

Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS QUIMIOPREVENTIVOS DA
VITAMINA C E DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EM
MODELO ANIMAL DE CÂNCER COLORRETAL**

MAIARA PEREIRA



**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CÊNCIAS DA SAÚDE**

MAIARA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS QUIMIOPREVENTIVOS DA
VITAMINA C E DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EM
MODELO ANIMAL DE CÂNCER COLORRETAL**

Dissertação de Mestrado apresentado
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade do
Extremo Sul Catarinense para
obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vanessa
Moraes de Andrade
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando
Tadeu Trevisan Frajacomo.

Criciúma

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

P436aPereira, Maiara.

Avaliação dos efeitos quimiopreventivos da vitamina C e do ácido acetilsalicílico em modelo animal de câncer colorretal / Maiara Pereira. - 2016.

108 p. : il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2016.

Orientação: Vanessa Moraes de Andrade.

Coorientação: Fernando Tadeu Trevisan Frajacomo.

1. Ácido acetilsalicílico – Efeito quimiopreventivo.
2. Vitamina C – Efeito quimiopreventivo. 3. Câncer colorretal – Tratamento. 4. Dano ao DNA. I. Título.

CDD 23. ed. 615.1

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101

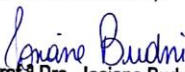
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 297

Com início às 14h00 (quatorze horas) do dia trinta do mês de novembro de 2017 (dois mil e dezessete), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Maiara Pereira**, sob a orientação da Prof.^a Dra. Vanessa Moraes de Andrade, intitulada "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS QUIMIOPREVENTIVOS DA VITAMINA C E DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EM MODELO ANIMAL DE CÂNCER COLORRETAL". A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada; Prof. Dr. Alexandre Pastoris Müller (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Prof.^a Dra. Fernanda Rabaioli da Silva (Universidade – LaSalle) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 15h00 (quinze horas), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Prof.^a Dra. Josiane Budni, Coordenadora Adjunta do Programa. Criciúma, 30 (trinta) de novembro de 2017 (dois mil e dezessete).


Prof.^a Dra. Josiane Budni
Coordenadora Adjunta PPGCS
Prof.^a Dra. Josiane Budni
Coordenadora Adjunta do PPGCS


Diana Ghisi Daniel
Secretária

Folha informativa

A dissertação foi elaborada seguindo a resolução nº 07/2015/colegiado de Coordenação do PPGCS e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LABIM) do Programa de Pós- graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Dedico esta dissertação aos meus pais, Jair e Roseli, que desde o início da minha jornada acadêmica sempre me incentivaram e me apoiaram, sendo eles, o meu porto seguro durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela dádiva da vida e pelas oportunidades de melhoramento intelectual e moral.

Agradeço aos meus pais, minha avó e meu irmão, pelo amor, dedicação e apoio. Ao meu namorado, Marcos, pela compreensão, paciência e carinho durante os momentos mais difíceis, sempre me incentivando a continuar.

Agradeço a minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Vanessa Moraes de Andrade, que desde a graduação vem me instruindo com sabedoria e ética, contribuindo para o meu crescimento profissional.

Agradeço ao meu coorientador, Prof. Dr. Fernando Tadeu Trevisan Frajacomo, pelas contribuições pertinentes na construção deste trabalho.

Agradeço as minhas melhores amigas Ângela, Giulia Strapazzon e Luiza, que sempre estiveram ao meu lado, tornando os meus dias mais alegres, me ajudando e me apoiando durante esta caminhada.

Agradeço as minhas amigas queridas Denise e Giulia Fidelis, pelo apoio e carinho durante todos esses anos de amizade.

Agradeço aos meus colegas e amigos Ângela, Vanessa e Rafael, que vivenciaram comigo a elaboração e a realização deste projeto, sem a ajuda de vocês esse trabalho não teria saído do papel.

Agradeço aos alunos de pós graduação, Adriani, Luiza e Rafael, e a *pós doc* Thais pela amizade e por toda a ajuda durante a minha jornada acadêmica.

Agradeço a todos os alunos de iniciação científica do Grupo de Pesquisa em Genética Toxicológica que não mediram esforços para ajudar nos experimentos.

Agradeço a professora Dr^a. Ana Paula Bazo, pela parceria e disponibilidade em nos ajudar no desenvolvimento do modelo experimental.

Agradeço ao professor Dr. Paulo Cesar Lock Silveira, a todos os alunos de iniciação científica e os pós graduandos do Grupo de Pesquisa em Proteção e Reparo Tecidual, pela parceria e pelos esforços para a finalização deste trabalho.

Por fim, agradeço aos professores, Dr. Alexandre Pastoris Müller, Dr^a. Fernanda Rabaioli da Silva e o Dr. Ricardo Aurino de Pinho, pela disponibilidade de participarem da banca examinadora deste trabalho.

A todos, muito obrigada!

*“As grandes ideias surgem da
observação dos pequenos
detalhes”.*
Augusto Cury

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) causa anualmente 1,3 milhões de novos casos e mais de 650.000 mortes em todo o mundo e está relacionado a diversos fatores como a dieta e estilo de vida (câncer esporádico), e com a predisposição genética (câncer hereditário). A carcinogênese colorretal é um processo gradual que pode durar vários anos, sendo assim, ações quimiopreventivas podem ser estudadas a fim de parar ou alterar o curso do processo maligno. Muitos estudos demonstraram que lesões pré-malignas podem ser revertidas ou impedidas farmacologicamente, como por exemplo, com o Ácido Acetilsalicílico (AAS). Outro grupo de compostos quimiopreventivos são os antioxidantes, tais como a vitamina C (VC), que pode neutralizar os radicais livres e impedir que as moléculas vitais, como DNA e proteínas, sejam danificadas. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos quimiopreventivos da VC e do AAS, isolados e combinados, em modelo animal de CCR. Para o presente estudo foram utilizados 80 camundongos *Balb-c* adultos, fêmeas e machos, divididos em 8 grupos (n=10): Controle Negativo, Controle Positivo, VC (0,15mg) + Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), AAS (6mg) + EDTA, VC e AAS + EDTA, VC + DMH, AAS + DMH e VC e AAS + DMH. Os animais foram tratados com a VC ou AAS durante as 12 semanas do experimento e o protocolo de indução química do CCR incluiu duas injeções intraperitoneais de DMH (40mg/kg) ou EDTA na 4ª e na 5ª semana de tratamento. No final da 12ª semana foi realizada uma coleta de sangue via retro-orbital e em seguida os animais foram submetidos à eutanásia para a dissecação do cólon e fígado, para as posteriores análises de estresse oxidativo, do Ensaio Cometa e do Teste de Criptas Aberrantes. Os resultados do estresse oxidativo mostraram que a VC e o AAS, reduziram significativamente a produção de espécies reativas de oxigênio, as concentrações de óxido nítrico e a carbonilação de proteínas nos animais expostos à DMH, além disso, a VC e o AAS também aumentaram a atividade das enzimas Catalase e a Superóxido Dismutase no animais expostos à DMH. Na análise do Ensaio Cometa, a VC não apresentou ação antígeno-tóxica no sangue dos animais que expostos à DMH, porém quando foram avaliados somente os danos oxidativos causados pela DMH, a VC reduziu os danos. No fígado, VC apresentou ação antígeno-tóxica, nas duas versões do Ensaio Cometa. O AAS (isolado) e os dois compostos combinados (VC e AAS) também apresentaram ação antígeno-tóxica nos dois tecidos avaliados e nas duas versões do Ensaio Cometa. Na análise das Criptas Aberrantes, a VC e o AAS, isolados ou combinados,

demonstraram um efeito anticarcinogênico no cólon dos animais expostos à DMH. Em suma, os resultados mostraram os efeitos quimiopreventivos da VC e do AAS no desenvolvimento da carcinogênese colorretal, sugerindo que esses compostos podem no futuro ser utilizados na prevenção primária do CCR em humanos.

Palavras-chave: Ácido Acetilsalicílico; Câncer Colorretal; Criptas aberrantes; Dano ao DNA; Quimioprevenção; Vitamina C.

ABSTRACT

The colorectal cancer (CRC) causes yearly 1,3 million of new cases and more than 650.000 deaths around the world. The CRC is influenced by many factors, related to diet, lifestyle (sporadic cancer) whereas others have a strong genetic predisposition (hereditary cancer). The colorectal carcinogenesis is a gradual process which can last many years, and chemopreventive actions must be studied aiming to reduce the malignant cascade. Several studies have demonstrated that pre-malignant lesions could be pharmacologically reversed by Acetylsalicylic Acid (ASA) use. Another group of compounds is the antioxidants, such as vitamin C (VC) which can interact with free radicals blocking vital molecules damage. Thus, the objective of this study was to evaluate the chemopreventive effects of VC and ASA, isolated and combined, in an animal model of CRC. We carried out an experiment with 80 *Balb-c* adult mice with 12 weeks of duration. The animals were divided in 8 groups: negative control, positive control, VC + Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ASA (6mg) + EDTA, VC (0,15 mg) and ASA + EDTA, VC + DMH, ASA + DMH, VC and ASA + DMH. The animals received ASA and VC daily during 12 weeks, and DMH induction was made during the 4th and 5th week of treatment with a dose of 40 mg/kg twice a week. In the end of 12th week blood samples from the retroocular venous plexus was taken and after that the animals were sacrificed on week 12 of the experiment. Then the animals were submitted at laparotomy to remove the medium-distal colon and small fragment of the liver. The analyses were: Parameters of oxidative stress, Comet Assay and Aberrant Crypt Foci detection. The results of oxidative stress showed that VC and ASA reduced the production of reactive oxygen species, such as nitric oxide concentrations and carbonylation of proteins from animals exposed to DMH, and VC and ASA also increased the activity of enzymes Catalase and Superoxide Dismutase in the animals exposed to DMH. In the Comet Assay, VC did not demonstrate antigenotoxic effect in the blood of animals who received DMH induction, however when only the oxidative damage to DNA was evaluated, the VC was able to reduce oxidative damage. In the liver, with the both versions of comet assay, the VC presented antigenotoxic action as well as the AAS and the combination of both. In the aberrant crypt evaluation all the pharmacological interventions has demonstrated anti carcinogenic effect in the animals exposed to DMH. In conclusion, the results have shown the chemopreventive effects of

VC and ASA in an experimental model of colorectal carcinogenesis, reinforcing the importance of primary prevention of CRC in humans.

Keywords: Aberrant crypts; Acetylsalicylic Acid, Chemoprevention; Colorectal Cancer; DNA damage; Vitamin C.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1: Sequência clássica de mutações da via da instabilidade cromossômica ou adenoma-carcinoma (Adaptado de Kim, 1997)..... | 3 |
| Figura 2: Metabolização da 1,2-dimetilhidrazina (Adaptado de Druckrey, 1973)..... | 7 |
| Figura 3: Modelo da metilação do oxigênio ligado ao carbono seis da guanina causado pela DMH. Tal metilação resulta na alteração da ligação de hidrogênio entre nucleotídeos, no caso o que seria uma ligação entre G:C se torna uma ligação A:T (Adaptado de Pinto, 2012)..... | 7 |
| Figura 4: Alterações fenotípicas, genéticas e epigenéticas envolvidas no desenvolvimento da tumorigênese colorretal em roedores induzido pela DMH/AOM (Adaptado de Perse e Cerar, 2011)..... | 8 |
| Figura 5: Estrutura química do ácido ascórbico e do ácido dehidroascórbico (Adaptado de Mamede et al., 2012)..... | 11 |
| Figura 6: Absorção de VC por células de CCR mutantes para os genes <i>KRAS</i> e <i>BRAF</i> . O aumento resultante da produção de ERO bloqueia o metabolismo da glicose (além de outros efeitos mostrados). As células mudam o seu fluxo glicolítico para a via do fosfato de pentose, mas, em última análise, as células se tornam esgotadas da ATP (Adenosina Trifosfato), induzindo uma crise energética que leva à morte celular (Adaptado de Reczek e Chandel, 2015)..... | 13 |
| Figura 7: A inibição da produção de prostaglandinas derivadas da catálise do ácido araquidônico (Adaptado de Fuster e Sweeny, 2015)..... | 15 |
| Figura 8: Desenho experimental..... | 19 |
| Figura 9: Níveis de oxidação de DCF no cólon dos camundongos tratados com VC e AAS, e submetidos ao modelo animal de CCR com DMH. AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DCF (Diclorofluoresceína), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) e VC (vitamina C). Dados expressos em média ± erro padrão (ANOVA de 2 vias, post hoc de <i>Bonferroni</i>)..... | 28 |
| Figura 10: Concentrações de óxido nítrico no cólon dos camundongos tratados com VC e AAS, e submetidos ao modelo animal de CCR com DMH. AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) e VC (vitamina C). Dados expressos em | |

| | |
|---|----|
| média \pm erro padrão (ANOVA de 2 vias, post hoc de <i>Bonferroni</i>)..... | 29 |
| Figura 11: Níveis de carbonilação de proteínas no cólon dos animais tratados com VC e AAS, e submetidos ao modelo animal de CCR com DMH. AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) e VC (vitamina C). Dados expressos em média \pm erro padrão (ANOVA de 2 vias, post hoc de <i>Bonferroni</i>)..... | 30 |
| Figura 12: Conteúdo de sulfidril no cólon dos camundongos tratados com VC e AAS, e submetidos ao modelo animal de CCR com DMH. AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) e VC (vitamina C). Dados expressos em média \pm erro padrão (ANOVA de 2 vias, post hoc de <i>Bonferroni</i>)..... | 31 |
| Figura 13: Atividade da enzima superóxido dismutase no cólon dos camundongos tratados com VC e AAS, e submetidos ao modelo animal de CCR com DMH. AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético), SOD (superóxido dismutase) e VC (vitamina C). Dados expressos em média \pm erro padrão (ANOVA de 2 vias, post hoc de <i>Bonferroni</i>)..... | 32 |
| Figura 14: Atividade da enzima catalase no cólon dos camundongos tratados com VC e AAS, e submetidos ao modelo animal de CCR com DMH. AAS (ácido acetilsalicílico), CAT (catalase), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) e VC (vitamina C). Dados expressos em média \pm erro padrão (ANOVA de 2 vias, post hoc de <i>Bonferroni</i>)..... | 33 |
| Figura 15: Níveis totais de glutatona no cólon dos camundongos tratados com VC e AAS, e submetidos ao modelo de CCR com DMH. AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético), GSH (glutatona) e VC (vitamina C). Dados expressos em média \pm erro padrão (ANOVA de 2 vias, post hoc de <i>Bonferroni</i>)..... | 33 |
| Figura 16: ID (A) e FD (B) no DNA de células de sangue de camundongos tratados VC e AAS, e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH avaliados através do Ensaio Cometa alcalino. AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP | |

| | |
|--|----|
| (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético), FD (frequência de danos), ID (índice de danos) e VC (vitamina C). Dados expressos em média \pm desvio padrão (ANOVA de 2 vias, <i>post hoc</i> de <i>Bonferroni</i>)..... | 35 |
| Figura 17: ID (A) e FD (B) no DNA de células de fígado de camundongos tratados VC e AAS, e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH avaliados através do Ensaio Cometa alcalino. AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético), FD (frequência de danos), ID (índice de danos) e VC (vitamina C). Dados expressos em média \pm desvio padrão (ANOVA de 2 vias, <i>post hoc</i> de <i>Bonferroni</i>)..... | 36 |
| Figura 18: ID (A) e FD (B) oxidativos no DNA de células de sangue de camundongos tratados VC e AAS, e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH avaliados através do Ensaio Cometa alcalino modificado com a enzima FPG. AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético), FD (frequência de danos), FPG (formamido pirimidina glicosilase), ID (índice de danos) e VC (vitamina C). Dados expressos em média \pm desvio padrão (ANOVA de 2 vias, <i>post hoc</i> de <i>Bonferroni</i>)..... | 37 |
| Figura 19: ID (A) e FD (B) oxidativos no DNA de células de fígado de camundongos tratados VC e AAS, e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH avaliados através do Ensaio Cometa alcalino modificado com a enzima FPG. AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético), FD (frequência de danos), FPG (formamido pirimidina glicosilase), ID (índice de danos) e VC (vitamina C). Dados expressos em média \pm desvio padrão (ANOVA de 2 vias, <i>post hoc</i> de <i>Bonferroni</i>)..... | 38 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Ingestão média total de líquidos por animal entre fêmeas e machos do mesmo grupo e a média total por grupo..... | 26 |
| Tabela 2: Análise da concentração média (mg/ml) de VC no plasma dos camundongos tratados com VC e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH..... | 27 |
| Tabela 3: Análise do ID e FD no DNA de células de sangue e fígado, entre fêmeas e machos, tratados com VC e AAS, e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH..... | 34 |
| Tabela 4: Análise do número de CA e FCA no cólon de camundongos, entre fêmeas e machos tratados com VC e AAS, e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH..... | 39 |
| Tabela 5: Análise total, fêmeas e machos, do número de CA e FCA no cólon de camundongos tratados com VC e AAS, submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH..... | 40 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS - Ácido Acetilsalicílico
ACN - Acetonitrila
ASA - *Acetylsalicylic Acid*
AINE - Anti-inflamatório não esteroide
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOM - Azoximetano
CA - Criptas Aberrantes
CAT - Catalase
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CCR - Câncer Colorretal
CN - Controle Negativo
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX-2 - Ciclooxygenase – 2
CP - Controle Positivo
CRC - *Colorectal Cancer*
CYP 2E1 - Citocromo P450 2E1
DCF - Diclorofluoresceína
DHA - Ácido Dehidroaascórbico
DMH - 1,2 – Dimetilhidrazina
EC - Ensaio Cometa
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio
ERRO - Espécies Reativas de Oxigênio
FCA - Focos de Criptas Aberrantes
FD - Frequência de Danos
FPG - Formamido Pirimidina Glicosilase
GAPDH - Gliceraldeído 3 – Fosfato Desidrogenase
GSH - Glutathiona
H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio
H460 - Linhagem de células epiteliais pulmonares
IARC - Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer
ID - Índice de Danos
INCA - Instituto Nacional do Câncer
INOS - Óxido Nítrico Sintase
IP - Intraperitoneal
MAM - Metilazoximetano
MMC - Mitomicina C
MMR - *Mismatch Repair*
NO - Óxido Nítrico

O₂^{•-} - Superóxido

OH[•] - Radical Hidroxila

PGE – 2 - Prostaglandina E2

SC - Subcutânea

SMART - *Somatic Mutation and Recombination Test*

SOD - Superóxido Dismutase

TFA - Trifluoracético

VC - Vitamina C

WiDr - Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 CÂNCER COLORRETAL | 1 |
| 1.2 MODELOS ANIMAIS DE CCR..... | 4 |
| 1.2.1 Modelo animal de CCR induzido pela DM..... | 5 |
| 1.3 QUIMIOPREVENÇÃO DO CCR..... | 9 |
| 1.4 VITAMINA C | 11 |
| 1.5 ÁCIDO ACETILSALICÍLICO | 14 |
| 2 OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 Geral | 17 |
| 2.2 Específicos | 17 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 3.1 ANIMAIS E O COMITÊ DE ÉTICA | 18 |
| 3.2 DESENHO EXPERIMENTAL | 18 |
| 3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE VITAMINA C E ÁCIDO ACETILSALICÍLICO | 19 |
| 3.4 INDUÇÃO DA CARCINOGENESE COLORRETAL COM DMH..... | 19 |
| 3.5 EUTANÁSIA E DESCARTE DOS ANIMAIS | 20 |
| 3.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .. | 20 |
| 3.7 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO..... | 21 |
| 3.8 ENSAIO COMETA..... | 23 |
| 3.9 TESTE DAS CRIPTAS ABERRANTES | 24 |
| 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 25 |
| 4 RESULTADOS | 26 |
| 4.1 INGESTÃO DE LÍQUIDOS | 26 |
| 4.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .. | 27 |
| 4.3 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO..... | 28 |
| 4.4 ENSAIO COMETA..... | 34 |
| 4.5 TESTE DAS CRIPTAS ABERRANTES | 39 |
| 5 DISCUSSÃO | 41 |
| 6 CONCLUSÃO | 49 |
| 7 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS | 50 |
| 7.1 LIMITAÇÕES..... | 50 |
| 7.2 PERSPECTIVAS | 50 |
| REFERÊNCIAS | 51 |
| ANEXO | 71 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER COLORRETAL

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro diagnóstico mais comum em homens e o segundo em mulheres. A cada ano são registrados mundialmente 1,3 milhões de novos casos e mais de 650.000 mortes (Torre et al., 2015). Nos últimos anos, o número de indivíduos com CCR tem aumentado em todo o mundo, sendo uma das principais causas de morte na maioria dos países desenvolvidos (Winawer, 2007; Center et al., 2009).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2014), em 2013 foram registradas 13.961 mortes relacionadas com os cânceres de cólon e reto, e para o ano de 2016 foram estimados 34.280 novos casos, sendo 16.660 em homens e 17.620 em mulheres (INCA, 2016).

