 0143438, Nov. 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0143438.

LIU, Q.; LI, W.; QIN, S. Therapeutic effect of phycocyanin on acute liver oxidative damage caused by X-ray. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 130, p. 110553, Out. 2020. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110553.

LIU, Y. *et al*. Curcumin and resveratrol in combination modulate drug-metabolizing enzymes as well as antioxidant indices during lung carcinogenesis in mice. **Human & Experimental Toxicology**, v. 34, n. 6, p. 620-627, Jan. 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1177/0960327114551396.

MAGNUSON, B. *et al*. Increased susceptibility of adult rats to azoxymethane-induced aberrant crypt foci. **Cancer Letters**, v. 161, n. 2, p. 185-193, Dez. 2000. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3835(00)00609-1.

MAJUMDAR, A. P. N. *et al*. Curcumin Synergizes With Resveratrol to Inhibit Colon Cancer. **Nutrition And Cancer**, v. 61, n. 4, p. 544-553, Jul. 2009. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1080/01635580902752262.

MALHOTRA, A. *et al*. Curcumin and resveratrol in combination modulates benzo(a)pyrene-induced genotoxicity during lung carcinogenesis. **Human & Experimental Toxicology**, v. 31, n. 12, p. 1199-1206, Abr. 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1177/0960327112440113.

MISHRA, S. *et al*. The effect of curcumin (turmeric) on Alzheimer′s disease: an overview. **Annals Of Indian Academy Of Neurology**, v. 11, n. 1, p. 13, 2008. Disponível em: http://dx.doi.org/10.4103/0972-2327.40220.

MOFFATT, P. *et al*. Rat Hepatocytes with Elevated Metallothionein Expression Are Resistant toN-Methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine Cytotoxicity. **Toxicology And Applied Pharmacology**, v. 136, n. 1, p. 200-207, Jan. 1996. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1006/taap.1996.0025.

MUKHERJEE, B. *et al*. Effect of selenomethionine on N -methylnitronitrosoguanidine-induced colonic aberrant crypt foci in rats. **European Journal Of Cancer**

Prevention, v. 10, n. 4, p. 347-355, Ago. 2001. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1097/00008469-200108000-00008.

NAGEL, W. W. *et al*. Cell cycle regulation of metallothionein in human colonic cancer cells. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 92, n. 2, p. 579-583, Jan. 1995. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1073/pnas.92.2.579.

NAIR, P. *et al*. Curcumin and quercetin trigger apoptosis during benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis. **Molecular And Cellular Biochemistry**, v. 400, n. 1-2, p. 51-56, Out. 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/s11010-014-2261-6.

NGAI, S. C. *et al*. Curcumin Sensitizes Cancers Towards TRAIL-induced Apoptosis via Extrinsic and Intrinsic Apoptotic Pathways. **Current Drug Targets**, v. 21, n. 9, p. 849-854, Jul. 2020. Disponível em: http://dx.doi.org/10.2174/1389450121666200302124426.

OGATA, H. *et al*. GROα promotes invasion of colorectal cancer cells. **Oncol Rep**. v. 24, n. 6, p. 1479-1486, Dec. 2010. Disponível em: PMID: 21042742.

PAN, M. H. *et al*. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. **Drug Metab Dispos**. v. 27, n. 4, p. 486-494, Apr. 1999. Disponível em: PMID: 10101144.

PATEL, B. B. *et al*. Curcumin targets FOLFOX-surviving colon cancer cells via inhibition of EGFRs and IGF-1R. **Anticancer Res**. v. 30, n. 2, p. 319-325. Feb. 2010 Disponível em: PMID: 20332435.

PATEL, B. B. *et al*. Synergistic Role of Curcumin With Current Therapeutics in Colorectal Cancer: minireview. **Nutrition And Cancer**, v. 61, n. 6, p. 842-846, Nov. 2009. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1080/01635580903285106.

PRICCI, M. *et al*. Curcumin and Colorectal Cancer: from basic to clinical evidences. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 2364, Mar. 2020. Disponível em: http://dx.doi.org/10.3390/ijms21072364.

QI, G. *et al*. Effects of high-fat diet on 1,2-dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci and colorectal tumours in rats. **Biomedical Reports**, v. 3, n. 3, p. 289-294, Fev. 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.3892/br.2015.433.

RAHMANI, A. H. *et al*. Curcumin: a potential candidate in prevention of cancer via modulation of molecular pathways. **Biomed Research International**, v. 2014, p. 1-15, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1155/2014/761608.

RAO, C. V. *et al*. Inhibition by dietary curcumin of azoxymethane-induced ornithine decarboxylase, tyrosine protein kinase, arachidonic acid metabolism and aberrant crypt foci formation in the rat colon. **Carcinogenesis**, v. 14, n. 11, p. 2219-2225, 1993. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1093/carcin/14.11.2219.

ROBBINS E COTRAN. Bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: Elsevier, 8° ed. 2010.

ROBSON, T. *et al*. Increased DNA-repair capacity and the modulation of 2 proteins in and metallothionein overexpressing Chinese hamster cell line. **Mutation Research/Dna Repair**, v. 314, n. 2, p. 143-157, Mar. 1994. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/0921-8777(94)90078-7.

SAAD, S. M. I. *et al*. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, Mar. 2006. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/s1516-93322006000100002.

