

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

RAFAEL ALENCASTRO BRANDÃO OSTERMANN

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

CRICIÚMA-SC

2017

RAFAEL ALENCASTRO BRANDÃO OSTERMANN

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

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC 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 Frajarcomo

CRICIÚMA-SC

2017

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 aos meus pais, Jussara e Paulo, que plantaram em mim a semente da ética, do respeito e a dedicação como legados de uma vida, dedico esta dissertação.

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, o ponto de partida de tudo que sou hoje, minha gratidão e amor por todo amor e ensinamentos ainda hoje essenciais.

A minha esposa Bruna, pela compreensão com as noites e os fins de semana, debruçado sobre artigos, e por seu amor demonstrados através do incentivo e vibração diárias.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Vanessa Moraes de Andrade, pela amizade nascida a partir desta nova etapa acadêmica, pelas orientações de valor inestimável, pelo alto rigor científico e excelência em pesquisa a qual só cabe espelhar-me e seguir com gratidão.

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

Agradeço aos tantos mestres que fizeram parte da minha trajetória, em especial ao meu mentor de toda uma carreira, Prof. Emérito da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Dr. Átila Velho.

À minha colega e amiga Maiara Pereira minha gratidão eterna pela parceria, pelo comprometimento, espírito científico rigoroso e principalmente pela compreensão com minhas ausências frutos da vida médica corrida.

À Professora Ana Paula Bazo, Coordenadora da UNIBAVE, que gentilmente nos auxiliou na sistemática de avaliação microscópica das criptas aberrantes.

Às colegas de laboratório Paula Rohr e Tais Vilela, que gentilmente cederam seu tempo para analisar, discutir e compartilhar detalhes importantes em meu estudo.

Ao Professor Paulo Lock Silveira, do laboratório LAFIBE pela atenção e pelo trabalho de alto nível na área de estresse oxidativo.

Ao Richardi, da Vida Nature, que gentilmente disponibilizou a vitamina D para nosso estudo, acreditando em nosso projeto para um bem maior.

Agradeço a todos os alunos de iniciação científica, especialmente as acadêmicas Vanessa e Angela por terem abraçado com tanta paixão esse projeto

sobre prevenção no câncer, e os pós-graduandos do LABIM (Laboratório de Biologia Celular e Molecular) que não mediram esforços para ajudar nos experimentos.

Por fim, agradeço aos Professores Felipe Dal Pizzol, Emilio Streck e Jaqueline Picada pela disponibilidade de participarem da banca examinadora deste trabalho, com a qual ,tenho certeza, será de grande aprendizado.

“Noventa por cento do sucesso baseia simplesmente em insistir.”

Woody Allen.

RESUMO

A carcinogênese colorretal é um processo complexo que pode durar vários anos, tendo como sequência clássica, a transformação progressiva de adenomas colorretais em carcinomas. Entretanto, os focos de criptas aberrantes têm substituído os microadenomas como biomarcadores precoces na gênese do câncer colorretal. Com intuito de frear a cascata carcinogênica, e particularmente a ocorrência de focos de criptas aberrantes, várias ações quimiopreventivas vêm sendo testadas. Um grupo que merece destaque é a classe dos antioxidantes, tais como as vitaminas C, D e E, cuja ação fundamental seria neutralizar a ação dos radicais livres, impedindo que moléculas vitais - como o DNA - sejam danificadas. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos quimiopreventivos da Vitamina D e do Ácido Acetilsalicílico - de forma isolada e/ou combinada - em modelo animal de carcinogênese colorretal. Para esse fim foram utilizados camundongos *Balb-c* adultos em experimento com duração de 12 semanas. Os animais foram divididos em 2 grupos principais (EDTA e DMH) e por sua vez subdivididos em 4 grupos cada: controle e os grupos intervenção: AAS, Vitamina D e AAS+Vitamina D. Os animais receberam AAS (6 mg/kg, VO) e Vitamina D (1500 UI/semana por gavagem) durante 12 semanas e a indução química incluiu duas injeções de DMH (40mg/kg) ou EDTA (37 mg/100 mL de água destilada com volume de administração de 0,5 ml/10 gr de peso corporal) por via subcutânea na 4^a e na 5^a semanas de tratamento. No final da 12^a semana foi realizada uma coleta de sangue via retro-orbitária e em seguida os animais foram submetidos à eutanásia para a dissecação do cólon e fígado, para as análises do Ensaio Cometa, Estresse Oxidativo e da Técnica de Criptas Aberrantes. Os resultados mostraram que, no Ensaio Cometa, todas as intervenções apresentaram ação antígeno-tóxica no sangue e fígado dos animais que receberam as injeções de DMH, reduzindo também dano oxidativo ao DNA. Na avaliação do estresse oxidativo, as intervenções farmacológicas reduziram a oxidação de proteínas porém não a quantidade de grupamentos sulfidrilas, quando comparadas ao grupo água/DMH. Entre as enzimas do sistema antioxidante, somente a catalase apareceu estar alterada nos grupos de intervenção quimiopreventiva. Na avaliação das criptas aberrantes, todas as intervenções demonstraram um efeito anticarcinogênico no cólon dos animais expostos a DMH quando comparados ao grupo controle positivo (Água/DMH). Em suma, os resultados mostraram os efeitos quimiopreventivos da Vit D e do AAS em modelo de carcinogênese colorretal, reforçando que esses compostos podem ser utilizados na prevenção primária do CCR em humanos. Entretanto, o efeito sinérgico foi semelhante às intervenções quimiopreventivas.

Palavras-chave: Câncer Colorretal. 1,2 – Dimetilhidrazina. Vitamina D. Ácido Acetilsalicílico. Quimioprevenção. Dano em DNA.

ABSTRACT

Colorectal carcinogenesis is a complex process which can last many years, having as classical substrate the sequence adenoma-carcinoma. However, aberrant crypt foci has substituted microadenomas as early biomarkers in the colorectal tumorigenesis. Aiming to brake the cascade, and particularly the occurrence of aberrant crypt foci, many chemopreventive actions have been tested intending to block the carcinogenesis progression. The antioxidant group has been highlighted by neutralizing the free radicals action. The aim of this study was to evaluate the chemopreventive effects of vitamin D and acetylsalicylic acid (AAS) - isolated and/or blended - in a animal model of colorectal carcinogenesis. It was utilized *Balb-c* adult mouse in a experiment with 12 weeks of duration. The animals were divided in 2 main groups (EDTA and DMH) and after subdivided in 4 groups each: AAS, Vitamin D and AAS+Vitamin D. The animals received AAS (6 mg/kg daily) and Vitamin D (1500 UI a week) 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 analysis were: Comet Assay, Oxidative Stress and Aberrant Crypt Foci detection. The results have shown that all the pharmacological interventions demonstrate anti-genotoxic properties in both blood and liver, reducing even the DNA oxidative damage. At the evaluation of oxidative stress, the pharmacological interventions reduced the protein oxidization but not the formation of sulfidriils when comparing with positive control. When the enzymatic antioxidant system was evaluated, only the catalase activity demonstrated effectivity in the intervention groups. In the aberrant crypt foci evaluation, all the interventions demonstrated anti-carcinogenic effect in the colon of the animals exposed to DMH when comparing to positive control. In conclusion, the results have shown the chemopreventive effects of vitamin D and AAS in a experimental model of colorectal carcinogenesis, reinforcing the importance of primary prevention of CCR in humans. However, the synergistic effect was similar at isolated chemopreventive interventions.

Keywords: Colorectal cancer. 1,2 - DimethylHydrazine. Vitamin D. Acetylsalicylic acid. Chemoprevention. DNA damage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sequência adenoma-carcinoma e as mutações genéticas características da via de instabilidade cromossômica (vic) - cin: chromossomal instability	19
Figura 2 - Aspecto microscópico dos Focos de Criptas Aberrantes (FCAs).....	24
Figura 3 - Estrutura química da 1,2 - DimetilHidrazina, agente carcinógeno utilizado em modelos experimentais de carcinogênese colorretal.....	28
Figura 4 - Estrutura química do Ácido Acetilsalicílico.....	31
Figura 5 - Esquema geral demonstrando as fontes, metabolismo e propriedades anti-tumorais da Vitamina D	33
Figura 6 - Desenho experimental	38
Figura 7 - Irrigação do segmento colorretal a ser examinado utilizando-se solução salina	40
Figura 8 - Classificação de cometas em classes de danos ao DNA	42
Figura 9 - Aspecto microscópico de foco de criptas aberrantes caracterizado pelo espessamento dos limites, aspecto hipercolorado e abertura luminal em fenda	43
Figura 10 - ID (A) e FD (B) no DNA de células de sangue de camundongos tratados VitD e AAS, e submetidos ao modelo experimental de câncer colorretal com DMH avaliados através do ensaio cometa alcalino	51
Figura 11 - ID (A) e FD (B) oxidativos no DNA de células de sangue de camundongos tratados VitD e AAS, e submetidos ao modelo experimental de câncer colorretal com DMH avaliados através do ensaio cometa alcalino modificado com a enzima FPG.	52
Figura 12 - ID (A) e FD (B) oxidativos no DNA de células de sangue de camundongos tratados com VitD e AAS, e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH avaliados através do ensaio cometa alcalino modificado com a enzima FPG	53
Figura 13 - A e B - ID(A) e FD(B) oxidativos no DNA de células hepáticas de camundongos tratados com VitD e AAS combinados e isolados, submetidos ao modelo experimental de câncer colorretal com DMH avaliados através do ensaio cometa alcalino modificado com enzima	54
Figura 14 - 14A e 14B. Análise da carbonilação de proteínas e conteúdo de sulfidrilas em animais submetidos ao modelo experimental de câncer colorretal com DMH precoces da carcinogênese colorretal (CAs & FCAs)	55

Figura 15 - A e B - Análise da atividade da diclorofluoresceína e óxido nítrico em animais submetidos ao modelo experimental de câncer colorretal com DMH avaliados	56
Figura 16 - A, B e C - Análise do sistema antioxidante através da atividade da SOD, CAT e GSH, respectivamente, em animais submetidos ao modelo experimental de câncer colorretal com DMH	57
Figura 17 - A e B - Correlação entre indicadores de genotoxicidade (FD) no sangue e marcadores fenotípico precoce da carcinogênese colorretal (CAs & FCAs) / (r = 0.2799 e r = 0.2686, respectivamente).....	61
Figura 18 - A e B - Correlação entre indicadores de genotoxicidade (ID) no sangue e marcadores precoces da carcinogênese colorretal (CAs e FCAs)	61
Figura 19 - A, B, C e D - Correlação entre indicadores de genotoxicidade(IDe/FDe) no sangue e carcinogênese (CAs & FCAs) / (r = 0.3015 e r = 0.3047)	62

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.....	48
Tabela 2 - Análise de ID e FD no DNA de células hematopoiéticas e hepáticas, de camundongos machos e fêmeas considerando as diferentes intervenções	50
Tabela 3 - Análise comparativa do número de criptas aberrantes (CAs) e focos de criptas aberrantes (FCAs) encontrado no cólon de camundongos machos e fêmeas tratados com Vitamina D, AAS, Vitamina D+ AAS nos diferentes grupos	58
Tabela 4 - Análise do número de CAs e FCAs no cólon distal de camundongos tratados com Vitamina D, AAS e Vitamina D + AAS em ambos os grupo (EDTA e DMH).....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

DMH	1,2- DimetilHidrazina
FCAs	Focos de criptas aberrantes
CAs	Criptas Aberrantes
OMS	Organização Mundial da Saúde
INCA	Instituto Nacional do Câncer
APC	Adenomatous Poliposis Coli
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
BC	Beta-Catenina
AAS	Ácido Acetilsalicílico
VitD	Vitamina D
ID	Índice de dano
FD	Frequência de dano
IDE	Índice de dano enzimático
FDE	Frequência de dano enzimático
DCF	Diclorofluoresceína
CAT	Catalase
SOD	Superóxido Dismutase
GSH	Glutathiona
AOM	Azoximetano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 CÂNCER COLORRETAL	15
1.1.1 Aspectos epidemiológicos	15
1.1.2 Fatores de risco relacionados ao câncer colorretal	15
1.2 VIAS MOLECULARES DE CARCINOGENESE COLORRETAL	18
1.3 ASPECTOS GENOTÓXICOS E ESTRESSE OXIDATIVO NA GÊNESE DO CÂNCER COLORRETAL	20
1.4 CRIPTAS ABERRANTES COMO MARCADORES PRECOSES DA CARCINOGENESE COLORRETAL	23
1.5 MODELOS ANIMAIS DE CARCINOGENESE COLORRETAL	25
1.5.1 Papel da 1,2 - dimetilhidrazina na carcinogênese colorretal	27
1.6 QUIMIOPREVENÇÃO NO CÂNCER COLORRETAL - PRINCIPAIS ESTRATÉGIAS FARMACOLÓGICAS	28
1.6.1 Caracterização e descrição do ácido acetil salicílico como agente quimiopreventivo	30
1.6.2 Caracterização e descrição da vitamina D3 como agente quimiopreventivo	32
1.7 JUSTIFICATIVA	35
2 OBJETIVOS	36
2.1 OBJETIVO GERAL	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 ANIMAIS E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	37
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL	37
3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES	38
3.4 INDUÇÃO DA CARCINOGENESE COLORRETAL COM 1,2 - DIMETILHIDRAZINA (DMH)	39
3.5 EUTANÁSIA E DESCARTE DOS ANIMAIS	39
3.6 ENSAIO COMETA	40
3.7 ANÁLISE DE CRIPTAS ABERRANTES	42
3.8 DETERMINAÇÃO INTRACELULAR DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) e ÓXIDO NÍTRICO (ON)	43

3.8.1 Ânion Superóxido	43
3.8.2 Diclorofluoresceína DCFHDA	43
3.8.3 Indicador da Formação de Óxido Nítrico (NO)	44
3.9 MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS	44
3.9.1 Carbonilação de Proteínas	44
3.9.2 Conteúdo de sulfidril	44
3.10 DEFESAS ANTIOXIDANTES	45
3.10.1 Atividade de Superóxido Dismutase (SOD)	45
3.10.2 Atividade da Glutathione Peroxidase (GPX)	45
3.10.3 Atividade da Catalase (CAT)	45
3.10.4 Glutathione Reduzida (GSH)	45
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5 RESULTADOS	48
5.1 INGESTÃO DE LÍQUIDOS	48
5.2 AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE E ANTI-GENOTOXICIDADE	49
5.3 AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO	54
5.3.1 Avaliação do estresse oxidativo no cólon	54
5.4 AVALIAÇÃO DE CRIPTAS ABERRANTES (CAs) E FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES (FCAs)	57
5.5 CORRELAÇÃO ENTRE DANO AO DNA E CRIPTAS ABERRANTES	60
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÃO	72
8 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER COLORRETAL

1.1.1 Aspectos epidemiológicos

O câncer colorretal (CCR) ou de cólon é o quarto tumor mais comum e a segunda causa de morte por câncer nos EUA. Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam para uma incidência global de 1,3 milhões de casos ao ano, e mais de 650.000 mortes. (Jemal et al., 2011; Colussi et al., 2013; Torre et al., 2015).

Apesar das estatísticas serem alarmantes, a incidência e mortalidade por CCR vem diminuindo desde a década de 90, devido a programas de rastreamento e melhorias na assistência oncológica clínica e cirúrgica. Nos EUA, estima-se uma incidência de 140.000 novos casos, e cerca de 50.000 óbitos por esta neoplasia. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para 2016, 34 mil novos casos, com discreto predomínio no sexo feminino. Observa-se aumento na incidência nas regiões Sul e Sudeste, mostrando diferenças geográficas neste tipo de câncer, o que pode ser explicado por diferentes exposições ambientais e estilos de vida. (INCA, 2016).

Nos últimos anos, por razões ainda pouco entendidas, observou-se uma ocorrência cada vez mais precoce do câncer colorretal. Estima-se que até 2030 haverá um aumento de 125% na incidência desta neoplasia em indivíduos com idade inferior a 35 anos, o que pode ser atribuído ao legado de um estilo de vida ruim, pautado em má alimentação, sedentarismo e a obesidade pandêmica. (Center et al., 2009; Jemal et al., 2011; Bray et al., 2012). Seguindo esta premissa, é salutar que diferentes estratégias de quimioprevenção devam ser estudadas e desenvolvidas com o intento de reduzir a incidência desse tipo de neoplasia.

1.1.2 Fatores de risco relacionados ao câncer colorretal

A elevada e crescente incidência do câncer colorretal têm sido atribuída a uma plêiade de fatores que, isolados ou não, possuem papel de destaque nas diferentes etapas que envolvem a formação de tumores no intestino grosso. Os fatores de risco já bem relatados em estudos experimentais e populacionais são, além da

idade avançada, as síndromes genéticas herdadas, os fatores ambientais como a dieta e estilo de vida, doenças como obesidade e doenças inflamatórias intestinais, como Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa Idiopática. (Giovanucci et al., 2001; Giovanucci et al., 2002; Ewing et al., 2014; Yang et al., 2016).

A idade talvez represente o mais consolidado fator de risco descrito na literatura. Sua importância é vista nos programas de rastreamento onde divide, a partir dos 50 anos, os indivíduos em risco baixo (menos de 50 anos) e médio (acima dos 50 anos). A participação como fator predisponente reside não somente na ocorrência de mutações aleatórias e cumulativas ao longo da vida, mas também no maior tempo de exposição a diferentes fatores de risco. (Grady et al., 2004; Ewing et al., 2014).

Somente 5-6% dos tumores colorretais envolvem alterações genéticas herdadas. As duas formas de tumores colônicos com caráter hereditário são a síndrome de Lynch e a Polipose Adenomatosa Familiar, as quais envolvem mutações germinativas em genes de reparo do DNA e supressores de tumor. (Colussi et al., 2013).

Os fatores ambientais envolvendo dieta e estilo de vida têm sido implicados na gênese de aproximadamente 90% dos tumores do intestino grosso. Nesse contexto, a dieta rica em carne vermelha ou processada, alto teor de gorduras, baixo teor de fibras, baixo consumo de cálcio, ácido fólico e vitamina D têm demonstrado sua associação com câncer colorretal. (Yang et al., 2016). Postula-se que altas concentrações de ferro presentes na carne vermelha promovam a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), como radicais hidroxila, aumentando o estresse oxidativo sobre o epitélio colônico e ocasionando a formação de pólipos e tumores malignos. (Pierre et al., 2006). De outra forma, o consumo de fibras, derivados de frutas, verduras e grãos - proposto como uma forma de reduzir carcinógenos fecais, modular trânsito intestinal, alterar o metabolismo dos ácidos biliares e reduzir o pH colônico - vem demonstrando resultados controversos quanto a prevenção de adenomas e tumores colorretais, o que põe em oportuno questionamento um paradigma já consagrado. (Alberts et al., 2000; Schatzkin et al., 2000; Peters et al., 2003; Larson et al., 2005).

O baixo consumo de cálcio também tem sido relacionado com o CCR. Estudos tem mostrado que o cálcio é capaz de diminuir a barreira epitelial colônica aos efeitos lesivos provocados pelo ácidos biliares e ácidos graxos. Inversamente, a suplementação a base de cálcio têm proporcionado efeito protetor ao otimizar a

barreira epitelial às substâncias carcinogênicas, minimizando assim estresse oxidativo, inflamação e focos de hiperproliferação. (Newmark et al., 2009).

O consumo de álcool e tabaco têm se revelado fator de risco para CCR. (Glovanucci et al., 2001; Cho et al., 2004; Moskal et al., 2007). Em uma revisão sistemática envolvendo 8 estudos observacionais de coorte foi evidenciado que o consumo de 30 gramas de etanol diariamente durante 16 anos aumentou o risco de CCR em 16%. Quando a ingesta aumentou para 45 gramas em média, o risco elevou-se para 41%. Além disso, uma meta-análise publicada em 2008 mostrou que o consumo dose-dependente do tabaco esteve associado a risco de 18% no desenvolvimento de CCR. (Kuper et al., 2002; Botteri et al., 2008). Contudo, é importante pontuar que estas revisões sistemáticas trazem estudos com diferentes delineamentos e possíveis fatores de confusão, os quais fragilizam as conclusões a respeito do tema. Em relação ao tabagismo, vários estudos foram realizados desde a década de 70 demonstrando associação entre tabaco e CCR, inclusive com riscos diferenciados para fumantes ativos (RR =2.14; IC 95%:1.86-2.46) e ocasionais (RR=1.82; IC 95%: 1.55-2.01). (Paskett et al., 2007; Hooker et al., 2008).

A obesidade constitui fator de risco para vários tipos de tumores e tem sido apontada como responsável por 14 % das mortes por câncer em homens e 20% em mulheres. Da mesma forma, o sedentarismo possui associação com CCR. (Wallace et al., 2009). Neste sentido, estudos populacionais têm demonstrado que a prática constante de exercícios físicos reduz em 40-50% o risco de tumores do intestino grosso. As hipóteses para tal impacto estão na redução da adiposidade central, minimizando inflamação sistêmica e melhorando a resposta imuno-mediada. (Tárraga-Lopez et al., 2014)

Entre os diferentes mecanismos moleculares de carcinogênese colorretal a via inflamatória tem ganhado destaque nas últimas décadas como fator predisponente. Presente na Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa, a inflamação induz mutações cumulativas que culminam com o desenvolvimento de displasia, adenomas e carcinomas colorretais. Por essa razão os programas de rastreamento de câncer colorretal neste subgrupo têm sido mais rígidos, através de colonoscopia com realização de múltiplas biópsias abrangendo todos os segmentos colônicos. (Alberts et al., 2000).

1.2 VIAS MOLECULARES DE CARCINOGENESE COLORRETAL

A ocorrência da neoplasia colorretal tem sido historicamente embasada na sequência adenoma-carcinoma, tendo como substrato inicial a ocorrência de mutações cumulativas em diferentes genes. Estudos têm demonstrado fortes evidências de que o fenômeno mais precoce, capaz de induzir as células normais do cólon a se tornarem pólipos adenomatosos, é o dano à molécula do ácido desoxirribonucléico (DNA), o qual pode ser desencadeado por agentes genotóxicos existentes no lúmen intestinal. (Ribeiro et al., 2008; Priolli et al., 2013; Guinney et al., 2015)

Sabe-se que os danos oxidativos no DNA, por exemplo, são causados por espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (ERN) ou pelos grupos metila (CH_3) em excesso, provocando processo inflamatório crônico que ocasiona alteração arquitetural na mucosa colônica normal. (Schmutte et al., 1996; Wheeler et al., 2003; Wheeler et al., 2005). Estas espécies reativas ao gerarem danos oxidativos ao DNA podem desencadear mutações que comprometem genes responsáveis pelo controle do ciclo celular, gerando clones com autonomia proliferativa e o início no processo de carcinogênese colorretal. (Wheeler et al., 2003).