A patogênese do CCR é muito complexa e diversificada, sendo influenciada por vários fatores, alguns dos quais estão relacionados com a dieta e o estilo de vida (câncer esporádico), enquanto outros com a predisposição hereditária (câncer hereditário) (Xie e Itzkowitz, 2008). Outro fator de risco (não modificável) importante é a idade. As chances de desenvolver o câncer aumentam a partir dos 40 anos, porém a população na faixa etária dos 70 anos é mais afetada (Hagggar e Boushey, 2009).

A grande incidência dos casos de CCR está relacionado com fatores esporádicos, enquanto aproximadamente 5% são hereditários (Jasperson et al., 2010). As síndromes hereditárias colorretais se dividem em duas classes, a primeira é denominada polipose adenomatosa familiar, e se caracteriza por mutações no gene *APC* na linhagem germinal (Halbert et al., 2004; Hadley et al., 2011). A segunda é a síndrome de Lynch, também conhecida como câncer colorretal não poliposo, e é causada por mutações nos genes do sistema de reparo de bases mal pareadas, também chamado de *Mismatch Repair* (MMR) (Van Duijvendijk et al., 2000; Yurgelun et al., 2012).

Os cânceres de cólon mais frequentes começam como um crescimento benigno conhecido como pólipos que se desenvolve no revestimento interno do cólon ou reto. Os pólipos mais comuns são denominados adenomatosos ou adenomas (Stryker et al., 1987). Os adenomas surgem a partir de células glandulares produtoras de muco, responsáveis pela lubrificação do intestino grosso. Embora todos os adenomas tenham a capacidade de se tornarem malignos, calcula-se que

menos de 10% progridam para um câncer invasivo (Levine e Ahnen, 2006; Risio, 2010).

Estudos têm demonstrado fortes evidências de que o fenômeno inicial, que induz as células normais do cólon a se tornarem pólipos adenomatosos, pode ser desencadeado por agentes genotóxicos existentes no lúmen intestinal (Ribeiro et al., 2008; Priolli et al., 2013). Os agentes genotóxicos são caracterizados por uma atividade biológica primária ou metabólica capaz de alterar o DNA. A genotoxicidade ocorre quando as células estão expostas a agentes tóxicos resultando em mudanças na estrutura dos cromossomos (clastogênese) ou na sequência de DNA (mutagenicidade) (Ribeiro et al., 2008). Sabe-se que os danos oxidativos no DNA, por exemplo, são causados por espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN) ou pelos grupos metila. Estes radicais estão relacionados com a inflamação da mucosa do cólon e, possivelmente, com o desenvolvimento de câncer no trato digestivo (Ames et al., 1993). Essas alterações oxidativas no DNA das células do cólon podem aumentar o número e o tamanho dos focos de criptas aberrantes (FCA) (Traverso et al., 2002). Os FCA são pólipos adenomatosos benignos que se desenvolvem em um adenoma avançado com displasia de alto grau e, em seguida, progridem para um câncer invasivo. São considerados biomarcadores intermediários confiáveis para carcinogênese colorretal, tanto em humanos quanto em modelos animais (Bird, 1995).

Alterações genéticas e epigenéticas estão relacionadas com a variabilidade da patogênese colorretal. Elas seguem um padrão de múltiplos estágios teorizado por Fearon e Vogelstein (1990). Tais alterações são diretamente responsáveis por um evento específico dentro da sequência que conduz ao CCR, contribuindo para o “início” da transformação neoplásica do epitélio saudável ou determinam a “progressão” para estágios mais malignos da doença (Colussiet al., 2013), ou seja, a transição do epitélio normal de adenoma para carcinoma está associada com eventos moleculares adquiridos (Dudok et al., 1998; Douma et al., 2010; Levine et al., 2010).

A progressão do CCR pela via adenoma-carcinoma compreende a sequência clássica de mutações nos genes *APC* – *K-ras* – *DCC* – *p53* (Figura 1) (Kim, 1997).

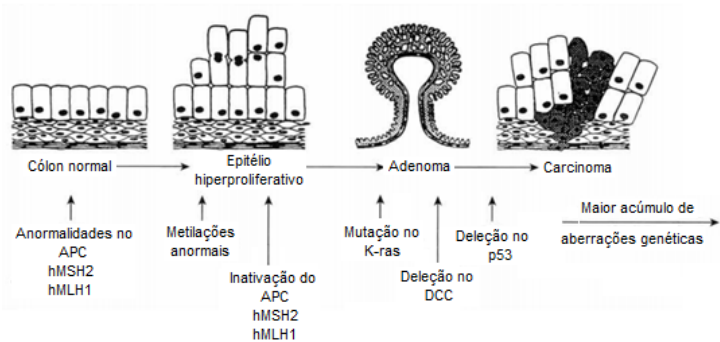


Figura 1: Sequência clássica de mutações da via da IC ou adenoma-carcinoma (Adaptado de Kim, 1997).

Pesquisas têm observado que a mutação inicial na via da instabilidade cromossômica ocorre no gene supressor de tumor *APC*, envolvido em ambos os CCRs, esporádico e hereditário (Shihet al., 2001; Sieber et al., 2002). Sua inativação resulta num aumento da sinalização da via conhecida como *WNT*, através da incapacidade de degradar β -catenina. O acúmulo de β -catenina no citoplasma, por sua vez, induz à sua translocação para o núcleo estimulando os fatores de transcrição, aumentando assim a proliferação, diferenciação, migração e adesão das células colorretais (Sparks et al., 1998; Morin et al., 1997).

As mutações iniciais da via da instabilidade cromossômica, acima mencionadas são seguidas por eventos subsequentes que promovem novas mutações e facilitam a progressão dos estágios tumorais, benigno para maligno (Colussi et al., 2013). A transição de adenoma para carcinoma é determinada, em primeiro lugar pelo gene *K-ras*, um proto-oncogene que codifica a proteína de GTPase envolvida na transdução da propagação de sinais extracelulares, por exemplo, as MAP quinases (MAPKs). As mutações de *K-ras* levam a um estado permanentemente ativo, o qual permite que a célula evite a apoptose e adquira uma vantagem de crescimento. Mais de 90% das mutações no gene *K-ras* acontecem nos códons 12 e 13 (Malumbres e Barbacid, 2003). As mutações no códon 12 conferem um fenótipo mais oncogênico do que as mutações no códon 13, pois estas estão mais envolvidas na transição adenoma-carcinoma, além de predispor as células tumorais para a invasão local e metástase (Guerrero et al., 2000).

A inativação do gene *p53* está frequentemente presente nas fases posteriores da tumorigênese colorretal (Baker et al., 1990). Uma única mutação no *p53* pode estimular intensamente a atividade proliferativa da célula devido à perda do controle do ciclo celular e da apoptose (El-Deiry et al., 1993). Outra função relacionada com o *p53* é a regulação do balanço energético através da ativação da via da AMPK (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato) (Morikawa et al., 2012). Esse gene também interage com ciclooxigenase-2 (COX-2), que desempenha um papel importante na promoção da inflamação e na proliferação celular no CCR (Swamy et al., 2003).

A carcinogênese colorretal é um processo gradual que pode durar vários anos, desde o seu início com um único evento mutacional em uma célula, até a malignidade detectável. Por essa razão, várias ações quimiopreventivas podem ser realizadas ou testadas em diversos modelos experimentais, como por exemplo, em modelos animais com a finalidade de parar ou alterar o curso do processo patológico (Roncucci e Mariani, 2015).

1.2 MODELOS ANIMAIS DE CCR

Atualmente, existem diversos modelos animais para estudar o CCR. Cada um mimetiza, em parte, a carcinogênese colorretal humana, sendo possível, testar diversas modalidades terapêuticas que não seriam viáveis em seres humanos. Há três tipos de modelos animais de CCR, os modelos de camundongos geneticamente modificados, que são úteis para estudar a importância de alterações genéticas específicas, os modelos induzidos quimicamente, que imitam o CCR esporádico humano e são frequentemente usados para estudar a influência da dieta no processo de carcinogênese, bem como estratégias de quimioprevenção, e os modelos de inoculação de células tumorais que são utilizados para analisar o potencial metastático do CCR. Como nenhum desses modelos abrange o processo de desenvolvimento do CCR por inteiro, é importante escolher um modelo adequado para abordar uma questão científica específica (Tonget et al., 2011).

A pesquisa básica do CCR cresceu com modelos animais, principalmente com roedores, que se tornaram os pilares para a compreensão da patogênese e para o desenvolvimento de novas terapias (Moser et al., 1990; Edelman e Edelman, 2004; Reichling et al., 2005). Os roedores possuem muitas vantagens, como por exemplo, semelhanças anatômicas e biológicas em relação aos humanos, tamanho pequeno, facilidade de manuseio, capacidade de reprodução, curto

tempo de gestação e manipulação genética acessível, por essa razão, são tão utilizados na pesquisa pré-clínica (Maddison e Clarke, 2005; Frese e Tuveson, 2007; He et al., 2015).

Os modelos animais mais utilizados são os que induzem a carcinogênese colorretal quimicamente, pois são rápidos e de fácil reprodução, além de mimetizarem a via adenoma-carcinoma que ocorre no câncer humano (Tonget al., 2011). A 1,2-dimetilhidrazina (DMH) ou o seu metabólito azoximetano (AOM) são os carcinógenos clássicos para a indução do CCR em animais (Choudhary e Hansen, 1998). A DMH induz tumores de origem epitelial com histologia, morfologia e anatomia semelhantes às neoplasias de cólon humanas e, portanto, é considerada um excelente carcinógeno para estudar modelos animais de CCR (Maskens, 1976).

Alguns estudos confrontam diversas linhagens de roedores, com a finalidade de verificar a sensibilidade aos carcinógenos do CCR, como por exemplo, no estudo de Delker et al. (1999) os camundongos *SWR/J* e *A/J* demonstraram sensibilidade ao AOM, por desenvolverem tumores no cólon distal, enquanto que camundongos *AKR/J* apresentaram resistência a esta droga. Em outro estudo, Nambiar et al. (2003) constataram que as linhagens *FVB*, *129SvJ*, *C57BL/6J*, *AKR/J* e *DBA/2J* são relativamente resistentes ao AOM e a DMH. E os autores Suzuki et al. (2006) submeteram quatro linhagens de camundongos ao protocolo com AOM e observaram 100% de frequência tumoral em camundongos *Balb-c*, 50% em *C57BL/6N* e as linhagens *C3H/HeN* e *DBA/2N* não desenvolveram tumores no cólon, os autores concluíram que a linhagem *Balb-c* foi a mais indicada para a indução química do CCR.

1.2.1 Modelo animal de CCR induzido pela DMH

A DMH é uma droga pertencente à classe das hidrazinas, que são substâncias sintéticas, líquidas, incolores e voláteis que contêm dois átomos de nitrogênio unidos por uma única ligação covalente. São fabricadas a partir de produtos químicos como a amônia, dimetilamina, peróxido de hidrogênio e o hipoclorito de sódio. As hidrazinas mais comuns são a hidrazina anidra utilizada como combustível em foguetes e espaçonaves, a 1,1-dimetilhidrazina usada para produzir medicamentos, produtos químicos agrícolas e espumas plásticas e a DMH, que não possui uso comercial, porém sua aplicação se restringe a laboratórios de pesquisa, pois é utilizada exclusivamente para induzir CCR em roedores (Choudhary e Hansen, 1998).

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) define a DMH como um composto genotóxico e classifica-a na categoria do Grupo 2A (carcinógenos prováveis para humanos) (IARC, 1999). De fato, muitos estudos *in vivo* sobre a genotoxicidade da DMH têm relatado resultados positivos. Agner et al. (2005) observaram danos significativos nas células do cólon de ratos *Wistar* induzidos pela DMH e Hobbs et al. (2015) verificaram danos em células hepáticas de ratos *Sprague Dawley* em diferentes doses de DMH.

Neste contexto, LaMont e O'Gorman (1978) definem a DMH como um agente pró-cancerígeno, ou seja, que requer uma ativação metabólica para se tornar um carcinógeno ativo. Esse processo ocorre no fígado, onde a DMH é oxidada pelo ácido β -glucurônico, gerando o metabólito azometano, posteriormente, este é transformado em AOM, que, por sua vez, é hidroxilado para metilazoximetano (MAM) pelo Citocromo P450 2E1 (CYP2E1). O MAM pode ser secretado na bile e transportado através do ducto biliar para o cólon ou entra diretamente nos colonócitos pela circulação sanguínea (Weisburger, 1971; LaMont e O'Gorman, 1978; Farber e Gerson, 1984; Fiala e Stathopoulos, 1984; Yagi, 1987). O MAM é um composto instável que sofre decomposição espontânea, dando origem ao formaldeído e ao metil diazônio (Figura 2). Este último é o principal responsável pela alquilação de macromoléculas no cólon (Fiala, 1977; Fiala et al., 1978; Fiala et al., 1984).

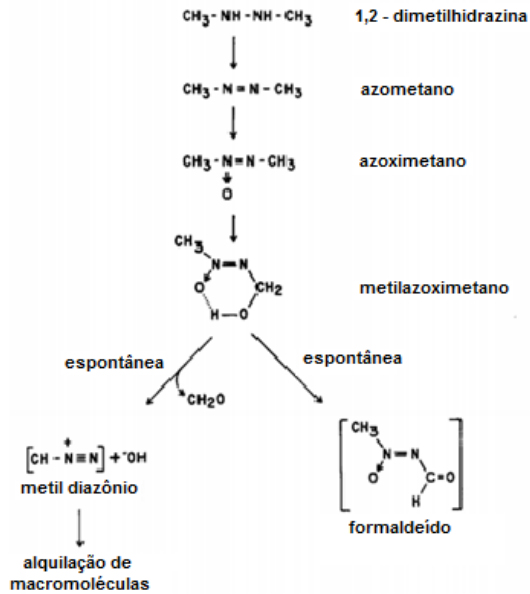


Figura 2: Metabolização da 1,2-dimetilhidrazina (Adaptado de Druckrey, 1973).

Durante o processo de metabolização da DMH, quando o metabólito reativo MAM é formado, ocorre a adição de grupos metila na posição O6 ou N7 da guanina (O6-metil-desoxiguanosina e N7-metil-desoxiguanosina) na molécula de DNA. A metilação na posição O6 da guanina (Figura 3) é a principal lesão pro-mutagênica produzida pela metabolização da DMH (Delker et al., 1998).

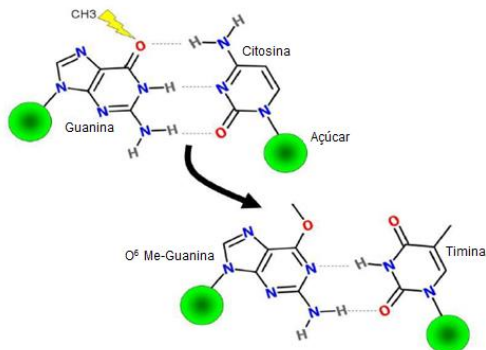


Figura 3: Modelo da metilação do oxigênio ligado ao carbono seis da guanina causado pela DMH. Tal metilação resulta na alteração da ligação de hidrogênio entre nucleotídeos, no caso o que seria uma ligação entre G:C se torna uma ligação A:T (Adaptado de Pinto, 2012).

Os tumores induzidos pela DMH compartilham muitas características histopatológicas do CCR humano e frequentemente carregam mutações nos genes *K-ras* e *β-catenina*. Alguns tumores induzidos pela DMH também podem estar relacionados com a via da instabilidade de microssatélites, o que indica uma falha no sistema de reparo do DNA. Já mutações no gene *APC*, que no caso do CCR humano são as mutações iniciais, em roedores no modelo de indução química com a DMH aparecem apenas como mutações tardias (Kobaek et al., 2000).

A tumorigênese colorretal em modelos animais induzida pela DMH ou AOM, envolve um processo gradual que se inicia com a formação de criptas aberrantes (CA) hiperplásicas, CA displásicas, adenomas e por fim carcinomas (Perse e Cerar, 2011). Cada uma dessas alterações histopatológicas compreende uma mutação específica, acometendo os seguintes genes em sequência: *K-ras*, *β-catenina* e *APC*. Essas mutações também são encontradas no CCR esporádico humano. Além disso, cada estágio da tumorigênese colorretal também abrange alterações epigenéticas particulares como demonstrado na figura 4 (Perse e Cerar, 2011).

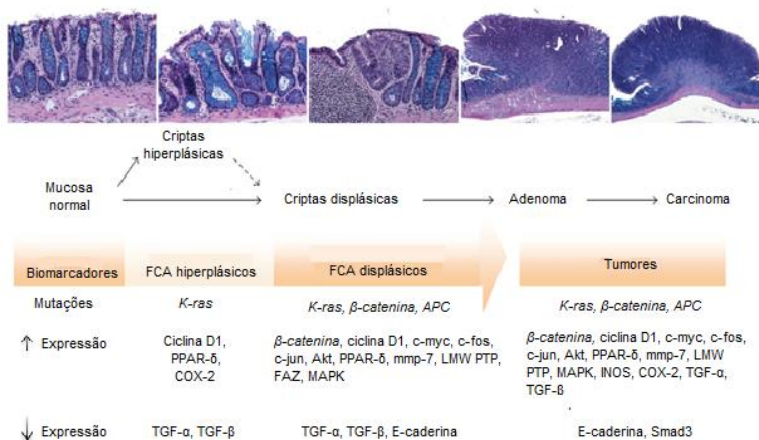


Figura 4: Alterações fenotípicas, genéticas e epigenéticas envolvidas no desenvolvimento da tumorigênese colorretal em roedores induzido pela DMH/AOM (Adaptado de Perse e Cerar, 2011).

Como citado anteriormente a DMH causa muitas alterações moleculares e histopatológicas semelhantes às que ocorrem nos tumores colorretais humanos, por esse motivo, é utilizada frequentemente em muitos estudos com modelos animais sobre a quimioprevenção do CCR (Choudhary e Hansen, 1998).

1.3 QUIMIOPREVENÇÃO DO CCR

A quimioprevenção pode ser definida como a utilização de compostos sintéticos ou naturais que previnem o desenvolvimento do câncer por inibição da etapa de iniciação da carcinogênese ou da progressão da malignidade (Wu et al., 2011). Desta forma, agentes que exercem efeitos antígenotóxicos e antimutagênicos podem ser usados também como compostos quimiopreventivos. Esses agentes podem atuar através de diferentes mecanismos, como por exemplo, protegendo as células dos danos oxidativos, melhorando o sistema de reparo do DNA ou interagindo diretamente com o composto mutagênico e, assim, impedindo sua interação com DNA (Ferguson, 1994).

Por mais de um de século, o principal objetivo do controle do câncer tem sido a prevenção (Curry et al., 2003). Atualmente, há duas estratégias de prevenção contra o CCR em execução, à prevenção primária, que reduz a incidência da doença afetando os fatores de risco, e a prevenção secundária, que visa à detecção precoce de lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas no intestino grosso em populações com uma alta predisposição de desenvolver o câncer (Varmus, 2006; Roncucci e Mariani, 2015).

Os dados disponíveis indicam que a prevenção primária do CCR é viável, onde aproximadamente 70% destes podem ser, pelo menos em teoria, evitáveis por mudanças na dieta e no estilo de vida (Giovannucci, 2002). Pelo fato do desenvolvimento do CCR ser um processo de várias etapas, que ocorre ao longo de um período de 10 anos, acaba por proporcionar assim uma oportunidade para a prevenção e detecção precoce (Winawer et al., 2003). A triagem e remoção dos pólipos iniciais são intervenções também bastante eficazes de prevenção do CCR (Winawer et al., 2003; Lieberman et al., 2012). No entanto,

juntamente com os esforços de triagem, precisamos de uma estratégia específica de prevenção para os pacientes com alto risco de desenvolvimento de CCR, seja pela predisposição hereditária ou a susceptibilidade aos fatores de risco.

Muitos estudos tem investigado a ação dos antioxidantes como compostos quimiopreventivos, pois eles podem interagir com os radicais livres e impedir que as moléculas vitais sejam danificadas (Osmak et al., 1997). Os mecanismos antioxidantes de defesa podem ser divididos em duas categorias diferentes. Em primeiro lugar, as enzimas com propriedades antioxidantes sintetizadas pelo corpo humano e o segundo grupo, as substâncias antioxidantes obtidas a partir da dieta, como por exemplo, as vitaminas C (VC) e E. De fato, estudos têm relacionado os baixos níveis sanguíneos de nutrientes antioxidantes, tais como a VC, com um maior risco de desenvolver o câncer (Ames, 2001; Mikirova et al., 2013).

Outros compostos que estão sendo estudados como quimiopreventivos do CCR são os medicamentos, porque as lesões pré-malignas podem ser revertidas ou impedidas farmacologicamente (Umar et al., 2012). Até o presente momento, vários medicamentos têm sido apontados como candidatos contra o CCR. Estes incluem a aspirina (um anti-inflamatório não esteroide - AINE) (Coyle et al., 2016; Emilsson et al., 2017), as estatinas (medicamentos utilizados para o tratamento da hipercolesterolemia) (Demierre et al., 2005; Ananthakrishnan et al., 2016; Voorneveld et al., 2017) e a metformina (medicamento amplamente prescrito para diabetes mellitus tipo II) (Shaw et al., 2005; Bekusova et al., 2016; Lee et al., 2017), que exibem efeitos quimiopreventivos em estudos epidemiológicos e experimentais, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Como citado anteriormente, a quimioprevenção é eficaz contra o desenvolvimento do CCR, várias drogas e compostos naturais têm sido investigados isoladamente por suas capacidades quimiopreventivas. Entretanto, outra maneira de estudar esses compostos é de forma combinada, pois podemos otimizar as propriedades quimiopreventivas ao mesmo tempo em que reduz as concentrações e os efeitos adversos (Burn et al., 2011). Muitos estudos avaliaram a aspirina isoladamente, concluindo que uso prolongado poderia diminuir a incidência de certas neoplasias malignas, incluindo o CCR (Wang e DuBois, 2006). Além da aspirina, a VC vem ganhando destaque, pois há várias pesquisas sobre a sua eficácia contra diversos tipos de câncer. (Ames, 2001; Mikirova et al., 2013). A combinação dessas duas substâncias pode ser em teoria,

uma ótima estratégia de quimioprevenção contra o CCR, pois ambas atuam em diferentes etapas da carcinogênese.

