

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**  
**Departamento de Patologia e Medicina Legal**



Stefânia Bovo Minto

**Mecanismos envolvidos no efeito anticarcinogênico da  
desnervação mientérica do cólon**

Ribeirão Preto

2021

STEFÂNIA BOVO MINTO

**Mecanismos envolvidos no efeito anticarcinogênico da desnervação  
mientérica do cólon**

Versão corrigida

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

Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora.

Área de concentração: Patologia.

Opção: Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia

Ribeirão Preto – SP  
2021

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

Bovo Minto, Stefânia

Mecanismos envolvidos no efeito anticarcinogênico da desnervação mientérica do cólon. Ribeirão Preto, 2021.

117 p.: il. ; 30 cm

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

Orientador: Britto Garcia, Sérgio.

**Stefânia Bovo Minto**

**Mecanismos envolvidos no efeito anticarcinogênico da desnervação mientérica do cólon**

*Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora.*

*Área de concentração: Patologia Experimental.*

**Banca Examinadora**

1) Prof.(a). Dr.(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

2) Prof.(a). Dr.(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

3) Prof.(a). Dr.(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

4) Prof.(a). Dr.(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho aos meus pais, Maristela e João, por incentivarem desde criança o meu sonho de ser cientista. Obrigada por cada esforço, renúncia e dedicação para nos proporcionar a melhor educação possível.*

*“O bom exemplo é a ferramenta mais eficaz que os pais podem utilizar para moldar os filhos, é a garantia de educação continuada. De nada vale ensinar os filhos a andar por um caminho se os pais andam em outro”*

*Volnei A. Silveira*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre me guiar pelo melhor caminho e iluminar meus passos.

Aos meus pais, João e Maristela, por serem meus maiores exemplos e, além de excelentes pais, grandes amigos. Obrigada por acreditarem sempre em mim, quando eu mesma não acreditava.

Ao meu marido e melhor-amigo, Teilor, por tornar a caminhada mais leve todos esses anos. Obrigada por ser sempre o primeiro a me incentivar, apoiar e ficar ao meu lado.

À minha irmã, Slana, pela amizade e incentivo. Por alegrar meus dias, muito obrigada.

Ao meu orientador, professor Sérgio Britto Garcia, por ter confiado em meu trabalho desde meu ingresso na pós-graduação; por toda a paciência, ensinamentos e incentivos a mim conferidos. Por me mostrar que é possível fazer ciência, sem perder a humanidade: muito obrigada.

À Célia R. L. Marino, pela amizade, ajuda e conselhos durante esses sete anos (e contando!). Obrigada pelas risadas e longas conversas.

Às técnicas do nosso laboratório, Rosângela O. Lopes e Érika P. D. Gual. Obrigada pela dedicação e carinho com que ajudam a nós, estudantes, com nossos trabalhos.

À Isabela C. S. Marques pelo auxílio com o protocolo anestésico utilizado neste trabalho e a todos os colegas de nosso laboratório que contribuíram de algum modo.

Ao Dr. Felipe Nogueira pela realização dos procedimentos cirúrgicos para obtenção do modelo de megacólon obstrutivo.

Aos amigos que a pós-graduação me presenteou: Everton Félix, Andrea S. D. Terada, Laís Bálico, Juliana Y. Sakita, Émerson Santos, Aline V. Bernardi, Ana C. Alvarenga, Suziene Cardoso, entre tantos outros. Obrigada pelo companheirismo, aprendizado diário e pela amizade além do ambiente de pesquisa.

Aos amigos que ganhei durante o doutorado-sanduíche: Karin V. D. Broek, Evandro Archilia, Camilo A. P. Bello, Felipe Henrique, Gabriel Moreira, Francine M. Giotto, principalmente à Isadora Batalha: obrigada por serem meus irmãos nos E.U.A. - e por continuarem sendo, mesmo à distância.

Aos colegas, docentes, funcionários e bioteristas do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP-USP e CEMEL.

À secretária Camila L. Z. Gimenes por todo carinho e atenção conferidos a nós, pós-graduandos. Obrigada por toda ajuda até hoje.

Ao professor Alceu Afonso Jordão Junior, pelo apoio neste trabalho e à técnica Paula O. Payão pelo auxílio com as análises de estresse oxidativo.

Aos colegas, funcionários e docentes do Departamento de Fisiologia da Universidade de Nevada – Reno, USA, principalmente ao professor Kenton Sanders, por me receberem e confiarem em meu trabalho.

Ao professor Sérgio Akira Uyemura e ao Dr. Vinicius K. Cardoso por me receberem no laboratório de Bioenergética e Biologia Molecular de Microorganismos do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP – USP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, por financiar este trabalho.

Ao Programa de Internacionalização PrInt CAPES/USP – processo número 88887.368416/2019-00, por financiar meu doutorado-sanduíche nos E.U.A..