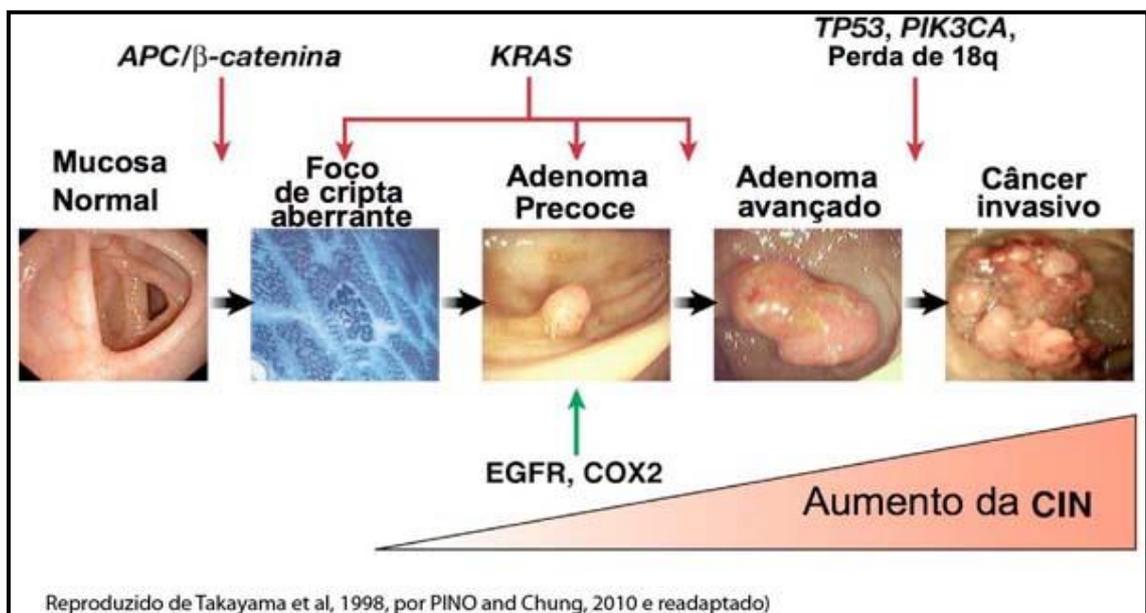
Entretanto, a genética do câncer de cólon é muito complexa. O estudo realizado por Sjöblom et al. (2006) apresenta mais de 13.000 genes sequenciados em tumores colorretais. Os autores descobriram que os tumores acumulam aproximadamente noventa genes mutantes e sessenta e nove destes foram apontados como relevantes. Cada tumor possui em média nove genes mutados e um perfil molecular único. (Sjöblom et al., 2006). Dessa forma, vários marcadores genéticos moleculares foram identificados e são utilizados atualmente para diagnóstico, prognóstico e tratamento. (Cancer Genome Atlas Network, 2012; Zhang et al., 2014).

Existem basicamente 3 vias moleculares que embasam a carcinogênese colorretal. A via de instabilidade cromossômica (VIC) - a mais frequente - é caracterizada pela perda de heterozigose e anormalidades cromossômicas grosseiras, e está presente em 85% dos CCRs. Dessa forma, é representada por tumores que normalmente apresentam alterações no cariótipo, como ganhos e perdas cromossômicas, bem como translocações. (Fearon e Vogelstein, 1990). O restante dos casos emergem de duas vias alternativas relacionadas à instabilidade de

microsatélites (IMS) e ao fenótipo metilador das ilhas *Citosina-Fosfato-Guanina* (CpG), também conhecida como via *CIMP* (Jass, 2007; Perea et al., 2011). A via da instabilidade cromossômica (IC) é representada por tumores que normalmente apresentam alterações no cariótipo, como ganhos e perdas cromossômicas, bem como translocações. (Fearon e Vogelstein, 1990).

A mutação 'chave' da via IC ocorre no gene *APC*, localizado no cromossomo 5q21-22 e envolvido em ambos os tumores esporádico e hereditário, e que age como gene de supressão tumoral sobre a via conhecida como *WNT*. (Shih et al., 2001; Sieber et al., 2002). A inativação do gene *APC*, de fato, resulta em aumento da sinalização na via canônica *WNT*, ocasionando acúmulo de beta-catenina (BC), substância que promove hiperproliferação, diferenciação, migração e adesão celular. (Morin et al., 1997; Sparks et al., 1998; Guerrero et al., 2000). A Figura 1 sumariza as mutações genéticas características da via de instabilidade genômica.

Figura 1 - Sequência adenoma-carcinoma e as mutações genéticas características da via de instabilidade cromossômica (vic) - cin: chromosomal instability



Fonte: Adaptado de Takayama et al. (1998).

Outra via alternativa do CCR é a IMS descrita primeiramente na década de 90. (Thibodeau et al., 1993). Esta refere-se a um acúmulo de erros no processo de replicação do DNA, especialmente em segmentos curtos de 1 a 5 nucleotídeos chamados microsatélites. (Thomas et al., 1996). A IMS é resultado de mutação nos

genes de reparo do DNA, conhecido como Mismatch Repair (MMR), que atuam corrigindo erros logo antes da ação da enzima DNA polimerase (Boland et al., 1998; Fishel et al., 1998). Esta via está presente em 15% dos CCRs esporádicos e cerca de 95% dos casos de síndrome de Lynch (HNPCC). Vários genes como *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* são considerados genes *MMR*, entretanto o *MLH1* e o *MSH2* são os mais associados a CCR (Peltomaki et al., 2003). De fato, as pessoas que possuem o sistema MMR deficiente têm as taxas de mutações aumentadas em 100 vezes nas células da mucosa colorretal. (Thomas et al., 1996).

A terceira via supracitada - *CIMP* ou 'via serrilhada' - é constituída pela hipermetilação aberrante de sequências de dinucleotídeos CpG (Citosina-Fosfato-Guanina) localizados nas regiões promotoras de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, apoptose, angiogênese, reparo do DNA, invasão e aderência. (Toyota et al., 1999). Os promotores hipermetilados causam a perda da expressão do gene, sendo encontrados em cerca de 20% a 30% dos cânceres de cólon. (Ogino et al., 2006). A inativação transcricional dos genes supressores de tumor pela *CIMP* é um importante mecanismo da carcinogênese, pelo qual, várias regiões promotoras são metiladas desempenhando esse papel em 35% dos CCRs. (Snover, 2011). A mutação do gene *BRAF* é frequentemente encontrada em casos de alto grau de hipermetilação e está associada com mecanismos anti-apoptóticos, crescimento celular e progressão para carcinogênese. Na *CIMP* há uma maior presença de mutações no gene *BRAF*, enquanto que as mutações no *p53* exibem uma taxa mais baixa. (Van et al., 2002; Samowitz et al., 2005; Ogino et al., 2006).

1.3 ASPECTOS GENOTÓXICOS E ESTRESSE OXIDATIVO NA GÊNESE DO CÂNCER COLORRETAL

A toxicologia genética prevê o estudo das alterações produzidas por determinados agentes sobre o material genético das células. A exposição de um organismo a compostos xenobióticos pode ser o fator indutor de uma cascata de eventos danosos sobre o DNA que pode levar à formação de alterações nesta macromolécula. Como resultado desta mudança, podem ocorrer diversas disfunções metabólicas que podem levar a vários tipos de doenças, inclusive ao câncer. (Moura, 2012).

Uma provável causa da iniciação do câncer pode ser a formação de adutos, como resultado da interação de compostos genotóxicos com o DNA. Caso não ocorra o reparo desta lesão, esta pode ser propagada para as células filhas. Estas células podem permanecer latentes por muitos anos acumulando novos danos ou ainda sofrerem uma exposição posterior a um agente promotor, e em ambos os casos o processo de malignização pode ser desencadeado. (Ribeiro et al., 2007).

Na gênese do câncer sobretudo em suas fases mais precoces, ocorre íntima correlação entre estresse oxidativo e dano à molécula de DNA. A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) ocorre de forma constante em condições normais nas células, sendo contrabalançada pelos sistemas antioxidantes. (Gutteridge e Halliwell, 2000). Entretanto, o desequilíbrio entre produção e neutralização resulta em estresse oxidativo e potencial dano genético. O dano ao DNA por sua vez pode ser reparado por um primoroso conjunto de genes que regulam essa função. Entretanto, a deficiência nesses mecanismos reparadores pode explicar a ocorrência da transformação neoplásica. (Ribeiro et al., 2007).

Alguns mecanismos de estresse oxidativo têm sido associados na gênese dos tumores colorretais. (Haklar et al., 2001; Dalle-Done et al., 2006). Este desequilíbrio entre produção e neutralização ocasiona oxidação de lipídeos, proteínas e o próprio DNA, além de alterar a modulação de vias de sinalização que controlam processos como proliferação, diferenciação, crescimento celular e apoptose. (Slattery et al., 2012). O CCR origina-se de uma linhagem de células epiteliais que habitualmente dividem-se rapidamente e possuem alta taxa metabólica. Um estudo demonstrou que células do fundo das criptas - células tronco - são mais suscetíveis ao dano causado pelo peróxido de hidrogênio, do que as células mais diferenciadas situadas na superfície das criptas. (Chang et al., 2008). Essa premissa explicaria que células progenitoras poderiam carrear e multiplicar diferentes danos oxidativos através da proliferação celular. De forma geral, em realidade as células em estágio proliferativo - fase S da mitose - são particularmente sensíveis ao dano oxidativo uma vez que o DNA está presente na forma de fita única nesta fase. (Chang et al., 2008).

Alguns marcadores de estresse oxidativo vêm sendo estudados na carcinogênese colorretal tais como o malondialdeído, acroleína, isoprostanos, oxidação de tirosina e hidroxilações. O radical hidroxil (OH^*) é considerado o mais danoso. Dentre os mecanismos mais bem estudados de dano oxidativo ao DNA, encontra-se a hidroxilação da base guanina ocasionada por esse radical. Ao ocorrer

a incorporação do OH⁻ no carbono oito da base guanina, forma-se a 8-hidroxi guanina (8-OHdG) promovendo um pareamento de bases de forma errônea com uma molécula de timina. (Seril et al., 2003). Adicionado a isso, níveis significativamente maiores de 8-OHdG têm sido encontrados em células tumorais, leucócitos e na circulação sanguínea de indivíduos com CCR. De outra forma, existem diferentes mecanismos protetores que representam as defesas antioxidantes das células. As substâncias antioxidantes são divididas em primárias, como a superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPX), e secundárias como as vitaminas C, D e E, bilirrubinas, ácido úrico e beta-caroteno. (Haklar et al., 2001). Além disso, alguns estudos têm demonstrado que o CCR pode ser decorrente de diferentes polimorfismos genéticos no sistema antioxidante bem como associado a níveis reduzidos dos micronutrientes acima citados. (Méphlan et al., 2010; Sutherland et al., 2010).

Inúmeros agentes têm sido descritos como promotores de estresse oxidativo e conseqüentemente dano oxidativo a molécula de DNA, tais como radiação, inflamação, trauma e agentes químicos. Dentre os agentes químicos, o presente estudo, utilizou a 1,2-Dimetilhidrazina (DMH), agente alquilante capaz de gerar quebras na fita dupla de DNA, que vem sendo utilizado amplamente em modelos experimentais de carcinogênese colorretal.

Vários estudos têm avaliado os níveis de dano oxidativo ao DNA na carcinogênese colorretal. (Ribeiro et al., 2007; Ribeiro et al., 2008; Perse, 2013; Lokesumar et al., 2015). Uma das linhas de pesquisa tem observado correlação entre dano oxidativo ao DNA e mutações no gene P53, importante regulador do ciclo celular e inibidor de estados hiperproliferativos. Scalise et al.(2016) identificaram que o dano oxidativo ao DNA pode ser um potencial marcador de mutação no gene P53 ao observarem maiores níveis de dano oxidativo e P53 mutado em tecidos tumorais quando comparados a tecidos normais. Em outro estudo, o dano oxidativo foi avaliado em modelo experimental de câncer colorretal induzido por azoximetano, utilizando-se como agente anti-genotóxico o chá de *Salvia officinalis*, demonstrando redução no dano ao DNA e nos estados de hiperproliferação mensurados pelo Ki-67. (Pedro et al., 2016) .

De outra forma, Ribeiro et al. (2009) demonstraram que o dano oxidativo ao DNA existe tanto em tecidos normais como em tecidos neoplásicos, porém ocorrem em maiores níveis neste último, mostrando também que os sistemas de reparo (Mismatch Repair) encontram-se reduzidos no tecido tumoral. Isto reforça a idéia de

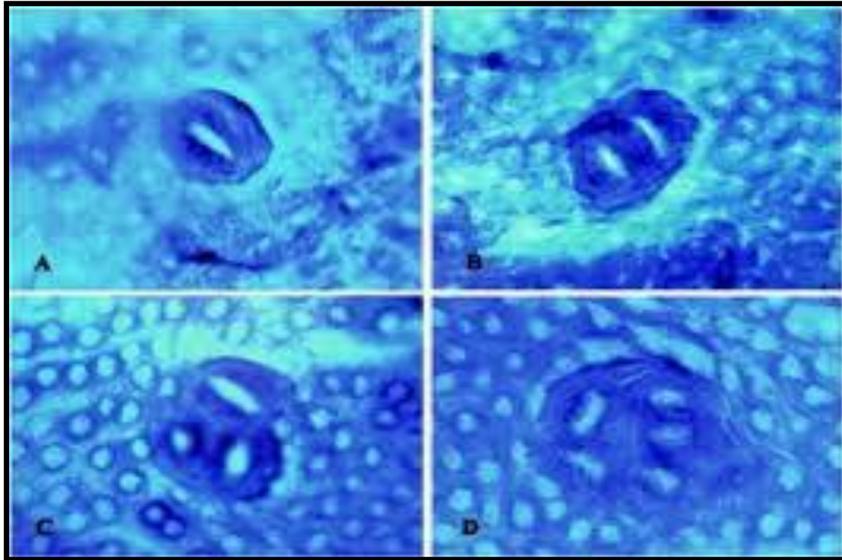
que o estresse oxidativo ocorre em todos os tecidos, porém seu efeito lesivo só ocorre quando a reparação é ineficiente.

De fato, alguns estudos têm demonstrado o efeito antígeno-tóxico de algumas substâncias presentes na dieta. O Mirtenal, óleo essencial da família dos Monoterpenos, presente na pimenta, menta e eucalipto tem demonstrado eficácia antígeno-tóxica em vários modelos de câncer. Lokeshkumar et al., em 2015, publicaram um estudo mostrando o efeito antioxidante e antígeno-tóxico do mirtenal suprimindo a cascata carcinogênica colorretal. Suwanalert et al., em 2016, demonstraram que o arroz tailandês possui inúmeras atividades anti-inflamatórias, antígeno-tóxicas e anticarcinogênicas atuando quimiopreventivamente no CCR.

1.4 CRIPTAS ABERRANTES COMO MARCADORES PRECOSES DA CARCINO- GÊNESE COLORRETAL

Durante muito tempo o adenoma foi considerado o melhor e mais relevante biomarcador do câncer colorretal. Entretanto, a partir da década de 80, os focos de criptas aberrantes (FCAs) vêm ganhando destaque como biomarcadores precoces da carcinogênese colorretal, primeiramente descritas em ratos tratados com azoximetano, metabólito da DMH. (Bird et al., 1987). Caracterizadas por apresentar um lúmen alargado cercado por epitélio hiperproliferativo o que lhe confere aspecto espessado quando corado pelo azul de metileno, as criptas aberrantes (CAs) usualmente não são visualizadas na endoscopia convencional, sendo melhor identificadas por magnificação de imagem e cromoscopia. (Bird et al., 1987; Ochiai et al., 2014; Takayama et al., 2016; Muguruma et al., 2017). A Figura 2 mostra o aspecto microscópico de FCAs encontradas no cólon distal de rato após utilização de corante azul de metileno. Da mesma forma, observou-se que sua formação foi intensificada também pela Dimetilhidrazina, e suprimida por agentes quimiopreventivos, como a aspirina. Dessa forma, os FCAs têm sido utilizadas como marcadores para avaliação de quimioprevenção no CCR. (Takayama et al., 2016).

Figura 2 - Aspecto microscópico dos Focos de Criptas Aberrantes (FCAs)



Fonte: Adaptado de Kushida et al. (2009).

Entretanto, o comportamento biológico dos FCAs tem se mostrado incerto, pois sua presença não implica necessariamente em transformação maligna futura. Na realidade, vários estudos têm aprofundado a descrição morfológica dos FCAs permitindo, baseado no formato de sua abertura, definir com acurácia significativa se há um comportamento hiperplásico ou displásico, o que auxiliaria na análise do potencial de progressão para câncer. (McLellan et al., 1991; Mereto et al., 1994; Pretlow et al., 2004). Ochiai et al., em 2014, demonstraram que FCAs com aberturas estreitas e hiperconadas possuíram uma correlação de 94% com a análise histopatológica posterior que evidenciou displasia. E nesse subgrupo de FCAs, identificou-se mais frequentemente a inativação do gene APC e acúmulo de BC, mostrando o caráter hiperproliferativo com maior tendência a malignidade. A expressão da BC pode ser avaliada por imunohistoquímica.

Outros autores têm estudado a importância das criptas aberrantes e de que forma ela poderia prever o risco de desenvolver pólipos e posteriormente câncer colorretal. (Takahashi et al., 2012; Moulahoum et al., 2017). Nesse contexto, Takahashi et al. (2012) identificaram 366 FCAs em 89 pacientes submetidos a colonoscopia com magnificação, demonstrando que o número de criptas identificadas no reto possui associação com a presença de adenomas de maior tamanho, mas não necessariamente com maior taxa de detecção de adenomas.

Uchiyama et al. (2012) mostraram que o número de criptas aberrantes identificadas no reto inferior possui correlação positiva com a taxa de recorrência de pólipos adenomatosos. Além disso, os autores identificaram que a prevalência de FCAs foi progressivamente maior entre indivíduos com adenomas colorretais e carcinomas (88% vs. 95%). Os autores identificaram também que o uso de álcool e tabaco aumentou a prevalência de FCAs bem como o risco de CCR, conforme descrito por outros autores. (Mutch et al., 2009; Ezuka et al., 2014).

Por outro lado, Ohkubo et al. (2012) realizaram um estudo interessante mostrando que a ocorrência de FCAs não é influenciada por fatores como consumo de álcool e tabaco, fatores estes reconhecidos como associados ao CCR. Embora alvo de algumas controvérsias, os FCAs vêm se consolidando como biomarcador precoce do CCR tanto em modelos animais como em humanos, mostrando sua correlação com a ocorrência de adenomas e carcinomas e demonstrando sua utilização como marcador biológico em estudos de quimioprevenção contra o CCR. (Patyar et al., 2017).

1.5 MODELOS ANIMAIS DE CARCINOGENESE COLORRETAL

Modelos experimentais são essenciais na construção do conhecimento e no entendimento sobre mecanismos de doença e estratégias terapêuticas. Na carcinogênese colorretal, modelos experimentais vêm sendo desenvolvidos desde a década de 80 com intuito de entender os complexos mecanismos genéticos e epigenéticos envolvidos, e que acarretam mudanças no comportamento biológico dos tumores colorretais. (Heyer et al., 1999; Hoffman, 1999; Fodde et al., 2001). Além disso, estes modelos possibilitam testar novas estratégias principalmente no campo da quimioprevenção.

Os modelos animais têm como prerrogativa reproduzir com confiabilidade as doenças em seres humanos, para que os resultados uma vez obtidos, possam dar maior precisão nos estudos em humanos. Dessa forma, existem diferentes modelos de carcinogênese colorretal que reproduzem diferentes cenários, como por exemplo, o câncer esporádico, tumores associados a doença inflamatória intestinal e síndromes hereditárias, permitindo uma avaliação bastante fidedigna sobre o comportamento tumoral nessas situações. (Marian, 2004; Rosenberg et al., 2009).

Modelos geneticamente modificados através da mutação germinativa no gene *Apc* reproduzem os mecanismos envolvidos na síndrome genética chamada Polipose Adenomatosa Familiar (PAF), onde os indivíduos desenvolvem centenas de tumores no intestino grosso em idade bastante precoce. Outro modelo animal geneticamente modificado, apresentando deleções em genes que expressam *fosfolipase A2*, *Ciclooxigenase A2* e receptores de prostaglandinas *EP2* e *EP4*, resultou em atenuação na formação de tumores. (Gebert et al., 1986; Heyer et al., 1999; Seno et al., 2002).

Por outro lado, os modelos induzidos por substâncias carcinogênicas podem reproduzir de forma bastante fidedigna o CCR esporádico. Embora as altas doses de carcinógenos que são administradas em modelos animais não possuam correspondência absoluta com os fatores de risco para o CCR em humanos, este modelo possui alta reprodutibilidade, possibilitando a avaliação de mecanismos genéticos bem como a ação de substâncias capazes de frear a gênese tumoral. (Agnier et al., 2005).

Além disso, a linhagem animal também tem mostrado influência em modelos de carcinogênese colorretal, necessitando modificações na dose, regime de administração e tempo de latência variando entre 12 e 50 semanas. (Hata et al., 2004; Suzuki et al., 2006; Rosenberg et al., 2009). Essa suscetibilidade genética diferenciada vem sendo evidenciada por alguns autores. Suzuki et al. (2004) estudaram 4 protocolos de administração de Azoximetano com Dextram Sulfato. Cem por cento dos animais de linhagem BALB/c desenvolveram tumores, enquanto somente 50% na linhagem C57BL/6N. Outro estudo, agora com a linhagem SWR/J, comparou 4 doses de 1,2-DimetilHidrazina (6,8 mg/kg, 34 mg/kg, 68 mg/kg, 136 mg/kg) em protocolo de 20 semanas, demonstrando uma incidência crescente de tumores de 26%, 76% e 87% nas 3 últimas doses acima descritas, com predomínio de lesões no cólon distal.

Em nível molecular, as alterações em modelos animais são muito similares ao CCR em humanos. A via canônica de sinalização APC/BC representa o primeiro de uma série de eventos moleculares no câncer e está relacionada com regulação na adesão e proliferação celular. (Yamada et al., 2000; Hata et al., 2004). A expressão imunohistoquímica da betacatenina (BC) tem sido descrita em modelos animais. Mutações ativas tem sido identificadas no gene *k-ras* e estão relacionadas a estágios precoces da carcinogênese, culminando em hiperproliferação e transformação celular.

(Jacoby et al., 1991; Valencia et al., 1991; Suzuki et al., 1995). O gene *p53* constitui checkpoint importante na regulação do ciclo celular, agindo como gene supressor de tumor. (Takesue et al., 2001; Nambiar et al., 2002). Entretanto, mutações nesse gene não tem sido observadas em ratos. A proteína COX-2 catalisa a síntese de mediadores inflamatórios (Prostaglandinas e Prostaciclina) no ciclo do ácido aracônico. Seus níveis estão aumentados em células tumorais, modulando mecanismos proliferativos, anti-apoptóticos, de angiogênese e invasão tumoral e podem ser identificados em modelos animais de carcinogênese. (Kohno et al., 2006; Stolfi et al., 2008).

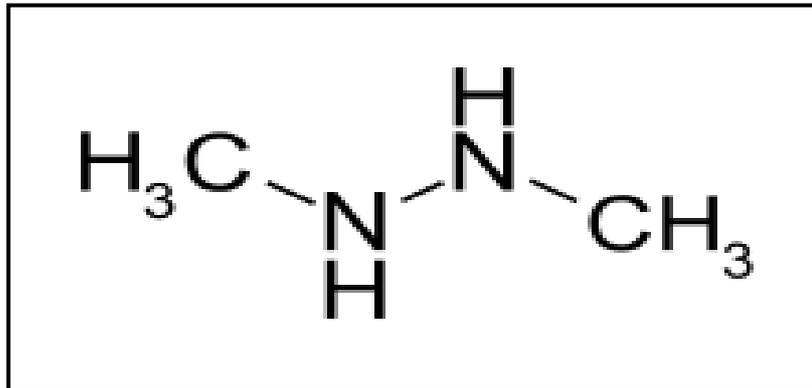
1.5.1 Papel da 1,2 - dimetilhidrazina na carcinogênese colorretal

Entre os carcinógenos, a 1,2 - DimetilHidrazina (DMH) e o Azoximetano têm sido mais estudados. Classicamente, a primeira tem como seu metabólito imediato o segundo e ambos induzem CCR em ratos. (Laquear et al., 1964; Maskens, 1976). Para se tornarem ativos, necessitam de ativação por meio de N-oxidações e hidroxilações para induzir danos no DNA. A cascata carcinogênica, no entanto, se processa em protocolos de administração em dose única ou repetida periodicamente em doses semanais. (Thumherr et al., 1973; Deschner et al., 1977). Essa cronologia é importante para o foco de diferentes estudos. Por exemplo, tumores raramente se desenvolvem em protocolos de 12-15 semanas, porém são comuns em estudos de 30 a 40 semanas. (Jackson et al., 1999; Bird et al., 2000; Bissahoyo et al., 2005). De outra forma, quando se quer avaliar biomarcadores mais precoces como criptas aberrantes e adenomas, os protocolos de menor tempo acima citados são geralmente suficientes.