1.4 VITAMINA C

A VC, também conhecida como ácido ascórbico é um dos mais poderosos e bem conhecidos antioxidantes nutricionais encontrados em frutas e vegetais frescos, onde está disponível na sua forma reduzida, ácido ascórbico, ou na sua forma oxidada, ácido dehidroascórbico (DHA) (Figura 5) (Deutsch, 2000; Lee et al., 2003; Padayatty et al., 2003).

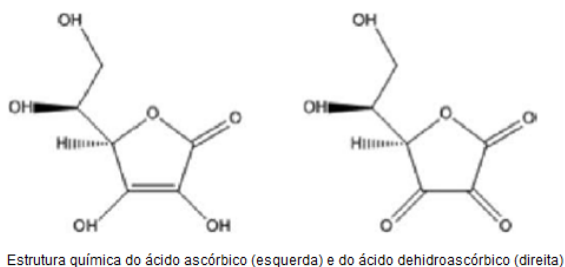


Figura 5: Estrutura química do ácido ascórbico e do ácido dehidroascórbico (Adaptado de Mamede et al., 2012)

A VC é uma lactona com seis átomos de carbono, que é sintetizada a partir da glicose, no fígado de muitas espécies de mamíferos (Naidu, 2003). No entanto, os seres humanos perderam evolutivamente a enzima gulonolactona oxidase, essencial para a síntese de 2-ceto-L-gulonolactona, seu precursor direto. Como resultado, os seres humanos absorvem a VC exclusivamente da dieta. Assim, ela entra nas células através dos seus transportadores dependentes de sódio (SVCT), em um processo favorecido pelo gradiente eletroquímico de sódio. No organismo há dois tipos de SVCT, o SVCT1 que está presente em maior quantidade no fígado, rins e intestino, e o SVCT2 presente no cérebro e olhos. O SVCT1 assegura a absorção e reabsorção intestinal e renal da VC (Michels et al., 2013).

A VC age como um agente quelante, atenuando a morte celular oxidativa, inibindo a apoptose induzida pela enzima ácido graxo sintase e modulando a proteção genômica através da redução de ERO

intracelulares (Han et al., 2007; Antonio-Garcia e Massó-Gonzalez, 2008; Chang et al., 2012). De fato, a propriedade antioxidante da VC contribui na redução dos danos oxidativos no DNA e no desenvolvimento do câncer, pois neutraliza a ação das ERO e de outros radicais livres que danificam a molécula de DNA (Wiseman e Halliwell, 1996). Essa neutralização ocorre porque os radicais livres precisam de um par de elétrons para se tornarem estáveis e como a VC é uma excelente fonte de elétrons, ela doa para os radicais livres, refletindo assim, na sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo (Padayatty et al., 2006).

Alguns estudos mostram o efeito protetor da VC sobre o DNA, como por exemplo, no estudo de Naeji et al. (2017), no qual analisaram o efeito radioprotetor da VC em micronúcleos induzidos por radiação de baixa dose em células de medula óssea de camundongos, e os resultados mostraram que a VC foi capaz de reduzir significativamente a frequência de micronúcleos quando comparada com o grupo controle. Kontek et al. (2013), por sua vez, investigaram a capacidade da VC, nas concentrações de 10 μM , 25 μM , 50 μM e 100 μM , em reduzir os danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em células de adenocarcinoma colorretal humano (HT29). Os resultados mostraram que 1 h de pré-incubação com VC e posteriormente exposição ao H_2O_2 foi capaz de reduzir significativamente os danos no DNA ($p < 0,05$) nas concentrações mais baixas de VC 10 μM e 25 μM .

De fato, a suplementação com VC tem sido relacionada com a diminuição de danos oxidativos, tanto em células animais como em células humanas (Kazimirova et al., 2006). No entanto, é possível que o impacto protetor da VC sobre o DNA dependa tanto das concentrações dela no indivíduo quanto do nível de exposição aos xenobióticos ou ao estresse oxidativo (Kazimirova et al., 2006).

Além da VC ser um antioxidante, ela também atua como uma molécula pró-oxidante quando encontrada na forma oxidada DHA, promovendo a formação de ERO que afetam a viabilidade celular (Mamede et al. 2012). Por essa razão, a maioria das células tumorais evitam transportar DHA para o seu interior com finalidade de preservar a sua integridade celular (Padayatty et al., 2006). No estudo de Mamede et al. (2012), foi avaliado os efeitos citotóxicos da VC *in vitro* na linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano (WiDr) e *in vivo*, nos camundongos *Balb-c* xenotransplantados com células WiDr. Os resultados mostraram que a forma reduzida da VC, o DHA induziu um efeito antiproliferativo e citotóxico *in vitro* nas células WiDr e uma redução significativa na taxa de crescimento tumoral *in vivo*.

Segundo Yun et al. (2015) as células malignas colorretais que possuem mutações nos genes *K-ras* ou *BRAF* são seletivamente mortas quando expostas a altos níveis de VC. Esse efeito se atribui ao aumento da captação da forma oxidada da VC, DHA, através do transportador de glicose GLUT1. O aumento de DHA no meio intracelular provoca o estresse oxidativo. Deste modo, o acúmulo de ERO inativa o gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), levando a uma crise energética e a morte celular (Figura 6).

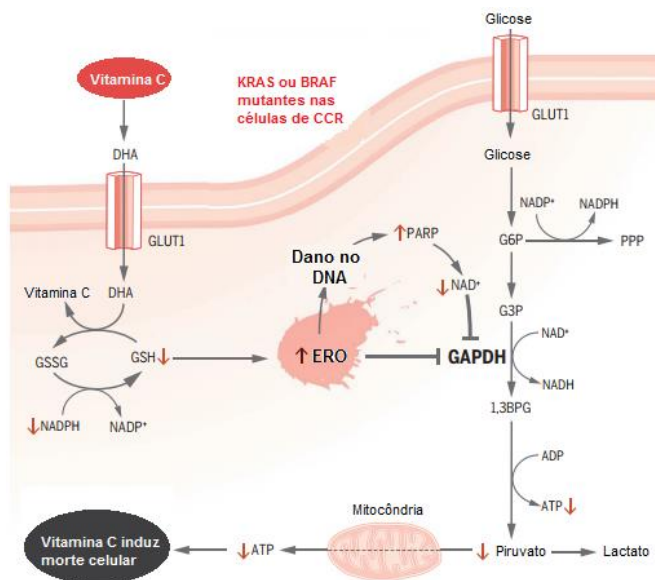


Figura 6: Absorção de VC por células de CCR mutantes para os genes *KRAS* e *BRAF*. O aumento resultante da produção de ERO bloqueia o metabolismo da glicose (além de outros efeitos mostrados). As células mudam o seu fluxo glicolítico para a via do fosfato de pentose, mas, em última análise, as células se tornam esgotadas da ATP (Adenosina Trifosfato), induzindo uma crise energética que leva à morte celular (Adaptado de Reczek e Chandel, 2015).

Outro fato importante é que as células cancerígenas apresentam uma peculiaridade: a diminuição de várias enzimas antioxidantes em relação às células normais. Por conseguinte, o aumento da produção de H_2O_2 , o colapso da atividade das enzimas antioxidantes e a presença de metais de transição nas células cancerígenas, podem resultar na seletiva citotoxicidade da VC e na revelação do seu potencial terapêutico

(Padayatty et al., 2006), pois participa da ativação de genes envolvidos no sistema de reparo do DNA, os quais modulam os níveis de danos no DNA de células expostas as ERO (Arrigoni e Tullio, 2002; Valko et al., 2006).

1.5 ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

O AAS também conhecido como aspirina, é uma droga anti-inflamatória não esteroide (AINE) amplamente utilizada como analgésico, anti-inflamatório, antipirético e agente antiplaquetário em idosos (Ashktorab et al., 2005; Basselin et al., 2011). O AAS pode atuar também na prevenção da trombose e doenças cardiovasculares (Patrono, 2015), além de reduzir a proliferação e induzir a apoptose em células cancerígenas, pode também inibir a carcinogênese química induzida em vários modelos animais (Ashktorab et al., 2005; Basselin et al., 2011).

A aspirina pode interagir de forma positiva com o DNA das células, como por exemplo, inibir a recombinação cromossômica. Esse efeito pode estar relacionado com a sua bio-antimutagenicidade (Sato et al., 1996). Os autores Niikawa et al. (2006) avaliaram cinco metabólitos do AAS (ácido salicílico, ácido salicilúrico, ácido gentísico, ácido gentísúrico e o ácido 2,3-dihidroxibenzoico) contra os danos genotóxicos induzidos pela Mitomicina C (MMC) em *Drosophila melanogaster*, através do teste SMART, em inglês *Somatic Mutation and Recombination Test*. Eles observaram que todos os cinco metabólitos reduziram a genotoxicidade de forma dose dependente, e concluíram que estes metabólitos são as principais substâncias antígeno-tóxicas presentes na via metabólica da aspirina.

Além disso, os mesmos autores Niikawa et al. (2001), analisaram a frequência de micronúcleos em diferentes doses de AAS (0,5, 5 e 50 mg/kg, via gavagem ou por injeções intraperitoneais (IP) em diferentes tempos após a administração da MMC (0, 5h, 6h e 24h), em células da medula óssea e de sangue periférico de camundongos. Os autores observaram um efeito supressor da aspirina mais pronunciado nos grupos tratados por 24h após a administração da MMC, cerca de 60-80% após a injeção IP e cerca de 40-70% após a administração oral. Eles sugerem que a aspirina pode agir diretamente sobre os metabólitos da MMC, mas não na própria MMC.

Vários estudos mostram que a aspirina possui a capacidade de sequestrar o radical hidroxila (OH[•]), uma das ERO que está intimamente envolvida com os múltiplos estágios da carcinogênese (Aruoma e

Halliwell, 1988). No estudo de Kataoka et al. (1997) os AINEs eliminaram a OH^{\bullet} diretamente, de forma dose dependente, através dos métodos de degradação do ácido hialurônico e de ressonância de spin eletrônico. Esta é a explicação para a hipótese da atuação do AAS como um agente anticarcinogênico, uma vez que, que ele age contra os danos oxidativos presentes no processo de carcinogênese.

Em outro estudo, Antunes et al. (2007) realizaram o ensaio de aberrações cromossômicas em linfócitos de pessoas saudáveis expostos ao tratamento com aspirina (nas concentrações de 25, 50 ou 100 g/mL) e doxorrubicina. Os autores observaram uma diminuição significativa no número total de aberrações cromossômicas no tratamento com AAS e doxorrubicina em todas as concentrações quando comparado com o grupo tratado somente doxorrubicina ($p < 0,01$). Eles discutem que o AAS pode ter atuado como um agente antioxidante, inibido o dano cromossômico induzido pelos radicais livres gerados pela doxorrubicina.

Ao contrário de outros AINEs, a aspirina inibe irreversivelmente a COX por acetilação de resíduos de serina no seu sítio ativo, impedindo assim a formação de prostaglandinas pró-inflamatórias (Ashktorab et al., 2005; Basselin et al., 2011). A enzima COX-2 é rapidamente induzida em resposta aos mediadores de inflamação e a sua expressão esta correlacionada com o aumento da proliferação e promoção das células tumorais (Dovizio et al., 2013). Deste modo, a aspirina pode diminuir a produção de prostaglandinas potencialmente neoplásicas que derivam da catálise do ácido araquidônico mediado pela COX-2 (Figura 7).

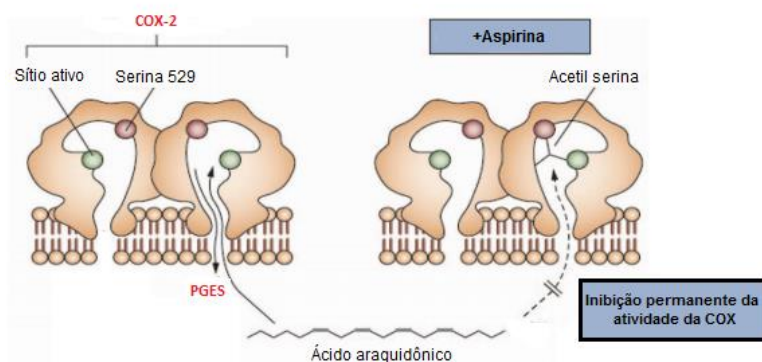


Figura 7: A inibição da produção de prostaglandinas derivadas da catálise do ácido araquidônico (Adaptado de Fuster e Sweeny, 2011).

Recentemente, vários trabalhos sugerem um efeito quimiopreventivo do AAS contra alguns tipos de cânceres (Rothwell et al., 2012; Bastiaannet et al., 2012). A evidência dos efeitos anticancerígenos do AAS surgiu a partir de modelos *in vitro* e *in vivo*, principalmente em relação ao CCR (Cole et al., 2009). Por exemplo, no estudo de Liu et al. (2008), camundongos fêmeas da linhagem *CF-1* foram tratados com cálcio, aspirina, e cálcio + aspirina, e submetidos ao modelo de CCR com AOM. Os autores observaram uma redução no número de focos de criptas aberrantes (FCA) por animal de 43%, 40% e 50%, respectivamente e no número total de CA por animal de 53%, 50% e 59%, respectivamente. Em outro estudo, Christudoss et al. (2013), avaliaram o cólon de ratos *Wistar* submetidos ao modelo de CCR com DMH e tratados com aspirina, VC e zinco, e constataram por meio da histologia, que 87,5% dos animais tratados com aspirina e DMH apresentaram uma mucosa colônica normal quando comparados com o grupo tratado com água e DMH (controle positivo).

As pesquisas sugerem que o AAS é eficaz na prevenção primária, onde seu uso diário em longo prazo e em doses baixas reduz o risco de pólipos adenomatosos (Cole et al., 2009). Também há indícios de um possível papel como adjuvante no tratamento do câncer, prevenindo a recorrência e aumentando a sobrevida dos pacientes, além de diminuir a probabilidade de metástases após a terapia potencialmente curativa (Langley et al., 2011; Bastiaannet et al., 2012; Rothwell et al., 2012).

Considerando os efeitos da VC e do AAS sobre o DNA e no processo de tumorigênese de muitos cânceres, este trabalho tem a finalidade de avaliar os possíveis efeitos quimiopreventivos desses compostos de forma combinada e isolada no modelo animal de CCR induzido pela DMH, visando contribuir com as estratégias de quimioprevenção do CCR.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar os efeitos quimiopreventivos da Vitamina C e do Ácido Acetilsalicílico em modelo animal de câncer colorretal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Quantificar os níveis plasmáticos da Vitamina C e do Ácido Acetilsalicílico nos camundongos submetidos ao modelo de câncer colorretal, visando definir a eficácia dos tratamentos;
2. Avaliar o efeito da Vitamina C e do Ácido Acetilsalicílico sobre parâmetros de estresse oxidativo no cólon de camundongos submetidos ao modelo animal de câncer colorretal;
3. Avaliar os níveis de dano no DNA em células do sangue e fígado de camundongos submetidos ao modelo de câncer colorretal e aos respectivos tratamentos com Vitamina C e Ácido Acetilsalicílico;
4. Investigar os efeitos da Vitamina C e do Ácido Acetilsalicílico no desenvolvimento de criptas aberrantes no cólon de camundongos submetidos ao modelo de câncer colorretal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Foram utilizados 80 camundongos *Balb-c* adultos (60 dias), machos e fêmeas. Os animais foram obtidos do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense, alojados em caixas de polietileno, com comida e água *ad libitum* e mantidos em um ciclo de 12 horas claro-escuro, com temperatura controlada de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESC, com número de protocolo 034/2016-2 (Anexo), e os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram randomicamente divididos em 8 grupos com 10 animais cada, 5 machos e 5 fêmeas, como descrito a seguir: Grupo 1: Controle negativo (CN), os animais receberam água durante 12 semanas, e na 4^a e na 5^a semana foram administradas duas injeções subcutâneas (SC) de Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA); Grupo 2: Controle positivo (CP), os animais receberam água durante as 12 semanas, e na 4^a e na 5^a semana foram administradas duas injeções SC de DMH; Grupo 3: VC + EDTA, os animais receberam VC diluída na água durante as 12 semanas, e na 4^a e na 5^a semana foram administradas duas injeções SC de EDTA; Grupo 4: AAS + EDTA, os animais receberam AAS diluído na água durante as 12 semanas, e na 4^a e na 5^a semana foram administradas duas injeções SC de EDTA; Grupo 5: VC e AAS + EDTA, os animais receberam VC e o AAS diluídos na água durante as 12 semanas, e na 4^a e na 5^a semana foram administradas duas injeções SC de EDTA; Grupo 6: VC + DMH, os animais receberam VC diluída na água durante as 12 semanas, e na 4^a e na 5^a semana foram administradas duas injeções SC de DMH; Grupo 7: AAS + DMH, os animais receberam AAS diluído na água durante as 12 semanas, e na 4^a e na 5^a semana foram administradas duas injeções SC de DMH; Grupo 8: VC e AAS + DMH, os animais receberam VC e o AAS diluídos na água durante as 12 semanas, e na 4^a e na 5^a semana foram administradas duas injeções SC de DMH (Figura 8). No final da 12^a semana foi realizada uma coleta de sangue via retro-orbital e em seguida os animais foram submetidos à eutanásia para a dissecação do cólon e fígado, para as análises moleculares e histológicas.

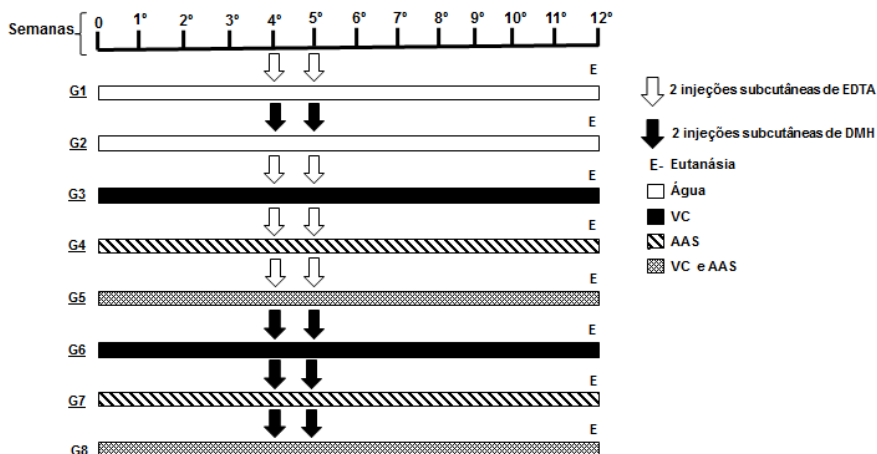


Figura 8: Desenho experimental.

3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE VITAMINA C E DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

A Vitamina C (Sigma Aldrich, Brazil) foi dissolvida em água potável a uma concentração de 500 mg/L (Rashid e Khan, 2013), a concentração diária de VC estimada por camundongo foi de 0,15 mg baseada num consumo médio de 10 mL de líquido por dia. A solução foi preparada no escuro e colocada em garrafas de água protegida da luz para evitar a oxidação.

O Ácido Acetilsalicílico (Sigma Aldrich, Brazil) também foi diluído em água potável, e a dose estimada por camundongo foi de 6 mg/kg por dia de peso corporal baseada num consumo médio de 10 mL de líquido por dia (Bousserouel et al., 2010).

Os camundongos tratados tiveram livre acesso à água ou à água com os compostos diluídos, conforme o desenho experimental. As soluções foram trocadas por soluções frescas três vezes por semana e o volume dos líquidos consumidos foram quantificados e divididos pelo número de animais por gaiola em cada troca.

3.4 INDUÇÃO DA CARCINOGENÊSE COLORRETAL COM DMH

Para induzir a carcinogênese colorretal, os animais receberam quatro injeções SC de DMH (Sigma Aldrich, Brazil). A DMH foi dissolvida em uma solução de EDTA (37 mg/100 mL de água

destilada). Os animais receberam duas injeções de DMH na 4ª e duas na 5ª semana de tratamento, cuja dose de cada injeção foi de 40 mg/kg de peso corporal, totalizando 160 mg/kg de DMH por animal (Rodrigues et al., 2002).

3.5 EUTANÁSIA E DESCARTE DOS ANIMAIS

No final da 12ª semana, foi realizada uma coleta de sangue via retro-orbital em todos os animais, em seguida foram submetidos à eutanásia por decapitação com guilhotina e os seguintes tecidos dissecados: cólon e fígado para a realização das análises moleculares, histológicas e bioquímicas.