SAMAHA, H. S. *et al*. Modulation of apoptosis by sulindac, curcumin, phenylethyl-3-methylcaffeate, and 6-phenylhexyl isothiocyanate: apoptotic index as a biomarker in colon cancer chemoprevention and promotion. **Cancer Res**. v. 57, n. 7, p. 1301-1305, Apr. 1997. Disponível em: PMID: 9102217.

SANT'ANNA, G. S. Efeito do extrato etanólico de curcuma longa sobre a atividade da enzima histona desacetilase no processo de envelhecimento cerebral. Rio Grande do Sul. Mestrado [**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**] - UFRGS. 2012.

SCHWARZ, M. A. *et al*. Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA-damaging effects of nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, n. 10, p. 4452-4456, Mai. 1995. Disponível em: http://dx.doi: 10.1073/pnas.92.10.4452.

SHANMUGAM, M. *et al*. The Multifaceted Role of Curcumin in Cancer Prevention and Treatment. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2728-2769, Fev. 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.3390/molecules20022728.

SHARMA, A. *et al*. Histone H2AX Phosphorylation: a marker for dna damage. **Methods In Molecular Biology**, p. 613-626, 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-998-3_40.

SINGH, S. *et al*. AGA Technical Review on the Management of Mild-to-Moderate Ulcerative Colitis. **Gastroenterology**, v. 156, n. 3, p. 769-808, Fev. 2019. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2018.12.008.

SINGH, S. *et al*. Biological Effects of Curcumin and Its Role in Cancer Chemoprevention and Therapy. **Anti-Cancer Agents In Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 259-270, Mai. 2006. Disponível em: http://dx.doi.org/10.2174/187152006776930918.

SUZUKI, J. S. *et al*. Metallothionein deficiency enhances skin carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in metallothionein-null mice. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 6, p. 1123-1132, Abr. 2003. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgg052.

SYNG-AI, C. *et al*. Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2. **Mol Cancer Ther**, v. 3, n. 9, p. 1101-1108, Sep. 2004. Disponível em: PMID: 15367704.

TAKABA, K. *et al*. Significant overexpression of metallothionein and cyclin D1 and apoptosis in the early process of rat urinary bladder carcinogenesis induced by treatment with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine or sodium L-ascorbate. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 4, p. 691-700, Abr. 2000. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1093/carcin/21.4.691.

TARASIUK, A. *et al*. The mechanisms linking obesity to colon cancer: an overview. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 12, n. 3, p. 251-259, Mai. 2018. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.orcp.2018.01.005.

TARASUB, N. *et al*. Protective effects of curcumin, vitamin C, or their combination on cadmium-induced hepatotoxicity. **Journal Of Basic And Clinical Pharmacy**, v. 3, n. 2, p. 273, 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.4103/0976-0105.103821.

THATTE, U. *et al*. Modulation of programmed cell death by medicinal plants. **Cell Mol Biol,** v. 46, n. 1, p. 199-214, Feb. 2000. Disponível em: PMID: 10726985.

TOURKINA, E. *et al*. Curcumin-Induced Apoptosis in Scleroderma Lung Fibroblasts. **American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 28-35, Jul. 2004. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2003-0354oc.

TSAI, K. D. *et al*. Curcumin Protects against UVB-Induced Skin Cancers in SKH-1 Hairless Mouse: analysis of early molecular markers in carcinogenesis. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-11, 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1155/2012/593952.

VAN ERK, M. J. *et al*. Time- and dose-dependent effects of curcumin on gene expression in human colon cancer cells. **Journal Of Carcinogenesis**, v. 3, n. 1, p. 8, 2004. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1186/1477-3163-3-8.

VOLATE, S. R. *et al*. Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin). **Carcinogenesis**, v. 26, n. 8, p. 1450-1456, Abr. 2005. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgi089.

WATANABE, K, *et al*. Age-related dysfunction of the DNA damage response in intestinal stem cells. **Inflamm Regen**. v. 26, n. 39, p. 8, Apr. 2019. Disponível em: doi: 10.1186/s41232-019-0096-y.

WILLENBACHER, E. *et al*. Curcumin: new insights into an ancient ingredient against cancer. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, p. 1808, Abr. 2019. Disponível em: http://dx.doi.org/10.3390/ijms20081808.

YAMAMURA, Y. *et al*. Metallothionein expression and apoptosis in pregnancy-dependent and -independent mouse mammary tumors. **Anticancer Res,** v. 21, n. 2A, p. 1145-1149, Mar. 2001. Disponível em: PMID: 11396154.

ZHAO, Y. *et al*. Inhibitor of Differentiation/DNA Binding 1 (ID1) Inhibits Etoposide-induced Apoptosis in a c-Jun/c-Fos-dependent Manner. **Journal Of Biological**

Chemistry, v. 291, n. 13, p. 6831-6842, Mar. 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m115.704361.

ZHENG, J. *et al*. Spices for Prevention and Treatment of Cancers. **Nutrients**, v. 8, n. 8, p. 495, Ago. 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.3390/nu8080495.

ZHOU, H. *et al*. The Targets of Curcumin. **Current Drug Targets**, v. 12, n. 3, p. 332-347, Mar. 2011. Disponível em: http://dx.doi.org/10.2174/138945011794815356.