A DMH é um derivado da família das hidrazinas caracterizado por baixa densidade e solubilidade em água (Figura 3). 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). Ela atua como alquilante na indução de carcinogênese colorretal em animais. (De Robertis et al., 2011). Sua ativação metabólica ocorre no fígado via CYP2E1, e seus metabólitos são transportados através do sangue e bile até o intestino grosso, principal alvo de ação desse agente. (Haase et al., 1973; Deschner, 1977). Os produtos de metabolismo da DMH induzem a formação de adutos de grupos metil no DNA,

mutações pontuais, separação aberrante de cromátides irmãs e induz apoptose no cólon, aumentando a proliferação de colonócitos. (Tanaka, 2009).

Figura 3 - Estrutura química da 1,2 - DimetilHidrazina, agente carcinógeno utilizado em modelos experimentais de carcinogênese colorretal



Fonte: Moura (2012).

As doses de DMH utilizadas variam entre protocolos, e vão de 10-40 mg/kg de peso do animal/semana durante período de 5 a 20 semanas, no entanto, alguns trabalhos utilizaram doses acima de 60-65 mg/kg de peso animal por semana. (Jackson et al., 1999). Quando comparada ao seu metabólito azoximetano, a DMH tem mostrado maior custo-efetividade conforme Jucá et al. (2014). Ele concluiu que seu uso resultou em menor custo e maior incidência de displasia e neoplasia colorretal. (Jucá et al., 2014).

Em realidade, nas últimas décadas a DMH tem demonstrado seu papel como importante agente carcinógeno em modelos experimentais de câncer colorretal em virtude da similaridade com os CCRs esporádicos. A DMH é usada como agente carcinogênico completo, pois induz as etapas de iniciação e promoção em estudos de carcinogênese de cólon e possui alta especificidade para o cólon de várias espécies de roedores. Seu uso é acessível, possui custo baixo (cerca de 20 vezes menor que o azoximetano) e possibilita protocolos altamente reprodutivos (Jucá et al., 2014).

1.6 QUIMIOPREVENÇÃO NO CÂNCER COLORRETAL - PRINCIPAIS ESTRATÉGIAS FARMACOLÓGICAS

A utilização de compostos sintéticos ou naturais capazes de retardar ou impedir o desenvolvimento do câncer, através da inibição da etapa de iniciação da carcinogênese ou da progressão da malignidade, é o marco conceitual da quimioprevenção no câncer. (Wu et al., 2011).

No entanto, juntamente com os esforços do rastreamento populacional, fazem-se necessárias estratégias específicas de quimioprevenção afim de impedir ou retardar a cascata tumorigênica em suas fases mais iniciais. Neste sentido, muitos estudos demonstraram que lesões pré-malignas podem ser revertidas ou impedidas farmacologicamente. (Umar et al., 2012). Até o presente momento, várias substâncias têm sido apontadas como estratégias quimiopreventivas promissoras contra o CCR. Estes incluem a aspirina (da classe dos Anti-inflamatórios não esteróides-AINEs), as estatinas, metformina e mais recentemente várias substâncias anti-oxidantes como a vitamina C, Vitamina D, Selênio, que têm demonstrado eficácia quimiopreventiva em diferentes estudos epidemiológicos, experimentais *in vitro* e *in vivo* e alguns ensaios clínicos. (Baron et al., 2003; Chan et al., 2005).

Particularmente os AINEs têm recebido a maior atenção como agentes quimiopreventivos do CCR. A primeira evidência científica do papel preventivo da aspirina veio de um grande estudo de caso-controle publicado em 1988 explorando a relação entre várias medicações e CCR. (Kune et al., 1988). Subsequentemente, vários estudos populacionais têm mostrado que eles podem reduzir a ocorrência de adenoma e câncer colorretal em média, cerca de 20-40%. (Baron et al., 2003; Chan et al., 2005; Coyle et al., 2016). Dados referentes a dose adequada bem a como a duração do uso dos AINEs - especialmente a aspirina - ainda não estão bem estabelecidos. Vários ensaios clínicos avaliando doses diárias entre 80 e 325 mg mostraram benefício não dose-dependente mas duração-dependente. (Chan et al., 2005; Nishihara et al., 2013; Nan et al., 2015; Cao et al., 2016).

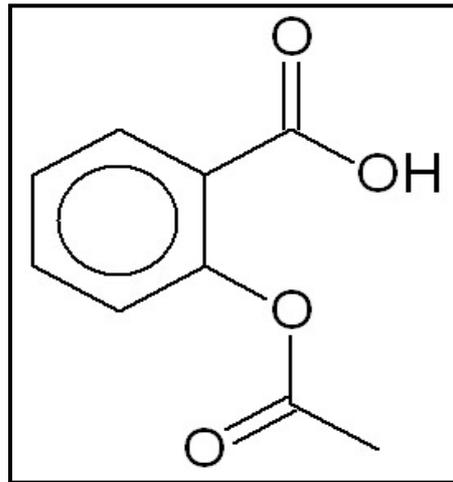
Outro grupo de compostos quimiopreventivos bastante investigados são os antioxidantes, que podem interagir seguramente com os radicais livres e impedir que as moléculas vitais sejam danificadas. (Osmak et al., 1997). Várias substâncias antioxidantes tais como beta-caroteno, Vitamina A, Vitamina C, Vitamina E e Selênio vêm sendo estudadas em seu papel quimiopreventivo. Entretanto, apesar dos resultados promissores vistos em estudos observacionais, os ensaios clínicos não têm mostrando relação causal entre uso de antioxidantes e incidência de CCR.

Por outro lado, estudos têm relacionado os baixos níveis sanguíneos de nutrientes antioxidantes, tais como a vitamina C, com um maior risco de desenvolver câncer. (Ames et al., 2001; Mikirova et al., 2013). 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, uma vez que elas não podem ser produzidas por seres humanos, incluindo nesta lista os nutrientes e os metabólitos de plantas, tais como as vitaminas C e E.

1.6.1 Caracterização e descrição do ácido acetil salicílico como agente quimio-preventivo

Os anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs) representam um grupo de cerca de 20 medicamentos que possuem uma ampla aplicação clínica. Agem habitualmente como analgésicos, anti-piréticos e como anti-agregantes plaquetários, ação esta consagrada na prevenção de eventos cardiovasculares. O ácido acetilsalicílico (AAS) tem como mecanismo de ação principal a inibição irreversível da ciclooxigenase (COX) por acetilação de resíduos de serina no seu sítio ativo, impedindo assim a formação de prostaglandinas pró-inflamatórias. Sua estrutura química é mostrada na Figura 4. Os AINEs possuem como alvo inibição da enzima acima citada, que pode ser dividida em COX-1, normalmente presente em tecidos como estômago, plaquetas e vasos sanguíneos, e COX-2 a qual apresenta-se nos sítios de inflamação. (Manzano et al., 2012). O AAS também pode reduzir a proliferação e induzir a apoptose de células cancerígenas (Ashktorab et al., 2005; Basselin et al., 2011), além de atuar na prevenção da trombose e doenças cardiovasculares. (Patrono, 2015).

Figura 4 - Estrutura química do Ácido Acetilsalicílico



Fonte: Disponível em: <<https://cornellbiochem.wikispaces.com>>.

Estudos epidemiológicos sobre prevenção cardiovascular com ácido acetilsalicílico demonstraram que seu uso crônico resultaria em regressão na formação de adenomas e consequente redução do risco de CCR. (Rothwell et al., 2012; Cook et al., 2013; Langley et al., 2011; Thorat; Cuzick, 2015). Vários estudos têm demonstrado a associação entre níveis elevados de COX-2 e a ocorrência de pólipos e adenocarcinomas. (Bousserouel et al., 2010; Ruder et al., 2011; Mariani et al., 2014; Coyle et al., 2016). Shehaan et al. (1999) observaram não somente esta associação mas também uma relação direta entre níveis de COX-2, estadiamento tumoral e a sobrevida, conferindo àquela proteína valor prognóstico. Por outro lado, Brambilla et al. (2007) estudaram a expressão da COX-2 nos diferentes estágios da carcinogênese demonstrando um aumento crescente na expressão dessa proteína a medida que o padrão histológico tornava-se mais desfavorável (27% dos adenomas tubulares, 40% dos adenomas vilosos e 70% nos carcinomas), porém sem impacto prognóstico. Sinicrope et al. (1999) mostraram que a expressão da COX-2 foi de 100% em indivíduos com PAF, caindo para 90% nos CCRs esporádicos e para 67% nos tumores não polipóides hereditários (HNPCC). Postula-se que a COX-2 inibe a diferenciação celular no epitélio intestinal e diminui a apoptose. (Brambilla et al., 2007; Coyle et al., 2016).

Dessa forma, há considerável evidência mostrando que o AAS pode ter um efeito anti-carcinogênico. A evidência dos efeitos anti-câncer do AAS surgiram a partir de modelos *in vitro* e *in vivo*, principalmente em relação ao CCR. (Langley et al., 2011).

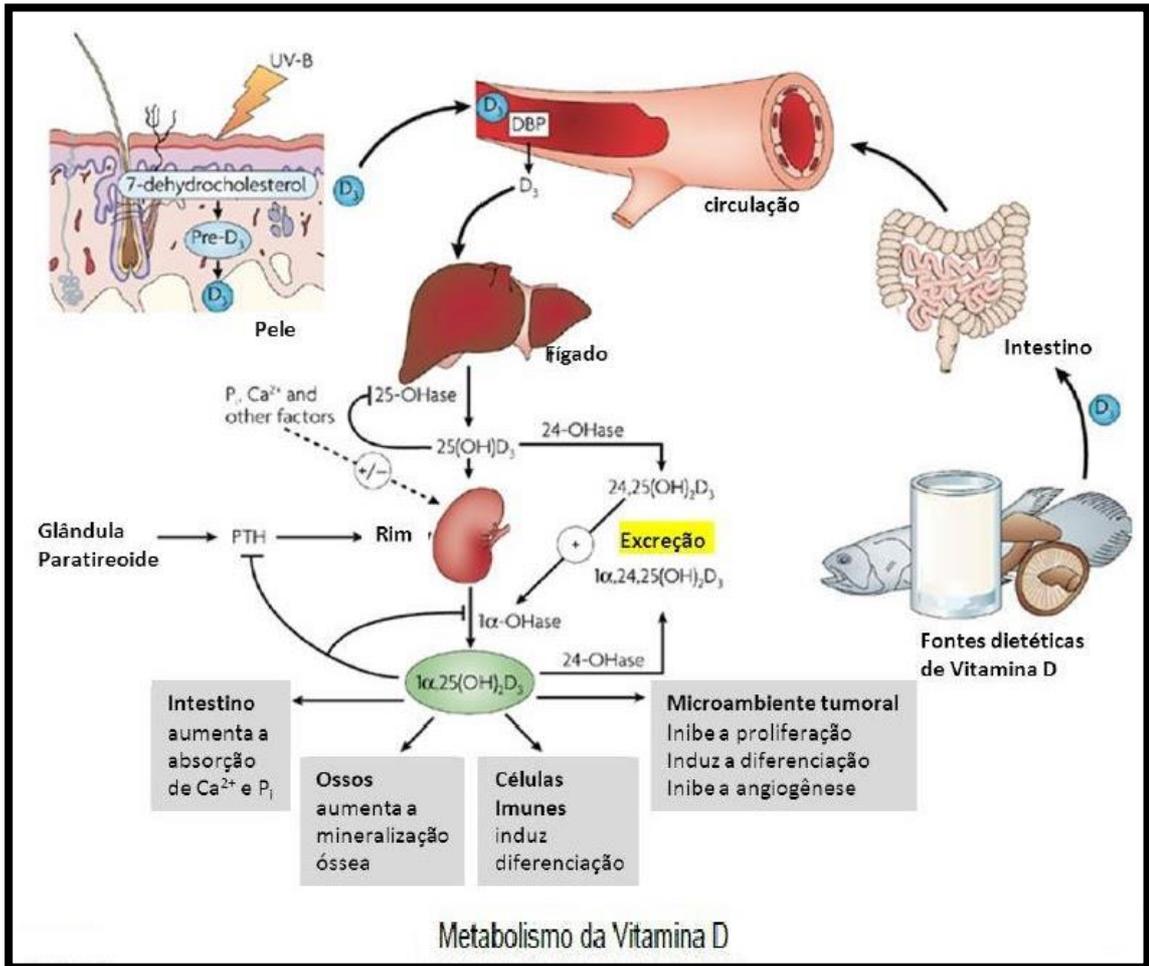
As pesquisas sugerem que o AAS é eficaz na prevenção primária, onde seu uso diário em longo prazo, em doses baixas, reduziu o risco de pólipos adenomatosos em 30-50%. (Cole et al., 2009; Burr et al., 2015). Também há indícios de um possível papel como adjuvante no tratamento do câncer, prevenindo a recorrência 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).

Irrefutavelmente, vários trabalhos sugerem um efeito quimiopreventivo do AAS contra alguns tipos de cânceres. (Ruder et al., 2011; Rothwell et al., 2012; Bastiaannet et al., 2012). No entanto, as 4 questões mais relevantes no estudo da quimioprevenção com AAS no CCR - e ainda carecendo de comprovação inequívoca - são: Eles são realmente eficazes quanto a desfechos como mortalidade? Se sim, os diferentes subgrupos de CCRs podem ser diferentemente afetados pelo uso de AAS? Qual a dose ótima? E por quanto tempo o AAS deve ser ingerido para ser considerado um quimiopreventivo adequado? (Chia et al., 2012; Rigas et al., 2015).

1.6.2 Caracterização e descrição da vitamina D3 como agente quimiopreventivo

O termo vitamina D refere-se a uma família de compostos químicos derivados do colesterol. Existem 2 formas principais da vitamina D: Vitamina D₂ encontrada em plantas e mais conhecida como ergocalciferol; e a Vitamina D₃ encontrada comumente em tecidos animais e descrita como Colecalciferol. Ambos compostos são precursores inativos que são inicialmente convertidos a calcidiol (25-Hidroxivitamina D) no fígado e este, posteriormente, sofre hidroxilação nos rins. Obtida da dieta ou principalmente sintetizada na pele sob a ação de raios solares UVB e submetida aos passos acima descritos, a 1,25 dihidroxivitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃) ou calcitriol, torna-se um metabólito ativo capaz de exercer várias funções regulatórias no organismo. Adicionalmente a seu clássico papel de reabsorção de cálcio no intestino e na homeostase óssea, a vitamina D parece inibir a proliferação, migração e promover diferenciação celular. (Pendás-Franco et al., 2008; Refaat et al., 2015). As funções, fontes, metabolismo e propriedades anti-tumorais da Vitamina D são mostradas na Figura 5.

Figura 5 - Esquema geral demonstrando as fontes, metabolismo e propriedades anti-tumorais da Vitamina D



Fonte: Oliveira et al. (2013). Doença de Crohn: Novas Perspectivas.

Em nível molecular, sabe-se que a 1,25 (OH) 2D₃ age como regulador da expressão gênica via ligação com o receptor da vitamina D (RVD) presente no núcleo das células, em especial nos colonócitos. (Lamprecht et al., 2003; Milczakerk et al., 2013). O RVD sofre um processo de heterodimerização ao ligar-se ao receptor retinóide X, a partir daí controlando a transcrição de vários genes. Dessa forma, observa-se que tanto os níveis de vitamina D como de RVD são importantes na manutenção da homeostase orgânica, na elaboração da resposta imune-inflamatória e na prevenção do câncer. Inúmeras vias de sinalização têm sido influenciadas pela ação conjunta da vitamina D/RVD, como por exemplo receptores *Toll-Like*, NF-κB, JNK/SAPK, JAK-STAT e Wnt/B-Catenina. (Lu et al., 2013).

Estudos têm mostrado relação direta entre a vitamina D e a via Wnt/beta-catenina já descrita anteriormente, e que se dá por 3 mecanismos já bem definidos. (Refaat et al., 2015). Primeiramente, a vitamina D induz a interação entre o RVD no

núcleo e a via Wnt/beta-catenina evitando sua translocação nuclear, levando à inibição do fator de transcrição χ e dos genes estimulados por esse fator, gerando assim um efeito *downstream*. Segundo, a 1,25 (OH) 2D3 induz a expressão da E-caderina, levando à exportação da beta-catenina acumulada e realocação para promover a adesão intercelular. Terceiro, a 1,25 (OH) 2D3 induz a expressão do fator Dickkopf (DK-1), um inibidor extracelular da via de sinalização Wnt, resultando na inibição de vários genes como *c-myc*, *TCF1*, *LEF1*, *Axin2*, *CD44*, *ENC1* e *EPHB2* em células colônicas. (Kwon et al., 2011; Larriba et al., 2011). Estes mecanismos de antagonismo da via *WNT* são dependentes da expressão do receptor RVD, conforme descrito por Shah et al. (2006).

A expressão do RVD é fundamental para a ação anti-carcinogênica da vitamina D. Por exemplo, sua expressão é mais exuberante em estágios mais precoces da tumorigênese, diminuindo significativamente em estágios mais avançados dos tumores colorretais. Dessa forma, além da heterogeneidade genética atribuída ao CCR, a variabilidade na expressão do RVD possui papel decisivo nos efeitos anti-tumorais da vitamina D. De outra forma, estudos tem mostrado que a concentração desse receptor pode modular a via canônica da Wnt/Beta-catenina de forma inversa, ou seja, maiores concentrações de RVD diminuem a capacidade proliferativa desencadeada pela via acima descrita, e o contrário também é verdadeiro. (Larriba et al., 2011).

Postula-se que o estilo de vida moderno, tais como volume de roupa utilizada diariamente, tempo passado em ambientes fechados e uso de protetores solares vem contribuindo para uma redução quase endêmica nos níveis de vitamina D. (Weinstein et al., 2011). Estudos observacionais têm sugerido uma associação entre baixos níveis séricos de 1,25 (OH)₂D₃ e um risco aumentado de quase todos os tipos de neoplasia, em especial o CCR. (Chan et al., 2005; Otani et al., 2007; Weinstein et al., 2011). Uma meta-análise de nove estudos caso-controle mostrou que a cada 4 ng/mL de aumento nos níveis de 25OH2D3 houve uma redução de 6% no risco de CCR. (Teixeira et al., 2014). No entanto, estudos de intervenção utilizando suplementação com 1,25 (OH) 2D3 mostraram-se discordantes. Uma meta-análise revelou que níveis maiores do que 33 ng/mL teriam maior caráter protetor quando comparados com níveis em torno de 12 ng/mL. (Bostick et al., 2015). O maior ensaio clínico sobre essa intervenção foi o *Women's Health Initiative*, reunindo 36.282 mulheres em pós-menopausa recebendo diariamente 400UI de vitamina D. Em sua

fase inicial, houve reforço na relação inversa entre vitamina D e risco de CCR, risco este que não se manteve em follow-up mais longo, de 7 anos. (Cook et al., 2013).

1.7 JUSTIFICATIVA

Considerando os efeitos quimiopreventivos, já bem documentados, do Ácido Acetilsalicílico, e mais recentemente demonstrando-se que a suplementação de vitamina D minimiza a ocorrência de criptas aberrantes, adenomas e carcinomas colorretais, este estudo experimental tem por objetivo avaliar os efeitos quimiopreventivos desses compostos, de forma sinérgica e isolada em 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 D3 e do Ácido Acetilsalicílico, combinados ou isolados, através de parâmetros genotóxicos, bioquímicos e microscópicos utilizando-se modelo animal de câncer colorretal induzido por 1,2-DimetilHidrazina

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Avaliar os efeitos da Vitamina D e do Ácido Acetilsalicílico sobre mecanismos de estresse oxidativo - através da determinação intracelular de espécies reativas de oxigênio, marcadores de estresse oxidativo e sistema antioxidante - no cólon de camundongos submetidos ao modelo de câncer colorretal;

✓ Avaliar os níveis de dano no DNA - através do ensaio cometa alcalino e enzimático - em células do sangue e fígado de camundongos submetidos ao modelo animal de carcinogênese colorretal, e aos respectivos tratamentos com Vitamina D e Ácido Acetilsalicílico combinados ou isolados;

✓ Avaliar os efeitos quimiopreventivos da vitamina D e o ácido acetilsalicílico sobre a formação de criptas aberrantes - identificadas à microscopia - no cólon de camundongos submetidos ao modelo animal de carcinogênese colorretal;

✓ Avaliar a correlação entre dano ao DNA e a ocorrência de criptas aberrantes em camundongos submetidos ao modelo animal de carcinogênese colorretal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

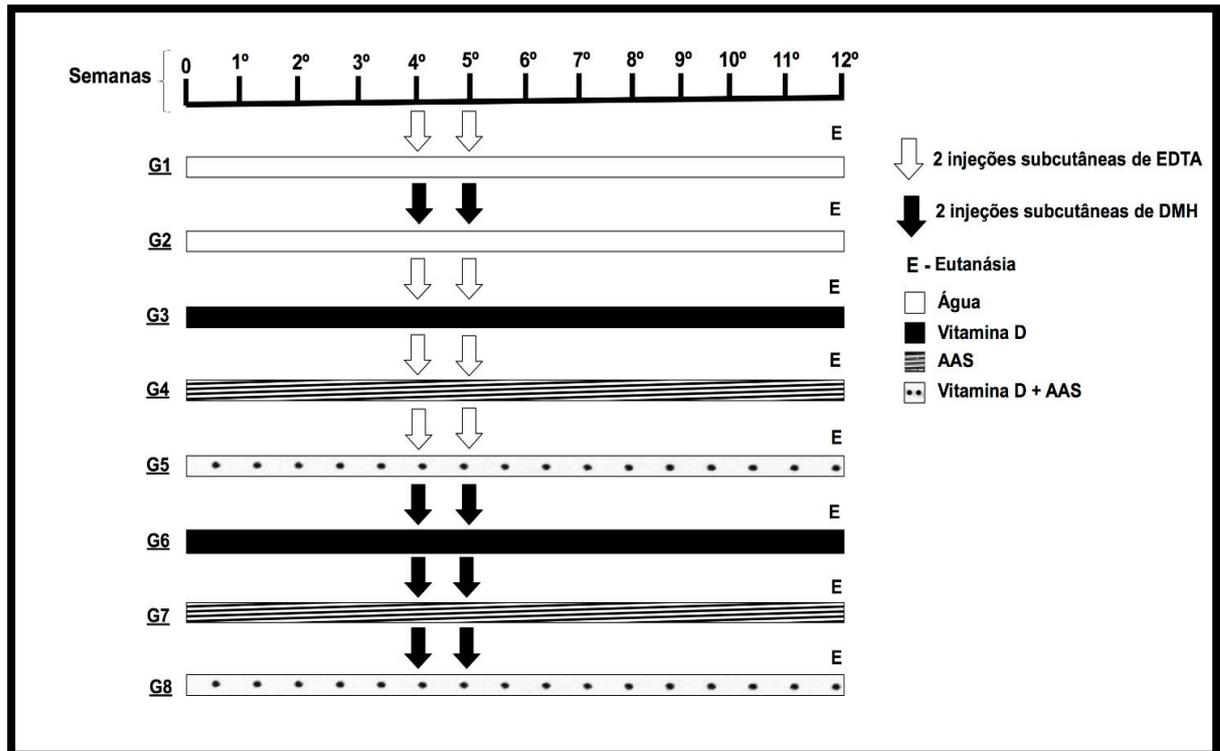
Foram utilizados no total 80 camundongos BALB-c adultos (60 dias), machos e fêmeas. Os animais foram obtidos do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e alojados em caixas de polietileno, com comida e água *ad libitum* e mantidos em um ciclo de 12 horas luz-escuro (a luz é ligada às 7h da manhã), 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, e os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Neste experimento foram utilizados 80 animais randomicamente alocados em 8 grupos com 10 animais cada, divididos igualmente entre machos e fêmeas. Seguem as descrições dos grupos: Grupo 1: os animais receberam água durante todo o experimento e na 4^a e 5^a semana foram administradas duas injeções subcutâneas (SC) de EDTA (controle negativo); Grupo 2: os animais receberam água durante todo o experimento e na 4^a e na 5^a semana foram administradas duas injeções SC de DMH (controle positivo); Grupo 3: os animais receberam 1,25 dihidroxivitamina D3 por gavagem na dose semanal de 1500UI durante todo experimento e na 4^a e na 5^a semana foram administradas duas injeções SC de EDTA; Grupo 4: os animais receberam AAS (6 mg/kg) diluído na água durante todo o experimento e na 4^a e na 5^a semana foram administradas duas injeções SC de EDTA; Grupo 5: os animais receberam 1,25 dihidroxivitamina D3 por gavagem na dose semanal de 1500 UI, e AAS diluído na água durante todo o experimento, e na 4^a e na 5^a semana foram administradas duas injeções SC de EDTA; Grupo 6: os animais receberam 1,25 dihidroxivitamina D3 por gavagem na dose semanal de 1500 UI durante todo o experimento e na 4^a e na 5^a semana será administradas 2 injeções SC de DMH; Grupo 7: os animais receberam AAS diluído na água durante todo o experimento e na 4^a e na 5^a semana será administradas 2 injeções SC de DMH; Grupo 8: os animais receberam 1,25 dihidroxivitamina D3 por gavagem na dose semanal de 1500 UI e o

AAS diluído na água durante todo o experimento e na 4ª e na 5ª semana foram administradas 2 injeções SC de DMH.