Ao término do experimento, os animais foram descartados em saco branco leitoso com identificação de infectante e armazenados em freezer. Posteriormente os resíduos foram tratados fisicamente e encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos seguiram a RDC nº 306/2004 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

3.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Para quantificar os níveis plasmáticos de VC e do AAS nos animais foi utilizado o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da *Proeminence Shimadzu* (Kyoto, Japan).

3.6.1 Reagentes

Os reagentes utilizados foram: fosfato de potássio monobásico 10 mM, metanol (CH₃OH) (Sigma-Aldrich), acetonitrila (ACN) (Sigma-Aldrich), água ultrapurificada em sistema *Direct-Q MilliPore* (água Milli-Q) e ácido trifluoracético (TFA) (Sigma-Aldrich).

3.6.2 Preparação do plasma

Foram coletados 500 µL de sangue via retro-orbital dos animais tratados com a VC e com o AAS. O sangue foi colocado em tubos contendo 5µL de K₃EDTA 50 mg/mL, e imediatamente centrifugados a 6000×g por 10 min para a separação do plasma.

Foi adicionado 60 µL de ACN em 20 µL de plasma dos animais tratados com vitamina C, após a solução foi agitada por 30s. Depois do descarte da proteína por centrifugação, foram adicionados 50 µL da

amostra com 5µL de 1% (v / v) de fosfato de potássio monobásico 10 mM.

Foi adicionado 60 µL de ACN em 20 µL de plasma dos animais tratados com ácido acetilsalicílico, após a solução foi agitada por 30s. Depois do descarte da proteína por centrifugação, foram adicionados 50 µL da amostra com 5µL de 1% (v/v) de TFA.

3.6.3 Condições Cromatográficas da VC e do AAS

O método cromatográfico foi proposto por Tyagi et al. (2014) com adaptações: as amostras de VC tiveram um volume de injeção de 20 µL, com temperatura de análise de 50°C. A coluna analítica utilizada foi Ascentis® C18 (250 x 2.1 mm, 5µm), a vazão de bombeamento da fase móvel foi de 0,5 mL/min. A detecção foi por absorbância, detector UV/VIS, no comprimento de onda de 254nm. O perfil da fase móvel foi isocrático, 40% (v/v) de ACN grau CLAE e 60% (v/v) de fosfato de potássio monobásico 10 mM.

As amostras de AAS tiveram um volume de injeção de 20 µL, com temperatura de análise de 25°C. A coluna analítica utilizada foi Ascentis® C18 (150 x 4,6 mm, 5µm), a vazão de bombeamento da fase móvel foi de 1.25 mL/min. A detecção foi por absorbância, detector UV/VIS, no comprimento de onda de 427nm. O perfil da fase móvel foi isocrático, 40% (v/v) de ACN grau CLAE e 60% (v/v) de TFA.

3.7 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

3.7.1 Determinação intracelular de ERO e óxido nítrico

A determinação intracelular de ERO e Óxido Nítrico foram realizadas no cólon dos camundongos tratados com VC e AAS e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH.

3.7.1.1 Diclorofluoresceína

A produção de hidroperóxidos foi determinada pela formação intracelular de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF-DA) a partir da oxidação do diacetato de DCF-DA por ERO de acordo com o método descrito anteriormente por Dong et al. (2010), com algumas modificações.

3.7.1.2 Indicador da formação de Óxido Nítrico

A produção de Óxido Nítrico (NO) foi avaliada espectrofotometricamente através do metabólito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente Griess (1 % sulfanilamida e 0,1 % de N-1 (naphthyl) ethylenodiamina) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância foi medida a 540 nm. O conteúdo de nitritos foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabólito nitrito de sódio (NaNO). Os resultados foram calculados em μmol Nitrito/mg proteína (Chaea e cols, 2004).

3.7.2 Marcadores De Danos Oxidativos

Os marcadores de danos oxidativos foram analisados no cólon dos camundongos tratados com VC e AAS e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH.

3.7.2.1 Carbonilação de proteínas

A oxidação de proteínas (carbonil) foi determinada mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a dinitrofenilhidrazina. Essa reação gera a formação de hidrazonas correspondentes. O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente a 370nm como previamente descrito por Levine et al., (1990). Os resultados foram calculados como nmol/mg de proteína empregando o coeficiente de extinção molar de dinitrofenilhidrazonas de 22.000 $^{-1}$. $^{-1}$.

3.7.2.2 Conteúdo de sulfidrila

Para determinar grupamentos tióis totais na amostra foi utilizado o reagente de cor (DTNB), que reduziu os grupos tióis gerados, formando um derivado amarelo (TNB), que foi mensurado espectrofotometricamente em um aparelho spectramax à 412nm (Aksenov e Markesbery, 2001).

3.7.3 Defesas Antioxidantes

As defesas antioxidantes foram analisadas no cólon dos camundongos tratados com VC e AAS e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH.

3.7.3.1 Superóxido Dismutase

A atividade da Superóxido Dismutase (SOD) foi medida pela inibição da oxidação da adrenalina adaptado de Bannister e Calabrese (1987). As amostras foram homogeneizadas em tampão de glicina. Os volumes de 5, 10 e 15 μ L foram retiradas da mesma, a qual 5mL de catalase (0,0024 mg/mL de água destilada), tampão de glicina 175-185mL (0,75g em 200mL de água destilada a 32°C, pH 10,2), 5 μ L adrenalina (60mM em água destilada + 15mL/mL de HCl fumegante) foram adicionados. As leituras foram realizadas por 180s em intervalos de 10s e medido em 480nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

3.7.3.2 Catalase

A atividade da Catalase (CAT) foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio lido em espectrofômetro a 240 nm, segundo Aebi (1984).

3.7.3.3 Glutathiona

Os níveis de Glutathiona (GSH) foram determinados como descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas adaptações. GSH foi mensurado no homogeneizado de cólon total após precipitação de proteína com 1mL proteína de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500 μ M DTNB. O desenvolvimento de cor resultante a partir da reação entre o DTNB e tióis atingiu um máximo em 5 minutos e manteve-se estável durante mais de 30 min. A absorbância foi lida a 412nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutathiona reduzida foi usado para calcular os níveis de GSH nas amostras.

3.8 ENSAIO COMETA

Para realização do Ensaio Cometa (EC) foram utilizados os seguintes tecidos biológicos: sangue e fígado. O EC foi realizado como descrito por Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000). As amostras de sangue (alíquotas de 10 μ L) foram coletadas e colocadas em microtubos heparinizados e as de fígado foram dissecadas e colocadas em microtubos com tampão *merchant* (0,14 M NaCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 10 mM Na₂EDTA). As amostras de fígado

foram individualmente homogeneizadas com o auxílio de uma seringa, a fim de obter uma suspensão celular.

As células sanguíneas (alíquotas de 10 μ L) e as suspensões celulares do fígado (alíquotas de 70 μ L) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (“*low melting*”) e em seguida distribuídas em dois poços (alíquotas de 70 μ L) em lâminas pré-revestidas com agarose de ponto de fusão normal (1,5%, w/v) e cobertas com duas lamínulas. Após solidificação do material biológico, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram colocadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10,0 - 10,5, com adição na hora de Triton X – 100 e 10% de DMSO) *overnight*, protegidas da luz. Passado esse tempo, foram incubadas em tampão alcalino (pH 12,6) durante 30 minutos para o desenovelamento do DNA. As lâminas foram submetidas a uma corrida de eletroforese, com o mesmo tampão, durante 20 minutos a 30 volts e uma corrente de 300 miliamperes, posteriormente foram neutralizadas com solução neutralizadora (Tris 0,4M em pH 7,5).

As lâminas foram coradas com Syber Gold por 30 minutos e analisadas em microscópio de fluorescência com ampliação de 400x. Foram analisados visualmente 100 nucleóides, sendo classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda, a classificação varia entre a ausência de cauda (0) até o comprimento máximo (4) (Collins et al., 1997). Desta forma, tem-se o Índice de Danos (ID) para cada grupo variando de zero (100 X 0 = 0; 100 nucleóides observados completamente sem danos) a 400 (100 X 4 = 400; 100 nucleóides observados com dano máximo). Calcula-se a frequência de danos (FD) em % em cada amostra com base no número de nucleóides com cauda versus o número de nucleóides sem cauda.

Para avaliação do dano oxidativo, foi realizado o método alcalino (Sigh et al., 1988; Tice et al., 2000, ver descrição acima), com alguns ajustes (Collins, 2014). Após o período que as lâminas permaneceram na solução de lise, foi adicionado em cada uma delas 60 μ L da enzima Formamido Pirimidina Glicosilase (FPG) e/ou tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1mM, pH>13) e imediatamente foram incubadas na estufa à 37°C por 45 min. Em seguida, as lâminas foram submetidas à corrida de eletroforese seguindo os procedimentos normais do Ensaio Cometa versão alcalina.

Foram utilizados controles negativos e positivos para cada corrida de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas.

3.9 TESTE DAS CRIPTAS ABERRANTES

Após a eutanásia dos animais foi realizada a técnica das criptas aberrantes descrita por Bird (1987): primeiramente foi feito uma laparotomia no animal, depois removeu-se o cólon, obstruiu-se uma das extremidades (com a utilização de uma linha) para a lavagem interna do mesmo com solução salina (0,9% NaCl), após a realização da incisão longitudinal no cólon, o mesmo foi fixado com alfinete em uma pequena placa de isopor. As amostras foram submergidas em solução de formalina a 10% por 24 horas. Para a leitura corou-se com solução aquosa de azul de metileno a 1% e a mucosa foi visualizada no microscópio óptico com aumento de 100X. Foram analisados 15 campos sequenciais por cólon/animal, em cada campo foi quantificado o número de FCA e de CA.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. A normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste *Bartlett*. A análise estatística do Ensaio Cometa, dos parâmetros de estresse oxidativo e do Teste de Criptas aberrantes foi feita através do teste *ANOVA* de 2 vias, seguido pelo *post hoc Bonferroni*. Na avaliação da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e da ingestão de líquidos foi utilizado o teste *ANOVA* de 1 via, seguido pelo *post hoc Tukey*. As análises de comparação entre fêmeas e machos foram realizadas pelo *Teste t-student*. Uma diferença de $p < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa. O pacote estatístico utilizado foi Graph Pad Prism versão 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 INGESTÃO DE LÍQUIDOS

Durante as 12 semanas do experimento, o volume dos líquidos consumidos foram quantificados e divididos pelo número de animais por gaiola, três vezes por semana. A tabela 1 mostra a ingestão média diária de líquidos por animal, entre fêmeas e machos do mesmo grupo e a média total por grupo.

Tabela 1: Ingestão média diária de líquidos por animal, entre fêmeas e machos do mesmo grupo e a média total por grupo.

| Grupos | | Ingestão diária de líquidos (mL) | Total |
|-----------------|--------|----------------------------------|----------------|
| CN | Fêmeas | 12,64 ± 6,52 | 12,85 ± 6,18 |
| | Machos | 13,07 ± 6,43 | |
| CP | Fêmeas | 7,26 ± 2,47 | 6,78 ± 1,97*** |
| | Machos | 6,30 ± 2,46 | |
| VC + EDTA | Fêmeas | 16,19 ± 5,21 | 16,68 ± 4,21 |
| | Machos | 17,17 ± 4,42 | |
| AAS + EDTA | Fêmeas | 8,93 ± 4,41 | 8,93 ± 3,92** |
| | Machos | 8,93 ± 4,79 | |
| VC e AAS + EDTA | Fêmeas | 13,66 ± 4,86 | 12,64 ± 4,08 |
| | Machos | 11,62 ± 5,54 | |
| VC + DMH | Fêmeas | 9,55 ± 3,67 | 10,11 ± 3,24 |
| | Machos | 10,64 ± 4,88 | |
| AAS + DMH | Fêmeas | 8,46 ± 4,00 | 7,99 ± 2,23*** |
| | Machos | 7,52 ± 3,93 | |
| VC e AAS + DMH | Fêmeas | 9,78 ± 4,85 | 9,73 ± 3,50* |
| | Machos | 9,68 ± 4,70 | |

Dados expressos em média ± desvio padrão. Para a comparação entre fêmeas e machos foi utilizado o *Testet-student* e para a comparação entre os grupos foi utilizado o ANOVA de 1 via, seguido pelo *post hoc* de *Tukey*. AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) e VC (vitamina C).

*Diferença significativa em relação ao grupo CN com $p < 0,05$.

**Diferença significativa em relação ao grupo CN com $p < 0,01$.

***Diferença significativa em relação ao grupo CN com $p < 0,001$.

Os resultados demonstram que não houve diferença significativa na ingestão média total de líquidos entre fêmeas e machos do mesmo grupo durante as 12 semanas de tratamento (*Teste t-student*). Entretanto, quando os grupos foram comparados, houve uma redução na média total de ingestão de líquidos nos grupos CP, AAS + EDTA, AAS + DMH e VC e AAS + DMH em relação ao grupo CN ($p < 0,001$, $p < 0,01$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente).

4.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Os resultados da CLAE sobre as concentrações plasmáticas de VC dos animais tratados com VC e submetidos ao modelo de CCR com a DMH estão apresentados na tabela 2, os dados representam a média da análise das concentrações em duplicata. Nos grupos tratados apenas com VC as concentrações plasmáticas de VC aumentaram significativamente com $p < 0,01$ em relação ao grupo controle. Já nos grupos que foram tratados com VC e AAS a concentrações plasmáticas de VC não apresentaram diferença significativa do controle.

Tabela 2: Análise da concentração média (mg/ml) de VC no plasma dos camundongos tratados com VC e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH.

| Grupos | Conc. (mg/mL) |
|-----------------|-------------------|
| Controle (água) | 0,1210 ± 0,0014 |
| VC + EDTA | 0,1885 ± 0,0064** |
| VC e AAS + EDTA | 0,1175 ± 0,0120 |
| VC + DMH | 0,1840 ± 0,0028** |
| VC e AAS + DMH | 0,1355 ± 0,0120 |

Dados expressos com a média ± desvio padrão (ANOVA de 1 via, *post hoc* de Tukey). AAS (ácido acetilsalicílico), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) e VC (Vitamina C).

**Diferença significativa em relação ao grupo Controle $p < 0,01$,

Os resultados das concentrações plasmáticas de AAS não foram concluídos, pois a análise foi feita comparando o tempo de retenção do AAS nas amostras plasmáticas com o tempo de retenção da solução

padrão de AAS, porém como os tempos de retenção foram diferentes não foi possível calcular as concentrações no plasma.

4.3 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

4.3.1 Determinação intracelular de ERO e óxido nítrico

Os níveis de oxidação de diclorofluoresceína (DCF) e de NO foram investigados como parâmetros oxidativos no cólon dos camundongos tratados com VC e AAS, e submetidos ao modelo animal de CCR com DMH. Nos níveis de DCF (Figura 9), o grupo CP, apresentou um aumento significativo na produção de ERO em relação ao grupo CN, com $p < 0,001$. E os grupos VC + DMH, AAS + DMH e VC e AAS + DMH reduziram significativamente a produção de ERO em relação ao grupo CP, com $p < 0,001$. O grupo VC + EDTA demonstrou uma maior produção de ERO em relação ao grupo CN, com $p < 0,01$ e em relação ao grupo VC + DMH, com $p < 0,001$. Já o grupo AAS + EDTA demonstrou uma maior produção de ERO em relação aos grupos CN e AAS + DMH, com $p < 0,001$.

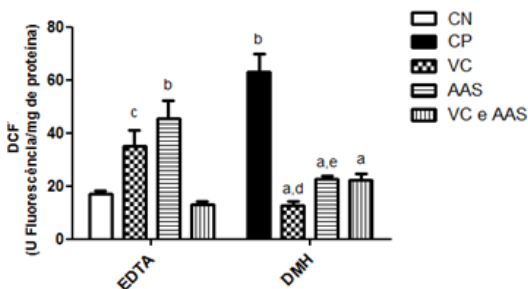


Figura 9: Níveis de oxidação de DCF no cólon dos camundongos tratados com VC e AAS, e submetidos ao modelo animal de CCR com DMH. AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DCF (Diclorofluoresceína), (DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) e VC (vitamina C). Dados expressos em média \pm erro padrão (ANOVA de 2 vias, *post hoc* de Bonferroni).

^aDiferença significativa em relação ao grupo CP com $p < 0,001$.

^bDiferença significativa em relação ao grupo CN com $p < 0,001$.

^cDiferença significativa em relação ao grupo CN com $p < 0,01$.

^dDiferença significativa em relação ao grupo VC + EDTA com $p < 0,001$.

^eDiferença significativa em relação ao grupo AAS + EDTA com $p < 0,001$.

As concentrações de NO estão apresentadas na figura 10. O grupo CP, mostrou um aumento significativo na concentração de óxido nítrico em relação ao grupo CN, com $p < 0,001$. E nos grupos VC + DMH, AAS + DMH e VC e AAS + DMH houve uma redução significativa na concentração de óxido nítrico em relação ao grupo CP, com $p < 0,001$. O grupo VC + DMH apresentou uma concentração menor de óxido nítrico em relação ao grupo VC + EDTA, com $p < 0,05$ e o grupo AAS + DMH demonstrou uma concentração menor de óxido nítrico em relação ao grupo AAS + EDTA, com $p < 0,001$.

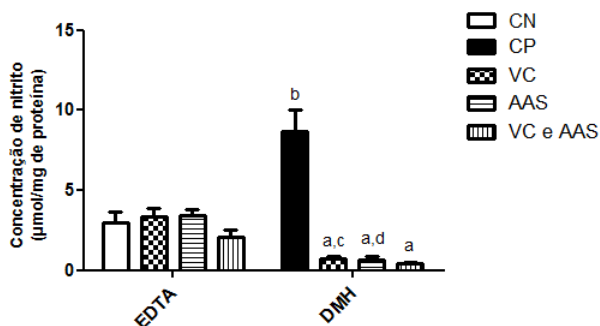


Figura 10: Concentrações de óxido nítrico no cólon dos camundongos tratados com VC e AAS, e submetidos ao modelo animal de CCR com DMH. AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) e VC (vitamina C). Dados expressos em média \pm erro padrão (ANOVA de 2 vias, *post hoc* de *Bonferroni*).

^aDiferença significativa em relação ao grupo CP com $p < 0,001$.

^bDiferença significativa em relação ao grupo CN com $p < 0,001$.

^cDiferença significativa em relação ao grupo VC + EDTA com $p < 0,05$.

^dDiferença significativa em relação ao grupo AAS + EDTA com $p < 0,01$.

4.3.2 Marcadores de danos oxidativos

No presente trabalho foram utilizados como marcadores de danos oxidativos o conteúdo de grupamentos de carbonila (carbonil) e o conteúdo de grupamentos de sulfidril, ambos foram analisados no cólon dos camundongos tratados com VC e AAS, e submetidos ao modelo animal de CCR com DMH. Quanto aos danos em proteínas, avaliados pelos níveis de carbonilação de proteínas (Figura 11), o grupo CP, mostrou um aumento significativo em relação ao grupo CN, com

$p < 0,001$. E os grupos VC + DMH, AAS + DMH e VC e AAS + DMH apresentaram uma redução significativa nos níveis de carbonilação de proteínas em relação ao grupo CP, com $p < 0,001$.

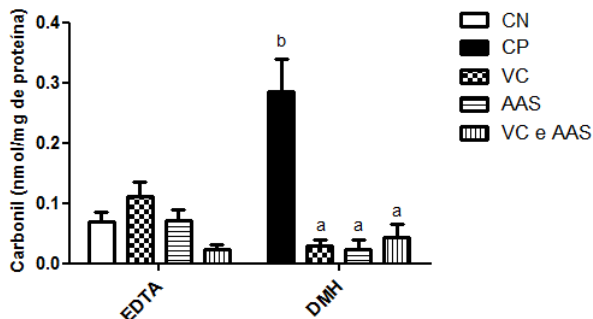


Figura 11: Níveis de carbonilação de proteínas no cólon dos animais tratados com VC e AAS, e submetidos ao modelo animal de CCR com DMH. AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) e VC (vitamina C). Dados expressos em média \pm erro padrão (ANOVA de 2 vias, *post hoc* de Bonferroni).

^aDiferença significativa em relação ao grupo CP com $p < 0,001$

^bDiferença significativa em relação ao grupo CN com $p < 0,001$.

No conteúdo de sulfidrila (Figura 12) ocorreu uma diminuição estatisticamente significativa no grupo CP em relação ao grupo CN, com $p < 0,01$. E os grupos VC + DMH, AAS + DMH e o VC e AAS + DMH não apresentaram um aumento no conteúdo de sulfidrila em relação ao CP. O grupo VC + DMH apresentou o conteúdo de sulfidrila menor em relação ao VC + EDTA, com $p < 0,001$. O grupo AAS + DMH demonstrou o conteúdo de sulfidrila menor em relação ao grupo AAS + EDTA, com $p < 0,001$. E grupo AAS + EDTA mostrou um conteúdo de sulfidrila menor em relação ao CN, com $p < 0,05$.