*A todos vocês,*

*muito obrigada!*

***“Nada na vida deve ser temido, apenas compreendido.  
Agora é a hora de compreender mais, para temer menos”***

*Marie Skłodowska-Curie*



MINTO, S.B. **Mecanismos envolvidos no efeito anticarcinogênico da desnervação mientérica do cólon, 2021.** Tese de Doutorado. Departamento de Patologia e Medicina Legal – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2021.

## RESUMO

A desnervação experimental do plexo mientérico pelo cloreto de benzalcônio (BAC) possui mecanismos protetores sobre a carcinogênese do cólon. Embora vários autores demonstrem que a desnervação pelo BAC desenvolva alguma ação protetora no trato gastrointestinal, seus mecanismos ainda não foram bem estabelecidos. Dessa forma, o objetivo do presente estudo é estabelecer os mecanismos pelos quais o BAC protege contra a carcinogênese experimental colônica induzida quimicamente. Para isso, ratos ou camundongos foram expostos aos carcinógenos Metil-N-nitro-N-nitroso-guanedina (MNNG 60 mg/kg) ou dimetilhidrazina (DMH 125 mg/kg) para desenvolvimento da carcinogênese colônica, enquanto o surfactante BAC (0,3% ou 1,5 mM) foi utilizado para ablação do plexo mientérico. Um anel de silicone foi posicionado ao redor do cólon esquerdo, abaixo do reflexo peritoneal para execução do modelo experimental de megacólon obstrutivo. Assim, os animais foram divididos em três experimentos distintos, a fim de avaliar: i. associação do modelo de megacólon obstrutivo à desnervação; ii. o papel do sistema nervoso entérico (SNE) e de espécies reativas do oxigênio (EROs) no efeito protetor da desnervação com BAC contra o câncer colorretal (CCR) e iii. o papel do Receptor de potencial transitório vanilóide – Tipo 1 (TRPV1) na carcinogênese colônica em animais TRPV1<sup>-/-</sup>. Após os experimentos, foram avaliados os níveis de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) colônicos, para determinação do papel de EROs na desnervação associada à carcinogênese. Além disso, foi realizada a técnica de imunistoquímica para detecção de células positivas para a histona  $\gamma$ H2AX ( $\gamma$ H2AX), antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA),  $\beta$ -galactosidase, ciclooxigenase-2 (COX-2), *ubiquitin C-terminal hydrolase L1* (UCHL1) e receptor de potencial transitório vanilóide do tipo 1 (TRPV1). O número de criptas displásicas também foi analisado nesse estudo. Como resultado, a desnervação com BAC foi capaz de diminuir  $\gamma$ H2AX, PCNA,  $\beta$ -galactosidase, UCHL1, MDA e COX-2 (P<0,05). Em contraponto, aumentou os níveis de expressão de GSH e TRPV1. Também foi encontrado um aumento no número de criptas displásicas em animais TRPV1<sup>-/-</sup>. Em conjunto, nossos achados sugerem que a desnervação – e não o megacólon obstrutivo - protege contra o câncer, além de elucidar os mecanismos pelos quais essa proteção ocorre, envolvendo principalmente a redução de estresse oxidativo, da expressão de COX-2 e aumento da expressão de TRPV1.

**Palavras-chave:** Câncer de cólon. Desnervação. SNE. BAC. MNNG. DMH.

MINTO, S.B. **Mechanisms involved in the anticarcinogenic effect of colonic myenteric denervation, 2021.** Doctorate thesis. Department of Pathology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2021.

## ABSTRACT

Experimental denervation of the myenteric plexus by benzalkonium chloride (BAC) has protective mechanisms against colon carcinogenesis. Although several authors demonstrate that denervation by BAC has some protective action in the gastrointestinal tract, its mechanisms have not yet been well established. Thus, the aim of the present study is to establish the mechanisms by which BAC protects against experimental colonic carcinogenesis. For this, rats, wild-type or TRPV1<sup>-/-</sup> mice were exposed to the carcinogens Metil-N-nitro-N-nitroso-guanedine (MNNG 60 mg/kg) or dimetilhidrazine (DMH 125 mg/kg) for the development of colonic carcinogenesis, while the BAC surfactant (0.3% or 1.5 mM) was used for ablation of the myenteric plexus. A silicon ring was positioned around the left colon, about 3 cm below the peritoneal reflex to acquire the experimental model of obstructive megacolon. Thus, the animals were divided into three different experiments, in order to evaluate: i. association between obstructive megacolon model and BAC denervation; ii. The role of the enteric nervous system (ENS) and reactive oxygen species (ROS) in the protective effect promoted by BAC denervation against colorectal cancer (CRC) and iii. The role of Transitory Receptor of Potencial Vanilloid – Type 1 (TRPV1) in colonic carcinogenesis by using wild type and TRPV1<sup>-/-</sup> mice. After all the experiments, colonic malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) levels were evaluated to determine the role of the ROS in the protective effect played by denervation on carcinogenesis. In addition, immunohistochemistry technique was performed to detect positive cells for  $\gamma$ H2AX histone ( $\gamma$ H2AX), Proliferating cell nuclear antigen (PCNA),  $\beta$ -galactosidase, ciclooxigenase-2 (COX-2), ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCHL1) and Transitory Receptor of Potencial Vanilloid – Type 1 (TRPV1). The number of dysplastic crypts was also analyzed. As results, the denervation with BAC was able to decrease  $\gamma$ H2AX, PCNA,  $\beta$ -galactosidase, UCHL1, COX-2 and MDA. In contrast to this, it increased the expression levels of GSH and TRPV1. Besides that, the number of dysplastic crypts was higher in TRPV1<sup>-/-</sup> animals. Together, our findings suggest that denervation with BAC – and not obstructive megacolon - protects against cancer, besides than elucidate the mechanisms involved in this protective effect, mainly involving the reduction of oxidative stress, COX-2 expression and increasing TRPV1 expression.