Figura 6 - Desenho experimental



Fonte: Dados do autor (2017).

3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES

A vitamina D (1,25 (OH) 2D3, Vida Nature/Criciúma, Brazil) em sua forma ativa foi disponibilizada uma vez por semana via gavagem na dose de 1500 UI. (Murillo et al., 2007). O ácido acetilsalicílico (Sigma Aldrich, Brazil) foi diluído em água potável, e a dose estimada por camundongo foi de 6 mg/kg por dia 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 o composto diluído, conforme o desenho experimental abaixo. As soluções foram trocadas por soluções frescas três vezes por semana e o volume de água ou da água com o AAS foi quantificado e dividido pelo número de animais por caixa em cada troca.

3.4 INDUÇÃO DA CARCINOGENESE COLORRETAL COM 1,2 - DIMETILHIDRAZINA (DMH)

Para induzir a carcinogênese colorretal, todos os animais, com exceção do grupo controle negativo (grupo 1) e dos grupos tratados somente com os compostos (Vitamina D e AAS), receberam 2 injeções de 40 mg/kg via subcutânea (SC) de 1,2-Dimetilhidrazina (DMH) (Sigma Aldrich, Brazil), duas vezes por semana durante duas semanas consecutivas, totalizando 160 mg/kg. (Rodrigues et al., 2002). A concentração de DMH utilizada neste estudo foi de 40 mg/kg/dose dissolvida em EDTA (37 mg/100 mL de água destilada) com volume de administração de 0,5 mL/10 g de peso corporal. (Waly et al., 2014; Rouhollahi et al., 2015).

3.5 EUTANÁSIA E DESCARTE DOS ANIMAIS

No final da 12^a semana foi realizada coleta de sangue por via retro-orbitária em todos os animais. Após a coleta os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação com guilhotina. Os animais foram submetidos a laparotomia mediana com a dissecação e retirada do segmento descendente do cólon e o reto até acima da margem anal. No mesmo momento, foi removido também pequeno fragmento de tecido hepático referente ao lobo esquerdo. A figura 7 disposta abaixo mostra a etapa de irrigação com solução salina do segmento intestinal para remoção de debris. As amostras foram processadas, aliquotadas e armazenadas para posterior análise microscópica, histológica e bioquímica.

Figura 7 - Irrigação do segmento colorretal a ser examinado utilizando-se solução salina



Fonte: Dados do autor (2017).

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 são conforme RDC nº 306/2004 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

3.6 ENSAIO COMETA

Para realização do ensaio cometa foram utilizados os seguintes tecidos biológicos: sangue e fígado. O ensaio cometa 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

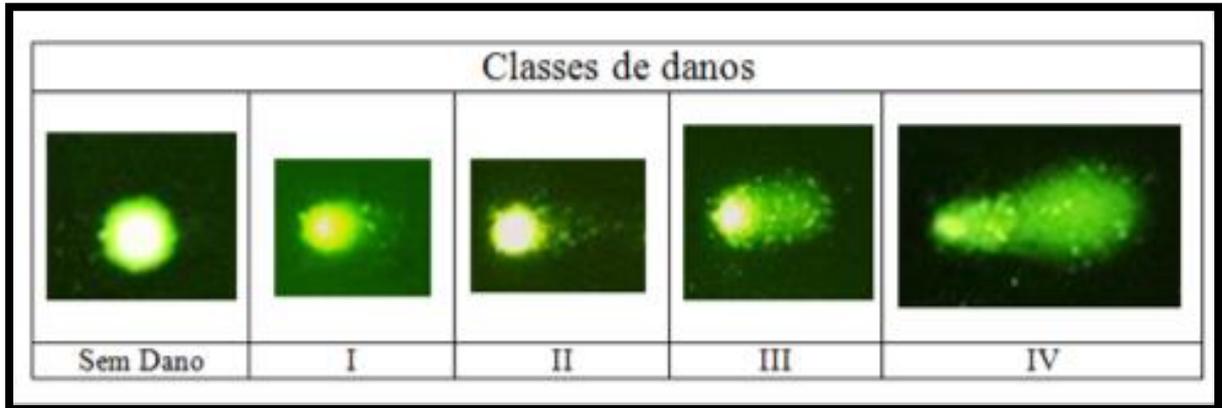
com duas lamínulas. Após solidificação do material biológico, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram colocadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10,0 - 10,5, com adição na hora de Triton X - 100 e 10% de DMSO) *overnight*, protegidas da luz. Passado esse tempo, foram incubadas em tampão alcalino (pH 12,6) durante 30 minutos para o desnovelamento 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, sendo a classificação para ausência de cauda 0 até 4 para o comprimento máximo (Collins et al 1997), conforme mostra a figura 9. Desta forma, tem-se o Índice de Danos (ID) para cada grupo variando de zero ($100 \times 0 = 0$; 100 nucleóides observados completamente sem danos) a 400 ($100 \times 4 = 400$; 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 (Singh 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 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.

Figura 8 - Classificação de cometas em classes de danos ao DNA



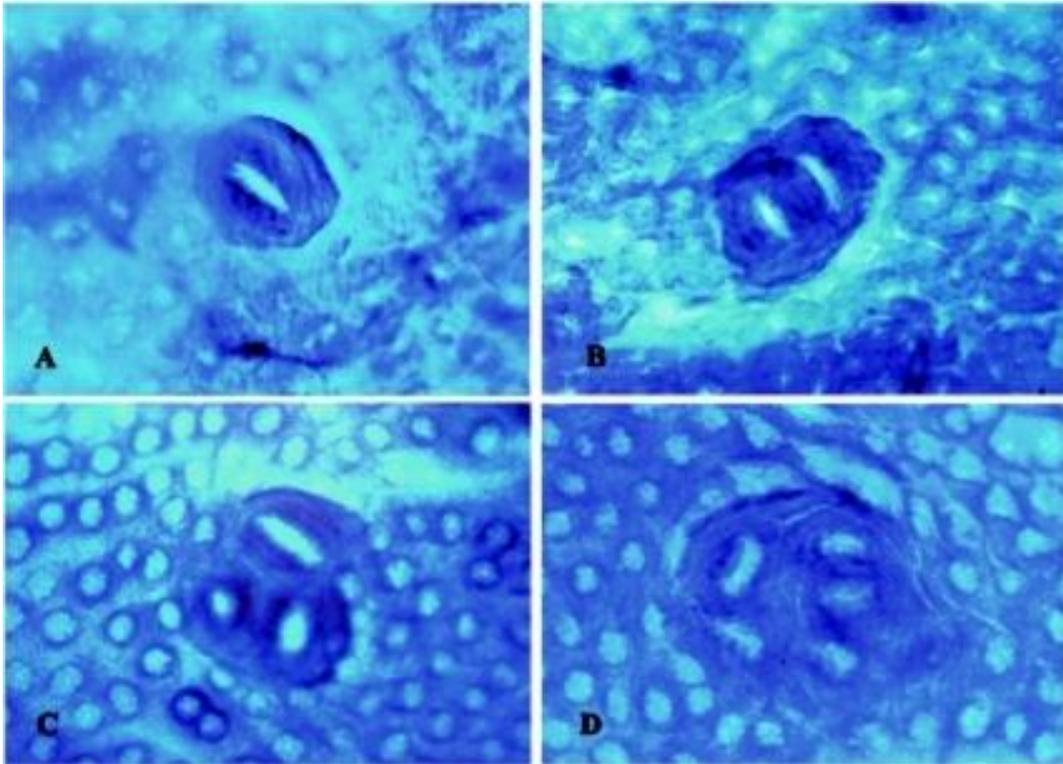
Fonte: Adaptado de Valente et al. (2017).

3.7 ANÁLISE DE CRIPTAS ABERRANTES

Após a eutanásia dos animais foi realizada a técnica de avaliação de focos de criptas aberrantes (FCAs) descrita por Bird (1987): primeiramente foi realizada laparotomia mediana nos animais, dissecando-se e removendo-se o segmento descendente do cólon e reto até logo acima da margem anal. O cólon removido teve uma de suas extremidades ocluídas por um pequeno segmento de barbante para realização do *wash out* (Irrigação e remoção do conteúdo fecal). Após o segmento colônico foi incisado longitudinalmente deixando a mucosa colônica exposta a qual foi gentilmente irrigada com solução salina (0,9% NaCl) a fim de remover resíduos fecais novamente. Posteriormente, seccionou-se o cólon em três segmentos (proximal, médio e distal), sendo a porção médio distal fixada com alfinete em uma pequena placa de isopor. Estes segmentos foram então submergidos em solução de formalina à 10% por 24 horas. Após a fixação, cora-se com solução aquosa de azul de metileno a 1% por 5 minutos e colocando-os em lâminas de microscopia com a face da mucosa voltada para cima onde as mesmas foram analisadas sob microscopia óptica com aumento de 100X. Foram analisados 15 campos sequenciais por cólon/animal. Os focos de criptas aberrantes foram caracterizados por seu tamanho aumentado, aspecto mais escuro, abertura luminal variando desde circular até alongada ou tortuosa, e pela camada de células epiteliais mais espessas em relação às normais circunvizinhas. (Bird, 1987; Fenaglio-Preiser e Noffsinger, 1999). O material permaneceu no formol por 24 horas e as análises foram feitas neste período. A

microscopia foi realizada por 2 examinadores em momentos diferentes, avaliando os segmentos colônicos corados com azul de metileno de forma cega.

Figura 9 - Aspecto microscópico de foco de criptas aberrantes caracterizado pelo espessamento dos limites, aspecto hipercolorado e abertura luminal em fenda



Fonte: Corpet DE & Taché S, 2002, Nutrition & Cancer.

3.8 DETERMINAÇÃO INTRACELULAR DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) e ÓXIDO NÍTRICO (ON)

3.8.1 Ânion Superóxido

A produção de superóxido foi determinado pela oxidação da adrenalina em tampão contendo SMP (partículas submitocondriais), succinato (Inibidor da cadeia de transferência de elétrons) e catalase. Um controle negativo foi determinado com a presença da enzima Superóxido Dismutase - SOD. (Poderoso et al., 1996).

3.8.2 Diclorofluoresceína DCFHDA

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

3.8.3 Indicador da Formação de Óxido Nítrico (NO)

A produção de 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 N1 (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 (NaNO₂). Os resultados foram calculados em µmol Nitrito/mg proteína. (Chaea et al., 2007).

3.9 MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS

3.9.1 Carbonilação de Proteínas

A oxidação de proteínas 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 e colaboradores (1990). Os resultados foram calculados como nmol/mg de proteína empregando o coeficiente de extinção molar de dinitrofenilhidrazonas de 22.000 M⁻¹. cm⁻¹.

3.9.2 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, conforme descrito por Grotto et al. (2007).

3.10 DEFESAS ANTIOXIDANTES

3.10.1 Atividade de Superóxido Dismutase (SOD)

Foi medida pela inibição da oxidação da adrenalina adaptado de Bannister e Calabrese (1987). Os volumes de 5, 10 e 15uL foram retiradas da mesma, a qual 5 mL de catalase (0,0024 mg/mL de água destilada), tampão de glicina 175185mL (0,75g em 200 mL de água destilada a 32°C, pH 10,2), 5uL 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 leitor de ELISA a 480nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/MG de proteína).

3.10.2 Atividade da Glutaciona Peroxidase (GPX)

A determinação da atividade da GPX foi realizada a partir da taxa de decaimento do NADPH. A determinação foi realizada em espectrofotômetro a 340 nm, conforme Flohé e Günzler (1984). Os resultados foram calculados como U/mg de proteína, sendo que 1U corresponde a 1µmol de peróxido transformado em água por minuto.

3.10.3 Atividade da Catalase (CAT)

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

3.10.4 Glutaciona Reduzida (GSH)

Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Moron et al. (1979), com algumas adaptações. GSH foi mensurado em homogeneizado de tecido muscular total após precipitação de proteína com 1 mL proteína de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500 µm 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.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. A normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste *Bartlett*. A análise estatística foi feita através do teste ANOVA de 2 vias, seguido pelo teste post hoc de *Bonferroni*. 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 6.0.

5 RESULTADOS

5.1 INGESTAO DE LÍQUIDOS

Durante o período do experimento (12 semanas), o volume de líquido ingerido pelos animais foi aferido três vezes na semana, quantificado e dividido pelo número de animais em cada gaiola. A tabela 1 mostra a ingestão média total de líquidos por animal entre fêmeas e machos do mesmo grupo e a média total por grupo.

Tabela 1 - Ingestão média total de líquidos por animal entre fêmeas e machos do mesmo grupo e a média total por grupo

Grupos		Ingestão líquida/dia (mL)	Total
Água / EDTA	Fêmeas	12,64 ± 6,52	12,85 ± 6,18
	Machos	13,07 ± 6,43	
Água / DMH	Fêmeas	7,26 ± 2,47	6,78 ± 1,97**
	Machos	6,30 ± 2,46	
Vitamina D / EDTA	Fêmeas	12,63 ± 6,25	12,75 ± 5,03
	Machos	12,88 ± 5,06	
AAS / EDTA	Fêmeas	8,93 ± 4,41	8,93 ± 3,92*
	Machos	8,93 ± 4,79	
Vitamina D e AAS / EDTA	Fêmeas	9,60 ± 5,20	9,12 ± 4,52*
	Machos	8,65 ± 5,59	
Vitamina D / DMH	Fêmeas	6,87 ± 3,38	7,16 ± 1,70**
	Machos	7,46 ± 2,59	
AAS / DMH	Fêmeas	8,46 ± 4,00	7,99 ± 2,23*
	Machos	7,52 ± 3,93	
Vitamina D e AAS / DMH	Fêmeas	9,38 ± 3,48	8,76 ± 2,71**
	Machos	8,13 ± 3,78	

Dados expressos em média ± desvio padrão, Para a comparação entre fêmeas e machos foi utilizado o Teste t de Student e para a comparação entre os grupos foi utilizado o ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey. AAS (ácido acetilsalicílico), EDTA (sal dissódico) e DMH (1,2-dimetilhidrazina).* Diferença significativa em relação ao grupo Água + EDTA com $p < 0,01$.** Diferença significativa em relação ao grupo Água + EDTA com $p < 0,001$.
Fonte: Dados do autor (2017).

Os resultados acima expressos demonstram que não houve diferença na ingesta hídrica entre os sexos, entretanto houve redução na média total de ingestão de líquidos em quase todos os grupos quando comparados ao grupo água/EDTA ($p < 0,001$; Tukey), com exceção do grupo Vitamina D/EDTA.

5.2 AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE E ANTI-GENOTOXICIDADE

A avaliação do perfil genotóxico da DMH e os efeitos antigenotóxicos das três intervenções (VitD, AAS e VitD+AAS) foi realizada segundo sistematização exposta no item 4.5 e avaliados separadamente, analisando-se o Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD) no sangue e fígado, através do ensaio cometa, conforme tabela 4. Inicialmente, foi avaliado o ID e FD entre fêmeas e machos do mesmo grupo e pode-se observar que não houve diferença significativa entre os sexos em nenhum dos parâmetros avaliados (Teste t de Student) (Tabela 2). Dessa forma, todas as comparações entre os grupos se darão com o total de animais (fêmeas e machos).

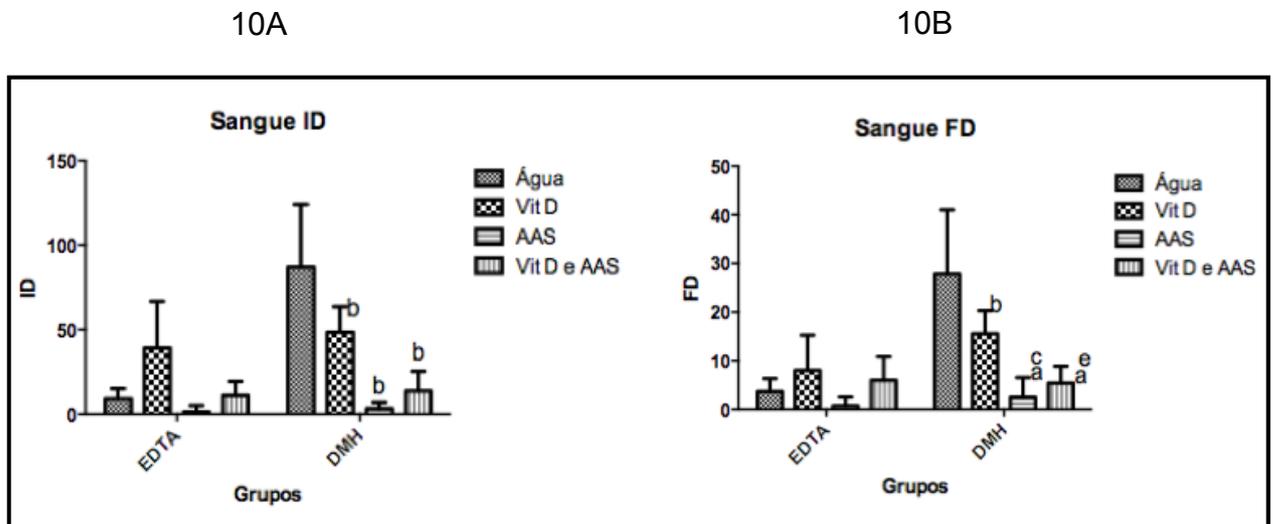
Tabela 2 - Análise de ID e FD no DNA de células hematopoiéticas e hepáticas, de camundongos machos e fêmeas considerando as diferentes intervenções

Grupos	Análise	Sangue			Fígado		
		Fêmeas	Machos	Total	Fêmeas	Machos	Total
Água + EDTA	ID	17,50 ± 18,72	11,00 ± 5,03	14,25 ± 13,16	51,75 ± 51,75	55,75 ± 18,39	53,75 ± 13,25
	FD	7,50 ± 8,10	3,75 ± 2,63	5,62 ± 5,93	19,25 ± 1,50	18,00 ± 4,08	18,63 ± 2,92
Água + DMH	ID	89,00 ± 45,81	76,00 ± 30,24	82,50 ± 36,60	183,6 ± 31,13	170,4 ± 29,30	177,0 ± 29,33
	FD	23,50 ± 8,50	22,25 ± 5,18	22,88 ± 6,56	64,20 ± 10,18	58,40 ± 10,99	61,30 ± 10,45
Vitamina D + EDTA	ID	28,0 ± 039,60	30,33 ± 24,01	28,80 ± 25,96	34,60 ± 22,33	49,60 ± 28,61	52,63 ± 14,14
	FD	8,00 ± 9,90	8,00 ± 7,55	8,00 ± 7,28	13,80 ± 8,786	16,40 ± 9,182	18,88 ± 3,643
AAS + EDTA	ID	9,33 ± 14,05	7,16 ± 8,68	8,25 ± 11,19	54,17 ± 16,02	67,00 ± 14,31	60,58 ± 15,96
	FD	3,00 ± 4,19	5,00 ± 4,73	4,00 ± 4,39	22,33 ± 7,47	25,50 ± 5,46	23,92 ± 6,46
Vitamina D e AAS + EDTA	ID	12,80 ± 9,23	15,40 ± 19,54	11,00 ± 8,26	49,80 ± 9,39	35,40 ± 15,55	35,00 ± 15,52
	FD	4,60 ± 1,71	4,80 ± 5,76	6,00 ± 4,90	17,00 ± 2,55	12,20 ± 4,44	15,13 ± 4,581
Vitamina D + DMH	ID	57,00 ± 12,78	34,00 ± 9,90	11,00 ± 8,26	43,00 ± 13,59	59,00 ± 13,11	51,00 ± 15,03
	FD	18,00 ± 4,69	11,00 ± 3,36	14,43 ± 5,74	15,50 ± 3,11	20,50 ± 2,52	18,00 ± 3,742
AAS + DMH	ID	1,00 ± 2,00	2,50 ± 5,00	1,75 ± 3,61	57,20 ± 13,01	48,20 ± 31,16	52,70 ± 23,00
	FD	0,20 ± 0,44	1,00 ± 2,23	0,60 ± 1,58	22,60 ± 5,68	17,20 ± 10,71	19,90 ± 8,57
Vitamina D e AAS + DMH	ID	13,67 ± 10,78	10,17 ± 9,09	48,43 ± 15,06	42,00 ± 14,90	54,40 ± 12,78	42,38 ± 13,75
	FD	4,17 ± 3,43	3,50 ± 3,51	5,13 ± 3,27	16,80 ± 5,07	19,40 ± 4,72	18,88 ± 8,306

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média. CN (controle negativo), CP (controle positivo), Vit D (vitamina D), AAS (ácido acetilsalicílico), EDTA (sal dissódico) e DMH (1,2-dimetilhidrazina), CA (criptas aberrantes) e FCA (focos de criptas aberrantes), ID (Índice de Dano) e FD (Frequência de dano). *diferença significativa em relação ao grupo CN p<0,05 (ANOVA, Bonferroni).
Fonte: Dados do autor (2017).