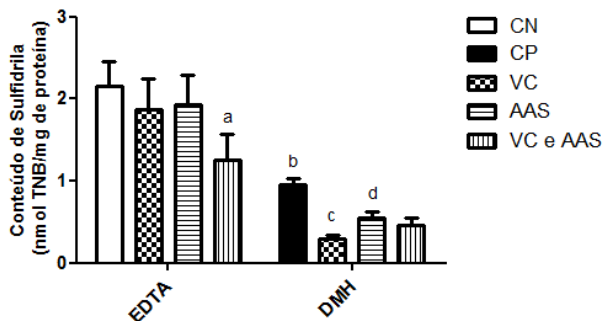


Figura 12: Conteúdo de sulfidríla no cólon dos camundongos tratados com VC e AAS, e submetidos ao modelo animal de CCR com DMH. AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) e VC (vitamina C). Dados expressos em média \pm erro padrão (ANOVA de 2 vias, *post hoc* de *Bonferroni*).

^aDiferença significativa em relação ao grupo CN com $p < 0,05$.

^bDiferença significativa em relação ao grupo CN com $p < 0,01$.

^cDiferença significativa em relação ao grupo VC + EDTA com $p < 0,001$.

^dDiferença significativa em relação ao grupo AAS + EDTA com $p < 0,001$.

4.3.3 Defesas antioxidantes

A atividade da enzima SOD, CAT e os níveis de GSH, foram mensurados como parâmetros do sistema antioxidante no cólon dos camundongos tratados com VC e AAS, e submetidos ao modelo de CCR com DMH. A atividade da enzima SOD está demonstrada na figura 13. O grupo CP, apresentou um aumento significativo em relação ao grupo CN, já os grupos VC + DMH e o AAS + DMH tiveram uma diminuição da atividade enzimática quando comparado ao grupo CP, com $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente. O grupo VC + DMH apresentou uma diminuição da atividade enzimática quando comparado ao grupo VC + EDTA, com $p < 0,01$ e o grupo AAS + DMH demonstrou uma diminuição da atividade enzimática quando comparado ao grupo AAS + EDTA, com $p < 0,05$.

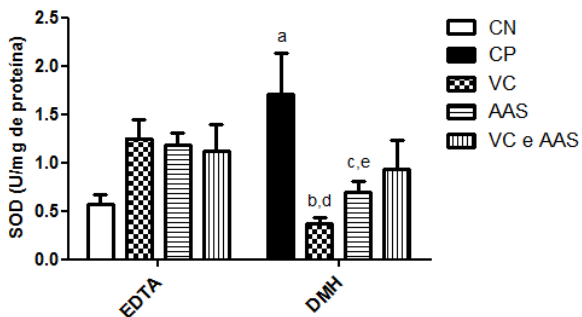


Figura 13: Atividade da enzima superóxido dismutase no cólon dos camundongos tratados com VC e AAS, e submetidos ao modelo animal de CCR com DMH. AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético), SOD (superóxido dismutase) e VC (vitamina C). Dados expressos em média \pm erro padrão (ANOVA de 2 vias, *post hoc* de *Bonferroni*).

^aDiferença significativa em relação ao grupo CN com $p < 0,05$.

^bDiferença significativa em relação ao grupo CP com $p < 0,05$.

^cDiferença significativa em relação ao grupo CP com $p < 0,01$.

^dDiferença significativa em relação ao grupo VC + EDTA com $p < 0,01$.

^eDiferença significativa em relação ao grupo AAS + EDTA com $p < 0,05$.

Em relação à atividade da CAT (Figura 14), o grupo CP não apresentou diferença significativa em relação ao grupo CN. E os grupos AAS + DMH e o VC e AAS + DMH apresentaram um aumento significativo em relação ao grupo CP, com $p < 0,001$. O grupo VC + EDTA apresentou um aumento significativo em relação ao grupo CN, com $p < 0,05$. O grupo VC + DMH demonstrou uma diminuição significativa em relação ao grupo VC + EDTA, com $p < 0,001$ e o grupo AAS + DMH apresentou uma diminuição significativa em relação ao grupo AAS + EDTA, com $p < 0,001$.

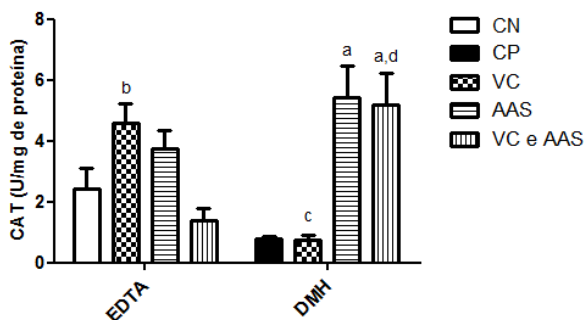


Figura 14: Atividade da enzima catalase no cólon dos camundongos tratados com VC e AAS, e submetidos ao modelo animal de CCR com DMH. AAS (ácido acetilsalicílico), CAT (catalase), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) e VC (vitamina C). Dados expressos em média \pm erro padrão (ANOVA de 2 vias, *post hoc* de Bonferroni).

^aDiferença significativa em relação ao grupo CP com $p < 0,001$.

^bDiferença significativa em relação ao grupo CN com $p < 0,05$.

^cDiferença significativa em relação ao grupo VC + EDTA com $p < 0,001$.

^dDiferença significativa em relação ao grupo AAS + EDTA com $p < 0,001$.

Na avaliação dos níveis totais de GSH (Figura 15), houve uma diminuição estatisticamente significativa do conteúdo de GSH no grupo CP em relação ao grupo CN, com $p < 0,001$. E os grupos VC + EDTA, AAS + EDTA e VC e AAS + DMH apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa do conteúdo de GSH em relação ao grupo CN, com $p < 0,01$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$ respectivamente.

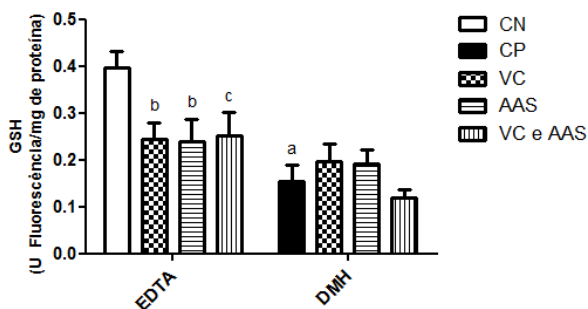


Figura 15: Níveis de glutatona no cólon dos camundongos tratados com VC e AAS, e submetidos ao modelo animal de CCR com DMH. AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético), GSH (glutaciona) e

VC (vitamina C). Dados expressos em média \pm erro padrão (ANOVA de 2 vias, *post hoc* de *Bonferroni*).

^aDiferença significativa em relação ao grupo CN, com $p < 0,001$.

^bDiferença significativa em relação ao grupo CN, com $p < 0,01$.

^cDiferença significativa em relação ao grupo CN, com $p < 0,05$.

4.4 ENSAIO COMETA

No Ensaio Cometa foram avaliados danos ao DNA nas células de sangue e fígado dos camundongos tratados com VC e AAS e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH. Os parâmetros avaliados foram ID e FD.

Inicialmente, foi avaliado o ID e FD no DNA de células do sangue e fígado entre fêmeas e machos do mesmo grupo e pode-se observar que não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados (*Teste t-student*) (Tabela 3). Dessa forma, todas as comparações entre os grupos se darão com o total de animais (fêmeas e machos).

Tabela 3: Análise do ID e FD no DNA de células de sangue e fígado, entre fêmeas e machos, tratados com VC e AAS, e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH.

| Grupos | Análise | Sangue | | | Fígado | | |
|-----------------|---------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | | Fêmeas | Machos | Total | Fêmeas | Machos | Total |
| CN | ID | 17,50 \pm 18,72 | 11,00 \pm 5,03 | 14,25 \pm 13,16 | 51,75 \pm 51,75 | 55,75 \pm 18,39 | 53,75 \pm 13,25 |
| | FD | 7,50 \pm 8,10 | 3,75 \pm 2,63 | 5,62 \pm 5,93 | 19,25 \pm 1,50 | 18,00 \pm 4,08 | 18,63 \pm 2,92 |
| CP | ID | 89,00 \pm 45,81 | 76,00 \pm 30,24 | 82,50 \pm 36,60 | 183,6 \pm 31,13 | 170,4 \pm 29,30 | 177,0 \pm 29,33 |
| | FD | 23,50 \pm 8,50 | 22,25 \pm 5,18 | 22,88 \pm 6,56 | 64,20 \pm 10,18 | 58,40 \pm 10,99 | 61,30 \pm 10,45 |
| VC + EDTA | ID | 8,50 \pm 5,80 | 7,25 \pm 4,27 | 7,87 \pm 4,76 | 32,40 \pm 25,42 | 38,00 \pm 22,92 | 35,20 \pm 23,01 |
| | FD | 3,50 \pm 2,64 | 2,75 \pm 1,71 | 3,12 \pm 2,10 | 11,40 \pm 7,40 | 13,00 \pm 8,09 | 12,20 \pm 7,36 |
| AAS + EDTA | ID | 9,33 \pm 14,05 | 7,16 \pm 8,68 | 8,25 \pm 11,19 | 54,17 \pm 16,02 | 67,00 \pm 14,31 | 60,58 \pm 15,96 |
| | FD | 3,00 \pm 4,19 | 5,00 \pm 4,73 | 4,00 \pm 4,39 | 22,33 \pm 7,47 | 25,50 \pm 5,46 | 23,92 \pm 6,46 |
| VC e AAS + EDTA | ID | 7,00 \pm 5,91 | 4,60 \pm 5,27 | 5,80 \pm 5,43 | 40,60 \pm 13,01 | 35,40 \pm 17,27 | 38,00 \pm 14,67 |
| | FD | 2,20 \pm 1,09 | 1,00 \pm 1,73 | 1,60 \pm 1,51 | 16,40 \pm 4,34 | 12,40 \pm 7,09 | 14,40 \pm 5,93 |
| VC + DMH | ID | 77,75 \pm 27,92 | 90,00 \pm 74,18 | 83,88 \pm 52,30 | 86,25 \pm 28,29 | 112,00 \pm 18,17 | 99,13 \pm 25,96 |
| | FD | 17,75 \pm 5,56 | 39,75 \pm 22,40 | 28,75 \pm 19,14 | 34,75 \pm 11,09 | 43,00 \pm 5,71 | 38,88 \pm 9,28 |
| AAS + DMH | ID | 1,00 \pm 2,00 | 2,50 \pm 5,00 | 1,75 \pm 3,61 | 57,20 \pm 13,01 | 48,20 \pm 31,16 | 52,70 \pm 23,00 |
| | FD | 0,20 \pm 0,44 | 1,00 \pm 2,23 | 0,60 \pm 1,58 | 22,60 \pm 5,68 | 17,20 \pm 10,71 | 19,90 \pm 8,57 |
| VC e AAS + DMH | ID | 18,50 \pm 21,15 | 23,83 \pm 33,77 | 21,17 \pm 27,01 | 100,5 \pm 46,87 | 94,33 \pm 49,69 | 97,42 \pm 46,16 |
| | FD | 7,33 \pm 8,73 | 8,00 \pm 11,06 | 7,67 \pm 9,51 | 36,33 \pm 16,93 | 32,83 \pm 13,76 | 34,58 \pm 14,82 |

Dados expressos em média \pm desvio padrão (*Teste t-student*). AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético), FD (frequência de danos), ID (índice de danos) e VC (vitamina C).

Os resultados de danos no DNA por grupo, com o total de fêmeas e machos, estão apresentados nas figuras abaixo. Nas células do sangue (Figuras 9A e B) os grupos VC + EDTA, AAS + EDTA e o VC e AAS + EDTA não demonstraram um aumento de danos no DNA em relação ao grupo CN, mostrando que esses compostos não foram genotóxicos para os animais nessas condições experimentais. Considerando os grupos expostos à DMH, houve um aumento significativo no ID e FD no grupo CP em relação ao grupo CN, com $p < 0,001$, evidenciando a ação genotóxica da DMH. Nos grupos AAS + DMH e VC e AAS + DMH verificou-se uma redução significativa no ID e FD no DNA em relação ao grupo CP, com $p < 0,001$. O grupo VC + DMH apresentou um aumento significativo no ID e FD em relação ao grupo VC + EDTA, com $p < 0,001$.

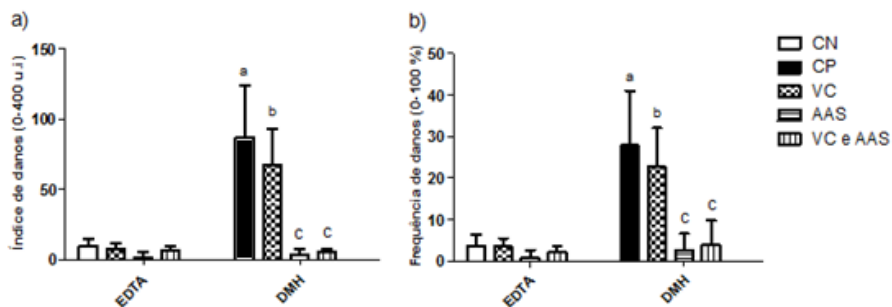


Figura 16: ID (A) e FD (B) no DNA de células de sangue de camundongos tratados VC e AAS, e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH avaliados através do Ensaio Cometa alcalino. AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético), FD (frequência de danos), ID (índice de danos) e VC (vitamina C). Dados expressos em média \pm desvio padrão (ANOVA de 2 vias, *post hoc* de *Bonferroni*).

^aDiferença significativa em relação ao grupo CN com $p < 0,001$.

^bDiferença significativa em relação ao grupo VC + EDTA com $p < 0,001$.

^cDiferença significativa em relação ao grupo CP com $p < 0,001$.

Nas células do fígado (Figuras 10A e B) os grupos VC + EDTA, AAS + EDTA e o VC e AAS + EDTA não demonstraram um aumento de danos no DNA em relação ao grupo CN, mostrando novamente que esses compostos não foram genotóxicos para os animais nessas condições experimentais. Já nos grupos expostos à DMH, houve um aumento significativo no ID e FD no grupo CP em relação ao grupo CN, com $p < 0,001$, evidenciando novamente a ação genotóxica da DMH. Os grupos VC + DMH, AAS + DMH e VC e AAS + DMH apresentaram uma redução significativa no ID e FD nos grupos em relação ao grupo CP, com $p < 0,001$.

O grupo VC + DMH apresentou um aumento no ID e FD em relação ao grupo VC + EDTA, com $p < 0,001$ e o grupo Aas e VC + DMH demonstrou um aumento no ID e FD em relação ao grupo AAS e VC + EDTA, com $p < 0,001$.

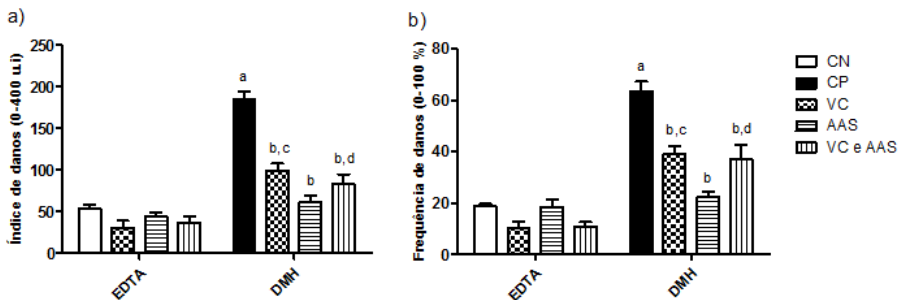


Figura 17: ID (A) e FD (B) no DNA de células de fígado de camundongos tratados VC e AAS, e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH avaliados através do Ensaio Cometa alcalino. AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético), FD (frequência de danos), ID (índice de danos) e VC (vitamina C). Dados expressos em média \pm desvio padrão (ANOVA de 2 vias, *post hoc* de *Bonferroni*).

^aDiferença significativa em relação ao grupo CN com $p < 0,001$.

^bDiferença significativa em relação ao grupo CP com $p < 0,001$.

^cDiferença significativa em relação ao grupo VC + EDTA com $p < 0,001$.

^dDiferença significativa em relação ao grupo VC e AAS + EDTA com $p < 0,001$.

Para avaliação dos danos oxidativos no DNA, foi utilizada a versão do Ensaio Cometa alcalino modificado com a enzima FPG. No sangue (Figuras 11A e B), observamos que o grupo CP apresentou um aumento no ID e FD, com $p < 0,001$ em relação ao grupo CN. Os grupos

VC + DMH e o VC e AAS + DMH apresentaram uma redução significativa no ID ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente) e na FD ($p < 0,001$) em relação ao grupo CP. O grupo VC + DMH demonstrou um aumento no ID, com $p < 0,05$ em relação ao grupo VC + EDTA e o grupo VC e AAS + DMH apresentou um aumento no ID e FD, com $p < 0,01$ em relação ao grupo VC e AAS + EDTA.

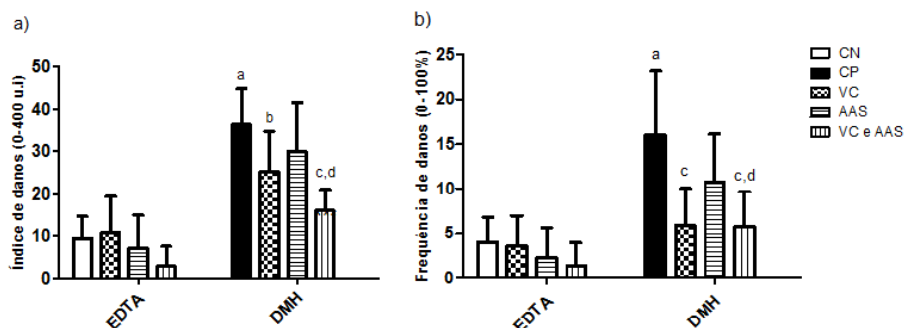


Figura 18: ID (A) e FD (B) oxidativos no DNA de células de sangue de camundongos tratados VC e AAS, e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH avaliados através do Ensaio Cometa alcalino modificado com a enzima FPG. AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético), FD (frequência de danos), FPG (formamido pirimidina glicosilase), ID (índice de danos) e VC (vitamina C). Dados expressos em média \pm desvio padrão (ANOVA de 2 vias, *post hoc* de *Bonferroni*).

^aDiferença significativa em relação ao grupo CN com $p < 0,001$.

^bDiferença significativa em relação ao grupo CP com $p < 0,05$.

^cDiferença significativa em relação ao grupo CP com $p < 0,001$.

^dDiferença significativa em relação ao grupo VC e AAS + EDTA com $p < 0,01$.

Em relação às células do fígado, a figura 12 mostra que o grupo CP apresentou um aumento no ID e FD, com $p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente, em relação ao grupo CN. O grupo VC + DMH e o grupo AAS + DMH apresentaram uma redução significativa no ID ($p < 0,01$) e na FD ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) em relação ao grupo CP.

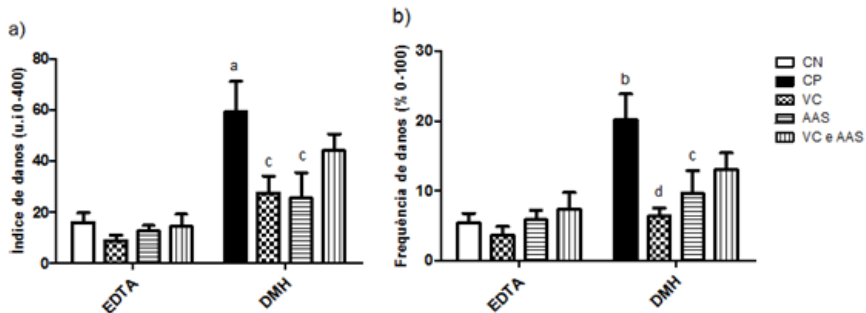


Figura 19: ID (A) e FD (B) oxidativos no DNA de células de fígado de camundongos tratados VC e AAS, e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH avaliados através do Ensaio Cometa alcalino modificado com a enzima FPG. AAS (ácido acetilsalicílico), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético), FD (frequência de danos), FPG (formamido pirimidina glicosilase), ID (índice de danos) e VC (vitamina C). Dados expressos em média \pm desvio padrão (ANOVA de 2 vias, *post hoc* de *Bonferroni*).

^aDiferença significativa em relação ao grupo CN com $p < 0,01$.

^bDiferença significativa em relação ao grupo CN com $p < 0,001$.

^cDiferença significativa em relação ao grupo CP com $p < 0,01$.

^dDiferença significativa em relação ao grupo CP com $p < 0,001$.

4.5 TESTE DAS CRIPTAS ABERRANTES

No Teste de Criptas Aberrantes foram avaliados os números de CA e FCA no cólon dos camundongos tratados com VC e AAS e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH.

Na tabela 3 foram avaliados os números de CA e FCA entre fêmeas e machos do mesmo grupo e pode-se observar que não houve diferença significativa em relação a estes parâmetros avaliados (*Teste-t student*). Logo, todas as comparações entre os grupos se darão com o total de animais (fêmeas e machos).