Quando avaliados o índice e a frequência de dano (ID e FD, respectivamente) tanto em sangue como no fígado, o grupo de animais expostos a DMH (controle positivo) apresentou um aumento significativo de danos ao DNA quando comparados ao grupo água /EDTA (controle negativo) ($p < 0,0001$; Bonferroni), confirmando o potencial genotóxico da DMH. (Respectivamente Figuras 10A e 10B).

Figura 10 - ID (A) e FD (B) no DNA de células de sangue de camundongos tratados VitD e AAS, e submetidos ao modelo experimental de câncer colorretal com DMH avaliados através do ensaio cometa alcalino



(^a) Diferença significativa em relação ao grupo VitD&AAS + DMH $p < 0,05$ (a) Diferença significativa em relação ao grupo Água + DMH $p < 0,0001$. (b) Diferença significativa em relação ao grupo VitD + DMH $p < 0,05$. (c) Diferença significativa em relação ao grupo Água + DMH $p < 0,001$. (d) Diferença significativa em relação ao grupo AAS + DMH $p < 0,05$. ANOVA de duas vias; *Post Hoc* de Bonferroni.
Fonte: Dados do autor (2017).

Por outro lado, comparando os animais dos grupos intervenção (VitD; AAS e AAS+VitD) que receberam EDTA com os mesmos grupos que receberam DMH quanto ao ID e FD, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$; Bonferroni).

Entre os grupos de intervenção que receberam DMH, todos apresentaram diferença significativa em relação ao grupo água/DMH revelando menor ID e FD ao DNA nos animais que receberam os agentes quimiopreventivos ($p < 0,001$; Bonferroni).

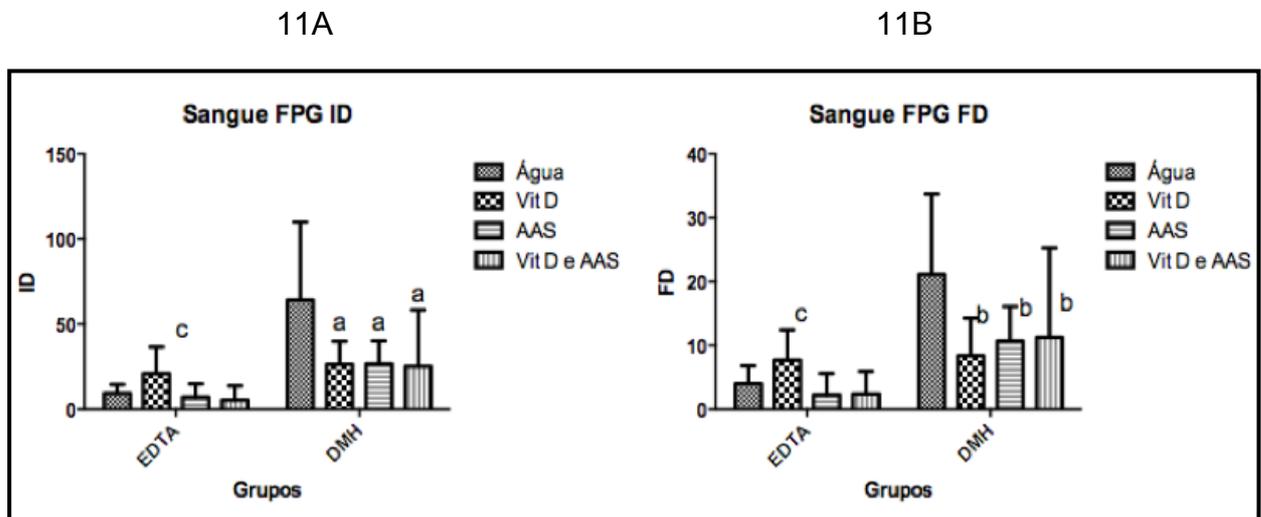
Ao comparar-se os grupos de intervenção (VitD, AAS, AAS+VitD / DMH) entre si quanto ao ID e FD, houve diferença estatística entre VitD vs. AAS e VitD vs.

VitD+AAS embora menos expressiva quando comparados aos animais do grupo água/DMH, demonstrando que o ID foi menor no grupo AAS e quando este foi associado a VitD ($p < 0,001$; Bonferroni). Em outras palavras, o AAS parece ter efeito anti-genotóxico mais efetivo quando comparado a VitD.

Para avaliação do ID e FD oxidativos no DNA de células do sangue, foi utilizada a versão do ensaio cometa alcalino modificado com a enzima FPG. Da mesma forma que no ensaio cometa alcalino, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos água/EDTA e água/DMH ($p < 0,001$; Bonferroni). Entre os grupos que receberam EDTA não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$; Bonferroni).

Entretanto, foi observado que os grupos VitD/DMH, AAS/DMH e o VitD e AAS /DMH apresentaram uma redução significativa tanto no ID como FD em relação ao grupo Água/DMH ($p < 0,01$ para ID e $p < 0,05$ para FD; Bonferroni). (Respectivamente Figuras 11A e 11B).

Figura 11 - ID (A) e FD (B) oxidativos no DNA de células de sangue de camundongos tratados VitD e AAS, e submetidos ao modelo experimental de câncer colorretal com DMH avaliados através do ensaio cometa alcalino modificado com a enzima FPG.



(a) Diferença significativa em relação ao grupo Água + DMH $p < 0,01$. (b) Diferença significativa em relação ao grupo Água + DMH $p < 0,05$. (c) Diferença significativa em relação ao grupo VitD + DMH $p < 0,05$. ANOVA de duas vias; *Post Hoc* de Bonferroni.

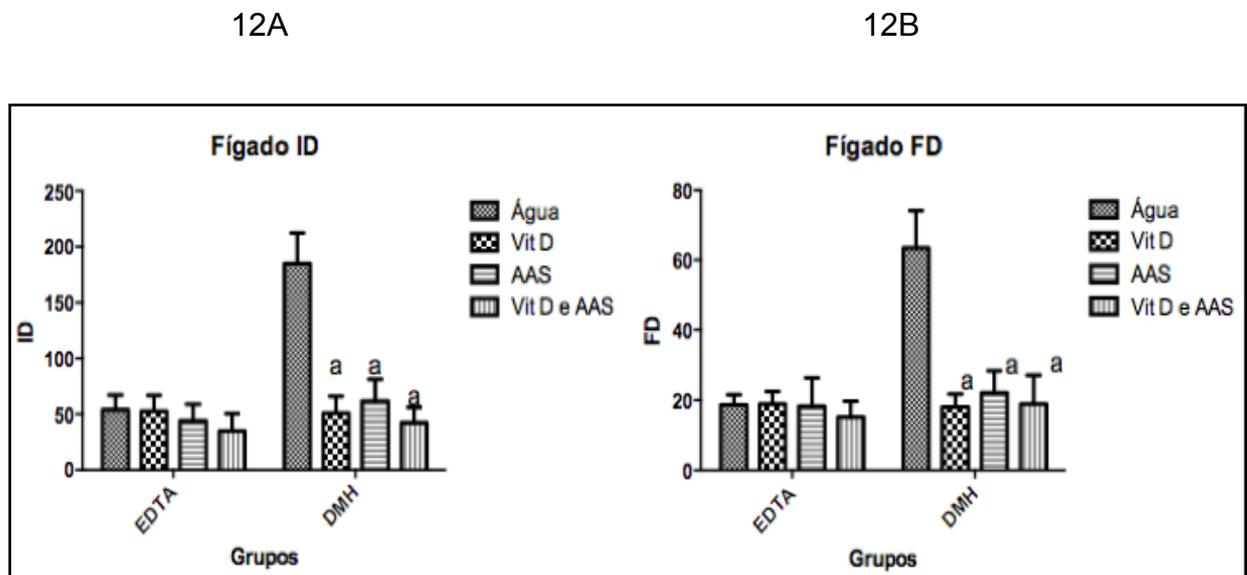
Fonte: Dados do autor (2017).

O ensaio cometa foi realizado também em amostras de tecido hepático após a laparotomia mediana. A semelhança dos indicadores acima descritos

avaliados no sangue, o ID e FD ao DNA em células hepáticas foi significativamente maior no grupo água /DMH quando comparado ao água/EDTA ($p < 0,001$; Bonferroni).

Entre os grupos que receberam EDTA, não houve diferença significativa quanto ao ID e FD no tecido hepático ($p > 0,05$; Bonferroni). De outra forma, quando os grupos de intervenção/DMH foram avaliados e comparados ao grupo água/DMH, houve diferença estatisticamente significativa entre o controle positivo e os grupos intervenção ($p < 0,001$; Bonferroni). (Respectivamente Figuras 12A e 12B).

Figura 12 - ID (A) e FD (B) oxidativos no DNA de células de sangue de camundongos tratados com VitD e AAS, e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH avaliados através do ensaio cometa alcalino modificado com a enzima FPG

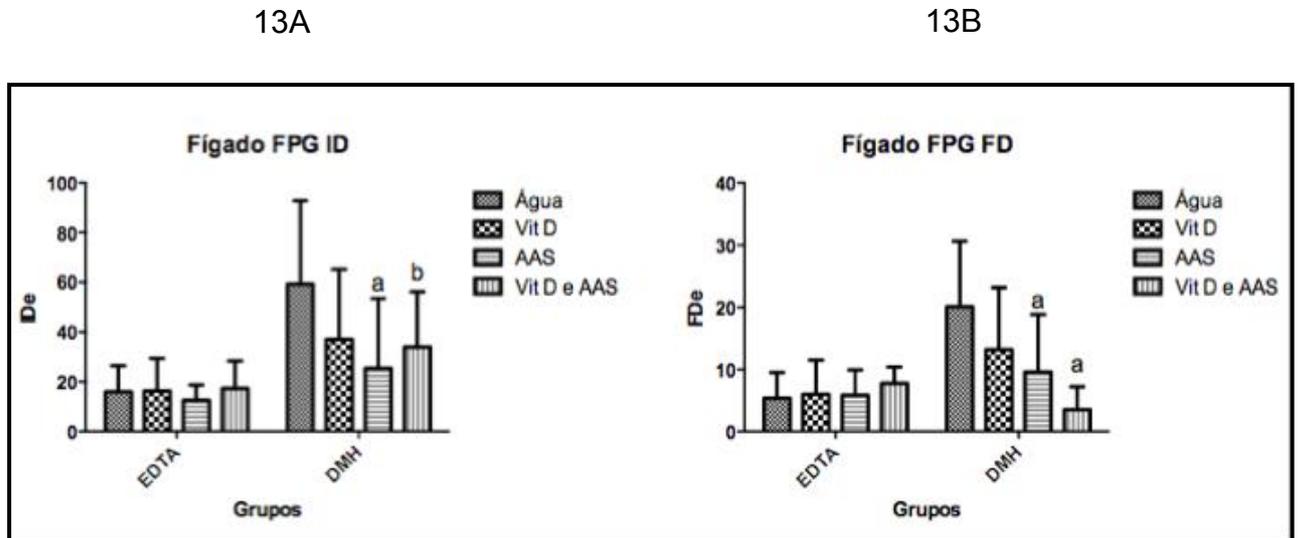


(^a) Diferença significativa em relação ao grupo Água + DMH $p < 0,01$. (^b) Diferença significativa em relação ao grupo Água + DMH $p < 0,05$. Dados expressos em média \pm desvio padrão (ANOVA de 2 vias, post hoc de Bonferroni)

Fonte: Dados do autor (2017).

Em relação ao ID e FD oxidativos no DNA das células hepáticas, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos água/EDTA e água/DMH ($p < 0,01$; Bonferroni). Entretanto, entre os grupos que receberam EDTA, não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$; Bonferroni). Houve redução significativa tanto do ID quanto FD oxidativo nos grupos AAS/DMH e AAS e VitD/DMH quando comparados ao grupo Água/DMH ($p < 0,05$; Bonferroni). (Respectivamente Figuras 13A e 13B).

Figura 13 - A e B - ID(A) e FD(B) oxidativos no DNA de células hepáticas de camundongos tratados com VitD e AAS combinados e isolados, submetidos ao modelo experimental de câncer colorretal com DMH avaliados através do ensaio cometa alcalino modificado com enzima



(a) Diferença significativa em relação ao grupo Água + DMH $p < 0,01$. (b) Diferença significativa em relação ao grupo Água + DMH $p < 0,05$. Dados expressos em média \pm desvio padrão (ANOVA de duas vias, post hoc de Bonferroni).
Fonte: Dados do autor (2017).

5.3 AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO

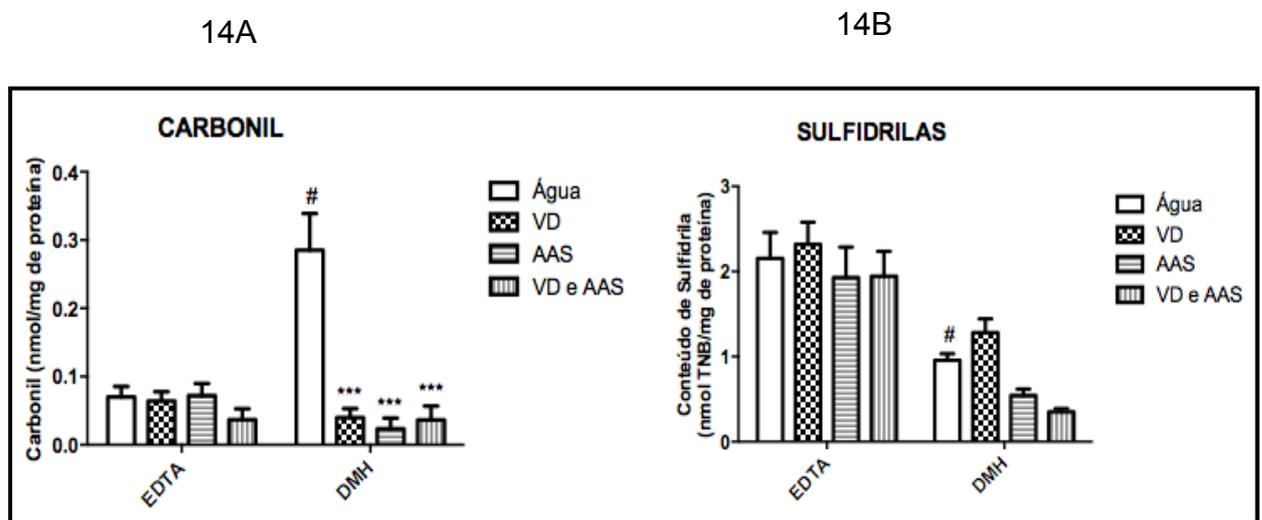
A avaliação do estresse oxidativo foi dividida na análise de marcadores de estresse oxidativo e análise enzimática do sistema antioxidante segundo sistematização exposta no item 3.8, 3.9 e 3.10. Esta avaliação foi realizada no tecido colônico e hepático removidos de camundongos durante a laparotomia mediana.

5.3.1 Avaliação do estresse oxidativo no cólon

Entre os marcadores de estresse oxidativo conhecidos, o presente estudo analisou a carbonilação de proteínas e o conteúdo de sulfidrilas. A oxidação de proteínas demonstrada pela quantificação de proteínas carboniladas foi significativamente maior no grupo água/DMH quando comparado ao grupo água/EDTA ($p < 0,01$; Bonferroni), bem como na comparação com os três grupos de intervenção (VitD, AAS e AAS+VitD $p < 0,001$). (Figura 14A). Por outro lado, entre os grupos que receberam EDTA não houve diferença significativa $p > 0,05$; Bonferroni).

Em relação a detecção de tióis totais (Grupos Sulfidrilas) os resultados foram diferentes, demonstrando apenas diferença estatisticamente significativa entre os grupos água /DMH e água/EDTA ($p < 0,01$; Bonferroni). (Figura 14B). De outra forma, entre os grupos que receberam EDTA não houve diferença na detecção de tióis totais entre os grupos ($p > 0,05$; Bonferroni).

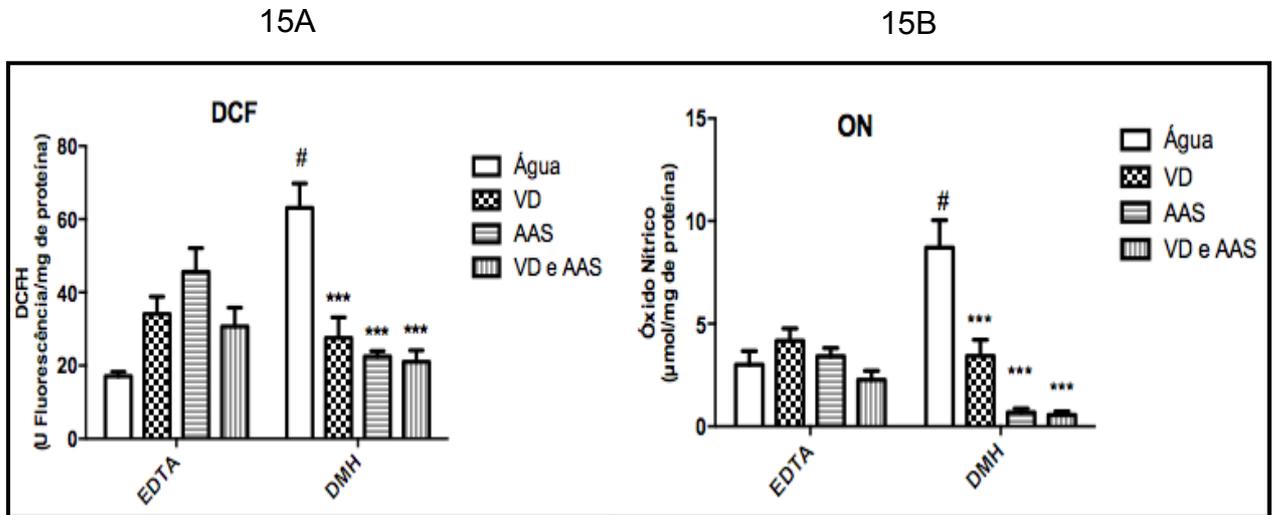
Figura 14 - 14A e 14B. Análise da carbonilação de proteínas e conteúdo de sulfidrilas em animais submetidos ao modelo experimental de câncer colorretal com DMH precoces da carcinogênese colorretal (CAs & FCAs)



Análise da carbonilação de proteínas e conteúdo de sulfidrilas em animais submetidos ao modelo experimental de câncer colorretal com DMH avaliados. # Diferença significativa em relação ao grupo Água + EDTA $p < 0.01$. ***Diferença significativa em relação
 Fonte: Dados do autor (2017).

A diclorofluoresceína (DCF) e o óxido nítrico (NO) mostraram atividade significativamente maior no grupo água/DMH quando comparado a o grupo água/EDTA ($p < 0,0001$; Bonferroni). Entre os grupos que receberam EDTA não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$; Bonferroni). Quando comparados grupo água/DMH e os grupos intervenção/DMH houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$; Bonferroni) (Figura 15A e 15B). Estes marcadores oxidativos não só demonstram que o modelo foi eficiente em gerar estresse oxidativo, como também tiveram seus níveis intracelulares diminuídos nos grupos intervenção revelando o caráter protetor do AAS e Vitamina D isolados e combinados.

Figura 15 - A e B - Análise da atividade da diclorofluoresceína e óxido nítrico em animais submetidos ao modelo experimental de câncer colorretal com DMH avaliados



*** Diferença significativa em relação ao grupo Água + DMH $p < 0.001$. # Diferença significativa em relação ao grupo Água + DMH $p < 0.0001$. Dados expressos em média \pm erro padrão (ANOVA de 2 vias, post hoc de Bonferroni).

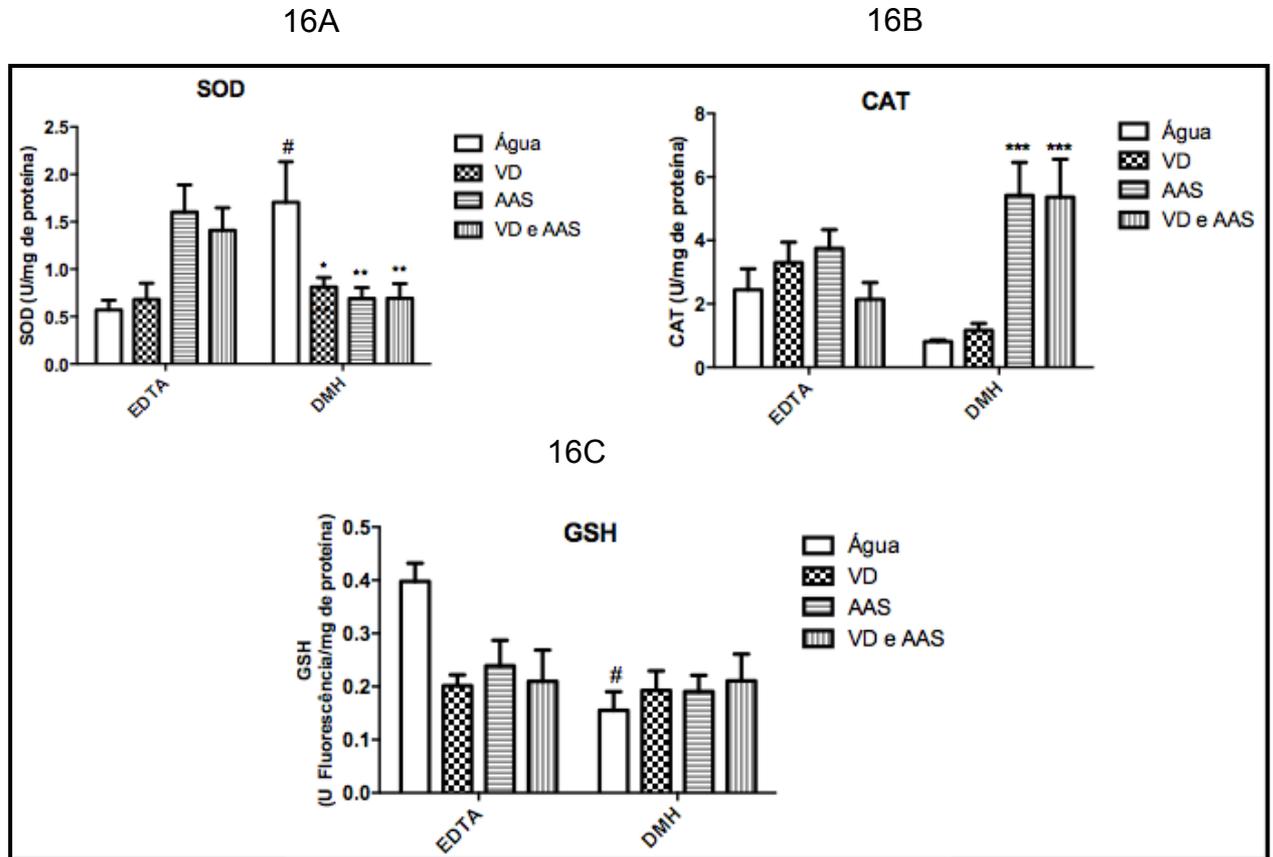
Fonte: Dados do autor (2017).

A atividade do sistema antioxidante também foi avaliada através das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), e pelos níveis totais de glutathiona (GSH). Todos os sistemas antioxidantes demonstraram diferença entre os grupos água/EDTA e água/DMH ($p < 0,001$; Bonferroni), mostrando que o modelo proposto pelo estudo foi capaz de gerar estresse oxidativo. A atividade da SOD demonstrou diferença entre o grupo água/DMH e os grupos intervenção/DMH, bem como diferença entre os grupos intervenção/DMH e água/DMH ($p < 0,001$; Bonferroni). Por outro lado, não houve diferença significativa entre os grupos que receberam EDTA ($p > 0,05$; Bonferroni).