Tabela 4: Análise do número de CA e FCA no cólon de camundongos, entre fêmeas e machos tratados com VC e AAS, e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH.

| Grupos | | Nº de CA | Total | Nº de FCA | Total |
|-----------------|--------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| CN | Fêmeas | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| | Machos | 0,0 ± 0,0 | | 0,0 ± 0,0 | |
| CP | Fêmeas | 8,60 ± 5,55 | 9,90 ± 5,28 | 4,20 ± 2,39 | 4,90 ± 2,28 |
| | Machos | 11,20 ± 5,26 | | 5,60 ± 2,19 | |
| VC + EDTA | Fêmeas | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| | Machos | 0,0 ± 0,0 | | 0,0 ± 0,0 | |
| AAS + EDTA | Fêmeas | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| | Machos | 0,0 ± 0,0 | | 0,0 ± 0,0 | |
| VC e AAS + EDTA | Fêmeas | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| | Machos | 0,0 ± 0,0 | | 0,0 ± 0,0 | |
| VC + DMH | Fêmeas | 5,25 ± 3,59 | 4,00 ± 2,98 | 3,50 ± 1,29 | 2,00 ± 1,43 |
| | Machos | 2,75 ± 1,89 | | 1,25 ± 1,50 | |
| AAS + DMH | Fêmeas | 2,60 ± 4,72 | 3,00 ± 4,63 | 2,00 ± 2,70 | 2,00 ± 2,56 |
| | Machos | 3,33 ± 4,97 | | 2,00 ± 2,83 | |
| VC e AAS + DMH | Fêmeas | 1,00 ± 2,00 | 1,08 ± 1,73 | 0,50 ± 0,84 | 0,58 ± 0,79 |
| | Machos | 1,17 ± 1,60 | | 0,67 ± 0,82 | |

Dados expressos em média ± desvio padrão (*Teste t-student*). AAS (ácido acetilsalicílico), CA (criptas aberrantes), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético), FCA (focos de criptas aberrantes) e VC (vitamina C).

Os resultados do número total de CA e FCA por grupo estão apresentados na tabela 4. Os grupos VC + EDTA, AAS + EDTA e VC e AAS + EDTA não demonstraram um aumento no número de CA e de FCA em relação ao grupo CN, mostrando que esses compostos não foram carcinogênicos para os animais nessas condições experimentais. Considerando os grupos expostos a DMH, houve um aumento significativo no número de CA e de FCA no grupo CP em relação ao grupo CN, com $p < 0,001$, evidenciando a ação carcinogênica da DMH. Os grupos VC + DMH, AAS + DMH e VC e AAS + DMH apresentaram uma redução no número de CA e de FCA em relação ao grupo CP com $p < 0,001$. O grupo VC + DMH apresentou um aumento no número de CA e de FCA ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) em relação ao grupo VC + EDTA e grupo AAS + DMH demonstrou um

aumento no número de FCA, com $p < 0,05$, em relação ao grupo AAS + EDTA

Tabela 5: Análise total, fêmeas e machos, do número de CA e FCA no cólon de camundongos tratados com VC e AAS, submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH.

| Grupos | Nº de CA | Nº de FCA |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| CN | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| CP | 9,90 ± 5,28 ^a | 4,90 ± 2,28 ^a |
| VC + EDTA | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| AAS + EDTA | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| VC e AAS + EDTA | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| VC + DMH | 4,00 ± 2,98 ^{b, c} | 2,00 ± 1,43 ^{b, d} |
| AAS + DMH | 3,00 ± 4,63 ^b | 2,00 ± 2,56 ^{b, e} |
| VC e AAS + DMH | 1,08 ± 1,73 ^b | 0,58 ± 0,79 ^b |

Dados expressos em média ± desvio padrão (ANOVA de 2 vias, *post hoc* de Bonferroni). AAS (ácido acetilsalicílico), CA (criptas aberrantes), CN (controle negativo), CP (controle positivo), DMH (1,2-dimetilhidrazina), EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético), FCA (focos de criptas aberrantes) e VC (vitamina C).

^aDiferença significativa em relação ao grupo CN, $p < 0,001$.

^bDiferença significativa em relação ao grupo CP, $p < 0,001$.

^cDiferença significativa em relação ao grupo VC + EDTA, $p < 0,05$.

^dDiferença significativa em relação ao grupo VC + EDTA, $p < 0,01$.

^eDiferença significativa em relação ao grupo AAS + EDTA, $p < 0,05$

5 DISCUSSÃO

Devido à alta incidência do CCR em humanos, muitos estudos têm se voltado para a utilização de modelos animais como ferramentas para monitorar detalhadamente as etapas biológicas inerentes à carcinogênese colorretal (Rubio, 2017). Os modelos animais de indução química do CCR com a DMH ou com o seu metabólito o AOM são os mais utilizados, pois apresentam muitas características similares do CCR esporádico que acomete os seres humanos, incluindo semelhanças na resposta a alguns agentes preventivos (Corpet e Pierre, 2005). Por essa razão, esses modelos são amplamente utilizados em estudos sobre a quimioprevenção do CCR (Jackson et al., 2003).

Além disso, o desenvolvimento do CCR é um processo complexo que envolve várias vias moleculares e pode durar décadas (Hawk e Levin, 2005), por esse motivo estudos sobre a quimioprevenção do CCR são de grande importância, pois a utilização de compostos químicos ou naturais podem bloquear, reverter ou atrasar o desenvolvimento do câncer (Arber, 2008). Neste contexto, o presente estudo avaliou os possíveis efeitos quimiopreventivos da VC e do AAS, de forma isolada e combinada, no modelo animal de indução química do CCR com a DMH.

No presente estudo, os animais receberam VC ou AAS diluídos na água potável durante todo o período experimental. As soluções foram colocadas nas garrafas e trocadas três vezes por semana, em cada troca o volume dos líquidos consumidos foram quantificados e divididos pelo número de animais por gaiola. Os animais dos grupos CP, AAS + EDTA, AAS + DMH e VC e AAS + DMH apresentaram uma diminuição significativa no consumo de líquidos em relação aos do grupo CN (Tabela 1). Nos grupos expostos à DMH, principalmente no CP que não recebeu nenhum tratamento de intervenção, essa diminuição pode ser atribuída à alta sensibilidade que camundongo *Balb-c* têm em relação à DMH, como demonstrado no estudo de Suzuki et al. (2006). Em contrapartida, no estudo de Lima et al. (2005) com ratos *Wistar* submetidos à indução química do CCR com a DMH essa diminuição não foi observada, porém os ratos *Wistar* são mais resistentes à indução química, sendo mais indicados em modelos de inoculação de células tumorais que são utilizados para avaliar o potencial metastático do CCR. (Lafreniere e Rosenberg, 1986; Casillas et al., 1997). Nos grupos que receberam AAS, a diminuição do consumo de líquidos pode estar relacionada também com o gosto do AAS, pois o mesmo foi diluído na água e colocado nas garrafas.

A ingestão diária de VC ou AAS estimada por animal foi de 0,15mg e 6mg/kg, respectivamente. No final do experimento foram quantificados os níveis de VC ou AAS no plasma dos animais através da CLAE (Tabela 2), para verificar a efetividade da ingestão dos compostos. Os grupos tratados com VC e AAS não apresentaram diferença significativa nas concentrações plasmáticas de VC em relação ao grupo controle. Após a análise dos resultados, foram avaliados pela CLAE o tempo de retenção e o perfil cromatográfico das soluções padrão de VC e AAS, isoladas e combinadas, os resultados mostraram que o AAS possui um tempo de degradação menor do que a VC, e quando combinados, o AAS acelera o tempo de degradação da VC, além disso, apareceram outros picos de tempos de retenção, indicando que os dois compostos ao reagirem formam outras substâncias. Essa pode ser a hipótese do porque as concentrações plasmáticas de VC não apresentaram diferença significativa do controle nos grupos tratados com VC e AAS.

A VC e o AAS são apontados pela literatura como possíveis agentes quimiopreventivos (Ullah et al., 2012; Rothwell et al., 2012), os seus mecanismos de ação contra o desenvolvimento do câncer, estão relacionados principalmente com o estresse oxidativo oriundo do processo da carcinogênese, pois ambos possuem ação antioxidante (Aruoma e Halliwell, 1988; Padayatty et al., 2003). Assim como outros tipos de câncer, o CCR humano está intimamente relacionado com o estresse oxidativo (Perše, 2013).

Do mesmo modo que o CCR humano, o CCR induzido em animais também está relacionado com o estresse oxidativo. Durante a metabolização da DMH, são gerados ERO, como o peróxido hidrogênio e o radical hidroxila (Sengottuvelan, 2006), essas ERO podem desempenhar um papel importante em todas as fases da carcinogênese, isto é, nos estágios de iniciação, promoção e progressão (Valko, 2006).

No presente estudo, níveis aumentados de DCF foram observados no cólon dos animais que receberam somente DMH (Figura 9), demonstrando que o processo carcinogênico induz a produção de oxidantes celulares que podem lesionar as macromoléculas. De acordo com Swenberg et al. (1979), a DMH é um agente alquilante que induz a metilação de bases púricas, gerando adutos de DNA, como a O6-metilguanina, porém durante a sua metabolização são gerados radicais livres (Swenberg et al., 1979; Sengottuvelan, 2006). Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Waly et al. (2014), no qual avaliaram a produção de DCF no cólon de ratos *Sprague Dawley* submetidos ao protocolo de indução química do CCR com AOM. O

grupo que recebeu somente AOM também apresentou um aumento significativo na produção de DCF. Assim como a DMH, o AOM precisa ser metabolizado, gerando também radicais livres que podem danificar as células do cólon (Al-Numair, 2011).

A redução dos níveis de DCF pela VC pode estar relacionada com a sua capacidade de aumentar a atividade oxidante do citocromo P450, atuando como um doador de elétrons para o citocromo b5 oxidoreductase ou para a formação de radicais hidroxila (Ginter et al., 1983). E a redução dos níveis de DCF pelo AAS, pode estar relacionada com a capacidade de sequestrar o radical hidroxila (Aruoma e Halliwell, 1988).

Ainda referente à produção de oxidantes celulares, o presente estudo apontou um aumento nos níveis de nitrato no cólon dos animais expostos somente à DMH, sugerindo maior síntese de NO. Tan et al. (2015), também observaram altas concentrações de NO no cólon de ratos *Sprague Dawley* submetidos ao protocolo de indução química do CCR com AOM. O NO é produzido durante a transcrição e a tradução da proteína Óxido Nítrico Sintase (INOS) (Hickey et al., 2001). Quando o NO está em excesso pode diminuir as enzimas de reparo do DNA e inibir a apoptose através da nitrosilação das enzimas caspases (Rao, 2004).

A diminuição dos níveis de nitrato no grupo que recebeu VC e DMH pode ser atribuída à capacidade da VC de ativar os genes envolvidos no sistema de reparo do DNA, modulando os níveis de danos no DNA nas células expostas a ERO *in vivo* e *in vitro* (Arrigoni e Tullio, 2002; Valko et al., 2006), uma vez que a DMH aumenta os níveis de nitrato que consequentemente diminui a atividade das enzimas de reparo do DNA. Em contrapartida, a diminuição dos níveis de nitrato no grupo AAS e DMH pode estar relacionada com o aumento da apoptose nas células malignas, possivelmente porque há uma interação complexa entre o AAS e os genes de reparo do DNA através da via Wnt/ β -catenina (Borthwick et al., 2006). Com relação às defesas antioxidantes, podemos observar no presente estudo, um aumento significativo na atividade da SOD (Figura 13) no cólon dos animais expostos à DMH. Esse aumento na atividade da SOD está associado à dismutação do O_2^\bullet , gerando o H_2O_2 (Neelwarne, 2012), fato observado pelo aumento do DCF. Corroborando com os nossos resultados, Al-Henhena et al. (2014), também observaram um aumento na atividade da SOD no cólon de ratos submetidos ao protocolo de indução química do CCR com AOM. Assim como a VC e o AAS reduziram os níveis de DCF, reduziram também a atividade da SOD, pois a VC reduz as ERO intracelulares (Han et al.,

2007; Antonio-Garcia e Massó-Gonzalez, 2008; Chang et al., 2012) e o AAS tem a capacidade de sequestrar o radical hidroxila (Aruoma e Halliwell, 1988).

Na análise da atividade da CAT (Figura 14), o grupo CP não apresentou diferença significativa em relação ao CN, ou seja, a atividade da CAT permaneceu baixa no grupo que recebeu somente DMH, porém os grupos que receberam AAS ou VC + AAS e foram expostos à DMH, apresentaram um aumento significativo na atividade da CAT. Concordando com os nossos resultados, Al-Henhena et al. (2015) também observaram que a atividade da CAT no cólon de ratos submetidos ao protocolo de indução química do CCR com AOM, se manteve nos mesmos níveis do grupo controle. No entanto, quando esses animais foram expostos ao AOM e tratados com o extrato de *Strobilanthes crispus* a atividade da CAT aumentou.

O aumento ou a diminuição da atividade da CAT pode estar relacionada com a fase tumoral, ou seja, com a etapa da carcinogênese em que indivíduo se encontra (Ho et al., 2006). No estudo de Dursun et al. (2006), realizado com um grupo de pacientes com CCR, o aumento da atividade da CAT foi relacionado com o estágio de desenvolvimento tumoral (Satomi et al., 1995; Stanczyk et al., 2005). No presente estudo, o tempo de exposição à DMH não foi suficiente para o desenvolvimento de tumores, apenas de criptas aberrantes (lesões pré neoplásicas).

Nos grupos tratados com AAS, houve um aumento significativo na atividade da CAT. Corroborando com os nossos resultados Kanwar et al. (2007), também observaram um aumento na atividade da CAT no cólon de ratos *Sprague Dawley* submetidos ao protocolo de indução química do CCR com a DMH e suplementados com o AAS e com o Celecoxibe, nos estágios iniciais do CCR há um aumento do estresse oxidativo no tecido e a ação quimiopreventiva dos AINEs pode ser atribuída aos seus efeitos indiretos na reposição da atividades de enzimas antioxidantes (Kanwar et al., 2007).

Na avaliação dos níveis de GSH (Figura 15), os grupos que foram expostos à DMH, apresentaram uma redução significativa do conteúdo de GSH em relação ao grupo CN. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Vinothkumar et al. (2014), no qual os níveis de GSH também diminuíram no cólon de ratos *Wistar* submetidos ao protocolo de indução química do CCR com DMH. A GSH é um componente crucial do mecanismo de defesa antioxidante, funcionando como um eliminador direto de radicais livres (Romão et al., 2006). Além disso, a GSH participa predominantemente na desintoxicação de xenobióticos e carcinógenos, protegendo as células e os órgãos contra a

toxicidade induzida por esses compostos (Gopalan et al., 1992). A diminuição dos níveis de GSH no cólon dos animais expostos à DMH pode ser atribuída à sua participação direta na desintoxicação do organismo contra a DMH.

O aumento da produção de oxidantes e a redução dos antioxidantes promovem danos oxidativos nas células. Os resultados do presente estudo mostraram que a DMH causou altos níveis de carbonilação de proteínas (Figura 11) e uma diminuição do conteúdo de sulfidrilas (Figura 12) no cólon dos animais. Corroborando com os nossos resultados Pandurangan et al. (2012), também observaram altos níveis de carbonilação de proteínas no cólon de camundongos *Balb-c* submetidos ao protocolo de indução química do CCR com o AOM.

A carbonilação é uma modificação irreversível, não enzimática, das proteínas. Os grupos carbonila são introduzidos nas proteínas por várias vias oxidativas (Dalle-Donne et al., 2003; Stadtman e Levine, 2005). E como citado anteriormente, a metabolização da DMH gera radicais livres, aumentando assim o estresse oxidativo e consequentemente a carbonilação das proteínas (Swenberg et al., 1979; Sengottuvelan, 2006). Por outro lado, a VC e o AAS possuem ação antioxidante (Aruoma e Halliwell, 1988; Padayatty et al., 2003), diminuindo o estresse oxidativo e a carbonilação de proteínas.

Em relação à diminuição do conteúdo de sulfidrilas, resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Park et al. (2014), no qual avaliaram os grupamentos tióis, como GSH, cisteína e seus respectivos dissulfetos, através da CLAE-UV no intestino de camundongos *A/J* submetidos ao protocolo de indução química do CCR com AOM. Os grupos que foram expostos ao AOM também apresentaram uma diminuição do conteúdo de sulfidrilas. A diminuição do conteúdo de sulfidrilas causada pela DMH ou AOM, pode ser atribuída à vulnerabilidade que os grupamentos tióis têm em relação a agentes alquilantes, pois são suscetíveis à alquilação por eletrófilos e a oxidação por agentes pró-oxidantes (Casini et al., 1987; Pascoe e Reed, 1989).

Nos resultados de danos ao DNA, a DMH apresentou efeitos genotóxicos em ambos os tecidos avaliados, sanguíneo e o hepático, através do Ensaio Cometa. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos, como por exemplo, o de Bazo et al. (2002), no qual a DMH foi genotóxica nas células sanguíneas de ratos *Wistar* e no estudo de McNamee e Bellier (2015), no qual a DMH apresentou ação genotóxica nas células hepáticas de ratos *Sprague Dawley*. A ação genotóxica da DMH é consequência da sua metabolização, que ocorre diretamente no fígado pelas enzimas CYP2E1 conjugadas com o ácido

glucurônico. Durante esse processo são formados azometano, AOM e o MAM, este último é capaz de metilar o DNA, sendo transportado pela corrente sanguínea ou pela bile até o intestino (Cheeseman e Slater, 1993).

Para testar o possível efeito antigenotóxico da VC e do AAS, inicialmente foi avaliado se estes compostos poderiam danificar a molécula de DNA. Neste sentido, observou-se que a VC e o AAS isoladamente ou de forma combinada não apresentaram ação genotóxica no estudo, fato observado em ambos os tecidos analisados sangue e fígado. Resultados similares sobre a VC também foram encontrados no estudo de Nishi et al. (2010) nas células de sangue e fígado de ratos *Wistar* e, da mesma forma, Pawar et al. (2009) não observaram ação genotóxica do AAS em células da medula óssea de camundons *Swiss*.

Os resultados mostraram que o grupo exposto a DMH tratado com VC não apresentou redução significativa dos danos ao DNA nas células sanguíneas (Figura 16). Uma hipótese para este resultado é proposta por Augusto et al. (1985) em estudo que sugere que durante o transporte do último metabólito da DMH (MAM) pela corrente sanguínea até o intestino, além das ERO, são gerados também radicais metila intermediários, através da catalise do MAM pelas hemoglobinas. Esses radicais, por sua vez, danificam a molécula de DNA. Corroborando com os presentes resultados, Reynolds et al. (2012) avaliaram a anticitotoxicidade da VC na linhagem de células epiteliais pulmonares (H460) expostas ao Cromo. Os resultados mostraram que a VC não diminuiu a citotoxicidade causada pelo radical O6-metil-desoxiguanosina. A metilação na posição O6 da guanina é a principal lesão pro-mutagênica produzida pelo metabólito MAM (Delker et al., 1998).

Diante disso, a VC não conseguiu reverter os danos das células sanguíneas causados pela DMH, possivelmente porque a maior parte desses danos está relacionados com radicais metila, e a VC age como um antioxidante doador de elétrons que neutraliza ERO e ERN (Levin, 1986). De fato, os resultados do Ensaio Cometa com FPG, técnica que detecta dano oxidativo nas bases purínicas, mostraram sugerindo sua ação antioxidante. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Bazo et al. (2002), no qual analisaram a ação do própolis nas células sanguíneas de ratos *Wistar* expostos à DMH. Os resultados mostraram que o própolis não conseguiu reduzir os danos, pois assim como a VC, o própolis possui ação antioxidante (Mendonça et al., 2015).

Nas células do fígado, a VC conseguiu reverter os danos no DNA causados pela DMH, fato observado nas duas versões do EC

(Figuras 17 e 19). Além de formar os radicais metila, a DMH também produz, ao logo da sua metabolização no fígado, radicais livres que podem estar relacionados com a enzimas CYP2E1, que aumentam o estresse oxidativo pela formação de H_2O_2 e O_2° . Na presença de íons metálicos, como o Fe^{2+} , o H_2O_2 pode reagir com oxigênio e convertê-lo em um radical mais reativo, o OH que pode danificar a molécula de DNA (Cheeseman e Slater, 1993).

Em ambos os tecidos, sangue e fígado, e nas duas versões do EC, foi observado uma redução significativa de danos no DNA no grupo AAS + DMH em relação ao grupo CP. Corroborando com os presentes achados, alguns estudos apontam a ação antígeno-tóxica do AAS como, por exemplo, no estudo de Niikawa et al. (2001), onde o AAS reduziu a frequência de micronúcleos no DNA das células sanguíneas e da medula óssea de camundongos *Swiss* expostos a MMC (Mitomicina C). Da mesma forma, Niikawa et al. (2008) também observaram a ação antígeno-tóxica do AAS contra os danos no DNA causados pela MMC, nas células de fígado, pulmão, rim, baço, medula óssea e cólon de camundongos *ICR*. A ação antígeno-tóxica do AAS pode ser atribuída a sua capacidade de sequestrar os radicais hidroxila (Aruoma e Halliwell, 1988). Além disso, a combinação dos compostos VC e AAS também foi antígeno-tóxica no presente estudo, fato observado no grupo VC e AAS + DMH, o qual reduziu os danos no DNA nas células do sangue e fígado.