De outra forma, a análise da CAT não revelou diferença estatisticamente significativa entre o grupo água/DMH e água/EDTA ($p > 0,05$; Bonferroni), porém os grupos que receberam AAS/DMH e AAS+VitD/DMH foram diferentes em relação ao controle água/DMH ($p < 0,001$; Bonferroni).

A atividade da GSH, por sua vez, não demonstrou diferença significativa entre os grupos que receberam DMH ($p > 0,05$; Bonferroni), exceto pela diferença evidenciada entre os grupos água/DMH e água/EDTA ($p < 0,001$; Bonferroni). (Respectivamente Figuras 16A, 16B e 16C).

Figura 16 - A, B e C - Análise do sistema antioxidante através da atividade da SOD, CAT e GSH, respectivamente, em animais submetidos ao modelo experimental de câncer colorretal com DMH



* Diferença significativa em relação ao grupo água+ DMH p <0,05 **Diferença significativa em relação ao grupo Água+DMH p <0,01 ***Diferença significativa em relação ao grupo Água + DMH p<0.001. # Diferença em relação ao grupo água/EDTA p < 0,001. Dados expressos em média \pm erro padrão (ANOVA de duas vias, post hoc de Bonferroni).

Fonte: Dados do autor (2017).

5.4 AVALIAÇÃO DE CRIPTAS ABERRANTES (CAs) E FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES (FCAs)

A presença de criptas aberrantes foi avaliada seguindo a sistematização descrita no item 4.6. Dessa forma, foram avaliados os números de criptas aberrantes (CAs) e focos de criptas aberrantes (FCAs) no cólon dos camundongos tratados com vitamina D e AAS e submetidos ao modelo experimental de CCR com DMH. Inicialmente, 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* de Student). (Tabela 3). Logo, todas as comparações entre os grupos se darão com o total de animais (fêmeas e machos).

Tabela 3 - Análise comparativa do número de criptas aberrantes (CAs) e focos de criptas aberrantes (FCAs) encontrado no cólon de camundongos machos e fêmeas tratados com Vitamina D, AAS, Vitamina D+ AAS nos diferentes grupos

Grupos		Nº de CA	Total	Nº de FCA	Total
Água / EDTA	Fêmeas	0,25 ± 0,50	0,50 ± 0,57	0,12 ± 0,25	0,37 ± 0,44
	Machos	0,75 ± 0,64		0,62 ± 0,47	
Água / DMH	Fêmeas	7,30 ± 4,89	8,80 ± 4,80	3,30 ± 1,75	4,00 ± 1,73
	Machos	10,30 ± 4,72		4,70 ± 1,56	
Vitamina D / EDTA	Fêmeas	0,60 ± 0,65	0,60 ± 0,74	0,60 ± 0,65	0,60 ± 0,74
	Machos	0,60 ± 0,89		0,60 ± 0,89	
AAS / EDTA	Fêmeas	0,50 ± 1,00	0,41 ± 0,87	0,25 ± 0,41	0,20 ± 0,39
	Machos	0,33 ± 0,81		0,16 ± 0,40	
Vitamina D e AAS / EDTA	Fêmeas	0,40 ± 0,89	0,90 ± 0,97	0,40 ± 0,55	0,41 ± 0,54
	Machos	1,10 ± 0,74		0,50 ± 0,61	
Vitamina D / DMH	Fêmeas	3,00 ± 1,41	2,38 ± 1,41	1,50 ± 0,70	1,31 ± 0,65
	Machos	1,75 ± 1,26		1,12 ± 0,63	
AAS / DMH	Fêmeas	2,50 ± 2,26	2,85 ± 2,16	1,50 ± 1,22	1,65 ± 1,02
	Machos	3,20 ± 2,25		1,80 ± 0,90	
Vitamina D e AAS / DMH	Fêmeas	2,33 ± 1,63	2,79 ± 1,86	1,83 ± 1,40	1,71 ± 1,27
	Machos	3,25 ± 2,12		1,58 ± 1,24	

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média. CN (controle negativo), CP (controle positivo), Vit D (vitamina D), AAS (ácido acetilsalicílico), EDTA (sal dissódico) e DMH (1,2-dimetilhidrazina), CA (criptas aberrantes) e FCA (focos de criptas aberrantes).
 Fonte: Dados do autor (2017).

Os resultados do número total de CA e FCA por grupo estão apresentados na tabela 3 abaixo. Dessa forma, pode-se observar aumento significativo do número médio CA e FCA no grupo que recebeu água/DMH (Controle positivo) em comparação com o grupo água/EDTA (Controle negativo) ($p < 0,0001$; Bonferroni). Entre os animais do grupo EDTA, não houve diferença significativa na avaliação das CAs e FCAs ($p > 0,05$; Bonferroni).

Quando os FCAs foram analisados separadamente em 3 grupos (1 cripta; 2-3 criptas; 4-7 criptas), os resultados foram similares aos mostrados na análise comparativa das CAs. Os animais do grupo água/DMH apresentaram focos com maior número de criptas quando comparados ao grupo água/EDTA, demonstrando que a indução química desencadeou mais estados hiperproliferativos e maior tendência a carcinogenicidade conforme estudos prévios. Por outro lado, as intervenções farmacológicas (VitD/DMH, AAS/DMH e VitD+AAS/DMH) mostraram reduzir o número médio de FCAs quando comparados ao grupo água/DMH ($p < 0,0001$; Bonferroni). (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise do número de CAs e FCAs no cólon distal de camundongos tratados com Vitamina D, AAS e Vitamina D + AAS em ambos os grupo (EDTA e DMH)

Grupos	Nº de CA	Nº de FCA	Nº de FCA com:		
			1 cripta	2-3 criptas	4-7 criptas
Água/EDTA	0,50 ± 0,59***	0,37 ± 0,44***	0,25 ± 0,37***	0,18 ± 0,37***	0,00 ± 0,00#
Água/DMH	10,44 ± 3,78	4,62 ± 1,24	1,93 ± 1,42	2,68 ± 0,92	0,31 ± 0,37
Vit D / EDTA	0,37 ± 0,58	0,37 ± 0,58	0,37 ± 0,58	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
AAS / EDTA	0,62 ± 1,02	0,31 ± 0,45	0,18 ± 0,25	0,18 ± 0,37	0,00 ± 0,00
Vit D e AAS / EDTA	0,50 ± 0,75	0,12 ± 0,23	0,18 ± 0,53	0,18 ± 0,37	0,06 ± 0,17
Vit D / DMH	2,37 ± 1,40***	1,31 ± 0,65***	0,68 ± 0,45***	0,68 ± 0,45***	0,00 ± 0,00#
AAS / DMH	3,43 ± 1,99***	1,87 ± 0,95***	0,87 ± 0,58***	1,06 ± 0,86***	0,00 ± 0,00#
Vit D e AAS / DMH	2,56 ± 1,45***	1,68 ± 1,22***	1,25 ± 1,06***	0,68 ± 0,37***	0,06 ± 0,17#

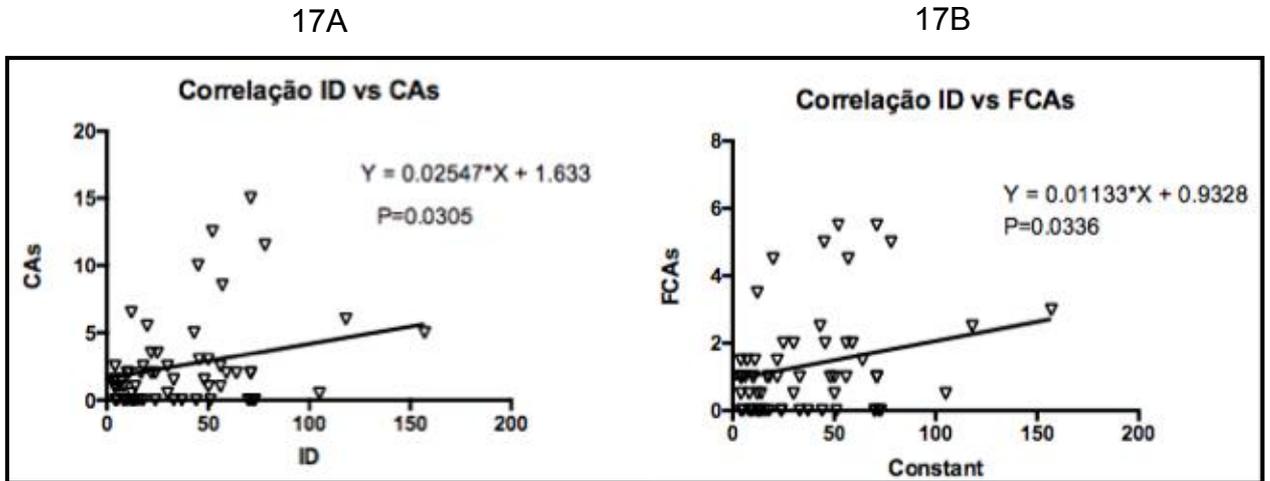
Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média. CN (controle negativo), CP (controle positivo), Vit D (vitamina D), AAS (ácido acetilsalicílico), EDTA (sal dissódico) e DMH (1,2-dimetilhidrazina), CA (criptas aberrantes) e FCA (focos de criptas aberrantes). *diferença significativa em relação ao grupo água/EDTA $p < 0,05$ #diferença significativa em relação ao grupo água/DMH $p < 0,05$, ***Diferença significativa em relação ao grupo CP $p < 0,0001$ (ANOVA de duas vias; Bonferroni). Fonte: Dados do autor (2017).

Dessa forma, os resultados do presente estudo demonstram que o modelo experimental de carcinogênese colorretal induzido com DMH foi efetivo pois gerou aumento de espécies reativas de oxigênio em ambiente intracelular, de marcadores de dano oxidativo bem como aumento na atividade anti-oxidante, especialmente da CAT nos grupos que receberam intervenção quimiopreventiva. Como consequência do estresse oxidativo proeminente, o índice de dano e a frequência de dano, tanto alcalino como enzimático, se mostrou elevado no grupo água/DMH (Controle positivo), e reduzido nos grupos de intervenção demonstrando o caráter protetor das substâncias estudadas. Estes dados estão em consonância com a expressão fenotípica das criptas aberrantes, que foram mais numerosas no grupo água/DMH e minimizadas pela ação das intervenções quimiopreventivas.

5.5 CORRELAÇÃO ENTRE DANO AO DNA E CRIPTAS ABERRANTES

Buscando-se estabelecer análise comparativa entre mecanismo genotóxico e expressão fenotípica, o autor realizou correlação entre dano ao DNA no sangue, CAs e FCAs. Analisando-se, separadamente, indicadores de dano ao DNA (ID & FD), indicadores de dano oxidativo e ocorrência de criptas, observou-se correlação linear positiva entre ID, FD e CAs (Coef. de Pearson; $p=0.0305$, $r = 0.2406$) Esta correlação foi observada também entre os marcadores supracitados e FCAs (Coef. de Pearson; $p=0,0336$, $r = 0.2365$). As figuras 17A, 17B, 18A e 18B mostram a FCAs e índice e frequência de dano e a correlação entre CAs, (FD e ID, respectivamente).

Figura 17 - A e B - Correlação entre indicadores de genotoxicidade (FD) no sangue e marcadores fenotípico precoce da carcinogênese colorretal (CAs & FCAs) / ($r = 0.2799$ e $r = 0.2686$, respectivamente)



Fonte: Dados do autor (2017).

Figura 18 - A e B - Correlação entre indicadores de genotoxicidade (ID) no sangue e marcadores precoces da carcinogênese colorretal (CAs e FCAs)

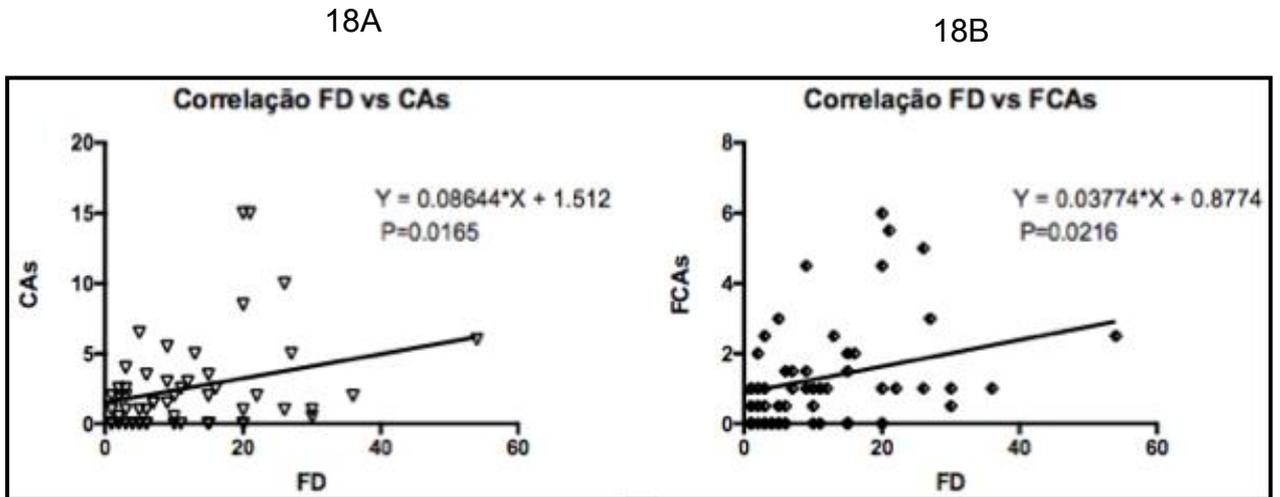
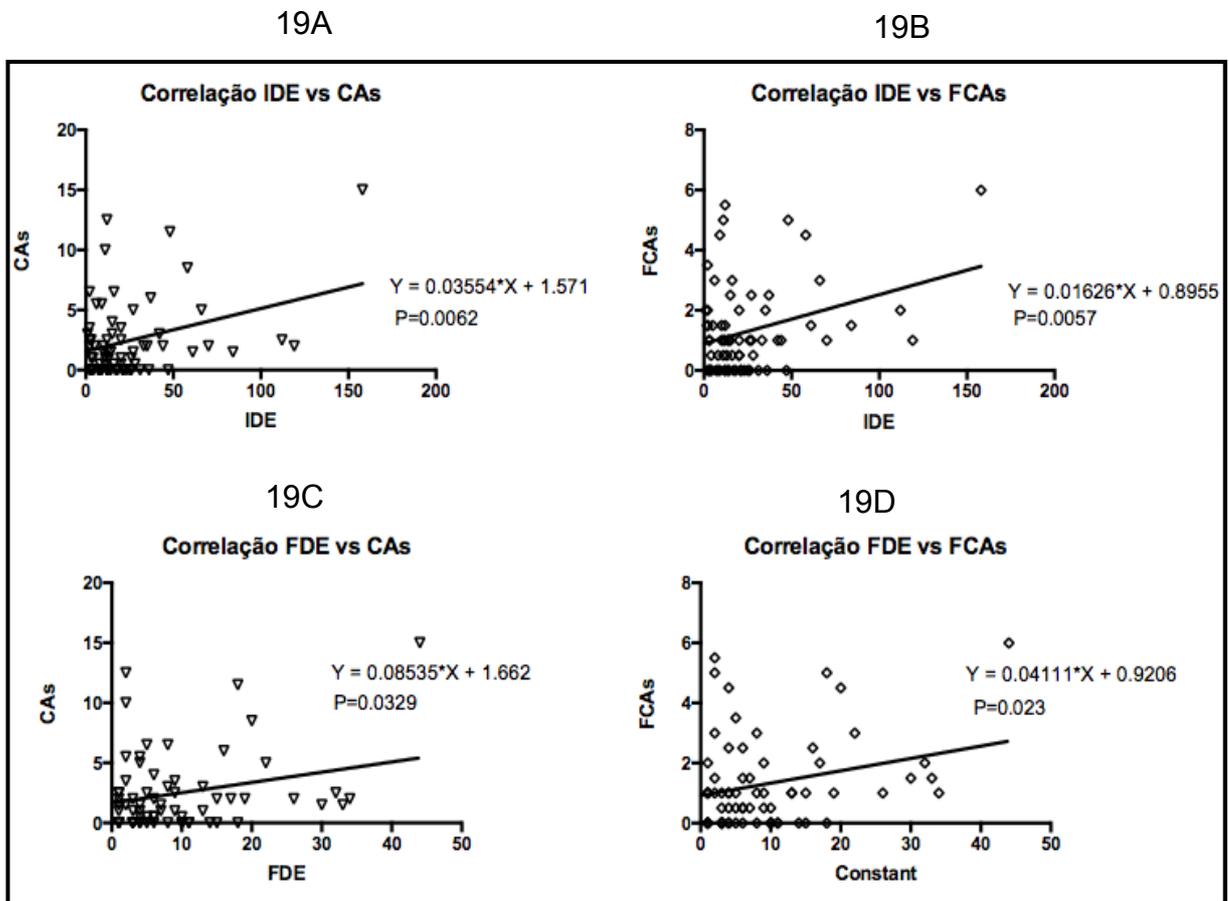


Figura 19 - A, B, C e D - Correlação entre indicadores de genotoxicidade (IDe/FDe) no sangue e carcinogênese (CAs & FCAs) / ($r = 0.3015$ e $r = 0.3047$)



Fonte: Dados do autor (2017).

Quando essa correlação foi testada entre CAs, FCAs e IDe e FDe oxidativos ao DNA, os resultados foram mais expressivos demonstrando que mesmo danos mais seletivos relacionados a oxidação da molécula de DNA foram significativos e correlacionaram-se a formação de criptas aberrantes e seus focos. As figuras 19A, 19B, 19C e 19D demonstra a correlação entre CAs, FCAs, IDe e FDe.

6 DISCUSSÃO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tumor mais frequente no mundo. Seu prognóstico está relacionado ao estágio no momento da detecção, ou seja, quanto mais precoce maiores as chances de cura. (Hagggar et al., 2009). Apesar da evolução na qualidade assistencial, com melhorias no tratamento oncológico, o CCR permanece um enorme problema de saúde pública por conta das baixas taxas de detecção precoce e de estratégias de prevenção primária ainda carecendo de normatização definitiva. (American Cancer Society, 2014).

Nesse contexto, o uso de substâncias químicas em indivíduos saudáveis com a intenção de bloquear, reverter ou retardar a progressão da carcinogênese vêm sendo estudado intensamente nas últimas décadas. (Chan et al., 2005). Em relação ao câncer colorretal, particularmente, vários medicamentos foram estudados demonstrando um papel promissor em frear as etapas iniciais da transformação maligna. (Ezuka et al., 2015). Neste estudo buscou-se aprofundar os conhecimentos a respeito dos efeitos quimiopreventivos de duas substâncias especificamente (Ácido Acetilsalicílico e Vitamina D), utilizando para isso um modelo experimental de câncer colorretal induzido por DMH.

A DMH historicamente vem sendo utilizada em modelos animais de carcinogênese colorretal há cerca de 20 anos, demonstrando sua eficácia e reprodutibilidade. (Heyer et al., 1999). De custo significativamente menor quando comparada ao seu metabólito Azoximetano, a DMH pode ser utilizada em doses diferentes e em protocolos de diferentes durações de acordo com o objetivo do estudo. Os protocolos que estudam a ocorrência de adenomas e carcinomas habitualmente são mais longos, em torno de 30-40 semanas. (Jacobi et al., 1991; Jackson et al., 1999). Contrariamente, nos estudos que utilizam azoximetano (AOM) na indução da carcinogênese, o surgimento de FCAs, adenomas e carcinomas ocorre mais precocemente. Takahashi et al. (2012) administraram AOM - em ratos da linhagem F344 - na dose de 15 mg/kg/semana por via subcutânea por duas semanas, observando o aparecimentos de FCAs logo após este período, protocolo esse preconizado também por Bousserouel et al. (2009). Importante ressaltar que algumas linhagens são mais sensíveis aos agentes carcinógenos, possuindo influência decisiva no estudo da cascata carcinogênica. O estudo de Wan Li et al. (2016), avaliando o efeito sinérgico da vitamina D e Metformina em modelo de carcinogênese

colorretal, os animais foram induzidos com DMH administrada semanalmente durante 18 semanas. Os autores observaram lesões pré-neoplásicas em diferentes estágios evolutivos. No presente estudo, o protocolo foi constituído por 4 aplicações de DMH por via subcutânea na 4ª e 5ª semanas, e teve duração de 12 semanas, sendo um dos objetivos estudar o surgimento de criptas aberrantes, que constituem o biomarcador mais precoce na carcinogênese colorretal. Além disso, a escolha da DMH como agente indutor de carcinogênese foi embasada na premissa de que ela induz as características fisiopatológicas e bioquímicas que mais se assemelham ao CCR esporádico, conforme já demonstrado nos estudos de Thurnerr et al. (1973) e de Deschner et al. (1977).

O presente estudo mostrou uma diminuição significativa no consumo de líquidos em todos os grupos, exceto o grupo Água / EDTA (controle negativo). Nos animais expostos à DMH, principalmente no grupo Água / DMH, que não recebeu nenhum tratamento de intervenção, essa diminuição pode ser atribuída a maior 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 utilizadas para avaliar o potencial metastático do CCR. (Lafreniere e Rosenberg, 1986; Casillas et al., 1997). Nos grupos que receberam AAS, a diminuição do consumo pode ser relacionada a palatabilidade do AAS, pois o mesmo foi diluído na água e oferecido por via oral.

Diversos estudos têm documentado que a agressão contínua atribuída às EROs promove inflamação crônica, alterando assim a arquitetura do epitélio colônico, o que predispõe a estados hiperproliferativos e instabilidade genômica progressiva, conforme já postulado por Ribeiro et al. (2007). Com o advento da técnica da eletroforese em gel de célula única (ensaio do cometa) é possível quantificar-se os níveis de danos oxidativos ao DNA em uma célula isolada. O ensaio cometa permite a medida dos níveis de estresse oxidativo em pequenos fragmentos de tecido, possibilitando o estudo comparativo entre células normais e neoplásicas da mucosa cólica nos diversos estágios do desenvolvimento do CCR. Além disso, essa técnica pode ser utilizada na avaliação de genotoxicidade em estratégias quimiopreventivas no CCR. (Pedro et al., 2016; Alves et al., 2017).

O dano em DNA, utilizando-se o ensaio cometa, foi avaliado no presente estudo - no sangue e fígado- através de dois indicadores: índice de dano (ID) e frequência de dano (FD). À semelhança de seu efeito comprovadamente carcinogênico, a DMH também provou ser poderoso agente genotóxico ao gerar maior dano oxidativo a molécula de DNA, achado já evidenciado por Bazo et al. (2002). Este efeito foi bem documentado em nosso estudo, pelo aumento no índice e frequência de dano tanto no sangue como no tecido hepático no grupo água/DMH em comparação ao grupo água/EDTA. Da mesma forma, Hobbs et al. (2015), avaliando três doses de DMH potencialmente genotóxicas através do ensaio cometa, observaram aumento de dano em DNA de células hepáticas com as diferentes dosagens.

O ensaio cometa com FPG, técnica que detecta dano oxidativo ao DNA, também demonstrou semelhança nos resultados, tanto em sangue como no tecido hepático. Entre os grupos que receberam água/EDTA não houve diferença significativa, porém a mesma foi observada nos grupos DMH que receberam as 3 intervenções em relação ao controle positivo (água/DMH), reforçando a ação antigenotóxica da vitamina D e AAS e de sua combinação. Esta redução do dano oxidativo promovida pela vitamina D e evidenciada no presente estudo pode ser explicada através de sua ação sobre diferentes genes de reparação de dano à molécula de DNA durante o ciclo celular, reduzindo assim estados hiperproliferativos e anti-apoptóticos. (Refaat et al., 2015). De outra forma, a ação antigenotóxica do AAS pode ser explicada por sua ação inibidora sobre a ciclooxigenase (COX), enzima que catalisa a formação da prostaglandina E2 (PGE2) a partir do ácido aracdônico, e que ativaria cascatas de sinalização redox, induzindo maior estresse e dano oxidativo ao DNA, conforme postulado por Tsioulis et al. (2015). Além disso, a ação do AAS - já comprovada em estudos experimentais - tem propriedades anti-proliferativas e pró-apoptóticas, o que poderia explicar a redução no status hiperproliferativo característico das criptas aberrantes. (Shpitz et al., 2003).

Evidências crescentes suportam a premissa de que EROs e ERNs possuem papel progenitor na carcinogênese colorretal. A atividade tanto de marcadores de estresse oxidativo como dos principais sistemas anti-oxidantes enzimáticos foi avaliada no presente estudo. A oxidação de proteínas demonstrada pela carbonilação das mesmas ficou bem evidenciada na comparação entre os grupos água/EDTA versus água/DMH. Este achado foi demonstrado também na avaliação e

detecção de grupos sulfidrilas, evidenciando que a DMH isolada foi capaz de induzir níveis maiores de oxidantes e danos oxidativos. Estes mecanismos podem explicar alterações moleculares tais como, inativação de enzimas de reparo do DNA promovendo maior dano oxidativo a molécula. Além disso, o acúmulo de proteínas oxidadas, expressão dos produtos da carbonilação protéica, não são degradadas pelo proteossoma gerando seu acúmulo e consequente disfunção celular, conforme descrito por Shringarpure et al. (2002). Por outro lado, as substâncias quimiopreventivas foram efetivas em frear a oxidação de proteínas, mas não foram efetivas em relação aos grupos sulfidrilas. Estes argumentos dão substrato para o entendimento das alterações moleculares e fenotípicas do CCR.

A análise da diclorofluoresceína (DCF) e o óxido nítrico (ON) também mostraram atividade significativamente maior no grupo água/DMH quando comparados ao grupo água/EDTA e aos grupos de intervenção. Esse dado demonstra que os níveis aumentados de DCF oxidada no grupo água/DMH sugere indiretamente a presença de altos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). (Padayatty et al., 2003).

Sabe-se que altas concentrações desse radical têm papel importante na função celular, estimulando proliferação e mediando ativação da COX-2 e metaloproteinases (MMPs), conforme descreve Pai et al. (2002). Esse mecanismo, uma vez presente, em nosso estudo poderia explicar o estado hiperproliferativo representado pelos FCAs.

No presente estudo, a atividade do ON se mostrou significativamente aumentada no grupo água/DMH em relação ao grupo água/EDTA. Contudo, nos grupos intervenção/DMH, a atividade do ON se mostrou significativamente diminuída com as três intervenções, sugerindo que estas foram efetivas em minimizar o estresse oxidativo por essa via. Sabe-se que o ON resulta da transcrição e translação da via iNOS. A atividade aumentada do ON pode estar associada com a expressão de proteínas associadas a apoptose, tais como Bcl-2, Bax e Fas. (Xie et al., 2003). Além disso, a excessiva produção de ON no estresse oxidativo poderia resultar em redução nas enzimas de reparo do DNA e inibir a apoptose através da nitrosilação de caspases (Rao, 2004), o que poderia corroborar os resultados do presente estudo.

O sistema anti-oxidante foi avaliado através da atividade da SOD, CAT e GHS. A atividade da SOD se mostrou aumentada no grupo que água/DMH em relação ao grupo água/EDTA. Estes resultados sugerem a sobrecarga do sistema antioxidante em virtude das altas concentrações de ânion superóxido, e alta conversão deste para

peróxido de hidrogênio. Ao contrário, a CAT mostrou atividade significativamente maior nos grupos que receberam AAS e AAS+VitD/DMH quando comparado ao grupo água/DMH. Este resultado explicaria a maior efetividade na remoção e neutralização de ERs durante o uso das substâncias quimiopreventivas acima citadas. A atividade da GSH foi significativamente menor no grupo água/DMH em comparação ao grupo água/EDTA, porém sem diferença em relação aos grupos de intervenção/DMH. Esta diferença na atividade da GSH pode ser explicada pela presença de peróxido de hidrogênio em concentrações elevadas, o qual estimula a captação de cisteína e a síntese de GSH conforme postulado por King et al. (2011).

Por sua vez, os microadenomas, que outrora eram considerados as lesões precursoras do CCR, abriram espaço nos últimos anos para os FCAs como marcadores precoces da cascata carcinogênica e parâmetro de avaliação em estratégias quimiopreventivas. (Cheng et al., 2003; Agner et al., 2005; Waly et al., 2014; Yang et al., 2016). Sendo assim, procuramos avaliar se o uso preventivo das substâncias acima citadas poderia reduzir a formação de CAs e FCAs no cólon médio-distal de camundongos. Os resultados deste estudo demonstraram que o papel da DMH como agente carcinogênico ficou bem estabelecido através do aumento expressivo na formação de CAs e FCAs com este agente alquilante, a semelhança do que já foi demonstrado por Agner et al. (2005) utilizando o mesmo esquema de indução com DMH de nosso estudo (80 mg/Kg/semana por 2 semanas em protocolo de 15 semanas de duração). Interessante observar que, provavelmente pelo tempo de exposição a DMH (15 semanas) e pelo esquema de doses de DMH somente na quarta e quinta semana, não houve formação de microadenomas e carcinomas à análise macroscópica dos cólons nos diferentes grupos analisados. Lokeshumar et al. (2015) avaliaram os efeitos quimiopreventivos do Mirtenal em modelo experimental, utilizando a DMH na dose de 20 mg/Kg/semana por 15 semanas. Estes autores observaram formação de tumores após 15 semanas de indução química (Lokeshumar et al., 2015), provavelmente atribuída a maior exposição ao agente carcinógeno.

Dessa forma, é importante salientar que existem diferentes protocolos de carcinogênese colorretal com diferentes tempos de indução, o que é de suma importância para o que se quer avaliar (Formação de criptas aberrantes, adenomas e/ou carcinomas). (Thumherr et al., 1973; Deschner et al., 1977). Takahashi et al. (1998) referem que a partir de 4-5 semanas de indução com DMH a análise da superfície mucosa colônica já revela FCAs. Por outro lado, Clap et al. (1998)

postularam que injeções semanais de DMH (20 mg/Kg/Semana) em camundongos *Balb-c* resultaram em alta incidência de tumores colônicos somente após 40 semanas de experimento. Aliado a isso, a formação de criptas aberrantes induzida pela DMH pode ser explicada pela presença de mutações no gene K-ras e na via da BC, via esta que promove hiperproliferação do epitélio colônico, conforme postulado por Kobaek-Larsen et al. (2000). Em suma, a DMH tem demonstrado que pode reproduzir de forma confiável - em caráter experimental - o CCR esporádico, na medida em que desencadeia a cascata de mutações genéticas com razoável semelhança aos humanos.

Quando os grupos de intervenção (VitD, AAS e VitD+AAS/DMH) foram analisados, a redução nas CAs e FCAs foi observada nos três grupos respaldando o caráter preventivo dos mesmos. Na realidade, a hipótese de que os AINEs - em especial a aspirina- poderiam prevenir o CCR, foi embasada em estudos que identificaram níveis mais altos de PGE2 em tecidos neoclássicos em comparação ao tecido normal. (Jaffe, 1974; Bennett et al., 1975; Sheehan et al., 1999). Takayama et al. (2016) demonstraram em elegante estudo a redução dos FCAs com o uso quimiopreventivo do Sulindac, AINE da mesma classe do AAS. Shpitz et al. (2003) avaliando o efeito supressor do AAS em indivíduos com CCR, demonstraram que houve uma redução de 50% de FCAs nos indivíduos usando AAS em baixa dose. Os resultados do presente estudo em relação ao AAS são respaldados por Bousserouel et al. (2009) que ao usarem a mesma dosagem que o presente estudo (6 mg/kg em água de beber), observaram redução de 50% na formação de FCAs. Assim como no estudo de Bousserouel et al. (2009), a redução desse estado hiperproliferativo que se inicia no fundo das criptas colônicas pode ser explicada pela ação inibitória não só sobre a via COX-dependente mas também em vias COX-independentes como NF-kB e WNT/BC que mediam inflamação e hiperproliferação descontrolada. (Tinsley et al., 2012; Tsioulis et al., 2015). Alguns estudos têm mostrado que a redução dos FCAs se dá de forma mais pronunciada nos segmentos mais distais em comparação ao cólon proximal. (Roy et al., 2001). Este fenômeno poderia ser explicado por maiores níveis de COX-2 no cólon e reto distais, favorecendo a ação do AAS nesta região do intestino. (Shiff et al., 1999). Em escala populacional, vários estudos têm relacionado a suplementação de AAS a menor incidência de CCR. Estudo de coorte publicado recentemente demonstrou redução de 31% na incidência de CCR com o uso de baixas doses de aspirina (75 mg) não se observando efeitos gastrintestinais significativos

(Cao et al., 2016). O tempo de quimioprofilaxia parece ter encontrado uma resposta no estudo de Garcia Rodriguez et al. (2017) que mostrou benefícios em reduzir a progressão da carcinogênese com uso de aspirina por mais de 5 anos.

Da mesma forma, em nosso estudo a suplementação com vitamina D se mostrou efetiva em reduzir a formação de FCAs, o que pode ser explicada de forma ampla por suas propriedades na regulação do ciclo celular, proliferação, diferenciação e angiogênese, conforme descrito por Milczarek et al. (2013) e Yang et al. (2016). Apesar da controvérsia que ainda ronda a dose ideal de suplementação de vitamina D no CCR, no presente estudo utilizamos a dose de 1500 UI/semana, conforme proposto por Refaat et al. (2015) que utilizou protocolo de 500 U/3 vezes na semana, observando redução na formação de adenomas/carcinomas bem como na expressão da via WNT/BC. Da mesma forma, o efeito anticarcinogênico da vitamina D ficou bem estabelecido no presente estudo, e provavelmente atribuído a inibição de vias de hiperproliferação. Por outro lado, DeWitt et al. (2015) demonstraram que em camundongos com via Wnt/BC ativa resultante da inativação de ambos alelos do gene APC a suplementação de vitamina D ativou a formação de VDR mas não inibiu a via acima citada. Por outro lado, Wan Li et al. (2016) reforçaram o papel quimiopreventivo da vitamina D, ao avaliar o efeito combinado com a metformina. Os autores deste estudo demonstraram redução dos FCAS nos grupos intervenção, atribuindo essa redução a inibição de vias proliferativas como mTOR e Beta Catenina

Em realidade, há vários estudos populacionais na literatura procurando definir o real impacto quimiopreventivo da vitamina D e o AAS na prevenção do CCR. (Gandini et al., 2011; Pommergaard et al., 2016; Garcia Rodriguez et al., 2017). Entretanto, poucos estudos vêm avaliando o efeito sinérgico entre elas em modelos experimentais de quimioprevenção no câncer colorretal. Não obstante, a avaliação isolada de cada substância nos diferentes estudos tem permitido definir com precisão os diferentes processos mecanísticos que envolvem a quimioprevenção. Nesse sentido, a relação inversa entre níveis de vitamina D e CCR vem sendo estabelecida desde Garland e Garland (1980) que observaram níveis mais baixos de vitamina D em regiões com maior incidência de CCR. Essa correlação inversa foi bem demonstrada em vários estudos epidemiológicos posteriores. (Iwasaki et al., 2007; Weinstein et al., 2011). No entanto, O *Japan Public Health Center-based Prospective Study* acompanhou 38.373 indivíduos durante 11 anos demonstrando uma associação inversa entre baixos níveis de vitamina D e câncer de reto, a mesma

associação não sendo evidenciada em relação ao câncer de cólon. (Iwasaki et al., 2007). Importante ressaltar que este estudo teve como uma de suas principais limitações o uso de questionários sobre estilo de vida, alimentação e uso de suplementações vitamínicas. Um questionamento que vem sendo objeto de vários estudos refere-se a dose de suplementação diária de vitamina D. Vários estudos apontam que a reposição de 600-800 UI/dia de vitamina D são suficientes para manter os níveis séricos acima de 33 ng/ml. (Wu et al., 2007; Ma et al., 2011). Nesse sentido, Gorham et al. (2005) avaliando a relação entre suplementação (>1000 UI/dia) ou níveis séricos maiores que 33 ng/mL e o risco de CCR, observaram que estes indivíduos tiveram uma redução de 50% na incidência de CCR, resultados reproduzidos por Plum et al. (2010) e Leyssens et al. (2013). Entretanto, essa associação inversa está longe de ser inequívoca. O *Beta-Carotene Cancer Prevention (ATBC) Study* evidenciou maior risco de CCR em homens finlandeses com maiores níveis séricos de vitamina D. (Weinstein et al., 2011). Da mesma forma, o *Women's Health Initiative Study*, de longe o maior trial sobre efeitos da suplementação com vitamina D no CCR, demonstrou que a suplementação de vitamina D e cálcio não diminuiram o risco de CCR em um follow-up de 7 anos. (Wactawski-Wende et al., 2006).

Entretanto, embora as 3 intervenções tenham provado serem efetivas quanto à quimioprevenção, não houve diferenças entre elas, nem a ação sinérgica se sobrepôs aos agentes isolados. A ausência dessa sobreposição sobre as intervenções isoladas pode ser explicada talvez porque em estágios mais precoces da cascata tumoral, os mecanismos se sobreponham na prevenção de lesões precursoras. (Larriba et al., 2011). Outra explicação pode estar na dose das substâncias utilizadas, bem como na avaliação de estágios mais precoces. Entretanto, essa combinação já foi testada, em estudos populacionais, em relação a desfechos mais tardios como recorrência de adenomas colorretais. Um estudo clínico randomizado com duração de 6 anos, comparou grupo placebo com grupo recebendo calcitriol, aspirina e carbonato de cálcio em pacientes que já haviam tido adenomas colorretais removidos e história familiar de CCR, demonstraram que não houve diminuição na recorrências das lesões adenomatosas. (Pommergaard et al., 2016). Os autores, no entanto, assumem que o tabagismo pode ter tido influência nos resultados, bem como a dose dos agentes quimiopreventivos pode ter sido baixa. (Pommergaard et al., 2016).

A mensuração do dano oxidativo é essencial para o entendimento dos mecanismos de estresse oxidativo e suas repercussões em nível molecular. Essa avaliação permite aferir com precisão o papel das EROs nas diferentes etapas da carcinogênese colorretal, entre elas na formação de criptas aberrantes. Seguindo esta premissa, observamos uma correlação positiva entre a ocorrência de criptas aberrantes e o ID/FD oxidativo ao DNA em células do sangue e do fígado causado pela DMH, mostrando que a agressão crônica causada por esse agente alquilante desencadeia diferentes padrões de quebras na fita de DNA. Por conseguinte, esse efeito deletério continuado poderia gerar mutações em genes como APC e p53 - reconhecidos como reguladores da proliferação celular. Com isso, esse mecanismo poderia explicar o estado hiperproliferativo que culminaria na formação de criptas aberrantes, fechando assim a correlação entre dano oxidativo e a expressão fenotípica mais precoce. Por outro lado, conforme já descrito anteriormente tanto APC como P53 são pouco mutados nesse modelo de indução com DMH, onde diferentes mutações em genes da via Wnt/BC são mais prevalentes.

7 CONCLUSÃO

Com base no experimento, pode-se chegar às seguintes conclusões:

1. A DMH confirmou seu papel no desencadeamento de estresse oxidativo bem como agente genotóxico e carcinogênico em nosso modelo experimental de carcinogênese colorretal, mimetizando as etapas fisiopatológicas do CCR esporádico, e demonstrando sua fácil reprodutibilidade em estudos futuros.

2. A vitamina D, AAS e a associação de ambos reduziu significativamente - neste modelo experimental - a carbonilação de proteínas, a atividade da DCF e o NO quando comparados ao controle positivo (Água/DMH). O sistema oxidante foi mais efetivo através da atividade da catalase.

3. A vitamina D, AAS e a associação de ambos reduziu significativamente - neste modelo experimental - o índice e frequência de dano oxidativo no DNA no sangue e no fígado.

4. A vitamina D, AAS e a associação de ambos reduziu significativamente - neste modelo experimental - a formação de focos de criptas aberrantes, porém sem vantagem da estratégia combinada.

5. Houve uma leve vantagem do AAS em proteger contra o estresse oxidativo e genotoxicidade causada pela DMH, que não se refletiu em menor formação de criptas aberrantes quando comparado a Vitamina D.

8 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Analisando com cuidado, observamos algumas limitações no estudo que merecem atenção. Uma delas foi o ensaio cometa no tecido colônico, no qual houve dificuldade na dissociação das células epiteliais do cólon. As amostras de cólon estão armazenadas no freezer (-80 C) e novos testes serão realizados a fim de concluir esta etapa com êxito, pois esses resultados são de grande importância para o trabalho.

Como perspectiva do estudo, buscaremos não só a sistematização do ensaio cometa no cólon como a avaliação de marcadores de proliferação celular (Ki-67), via da beta-catenina/Wnt através de técnicas imunohistoquímicas, bem como as análises histológicas por hematoxilina/eosina e alcian blue. Além disso, pretendemos estudar vias importantes através da expressão da Ciclooxygenase 2 (COX-2), Prostaglandina E2 (PGE-2) e a Óxido Nítrico Sintase (iNOS) por meio da técnica de Western Blotting. Dessa forma, conseguiremos estudar diferentes mecanismos e desfechos importantes, buscando assim um melhor entendimento da carcinogênese colorretal e das estratégias quimiopreventivas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi H. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
- Agner AR, Bazo AP, Ribeiro LR, Salvadori DMF. DNA damage and aberrant crypt foci as putative biomarkers to evaluate the chemopreventive effect of Annatto in rat colon carcinogenesis. *Mutation Research* 2005;582: 146-54.
- Alberts DS, Martínez ME, Roe DJ, Guillén-Rodríguez JM, Marshall JR, van Leeuwen JB, Reid ME, Ritenbaugh C, Vargas PA, Bhattacharyya AB, et al. Lack of effect of a high-fiber cereal supplement on the recurrence of colorectal adenomas. Phoenix Colon Cancer Prevention Physicians Network. *N Engl J Med.* 2000; 342:1156-1162.
- Alves JM, Senedese JM, Leandro LF et al. Copaifera multijuga oleoresin and its constituent diterpene (-)-copalic acid: Genotoxicity and chemoprevention study. *Mutat Res.* 2017 Jul; 819:26-30.
- American Cancer Society. *Colorectal Cancer Facts & Figures 2014-2016.* Atlanta: American Cancer Society. 2014.
- Ames B, Shigenaga M, Hagen T. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90(17):7915-22.
- Ames BN. DNA damage from micronutrients deficiencies is likely to be a major cause of Cancer. *Mutat Res.* 2001; 475(1-2):7-20.
- 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.
- Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem.* 1987; 22(2):111-80
- Baron JA, Cole BF, Sandler RS, Haile RW, Ahnen D, Bresalier R, McKeown-Eyssen G, Summers RW, Rothstein R, Burke CA, Snover DC, Church TR, Allen JI, Beach M, Beck GJ, Bond JH, Byers T, Greenberg ER, Mandel JS, Marcon N, Mott LA, Pearson L, Saibil F, van Stolk RU. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med.* 2003; 348(10):891-9.
- 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, da Silva Franchi CA, Marques ME, Salvadori DM. Chlorhexidine induces DNA damage in rat peripheral leukocytes and oral mucosal cells. *J Periodontal Res.* 2004 Oct; 39(5):358-61
- Bennett A, Del Tacca M. Proceedings: Prostaglandins in human colonic carcinoma. *Gut.* 1975; 16:409
- 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.
- _____. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett.* 1995; 93(1):55-71.
- Bissahoyo A, Pearsall RS, Hanlon K, Amann V, Hicks D, Godfrey VL, et al. Azoxymethane is a genetic background-dependent colorectal tumor initiator and promoter in mice: effects of dose, route, and diet. *Toxicol Sci* 2005; 88:340-5.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998; 58(22):5248-57.
- Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology.* 2008;134:388-395.
- 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):511-7.
- Brambilla E; Moreira LF, Serafim EP. Immunohistochemical Evaluation of Cyclooxygenase-2 in Colorectal Neoplasias and Relationship with Pathological Factors in Prognosis. *Rev bras Coloproct,* 2007; 27(3):256-263.
- Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transition according to the human development index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol* 2012; 13:790-801.
- Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012; 487(7407):330-7.
- Cao Y, Nishihara R, Wu K, Wang M, Willet WC, Spiegelman D et al. The Population Impact of Long-term Use of Aspirin and Risk of Cancer *JAMA Oncol.* 2016 June 1; 2(6):762-769.
- Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18(6):1688-94. OK

Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Schernhammer ES, Curhan GC, Fuchs CS. Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer. *JAMA*. 2005; 294(8): 914-23.

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): 104-8.

Chaea HJ, Kim HR, Kang YJ, Hyun KC, Kim HJ, Seo HG et al. Heme oxygenase-1 induction by (S)-enantiomer of YS-51 (YS-51S), a synthetic isoquinoline alkaloid, inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB translocation in ROS 17/2.8 cells activated with inflammatory stimulants. *Int Immunopharmacol*. 2007;7(12):1559-68.

Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, et al. Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann Intern Med*. 2004; 140:603-613.

Clapp NK, Henke MA, London JF, Shock TL. Enhancement of 1,2-dimethylhydrazine-induced large bowel tumorigenesis in Balb/c mice by corn, soybean, and wheat brans. *Nutr Cancer* 1984; 6:77-85.

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): 256-66.

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.

Cook NR, Lee IM, Zhang SM, Moorthy MV, Buring JE. Alternate-day, low dose aspirin and cancer risk: Long-term observational follow-up of a randomized trial. *Ann Intern Med* 2013; 159(2):77-85.

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.

Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*. 2006; 52(4):601-23.

Deschner EE, Long FC. Colonic neoplasms in mice produced with six injections of 1,2-dimethylhydrazine. *Oncology*. 1977; 34:255-7.

De Robertis M, Massi E, Poeta ML, Carotti S, Morini S, Cecchetteli L. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J Carcinog*. 2011; 10:9 doi: 10.4103/1477-3163.78279.

DeWitt M, Johnson R, Snyder P, Fleet J. The effect of 1,25 dihydroxyvitamin D3 treatment on the mRNA levels of β catenin target genes in mice with colonic inactivation of both APC alleles. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015 April; 148:103-10.

Ezuka A, Sakai E, Kawana K, Nagase H, Kakuta Y, Uchiyama S, Higurashi T, Nonaka T. Association between factors associated with colorectal cancer and rectal aberrant crypt foci in humans. *Oncology Letters*. 2015; 10:3689-95.

Ewing I, Hurley JJ, Josephides E, Millar A. The molecular genetics of colorectal cancer. *Frontline Gastroenterology*. 2014; 5:26-30.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990; 61(5): 759-67.

Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger A. Aberrant crypt foci: A review. *Toxicol Pathol*. 1999; 27(6): 632-42.

Fischer SM, Hawk E, Lubet RA. Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs and Coxibs In Chemoprevention: A Commentary Based Primarily on Animal Studies. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011 November; 4(11):1728-35.