No teste de criptas aberrantes (Tabela 5), a DMH apresentou um comportamento carcinogênico, pois aumentou significativamente o número de CA e FCA quando comparada com o grupo CN. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Agner et al. (2005), no qual a DMH também aumentou o número de CA e de FCA no cólon de ratos *Wistar* em relação ao grupo controle.

No presente estudo, a VC apresentou um efeito anticarcinogênico, pois reduziu significativamente o número de FCA e de CA. Corroborando com os presentes resultados Christudoss et al. (2013) observaram que 87,5% dos ratos *Wistar* tratados com VC e submetidos ao modelo de indução química do CCR com DMH apresentaram a histologia do cólon normal quando comparados com o grupo que só recebeu DMH. No entanto, não há estudos semelhantes que avaliaram a ação anticarcinogênica da VC no desenvolvimento de FCA e de CA causados pela DMH em modelo animal.

São crescentes as evidências na literatura sobre os efeitos benéficos da VC em vários tipos de câncer, pois ela desempenha um papel importante nas células, mantendo a proporção de oxidação-

redução adequada devido a sua função de neutralização das ERO e das ERN formadas no curso do metabolismo celular ou na transformação oncogênica (Behrend et al., 2003). Além disso, a VC está disponível na sua forma reduzida ou na sua forma oxidada, podendo atuar em condições fisiológicas como antioxidante ou pró-oxidante. Neste contexto, no estudo de Mamede et al. (2012) a VC apresentou um efeito antiproliferativo e citotóxico *in vitro* na linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano (WiDr), e *in vivo*, nos camundongos *Balb-c* enxertados com as células WiDr o tratamento com VC apresentou uma redução na taxa de crescimento tumoral.

O AAS também apresentou um efeito anticarcinogênico, pois reduziu significativamente o número de FCA e CA. Um efeito semelhante foi encontrado por Barnes et al. (1996), que observaram redução do número de CA causados pela DMH no cólon de ratos *Sprague Dawley*. No estudo de Christudoss et al. (2013), o mesmo resultado dos animais tratados com VC foi observado nos animais tratados com AAS, ou seja, 87,5% dos animais que receberam AAS apresentaram a histologia do cólon normal quando comparados com o grupo que só recebeu DMH. Além da VC e do AAS, os autores observaram a ação do Zinco, que reduziu 100% a formação das lesões malignas no cólon.

Além da sua ação antioxidante, como citado anteriormente, o AAS é um inibidor irreversível da COX-2, reduz a proliferação de células cancerígenas e induz apoptose celular (Sano et al., 1995; Fosslie, 2000; Ashktorab et al., 2005; Elwood et al., 2009). Em animais, o AAS suprime a formação de FCA no cólon, induzidos pela DMH (Mereto et al., 1994), resultado observado também no presente estudo.

Assim como na antigenotoxicidade, a combinação dos compostos, VC e AAS, também obteve sucesso na anticarcinogenicidade, fato observado pela redução do número de CA e de FCA no cólon. Porém esses efeitos antigenotóxicos e anticarcinogênicos da combinação da VC e do AAS precisam ser investigados, pois como já foi citado anteriormente, os dois ao reagirem formam novas substâncias, e podem ser essas substâncias que estejam causando os efeitos benéficos.

6 CONCLUSÃO

Este foi o primeiro estudo que avaliou os possíveis efeitos antígeno-tóxicos da VC e do AAS, de forma isolada e combinada, contra os danos ao DNA causados pela DHM, bem como, a quimioprevenção desses compostos combinados no modelo animal de CCR.

O presente estudo forneceu evidências de que a VC isolada foi capaz de reverter apenas os danos oxidativos gerados pela metabolização da DMH. Já o AAS isolado ou os dois compostos combinados foram antígeno-tóxicos contra todos os tipos de danos causados pela DHM. Além disso, os compostos (isolados e combinados) apresentaram um comportamento quimio-reventivo no desenvolvimento do CCR em modelo animal de indução química com a DMH.

O modelo animal de indução química do CCR com a DMH mimetiza as etapas biológicas do desenvolvimento do câncer esporádico que acomete os seres humanos, sendo de grande importância estudos sobre a quimioprevenção do CCR.

Em suma, os resultados mostraram os efeitos quimio-preventivos da VC e do AAS no desenvolvimento da carcinogênese colorretal, sugerindo que esses compostos podem no futuro ser utilizados na prevenção primária do CCR em humanos. No entanto, mais estudos para avaliar melhor os mecanismos de ação da VC e do AAS, isoladamente ou de forma combinada, na carcinogênese colorretal são necessários.

7 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

7.1 LIMITAÇÕES

No decorrer do presente estudo, surgiram algumas limitações, como, na realização do Ensaio Cometa nas células de cólon e na análise plasmática do AAS pela CLAE. No primeiro caso, a dificuldade está relacionada com a dissociação das células da mucosa do cólon, pois existem diferentes protocolos na literatura, alguns já foram testados, porém sem sucesso. As amostras de cólon estão armazenadas no freezer (-80) e novos testes serão realizados a fim de concluir esta etapa com êxito, pois esses resultados são de grande importância para o trabalho.

Em relação, a análise plasmática do AAS pela CLAE, o tempo de retenção da substância que foi detectada no plasma dos animais não condiz com o tempo de retenção do AAS, logo chegou-se a conclusão que essa substância pode ser um dos metabólitos do AAS, pois quando o mesmo entra no organismo é rapidamente hidrolisado, gerando os seguintes metabólitos em sequência, ácido salicílico, ácido salicílico, ácido gentísúrico e o ácido 2,3-hidroxibenzóico (Hall e James, 1980; Hutt et al., 1986; Grootvelt e Halliwell, 1988). A partir disso, decidiu-se avaliar os metabólitos do AAS, o primeiro o ácido salicílico já foi analisado, porém o tempo de retenção do mesmo também não coincidiu com o tempo de retenção da substância detectada nas amostras. Desta forma, a análise ainda está em andamento.

7.2 PERSPECTIVAS

As perspectivas para a finalização do presente estudo atribuem-se a conclusão das demais análises, como citado anteriormente, o Ensaio Cometa nas células do cólon e as concentrações plasmáticas dos metabólitos do AAS, além disso, estão na fase final as análises histológicas, por HE e Alcian Blue e as Imunohistoquímicas, para avaliar os marcadores *β -catenina* e *KI67*.

Pretendemos também avaliar a imunodeteção das proteínas relacionadas com o CCR em animais, como a COX-2, Prostaglandina E2 (PGE-2) e a INOS por meio da técnica de Western Blotting. Analisar a expressão dos genes *K-ras* e *β -catenina*, os responsáveis pela carcinogênese colorretal em modelo animal, através da Reação em cadeia da polimerase em tempo real. E identificar as possíveis substâncias que foram formadas na reação entre o AAS e a VC.

REFERÊNCIAS

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105:121-126.
- Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (IARC). 1,2-Dimethylhydrazine, IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. 1999; 71: 947-989.
- Agner AR, Bazo AP, Ribeiro LR, Salvadori DM. DNA damage and aberrant crypt foci as putative biomarkers to evaluate the chemopreventive effect of annatto (*Bixa orellana* L.) in rat colon carcinogenesis. *Mutat Res.* 2005; 582(1-2):146-54.
- Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2001; 302(2-3):141-5.
- Al-Henhena N, Khalifa SA, Ying RP, Hassandarvish P, Rouhollahi E, Al-Wajeeh NS, Ali HM, Abdulla MA, El-Seedi HR. Chemopreventive effects of *Strobilanthes crispus* leaf extract on azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rat colon. *Sci Rep.* 2015; 5:13312.
- Al-Henhena N, Ying RP, Ismail S, Najm W, Khalifa SA, El-Seedi H, Ameen Abdulla M. Chemopreventive efficacy of *Andrographis paniculata* on azoxymethane-induced aberrant colon crypt foci in vivo. *PLoS One.* 2014; 9(11): 111118.
- Al-Numair KS, Waly MI, Ali A, Essa MM, Farhat MF, Alsaif MA. Dietary folate protects against azoxymethane-induced aberrant crypt foci development and oxidative stress in rat colon. *Exp Biol Med (Maywood).* 2011; 236(9):1005-1011.
- Ames B, Shigenaga M, Hagen T. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(17): 7915-22.
- Ananthkrishnan AN, Cagan A, Cai T, Gainer VS, Shaw SY, Churchill S, Karlson EW, Murphy SN, Liao KP, Kohane I. Statin Use Is Associated With Reduced Risk of Colorectal Cancer in Patients With

Inflammatory Bowel Diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016; 14(7):973-9.

Antonio-Garcia MT, Massó-Gonzalez EL. Toxic effects of perinatal lead exposure on the brain of rats: involvement of oxidative stress and the beneficial role of antioxidants. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46(6): 2089-95.

Antunes LM, de Barros E Lima Bueno R, da Luz Dias F, de Lourdes Pires Bianchi M. Acetylsalicylic acid exhibits anticlastogenic effects on cultured human lymphocytes exposed to doxorubicin. *Mutat Res.* 2007; 626(1-2):155-161.

Arber N. Cyclooxygenase-2 inhibitors in colorectal cancer prevention: point. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17(8):1852-1857.

Arrigoni O, De Tullio MC. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant (review). *Biochim Biophys Acta.* 2002;1569:1-9.

Aruoma OI, Halliwell B. The ion-binding and hydroxyl radical scavenging action of anti-inflammatory drugs. *Xenobiotica.* 1988; 18(4):459-470.

Ashktorab H, Dawkins FW, Mohamed R, Larbi D, Smoot DT. Apoptosis induced by aspirin and 5-fluorouracil in human colonic adenocarcinoma cells. *Dig Dis Sci.* 2005; 50(6): 1025-32.

Augusto O, Du Plessis LR, Weingrill CL. Spin-trapping of methyl radical in the oxidative metabolism of 1,2-dimethylhydrazine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985; 126(2):853-858.

Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 1990; 50(23): 7717-7722.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for SOD. *Meth Biochem Anal.* 1987; 32:279-312.

Barnes CJ, Lee M. Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the adenomatous polyposis coli Min mouse model with aspirin. *Gastroenterology*. 1998; 114(5):873-877.

Basselin M, Ramadan E, Chen M, Rapoport SI. Anti-inflammatory effects of chronic aspirin on brain arachidonic acid metabolites. *Neurochem Res*. 2011; 36(1): 139-45.

Bastiaannet E, Sampieri K, Dekkers OM, de Craen AJ, van Herk-Sukel MP, Lemmens V, van den Broek CB, Coebergh JW, Herings RM, van de Velde CJ, Fodde R, Liefers GJ. Use of aspirin postdiagnosis improves survival for colon cancer patients. *Br J Cancer*. 2012; 106(9): 1564-70

Bazo AP, Rodrigues MA, Sforcin JM, de Camargo JL, Ribeiro LR, Salvadori DM. Protective Action of Propolis on the Rat Colon Carcinogenesis. *Teratog Carcinog Mutagen*. 2002; 22(3):183-194.

Behrend L, Henderson G, Zwacka RM. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans*. 2003; 31:1441-1444.

Bekusova VV, Patsanovskii VM, Nozdrachev AD, Anisimov VN. Metformin inhibits development of colon malignant tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Dokl Biol Sci*. 2016; 468(1):97-100.

Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett*. 1987; 37(2): 147-51.

Bird RP. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett*. 1995; 93(1): 55-71.

Borthwick GM, Johnson AS, Partington M, Burn J, Wilson R, Arthur HM. Therapeutic levels of aspirin and salicylate directly inhibit a model of angiogenesis through a Cox-independent mechanism. *FASEB J*. 2006; 20(12):2009-2016.

Bousserouel S, Gosse F, Bouhadjar M, Soler L, Marescaux J, Raul F. Long-term administration of aspirin inhibits tumour formation and triggers anti-neoplastic molecular changes in a pre-clinical model of colon carcinogenesis. *Oncol Rep*. 2010; 23(2):511-517.

Burn J, Bishop DT, Chapman PD, Elliott F, Bertario L, Dunlop MG, Eccles D, Ellis A, Evans DG, Fodde R, Maher ER, Möslein G, Vasen HF, Coaker J, Phillips RK, Bülow S, Mathers JC, International CAPP consortium. A randomized placebo-controlled prevention trial of aspirin and/or resistant starch in young people with familial adenomatous polyposis. *Cancer prevention research*. 2011; 4(5):655-665.

Casillas S, Dietz DW, Brand MI, Jones SC, Vladisavljevic A, Milsom JW. Perfusion to colorectal cancer liver metastases is not uniform and depends on tumor location and feeding vessel. *J Surg Res*. 1997; 67(2):179-185.

Casini AF, Maellaro E, Pompella A, Ferrali M, Comporti M. Lipid peroxidation, protein thiols and calcium homeostasis in bromobenzene-induced liver damage. *Biochem Pharmacol*. 1987; 36(21):3689-3695.

Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18(6): 1688-1694.

Chaea SY, Lee M, Kim SW, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomaterials*. 2004; 25:843–850.

Chang BJ, Jang BJ, Son TG, Cho IH, Quan FS, Choe NH, Nahm SS, Lee JH. Ascorbic acid ameliorates oxidative damage induced by maternal low-level lead exposure in the hippocampus of rat pups during gestation and lactation. *Food Chem Toxicol*. 2012; 50(2): 104-108.

Cheeseman KH, Slater TT. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*. 1993; 49:481–493.

Choudhary G, Hansen H. *Chemosphere*. Human health perspective on environmental exposure to hydrazines: a review. 1998; 37(5):801-843.

Christudoss P, Selvakumar R, Pulimood AB, Fleming JJ, Mathew G. Protective Role of Aspirin, Vitamin C, and Zinc and their Effect on Zinc Status in the DMH-Induced Colon Carcinoma Model. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14(8):4627-4634.

Cole BF, Logan RF, Halabi S, Benamouzig R, Sandler RS, Grainge MJ, Chaussade S, Baron JA. Aspirin for the chemoprevention of colorectal adenomas: meta-analysis of the randomized trials. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101(4): 256-266.

Collins A, Dusinská M, Franklin M, Somorovská M, Petrovská H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslová K, Vaughan N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen.* 1997; 30(2):139-146.

Collins AR, El Yamani N, Lorenzo Y, Shaposhnikov S, Brunborg G, Azqueta A. Controlling variation in the comet assay. *Front Genet.* 2014; 5:359.

Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular Pathways Involved in Colorectal Cancer: Implications for Disease Behavior and Prevention. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14: 16365-16385;

Corpet DE, Pierre F. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. *Eur J Cancer.* 2005; 41(13):1911-1922.

Coyle C, Cafferty FH, Langley RE. Aspirin and Colorectal Cancer Prevention and Treatment: Is It for Everyone? *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2016; 12:27-34.

Curry SJ, Byers T, Hewitt M. Fulfilling the potential of cancer prevention and early detection. Washington (DC): National Academies Press (US). 2003.

Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med.* 2003; 9:169–176.

Delker DA, McKnight SJ 3rd, Rosenberg DW. The role of alcohol dehydrogenase in the metabolism of the colon carcinogen methylazoxymethanol. *Toxicol Sci.* 1998; 45(1):66-71.

Delker DA, Wang QS, Papanikolaou A, Whiteley HE, Rosenberg DW. Quantitative assessment of azoxymethane induced aberrant crypt foci in inbred mice. *Exp Mol Pathol.* 1999; 65(3):141-149.

Demierre MF, Higgins PD, Gruber SB, Hawk E, Lippman SM. Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5(12):930-942.

Deutsch JC. Dehydroascorbic acid. *J Chromatogr A*. 2000; 881(1-2): 299-307.

Dong J, Sulik KK, Chen SY. The role of NOX enzymes in ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryos. *Toxicol Lett*. 2010; 193:94-100.

Douma KF, Aaronson NK, Vasen HF, Verhoef S, Gundy CM, Bleiker EM. Attitudes toward genetic testing in childhood and reproductive decision making for familial adenomatous polyposis. *Eur J Hum Genet*. 2010; 18(2): 186-193.

Dovizio M, Maier TJ, Alberti S, Di Francesco L, Marcantoni E, Münch G, John CM, Suess B, Sgambato A, Steinhilber D, Patrignani P. Pharmacological inhibition of platelet-tumor cell cross-talk prevents platelet-induced overexpression of cyclooxygenase-2 in HT29 human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol*. 2013;84(1):25-40.

Druckrey H. Specific carcinogenic and teratogenic effects of "indirect" alkylating methyl and ethyl compounds. *Xenobiotica*. 1973; 3:271-303

Dudok de Wit AC, Duivenvoorden HJ, Passchier J, Niermeijer MF, Tibben A. Course of distress experienced by persons at risk for an autosomal dominant inheritable disorder participating in a predictive testing program: an explorative study. *Psychosom Med*. 1998; 60(5): 543-549.

Dursun H, Bilici M, Uyanik A, Okcu N, Akyuz M. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in erythrocytes of patients with oesophageal and gastric cancer. *J Int Med Res*. 2006; 34: 193-199.

Edelmann L, Edelmann W. Loss of DNA mismatch repair function and cancer predisposition in the mouse: animal models for human hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2004; 129C:91-99.

El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993; 75(4): 817-825.

Elwood PC, Gallagher AM, Duthie GG, Mur LA, Morgan G. Aspirin, salicylates, and cancer. *Lancet*. 2009; 373(9671):1301-1309.

Emilsson L, Holme Ø, Bretthauer M, Cook NR, Buring JE, Løberg M, Adami HO, Sesso HD, Gaziano MJ, Kalager M. Systematic review with meta-analysis: the comparative effectiveness of aspirin vs. screening for colorectal cancer prevention. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017; 45(2):193-204.

Farber JL, Gerson RT. Mechanism of cell injury of Hepatotoxic chemicals. *Pharmacol Rev*. 1984; 36(2):71-75.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990; 61(5): 759-767.

Ferguson LR. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat Res*. 1994; 307(1):395-410.

Fiala ES, Caswell N, Sohn OS, Felder MR, McCoy GD, Weisburger JH. Non-alcohol dehydrogenase-mediated metabolism of methylazoxymethanol in the deer mouse, *Peromyscus maniculatus*. *Cancer Res*. 1984; 44(7):2885-2891.

Fiala ES, Kulakis C, Christiansen G, Weisburger JH. Inhibition of the metabolism of the colon carcinogen, azoxymethane, by pyrazole. *Cancer Res*. 1978; 38(12):4515-4521.

Fiala ES, Stathopoulos C. Metabolism of methylazoxymethanol acetate in the F344 rat and strain-2 guinea pig and its inhibition by pyrazole and disulfiram. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1984; 108(1):129-134.

Fiala ES. Investigations in to the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane. *Cancer*. 1977; 40(5):2436-2445.

Fosslien E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci*. 2000; 30(1):3-21.

Frese KK, Tuveson DA. Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(9):645-658.

Fuster V, Sweeny JM. Aspirin: a historical and contemporary therapeutic overview. *Circulation*. 2011; 123(7):768-778.

Ginter E, Hudecová A, Kosinová A, Madaric A, Vejmolová J. Cytochrome P-450 cycle and vitamin C. *Vopr Pitan*. 1983; 4:5-10.

Giovannucci E. Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 2002; 31(4): 925-943.

Gopalan P, Jensen DE, Lotlikar PD. Glutathione conjugation of microsomes mediated and synthetic aflatoxin B₁-8, 9-oxide by purified glutathione S-transferases from rats. *Cancer Lett*. 1992; 64(3):225-233.

Guerrero S, Casanova I, Farré L, Mazo A, Capellà G, Manges R. K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. *Cancer Res*. 2000; 60(23): 6750-6756.

Hadley DW, Ashida S, Jenkins JF, Calzone KA, Kirsch IR, Koehly LM. Colonoscopy use following mutation detection in Lynch syndrome: exploring a role for cancer screening in adaptation. *Clin Genet*. 2011; 79(4): 321-328.

Haggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg*. 2009; 22(4): 191-197.

Halbert CH, Lynch H, Lynch J, Main D, Kucharski S, Rustgi AK, Lerman C. Colon cancer screening practices following genetic testing for hereditary nonpolyposis colon cancer (HNPCC) mutations. *Arch Intern Med*. 2004; 164(17): 1881-1887.

Han JM, Chang BJ, Li TZ, Choe NH, Quan FS, Jang BJ, Cho IH, Hong HN, Lee JH. Protective effects of ascorbic acid against lead induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat hippocampus in vivo. *Brain Res*. 2007; 1185: 68-74.

Hawk ET, Levin B. Colorectal cancer prevention. *J Clin Oncol*. 2005; 23(2):378-391.

He L, Tian DA, Li PY, He XX. Mouse models of liver cancer: progress and recommendations. *Oncotarget*. 2015; 6(27):23306-23322.

Hickey MJ, Granger DN, Kubes P. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and regulation of leucocyte/endothelial cell interactions: studies in iNOS-deficient mice. *Acta Physiol Scand*. 2001; 173:119-126.

Hissin PJ, Hilf R.A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976; 74(1):214-226.