Fishel, R. Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction. *Genes Dev*. 1998; 12(14):2096-101.

Fodde R, Smits R. Disease model: familial adenomatous polyposis. *Trends Mol Med*. 2001; 7:369-73.

Gandini S, Boniol M, Haukka J, et al. Meta-analysis of observational studies of serum 25-hydroxyvitamin D levels and colorectal, breast and prostate cancer and colorectal adenoma. *Int J Cancer*. 2011; 128(6):1414-24.

García Rodríguez LA, Soriano-Gabarró M, Bromley S, Lanás A, Cea Soriano L. New use of low-dose aspirin and risk of colorectal cancer by stage at diagnosis: a nested case-control study in UK general practice. *BMC Cancer*. 2017 Sep 7; 17(1):637.

Garland, C.F.; Garland, F.C. Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *Int. J. Epidemiol*. 1980; 9:65-71.

Gebert HF, Jagelman DG, McGannon E. Familial polyposis coli. *Am Fam Physician*. 1986; 33:127-37.

Giovannucci E. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001; 10:725-31.

Giovannucci E. Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 2002; 31(4): 925-43.

Gorham ED, Garland CF, Garland FC, Grant WB, Mohr SB et al. Vitamin D and prevention of colorectal cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97:179-94.

Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2004; 23(1-2):11-27.

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):6750-6.

Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015 Nov; 21(11):1350-6.

Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 899:136-47.

Haase P, Cowen DM, Knowles JC. Histogenesis of colonic tumours in mice induced by dimethyl hydrazine. *J Pathol* 1973.

Haggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg.* 2009; 22(4):191-7.

Haklar G, Sayin-Özveri M, Yüksel M, Aktan Ö. Different kinds of reactive oxygen and nitrogen species were detected in colon and breast tumors. *Cancer Letters.* 2001; 165(2):219-24.

Hamilton SR, Rubio CA, Vogelstein B L, Sobin H, Kudo S, Fogt F, Riboli E, Winawer SJ, Nakamura S, Goldgar DE, Hainaut P, Jass JR. Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, editores. *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System.* Lyon: IARC Press; 2000; 103-142.

Hata K, Yamada Y, Kuno T, Hirose Y, Hara A, Qiang SH, et al. Tumor formation is correlated with expression of beta-catenin-accumulated crypts in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. *Cancer Sci.* 2004; 95:316-20.

Heyer J, Yang K, Lipkin M, Edelmann W, Kucherlapati R. Mouse models for colorectal cancer. *Oncogene.* 1999; 18:5325-33.

Hobbs CA, Recio L, Streicker M, Boyle MH, Tanaka J. Comet assay evaluation of six chemicals of known genotoxic potential in rats. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2015 July; 0: 172-181.

Hoffman RM. Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Invest New Drugs.* 1999; 17:343-59.

Hooker CM, Gallicchio L, Genkinger JM, Comstock GW, Alberg AJ. A prospective cohort study of rectal cancer risk in relation to active cigarette smoking and passive smoke exposure. *Ann Epidemiol.* 2008; 18:28–35.

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.

- Iwasaki M, Otani T, Sasazuki S, Inoue M, Tsugane S. Plasma vitamin D and risk of colorectal cancer: the Japan Public Health Center-Based Prospective Study. *British Journal of Cancer*. 2007; 97, 446-51.
- Jackson PE, Cooper DP, O'Connor PJ, Povey AC. The relationship between 1,2-dimethylhydrazine dose and the induction of colon tumours: tumour development in female SWR mice does not require a K-ras mutational event. *Carcinogenesis*. 1999; 20:509-13.
- Jacoby RF, Llor X, Teng BB, Davidson NO, Brasitus TA. Mutations in the K-ras oncogene induced by 1,2-dimethylhydrazine in preneoplastic and neoplastic rat colonic mucosa. *J Clin Invest* 1991; 87:624-30.
- Jaffe BM. Prostaglandins and cancer: an update. *Prostaglandins*. 1974; 6:453-461.
- Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50:223-30.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61:69-90.
- Jucá MJ, Bandeira BC, Carvalho DS, Leal AT. Comparative study of 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane on the induction of colorectal cancer in rats. *j coloproctol*. 2014; 3 4(3):167-73.
- King N, Lin H, Suleiman MS. Oxidative stress increases SNAT1 expression and stimulates cysteine uptake in freshly isolated rat cardiomyocytes. *Amino Acids*. 2011; 40: 517-26.
- 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.
- Kohno H, Suzuki R, Curini M, Epifano F, Maltese F, Gonzales SP, et al. Dietary administration with prenyloxycompounds, auraptene and collinin, inhibits colitis-related colon carcinogenesis in mice. *Int J Cancer*. 2006; 118:2936-42.
- Kune GA, Kune S, Watson LF. Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations and medications: case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. *Cancer Res*. 1988; 48(15):4399-404.
- Kuper H, Bo etta P, Adami HO. Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. *J Intern Med*. 2002; 252:206–224.
- Kwon C, Cheng P, King IN, Andersen P, Shenje L, Nigam V et al. Notch post-translationally regulates beta-catenin protein in stem and progenitor cells. *Nat Cell Biol* 2011; 13:1244-517.

Larriba MJ, Ordonez-MORán P, Chicote I, Martín-Fernandez G, Puig I. Vitamin D Receptor Deficiency Enhances Wnt/ β -Catenin Signaling and Tumor Burden in Colon Cancer. *PLoS One*. 2011; 6(8): e23524.

Lamprecht S, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nature Reviews Cancer*. 2003; Aug 3:601-614.

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): 1107-13.

Leysens, C.; Verlinden, L.; Verstuyf, A. Antineoplastic effects of 1,25(OH)₂D₃ and its analogs in breast, prostate and colorectal cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 2013; 20: 31-47.

Lokeshkumar B, Sathishkumar V, Nandakumar N, T Rengarajan, Madankumar A e Balasubramanian MP. Anti-Oxidative Effect of Myrtenal in Prevention and Treatment of Colon Cancer Induced by 1, 2-Dimethyl Hydrazine (DMH) in Experimental Animals. *Biomol Ther*. 2015; 23(5): 471-8.

Lu R, Wu Shopping Wu, Xia Y, Sun J. The Vitamin D Receptor, Inflammatory Bowel Diseases, and Colon Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2012 Mar 1; 8(1): 57-65.

Marian B. Colorectal cancer: modeling causes, prevention and therapy. *Drug Discov Today Dis Mod*. 2004; 1:1-7.

Maskens AP. Histogenesis and growth pattern of 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon adenocarcinoma. *Cancer Res*. 1976; 36:1585-92.

Ma Y, Zhang P, Wang F, Yang J, Liu Z, Qin H. Association between vitamin D and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *J Clin Oncol*. 2011; 29(28):3775-82.

McLellan EA, Medline A and Bird RP. Sequential analyses of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci: Putative preneoplastic lesions . *Cancer Res* 1991; 51: 5270-4.

Méphlan C, Hughes DJ, Pardini B. Genetic Variants in selenoprotein genes increase risk of colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2010; 31(6):1074-79.

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

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.

Milczarek M, Psurski M, Kutner A & Wietrzyk J. Vitamin D analogs enhance the anti-cancer activity of 5-fluorouracil in an in vivo mouse colon cancer model. *BMC Cancer* 2013; 13:294.

Minagawa M, Makuuchi M, Torzilli G, Takayama T, Kawasaki S, Kosuge T, Yamamoto J, Imamura H. Extension of the frontiers of surgical indications in the treatment of liver metastases from colorectal cancer: long-term results. *Ann Surg.* 2000; 231(4): 487-99.

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):1169-78.

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):1787-90.

Morson BC. Precancerous and early malignant lesions of the large intestine. *Br J Surg* 1968; 55:725-31.

Moulaoum H, Nagy AL, Djerdjouri B, Clichici S. Precancerous ACF induction affects their regional distribution forsaking oxidative stress implication in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis model. *Inflammopharmacology.* 2017 Jul 21. doi: 10.1007/s10787-017-0377-5.

Muguruma N, Okamoto K, Nakagawa T, Sannomiya K, Fujimoto S, Mitsui Y, Kimura T, Miyamoto H, Higashijima J, Shimada M, Horino Y, Matsumoto S, Hanaoka K, Nagano T, Shibutani M, Takayama T. Molecular imaging of aberrant crypt foci in the human colon targeting glutathione S-transferase P1-1. *Sci Rep.* 2017 Jul 26; 7(1):6536-43.

Murillo G, Matusiak M, Benya RV, and Mehta RG. Chemopreventive Efficacy of 25-Hydroxyvitamin D3 in Colon Cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007 March; 103(3-5):763-7.

Mutch MG, Schoen RE, Flashman JW, Takahashi H, Iida H, Ezuka A, Yamada E. A multicenter study of prevalence and risk factors for aberrant crypt foci. *Gastroenterol Hepatol.* 2009; 7:568-74.

Nagao M, Sugimura T. Multiple steps in carcinogenesis, multiple carcinogenic factors, and multiple primary tumors: can we develop an appropriate response for cancer prevention? *Drug Metab Rev.* 1998; 30:405-19.

Nair KM, Iyengar V. Iron content, bioavailability & factors affecting iron status of Indians. *Indian J Med Res.* 2009; 130(5):634-45.

Nambiar PR, Giardina C, Guda K, Aizu W, Raja R, Rosenberg DW. Role of the alternating reading frame (P19)-p53 pathway in an in vivo murine colon tumor model. *Cancer Res.* 2002; 62:3667-74.

- Nishihara R, Lochend P, Kuchiba A, Yamaguchi M, Liao X, Imamura Y. Aspirin Use and Risk of Colorectal Cancer According to *BRAF* Mutation Status. *JAMA* 2013 June 26; 309(24): 2563-71.
- Ochiai M, Hippo Y, Izumiya M, Watanabe M, Nakagama H. Newly defined aberrant crypt foci as a marker for dysplasia in the rat colon. *Cancer Sci.* 2014; 105(8):943-50.
- Ogino S, Cantor M, Kawasaki T, Brahmandam M, Kirkner GJ, Weisenberger DJ, Campan M, Laird PW, Loda M, Fuchs CS. CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. *Gut.* 2006; 55(7): 1000-6.
- Ohkubo H, Takahashi H, Yamada E, Sakai E, Higurashi T, Uchiyama T, Hosono K, Endo H, Taguri M, Nakajima A. Natural history of human aberrant crypt foci and correlation with risk factors for colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2012 May; 27(5):1475-80.
- Otani T, Iwasaki M, Sasazuki S, Inoue M. Plasma vitamin D and risk of colorectal cancer: the Japan Public Health Center-Based Prospective Study. *British Journal of Cancer* 2007; 97:446-51.
- 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.
- Owen RW. Biomarkers in colorectal cancer. In: Miller AB, Bartsch H, Boffetta P. Biomarkers and cancer prevention. IARC Scientific Publication, Lyon. 2001; 10: p101-111.
- 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): 937-42.
- Pai R, Soreghan B, Szabo IL, et al. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med.* 2002; 8: 289-93.
- Paskett ED, Reeves KW, Rohan TE, et al. Association between cigarette smoking and colorectal cancer in the women's health initiative. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99:1729-1735.
- Patrono C. The multifaceted clinical readouts of platelet inhibition by low-dose aspirin. *J Am Coll Cardiol.* 2015; 66(1): 74-85.
- Patyar S, Patyar RR, Medhi B, Khanduja K. Chemopreventive effect of artesunate in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *J Adv Pharm Technol Res.* 2017; Jul-Sep; 8(3):102-7.

- PDQ Cancer Genetics Editorial Board. Genetics of Colorectal Cancer. PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-2016.
- Pedro DF, Ramos AA, Lima CF, Baltazar F, Pereira-Wilson C. Colon Cancer Chemoprevention by Sage Tea Drinking: Decreased DNA Damage and Cell Proliferation. *Phytother Res.* 2016 Feb; 30(2):298-305.
- Peltomaki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol.* 2003; 21(6): 1174-9.
- Pendás-Franco N, Aguilera O, Pereira F, Gonzalez- Sancho JM, Munoz A. Vitamin D and Wnt/ β -catenin Pathway in Colon Cancer: Role and Regulation of *DICKKOPF* Genes. *Anticancer Research* 2008; 28: 2613-2624.
- Perea J, Lomas M, Hidalgo M. Molecular basis of colorectal cancer: Towards an individualized management? *Rev Esp Enferm Dig.* 2011; 103(1): 29-35.
- Peters U, Sinha R, Chatterjee N, Subar AF, Ziegler RG, Kulldorff M, Bresalier R, Weissfeld JL, Flood A, Schatzkin A, et al. Dietary fibre and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme. *Lancet.* 2003; 361:1491-5.
- Pierre F, Peiro G, Tach e S, Cross AJ, Bingham SA, et al.: New marker of colon cancer risk associated with heme intake: 1,4-dihydroxynonane mercapturic acid. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15:2274-79.
- Pinho MSL. Cancer Stem Cells: A new concept in Colorectal Carcinogenesis. *Rev. Bras Coloproc.* 2009; 29(1):120-124.
- Plum, L.A.; DeLuca, H.F. Vitamin D, disease and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010; 9:941-55.
- Pommergaard HC, Burcharth J, Rosenberg J, Raskov H. Aspirin, Calcitriol, and Calcium Do Not Prevent Adenoma Recurrence in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology.* 2016 Jan; 150(1):114-22.
- Pretlow TP, Barrow WS, Ashton MA, O'Riordan TA. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res* 2004; 51:1564-7.
- 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): 713-22.
- Rao CV. Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutat Res.* 2004; 555:107-119.
- Refaat B, El-Shemi AG, Kensara OA, Mohamed AM, Ahmad J. Vitamin D3 enhances the tumouricidal effects of 5-Fluorouracil through multipathway mechanisms in azoxymethane rat model of colon cancer . *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2015; 34:71-79.

Ribeiro ML; Priolli DG; Miranda DDC; Paiva DA; Pedrazzoli JJ; Martinez C. Avaliação do Dano Oxidativo ao DNA de Células Normais e Neoplásicas da Mucosa Cólica de Doentes com Câncer Colorretal. *Rev bras Coloproct*, 2007; 27(4): 391-402.

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): 267-72.

Ribeiro ML, Martinez CA, Cordeiro AT, Miranda DD, Margarido NF et al.. Evaluation of expression of mismatch repair gene MLH1 and levels of oxidative DNA Damage in normal and neoplastic tissues of patients with colorectal cancer. *Rev Bras Coloproct*. 2009; 29(3):303-313.

Rigas B, Tsioulis GJ. The evolving role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colon cancer prevention: A cause for optimism. *J Pharmacy Exp There* 2015; 353:2-8.

Rosenberg DW, Giardina C, Tanaka T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2009; 30:183-96.

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): 1591-601.

Roy HK, Karolski WJ, Ratashak A. Distal bowel selectivity in the chemoprevention of experimental colon carcinogenesis by the non-steroidal anti-inflammatory drug nabumetone. *Int J Cancer* 2001; 92:609-15.

Ruder EH, LAiyemo AO, Graybeard BI, Hollenbeck AR, Cross AJ. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer risk in a large, prospective cohort. *Am J Gastroenterol*. 2011 July; 106(7): 1340-50.

Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, Levin TR, Sweeney C, Murtaugh MA, Wolff RK, Slattery ML. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype (CIMP) in colon cancer. *Gastroenterology*. 2005; 129(3): 837-45.

Schatzkin A, Lanza E, Corle D, Lance P, Iber F, Caan B, Shike M, Weissfeld J, Burt R, Cooper MR, et al. Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. Polyp Prevention Trial Study Group. *N Engl J Med*. 2000; 342:1149-1155.

Seno H, Oshima M, Ishikawa TO, Oshima H, Takaku K, Chiba T, et al. Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps. *Cancer Res*. 2002; 62:506-11.

Seril DN, Liao J, Yang GY, Yang CS. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. *Carcinogenesis*. 2003; 24(3):353-62.

Schmutte C, Yang AS, Nguyen TT, Beart RW, Jones PA. Mechanisms for the involvement of DNA methylation in colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1996; 56(10):2375-81.

Sheehan KM, Sheehan K, Macsweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *JAMA* 1999; 282:1254-7.

Shiff SJ, Rigas B. The role of cyclooxygenase inhibition in the antineoplastic effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs). *J Exp Med* 1999; 190:445-50.

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.

Shpitz B, Klein E, Buklan G, Neufeld D, Nissan A, Grankin M. Suppressive effect of aspirin on aberrant crypt foci in patients with colorectal cancer. *Gut* 2003; 52:1598-1601

Shringarpure R and Davies KJ. Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Radical Biology and Medicine* 2002; 32(11):1084-9.

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, Heinemann 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): 2954-8.

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): 184-91.

Sinitrope FA, Lemoine M, Li X, Lynch PM, Clearly KR. Reduced expression of cyclooxygenase-2 protein in hereditary nonpolyposis colorectal cancers relative to sporadic cancers. *Gastroenterol* 1999; 117:350-8.

Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson JK, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Liu C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2006; 314(5797): 268-74.

Slattery ML, Lundgreen A, Welbourn R, Wolff RK. Oxidative balance and colon and rectal cancer: Interaction of lifestyle factors and genes. *Mutation Research*. 2012; 734(I-2):30-40.

Snover DC. Update on serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum Pathol*. 2011; 42(1):1-10.

Soriano CL, Soriano-Gabarró M, García Rodríguez LA. The Protective Effect of Low-Dose Aspirin against Colorectal Cancer Is Unlikely Explained by Selection Bias: Results from Three Different Study Designs in Clinical Practice. *PLoS One*. 2016 Jul 18; 11(7):e0159179.

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):1130-4.

Sutherland A, Kim DH, Relton C, Ahn YO. Polymorphisms in the selenoprotein S and 15-kDA seleprotein genes are associated with altered susceptibility to colorectal cancer. *Genes and Nutrition*. 2010; 5(3):215-23.

Suzuki M, Yoshimi N, Ushijima T, Hirose Y, Makita H, Wang A, et al. No involvement of Ki-ras or p53 gene mutations in colitis-associated rat colon tumors induced by 1-hydroxyanthraquinone and methylazoxymethanol acetate. *Mol Carcinog*. 1995; 12:193-7.

Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Tanaka T. Sequential observations on the occurrence of preneoplastic and neoplastic lesions in mouse colon treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci*. 2004; 95:721-7.

Takahashi H, Yamada E, Ohkubo H, Sakai E, Higurashi T, Uchiyama T, Hosono K, ENdo H, NAKajima A. Relationship of human rectal aberrant crypt foci and formation of colorectal polyp: One-year following up after polypectomy. *World J Gastrointest Endosc*. 2012 Dec 16; 4(12):561-564.

Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y, Ohi M, Nojiri S, Sakamaki S et al. Aberrant Crypt Foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med*. 1998; 339(18): 1277-84.

Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y, Ohi M, Nojiri S, Sakamaki S, Kato J, Kogawa K, Miyake H, Niitsu Y. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2016; 339(18):1277-84.

Takesue F, Korenaga D, Yao T, Kabashima A, Sugimachi K. Development of colonic neoplasms and expressions of p53 and p21 proteins of experimental colitis of mice induced by dextran sulfate sodium. *J Exp Clin Cancer Res*. 2001; 20:413-8.

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993; 260(5109): 816-9.

Thomas DC, Umar A, Kunkel TA. Microsatellite instability and mismatch repair defects in cancer. *Mutat Res*. 1996; 350(1): 201-5.

Thorat MA, Cuzick J. Prophylactic use of aspirin: systematic review of harms and approaches to mitigation in the general population. *Eur J Epidemiol* 2015; 30(1):5-18.

Thurnherr N, Deschner EE, Stonehill EH, Lipkin M. Induction of adenocarcinomas of the colon in mice by weekly injections of 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res*. 1973; 33:940-5.

- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Kobayashi H, Rojas E et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2000; 35(3): 206-221.
- Tinsley HN, Piazza GA. Novel Therapeutics: NSAIDs, Derivatives, Phosphodiesterases. *Current colorectal cancer reports*. 2012; 8:325–30.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2015; 65(2): 87-108.
- Toyota M, Abuja N, Suzuki H, Itoh F, Imai K, Aylin SB, Issa JP. Aberrant methylation in gastric cancer associated with CpG island methylator phenotype. *Cancer Res*. 1999 Nov 1; 59(21):5438-42.
- Tsioulis GJ, Go MF, Rigas B. NSAIDs and Colorectal Cancer Control: Promise and Challenges. *Curr Pharmacol Rep*. 2015 October 1; 1(5):295-301.
- Uchiyama T, Takahashi H, Endo H, Kato S, Sakai E, Hosono K, Inamori M, Hippo Y. Number of aberrant crypt foci in the rectum is a useful surrogate marker of colorectal adenoma recurrence. *Dig Endosc*. 2012 Sep; 24(5):353-7.
- Umar A, Dunn BK, Greenwald P. Future directions in cancer prevention. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(12): 835-48.
- Valencia A, Chardin P, Wittinghofer A, Sander C. The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* 1991; 30:4637-48.
- Van Rijnsoever M, Grieu F, Elsaleh H, Joseph D, Iacopetta B. Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut*. 2002; 51(6): 797-802.
- Wactawski-Wende J, Kotchen JM, Anderson GL, Assaf AR, Brunner RL et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2006; 354: 684-696.
- Weinstein, S.J.; Yu, K.; Horst, R.L.; Ashby, J.; Virtamo, J.; Albanes, D. Serum 25-hydroxyvitamin D and risks of colon and rectal cancer in Finnish men. *Am. J. Epidemiol*. 2011, 173, 499-508.
- Wheeler JM, Kim HC, Ilyas M, Mortensen NJ, Bodmer WF. Hypermethylation of the promotor region of the E-Cadherin gene (CDH1) in sporadic and ulcerative colitis associated colorectal cancer. *Gut* 2003; 48(3):367-71.
- Wheeler JMD. Epigenetics, mismatch repair and colorectal cancer. *Ann R Coll Surg Engl* 2005; 87(1):15-20.
- 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.

- Woolcott CG, Wilkens LR, Nomura AM, et al. Plasma 25- hydroxyvitamin D levels and the risk of colorectal cancer: the Multiethnic Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19(1):130-34.
- Wu K, Feskanich D, Fuchs CS, Willett WC, Hollis BW, Giovannucci EL. A nested case control study of plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99(14):1120–1129.
- Wu X, Patterson S, Hawk E. Chemoprevention — history and general principles. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011; 25(4-5): 445-59.
- Xie K, Huang S. Contribution of nitric oxide-mediated apoptosis to cancer metastasis inefficiency. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34:969-86.
- Yamada Y, Yoshimi N, Hirose Y, Kawabata K, Matsunaga K, Shimizu M, et al. Frequent beta-catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. *Cancer Res* 2000; 60:3323-7.
- Yang K, Fard S, Furrer R, Archer MC, Bruce R, Lip HY, Mehta R, O'Brien PJ, Giacca A, Ward WE, Femia P, Caderni G, Meline A, Banks K. Risk Factors for colorectal cancer in man induce aberrant crypt foci in rats: Preliminary Findings. *Nutrition and Cancer.* 2016; 68(1):94-104.
- Zhang B, Wang J, Wang X, Zhu J, Liu Q, Shi Z, Chambers MC, Zimmerman LJ, Shaddox KF, Kim S, Davies SR, Wang S, Wang P, Kinsinger CR, Rivers RC, Rodriguez H, Townsend RR, Ellis MJ, Carr SA, Tabb DL, Coffey RJ, Slebos RJ, Liebler DC. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2014; 513(7518): 382-7.