Hobbs CA, Recio L, Streicker M, Boyle MH, Tanaka J, Shiga A, Witt KL. Comet assay evaluation of six chemicals of known genotoxic potential in rats. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015; 786-788:172-181

Ho JC, Mak JC, Ho SP, Ip MS, Tsang KW, Lam WK, Chan-Yeung M. Manganese superoxide dismutase and catalase genetic polymorphisms, activity levels, and lung cancer risk in Chinese in Hong Kong. *J Thorac Oncol*. 2006; 1(7): 648–653

Instituto Nacional do Câncer (BR). Estatísticas do Câncer: Vigilância do câncer e fatores de risco. 2014. Disponível em: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>. Acesso em 08 jul 2016.

Instituto Nacional do Câncer (BR). ESTIMATIVA 2016: Incidência de Câncer no Brasil. 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>. Acesso em 08 jul 2016.

Jackson PE, O'Connor PJ, Cooper DP, Margison GP, Povey AC. Associations between tissue-specific DNA alkylation, DNA repair and cellproliferation in the colon and colon tumour yield in mice treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis*. 2003; 24(3):527-533.

Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138(6): 2044-2058.

Kanwar SS, Vaiphei K, Nehru B, Sanyal SN. Chemopreventive effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats. *Toxicol Mech Methods*. 2007;17(4):197-204.

Kataoka M, Tonooka K, Ando T, Imai K, Aimoto T. Hydroxy radical scavenging activity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Free Radic Res*. 1997; 27(4):419-427.

Kazimirova A, Barancoková M, Krajcovicová-Kudláčková M, Volkovová K, Staruchová M, Valachovicová M, Pauková V, Blazíček P, Wsóllová L, Dusinská M. The relationship between micronuclei in human lymphocytes and selected micronutrients in vegetarians and non-vegetarians. *Mutat Res*. 2006; 611(1-2):64-70.

Kim YS. Molecular genetics of colorectal cancer. *Digestion*. 1997; 58(1): 65-68

Kobaek-Larsen M, Thorup I, Diederichsen A, Fenger C, Hoitinga MR. Review of colorectal cancer and its metastases in rodent models: comparative aspects with those in humans. *Comp Med* 2000;50(1):16-26.

Kontek R, Kontek B, Grzegorzczuk K. Vitamin C modulates DNA damage induced by hydrogen peroxide in human colorectal adenocarcinoma cell lines (HT29) estimated by comet assay in vitro. *Arch Med Sci*. 2013; 9(6):1006-1012.

Lafreniere R, Rosenberg SA. A novel approach to the generation and identification of experimental hepatic metastases in a murine model. *J Natl Cancer Inst*. 1986; 76(2):309-322.

LaMont JT, O'Gorman TA. Experimental colon cancer. *Gastroenterology*. 1978; 75(6):1157-1169.

Langley RE, Burdett S, Tierney JF, Cafferty F, Parmar MK, Venning G. Aspirin and cancer: has aspirin been overlooked as an adjuvant therapy? *Br J Cancer*. 2011; 105(8): 1107-1113.

- Lee J, Park D, Lee Y. Metformin Synergistically Potentiates the Antitumor Effects of Imatinib in Colorectal Cancer Cells. *Dev Reprod.* 2017; 21(2):139-150.
- Lee KW, Lee HJ, Surh YJ, Lee CY. Vitamin C and cancer chemoprevention: reappraisal. *Am J Clin Nutr.* 2003; 78(6): 1074-1078.
- Levin M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *N Engl J Med.* 1986; 314(14):892-902.
- Levine FR, Coxworth JE, Stevenson DA, Tuohy T, Burt RW, Kinney AY. Parental attitudes, beliefs, and perceptions about genetic testing for FAP and colorectal cancer surveillance in minors. *J Genet Couns.* 2010; 19(3): 269-279.
- Levine JS, Ahnen DJ. Adenomatous polyps of the colon. *N Engl J Med.* 2006; 355(24): 2551-2557.
- Levine RI, Garland D, Oliver CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology.* 1990; 186:464-478.
- Lieberman DA, Rex DK, Winawer SJ, Giardiello FM, Johnson DA, Levin TR. Guidelines for colonoscopy surveillance after screening and polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2012; 143(3): 844-857.
- Lima RO, Bazo AP, Said RA, Sforcin JM, Bankova V, Darros BR, Salvadori DM. Modifying effect of propolis on dimethylhydrazine-induced DNA damage but not colonic aberrant crypt foci in rats. *Environ Mol Mutagen.* 2005; 45(1):8-16.
- Liu Y, Ju J, Xiao H, Simi B, Hao X, Reddy BS, Huang MT, Newmark H, Yang CS. Effects of Combination of Calcium and Aspirin on Azoxymethane-Induced Aberrant Crypt Foci Formation in the Colons of Mice and Rats. *Nutr Cancer.* 2008; 60(5):660-665.
- Maddison K, Clarke AR. New approaches for modelling cancer mechanisms in the mouse. *J Pathol.* 2005; 205(2):181-193.

Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: The first 30 years. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(6): 459-465.

Mamede AC, Pires AS, Abrantes AM, Tavares SD, Gonçalves AC, Casalta-Lopes JE, Sarmiento-Ribeiro AB, Manuel JM, Botelho MF. Cytotoxicity of Ascorbic Acid in a Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line(WiDr): In Vitro and In Vivo Studies. *Nutrition and Cancer*. 2012, 64(7), 1049–1057.

Maskens AP. Histogenesis and growth pattern of 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon adenocarcinoma. *Cancer Res*. 1976; 36(5):1585-1592.

McNamee JP, Bellier PV. Use of a standardized JaCVAM in vivo rat comet assay protocol to assess the genotoxicity of three coded test compounds; ampicillin trihydrate, 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride, and N-nitrosodimethylamine. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Jul; 786-788:158-164.

Mendonça IC, Porto IC, do Nascimento TG, de Souza NS, Oliveira JM, Arruda RE, Mousinho KC, dos Santos AF, Basílio-Júnior ID, Parolia A, Barreto FS. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC Complement Altern Med*. 2015; 15:357.

Mereto E, Frenchia L, Ghia M. Effect of aspirin on incidence and growth of aberrant crypt foci induced in the rat colon by 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett*. 1994; 76(1):5-9.

Michels AJ, Hagen TM, Frei B. Human genetic variation influences vitamin C homeostasis by altering vitamin C transport and antioxidant enzyme function. *Annu Rev Nutr*. 2013; 33:45-70.

Mikirova N, Casciari J, Riordan N, Hunninghake R. Clinical experience with intravenous administration of ascorbic acid: achievable levels in blood for different states of inflammation and disease in cancer patients. *J Transl Med*. 2013; 11: 191.

Morikawa T, Kuchiba A, Liao X, Imamura Y, Yamauchi M, Qian ZR, Nishihara R, Sato K, Meyerhardt JA, Fuchs CS, Ogino S. Tumor TP53

expression status, body mass index and prognosis in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2012; 131(5): 1169-1178.

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*. 1997; 275(5307): 1787-1790.

Moser AR, Pitot HC, Dove WF. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science*. 1990; 247:322–324.

Naeaji A, Mozdarani H, Shabestani Monfared A, Faeghi F, Ahmadi AA, Gholami M, Behzadi R, Momtaz MR. Oral Administration of Vitamin C, Cimetidine and Famotidine on Micronuclei Induced by Low Dose Radiation in Mouse Bone Marrow Cells. *J Biomed Phys Eng*. 2017; 7(2):117-126.

Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J*. 2003; 2:7.

Nambiar PR, Girnun G, Lillo NA, Guda K, Whiteley HE, Rosenberg DW. Preliminary analysis of azoxymethane induced colon tumors in inbred mice commonly used as transgenic/knockout progenitors. *Int J Oncol*. 2003; 22(1):145-150.

Neelwarne B. *Red Beet Biotechnology: Food and Pharmaceutical Applications* 1^a ed: Springer. 2012.

Niikawa M, Nakamura T, Nagase H. Effect of co-treatment of aspirin metabolites on Mitomycin C-induced genotoxicity using the Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Drug Chem Toxicol*. 2006; 29(4):379-396.

Niikawa M, Nakamura T, Nagase H. Suppressive effect of aspirin on chromosome aberration induced by mitomycin C in mice. *Biol Pharm Bull* 2001; 24(8):964-966.

Niikawa M, Okamura T, Sugiura K, Nagase H. Aspirin intake suppresses MMC-induced genotoxicity in mice. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2008; 9(2):279-282.

Nishi EE, Campos RR, Bergamaschi CT, de Almeida VR, Ribeiro DA. Vitamin C prevents DNA damage induced by renovascular hypertension in multiple organs of Wistar rats. *Hum Exp Toxicol*. 2010; 29(7):593-599.

Osmak M, Kovacek I, Ljubenkovic I, Spaventi R, Eckert-Maksić M. Ascorbic acid and 6-deoxy-6-chloro-ascorbic acid: potential anticancer drugs. *Neoplasma*. 1997; 44(2): 101-7.

Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr*. 2003; 22(1): 18-35.

Padayatty SJ, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A, Hoffer LJ, Levine M. Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases. *CMAJ*. 2006; 174(7): 937-942.

Pandurangan AK, Dharmalingam P, Ananda Sadagopan SK, Ganapasam S. Effect of luteolin on the levels of glycoproteins during azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012; 13(4):1569-1573.

Park HJ, Davis SR, Liang HY, Rosenberg DW, Bruno RS. Chlorogenic acid differentially alters hepatic and small intestinal thiol redox status without protecting against azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. *Nutr Cancer*. 2010; 62(3):362-370.

Pascoe GA, Reed DJ. Cell calcium, vitamin E, and the thiol redox system in cytotoxicity. *Free Radic Biol Med*. 1989; 6(2):209-224.

Patrono C. The multifaceted clinical readouts of platelet inhibition by low-dose aspirin. *J Am Coll Cardiol*. 2015; 66(1): 74-85.

Pawar AA, Vikram A, Tripathi DN, Padmanabhan S, Ramarao P, Jena G. Modulation of Mitomycin C-induced Genotoxicity by Acetyl- and Thio- Analogues of Salicylic Acid. 2009; 23(2):303-307.

Perse M, Cerar A. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011:473964.

Perše M. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Colorectal Cancer: Cause or Consequence?. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:725710

Pinto IAA. Avaliação do potencial carcinogênico do dibenzotiofeno e dibenzotiofeno sulfona em ratos *Wistar* [dissertação de mestrado]. Programa de Pós- Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Ouro Preto-MG: Universidade Federal de Ouro Preto; 2012.

Priolli DG, Canello TP, Lopes CO, Valdívia JC, Martinez NP, Açari DP, Cardinali IA, Ribeiro ML. Oxidative DNA damage and β -catenin expression in colorectal cancer evolution. *Int J Colorectal Dis.* 2013; 28(5): 713-722.

Rao CV. Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutat Res.* 2004; 555: 107-119.

Rashid A, Khan UA. Effect of Ascorbic Acid on Long-Term Cold Exposure Induced Changes in Thyroid Activity in Sprague Dawley Rats. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2013; 23(9):649-652.

Reczek CR, Chandel NS. CANCER.Revisiting vitamin C and cancer. *Science.* 2015; 350(6266):1317-1318.

Reichling T, Goss KH, Carson DJ, Holdcraft RW, Ley-Ebert C, Witte D, Aronow BJ, Groden J. Transcriptional profiles of intestinal tumors in *Apc (Min)* mice are unique from those of embryonic intestine and identify novel gene targets dysregulated in human colorectal tumors. *Cancer Res.* 2005; 65:166–176.

Reynolds M, Armknecht S, Johnston T, Zhitkovich A. Undetectable role of oxidative DNA damage in cell cycle, cytotoxic and clastogenic effects of Cr(VI) in human lung cells with restored ascorbate levels. *Mutagenesis.* 2012; 27(4):437-443.

Ribeiro ML, Priolli DG, Miranda DD, Arçari DP, Pedrazzoli J Jr, Martinez CA. Analysis of oxidative DNA damage in patients with colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2008; 7(4): 267-272

Risio M. The natural history of adenomas. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010; 24(3): 271-280.

Rodrigues MA, Silva LA, Salvadori DM, De Camargo JL, Montenegro MR. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35(3):351-355.

Romão PR, Tovar J, Fonseca SG, Moraes RH, Cruz AK, Hothersall JS, Noronha-Dutra AA, Ferreira SH, Cunha FQ. Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. against nitrosothiol-induced cytotoxicity. *Braz J Med Biol Res.* 2006; 39(3):355-363.

Roncucci L, Mariani F. Prevention of colorectal cancer: How many tools do we have in our basket? *Eur J Intern Med.* 2015; 26(10): 752-756.

Rothwell PM, Wilson M, Price JF, Belch JF, Meade TW, Mehta Z. Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomized controlled trials. *Lancet.* 2012; 379(9826): 1591-1601.

Rubio CA. Three Pathways of Colonic Carcinogenesis in Rats. *Anticancer Res.* 2017; 37(1):15-20.

Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T. Expression of cyclogenase 1-and 2 in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1995; 55(17):3785-3789.

Sato T, Nagaoka K, Nagase H, Nikawa M, Kito H. The effect of several antipyretic analgesics on mitomycin C-induced mutagenesis using the wing spot test in *Drosophila melanogaster*. *Jpn J Toxicol Environ Health.* 1996; 42:136.

Satomi A, Murakami S, Hashimoto T, Ishida K, Matsuki M, Sonoda M. Significance of superoxide dismutase (SOD) in human colorectal cancer tissue: correlation with malignant intensity. *J Gastroenterol.* 1995; 30:177-182.

Sengottuvelan M, Senthilkumar R, Nalini N. Modulatory influence of dietary resveratrol during different phases of 1,2-dimethylhydrazine induced mucosal lipid-peroxidation, antioxidant status and aberrant

crypt foci development in rat colon carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1760(8):1175-1183.

Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Dpino RA, Montminy M, Cantley LC. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science*. 2005; 310:1642–1646.

Shih IM, Zhou W, Goodman SN, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*. 2001; 61(3): 818-22.

Sieber OM, Lamlum H, Crabtree MD, Rowan AJ, Barclay E, Lipton L, Hodgson S, Thomas HJ, Neale K, Phillips RK, Farrington SM, Dunlop MG, Mueller HJ, Bisgaard ML, Bulow S, Fidalgo P, Albuquerque C, Scarano MI, Bodmer W, Tomlinson IP, Heinimann K. Whole-gene APC deletions cause classical familial adenomatous polyposis, but not attenuated polyposis or “multiple” colorectal adenomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(5): 2954-2948.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988; 175(1): 184-191.

Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998; 58(6):1130-1134.

Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2005; 25:207–218.

Stanczyk M, Gromadzinska J, Wasowicz W. Roles of reactive oxygen species and selected antioxidants in regulation of cellular metabolism. *Int J Occup Med Environ Health*. 2005; 18: 15–26.

Stryker SJ, Wolff BG, Culp CE, Libbe SD, Ilstrup DM, MacCarty RL. Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology*. 1987; 93(5): 1009-1013.

Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Nakagama H, Tanaka T. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis* 2006; 27:162-169.

Swamy MV, Herzog CR, Rao CV. Inhibition of COX-2 in colon cancer cell lines by celecoxib increases the nuclear localization of active p53. *Cancer Res.* 2003; 63(17): 5239-5242.

Swenberg JA, Cooper HK, Bücheler J, Kleihues P. 1,2-Dimethylhydrazine- induced methylation of DNA bases in various rat organs and the effect of pretreatment with disulfiram. *Cancer Res.* 1979; 39:465-467.

Tan BL, Norhaizan ME, Huynh K, Yeap SK, Hazilawati H, Roselina K. Brewers' rice modulates oxidative stress in azoxymethanemediated colon carcinogenesis in rats. *World J Gastroenterol.* 2015; 21(29):8826-8835.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000; 35(3):206-221.

Tong Y, Yang W, Koeffler HP. Mouse Models of cancer colorectal. *Chin J Cancer.* 2011; 30(7):450-462.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65(2): 87-108.

Traverso G, Shuber A, Olsson L, Levin B, Johnson C, Hamilton SR, Boynton K, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection of proximal colorectal cancers through analysis of faecal DNA. *Lancet.* 2002; 359(9304): 403-404.

Tyagi G, Jangir DK, Singh P, Mehrotra R, Ganesan R, Gopal ES. Rapid determination of main constituents of packed juices by reverse phase-high performance liquid chromatography: an insight in to commercial fruit drinks. *J Food Sci Technol.* 2014; 51(3):476-484.

Ullah MF, Bhat SH, Hussain E, Abu-Duhier F, Ahmad A, Hadi SM. Ascorbic acid in cancer chemoprevention: translational perspectives and efficacy. *Curr Drug Targets*. 2012; 13(14):1757-1771.

Umar A, Dunn BK, Greenwald P. Future directions in cancer prevention. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(12): 835-848.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006; 160(1):1-40.

Van Duijvendijk P, Slors JF, Taat CW, Oosterveld P, Sprangers MA, Obertop H, Vasen HF. Quality of life after total colectomy with ileorectal anastomosis or proctocolectomy and ileal pouch-anal anastomosis for familial adenomatous polyposis. *Br J Surg*. 2000; 87(5): 590-596.

Varmus H. The new era in cancer research. *Science*. 2006; 312(5777): 1162-1165.

Vinothkumar R, Vinoth Kumar R, Karthikkumar V, Viswanathan P, Kabalimoorthy J, Nalini N. Oral supplementation with trolox (6-galloyloxyethylrutin), modulates lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014; 37(1):174-184.

Voorneveld PW, Reimers MS, Bastiaannet E, Jacobs RJ, van Eijk R, Zanders MMJ, Herings RMC, van Herk-Sukel MPP, Kodach LL, van Wezel T, Kuppen PJK, Morreau H, van de Velde CJH, Hardwick JCH, Liefers GJ. Statin Use After Diagnosis of Colon Cancer and Patient Survival. *Gastroenterology*. 2017; 153(2):470-479.

Waly MI, Al-Rawahi AS, Al Riyami M, Al-Kindi MA, Al-Issaei HK, Farooq SA, Al-Alawi A, Rahman MS. Amelioration of azoxymethane induced-carcinogenesis by reducing oxidative stress in rat colon by natural extracts. *BMC Complement Altern Med*. 2014; 14:60.

Wang D, Dubois RN. Prostaglandins and cancer. *Gut*. 2006; 55:115-122.

Weisburger JH. Colon carcinogens: their metabolism and mode of action. *Cancer*. 1971; 28(1):60-70.

Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, Ganiats T, Levin T, Woolf S, Johnson D, Kirk L, Litin S, Simmann C. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology*. 2003; 124(2): 544-560.

Winawer SJ. The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer. Colorectal cancer screening. *Best Practice & Research. Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2007; 21(6): 1031-1048.

Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J*. 1996; 313 (1): 17-29.

Wu X, Patterson S, Hawk E. Chemoprevention — history and general principles. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011; 25(4-5): 445-459

Xie J, Itzkowitz SH. Cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(3): 378-389.

Yagi T. Inhibition of NADH-ubiquinone reductase activity by N,N-dicyclohexylcabodiimide and correlation of this inhibition with the occurrence of energy coupling site 1 in various organisms. *Biochemistry*. 1987; 26:2822–2828.

Yun J, Mullarky E, Lu C, Bosch KN, Kavalier A, Rivera K, Roper J, Chio II, Giannopoulou EG, Rago C, Muley A, Asara JM, Paik J, Elemento O, Chen Z, Pappin DJ, Dow LE, Papadopoulos N, Gross SS, Cantley LC. Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. *Science*. 2015;350(6266):1391-1396.

Yurgelun MB, Mercado R, Rosenblatt M, Dandapani M, Kohlmann W, Conrad P, Blanco A, Shannon KM, Chung DC, Terdiman J, Gruber SB, Garber JE, Syngal S, Stoffel EM. Impact of genetic testing on endometrial cancer risk-reducing practices in women at risk for Lynch syndrome. *Gynecol Oncol*. 2012; 127(3):544-551.

ANEXO



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS QUIMIOPREVENTIVOS E ANTIGENOTÓXICOS DA VITAMINA D, VITAMINA C E ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EM MODELO ANIMAL DE CÂNCER COLORRETAL.", registrada com o protocolo nº 034/2016-2, sob a responsabilidade de Vanessa Moraes de Andrade, junto à equipe: Maiara Pereira, Rafael Alencastro Brandão Ostermann, Ângela Caroline da Luz Beretta, Vanessa Ozório Schneider - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de 20/09/2016.

| | |
|-------------------------|------------------------------------|
| Finalidade | () Ensino (X) Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | 29/09/2016 a 14/04/2017 |
| Espécie/linhagem/raça | Camundongo heterogêneo BALB-c |
| Nº de animais | 372 |
| Idade/Peso | 60 dias / 25 gramas |
| Sexo | Feminino/Masculino |
| Origem | Biotério da Unesc |

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: "EVALUATION CHEMOPREVENTIVE AND ANTIGENOTOXIC EFFECTS OF VITAMIN D, VITAMIN C AND ACETYSALICYLIC ACID IN EXPERIMENTAL MODEL OF COLORECTAL CANCER."


Protocol number: 034/2016-2

Principal Investigator: Vanessa Moraes de Andrade

Researchers: Maiara Pereira, Rafael Alencastro Brandão Ostermann, Ângela Caroline da Luz Beretta, Vanessa Ozório Schneider.

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 20 de setembro de 2016.


 Jairo José Zocche
 Coordenador da CEUA