**Key-words:** Colon cancer. Denervation. SNE. BAC. MNNG. DMH.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento experimental referente ao Experimento 1	p.38
Figura 2 - Delineamento experimental referente ao Experimento 2	p.39
Figura 3 - Delineamento experimental referente ao Experimento 3	p.40
Figura 4 – Número de criptas displásicas colônicas – E1	p.50
Figura 5 – PCNA (%) em células colônicas – E1	p.51
Figura 6 – Fotomicrografias de imunomarcação nuclear para PCNA	p.52
Figura 7 – $\gamma$ H2AX – E1	p.53
Figura 8 – COX-2 – E1	p.54
Figura 9 – Fotomicrografias de imunomarcação para COX-2	p.55
Figura 10 – UCHL1 – E1	p.56
Figura 11 – Criptas displásicas – E2	p.57
Figura 12 - $\gamma$ H2AX – E2	p.58
Figura 13 – Fotomicrografias de imunomarcação para $\gamma$ H2AX	p.59
Figura 14 – PCNA em células colônicas	p.60
Figura 15 – $\beta$ -galactosidase	p.61
Figura 16 – MDA e GSH no cólon (nmol/gP)	p.62
Figura 17 - COX-2 estromal e epitelial – E2	p.63
Figura 18 - UCHL-1 nas células das criptas – E2	p.64
Figura 19 - TRPV1 nas células das criptas e em fibras neuronais	p.65
Figura 20 - Criptas displásicas em animais TRPV1 <sup>-/-</sup>	p.66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação dos animais utilizados em cada experimento	p.37
Tabela 2 – Anticorpos utilizados nesse trabalho	p.45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
AOM	Azoximetano
BAC	Cloreto de benzalcônio
Bax	<i>Bcl-2 associated protein X</i>
CCR	Câncer colorretal
CD-68	Cluster de diferenciação - 68
c-fos	Protooncogene c-fos
CGRP	Gene da calcitonina
CID-O	Classificação Internacional de Doenças para Oncologia
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COX-2	Ciclooxigenase-2
CpG	Ilhas CpG
C57BL/6J	Linhagem de camundongos
DAB 3,3'	Diaminobenzidina
DCC	Gene supressor tumoral "Deleted in Colorectal Carcinoma"
DMH	Dimetil-hidrazina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPC4	Gene supressor tumoral localizado em 18q21
DSS	Dextran Sulfato de Sódio
DTNB	5,5'-diti-biois-2-ácido nitrobenzóico
EUA	Estados Unidos da América
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies reativas do oxigênio
ERNs	Espécies reativas do nitrogênio
GSH	Glutationa reduzida
H2AX	Histona $\gamma$ -H2AX
ICC	Células Intersticiais de Cajal

i.p.	Intraperitoneal
K-ras	Gene homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten
MC	Megacólon
MDA	Malondialdeído
MNNG	Metil-N-nitro-N-nitroso-guanedina
NaCl	Cloreto de Sódio
PACAP	<i>Gene "Predisposing For Prostate Cancer"</i>
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PSOF	Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes
p53	Proteína 53
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
TC	Tomografia Computadorizada
TCA	Ácido tricloroacético
T. cruzi	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TMP	1,1,3,3- tetrametoxipropano
TRIS–HCl	Solução de Tris(hidroximetil)aminometano e Ácido clorídrico
TRPV1	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid type-1</i>
TRPV1 <sup>-/-</sup>	Animais <i>knockout</i> para <i>Transient Receptor Potential Vanilloid type-1</i>
UCHL 1	<i>Ubiquitin C-terminal hydrolase L1</i>
VIP	Peptídeo vasointestinal
5-HT	5-hidroxitriptamina

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\beta$

Beta

$\gamma$

Gamma

$-/-$

*knockout*

$\delta$

Delta

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	19
1.1 Câncer colorretal: contextualização epidemiológica .....	20
1.2 Carcinogênese e inflamação .....	21
1.3 Megacólon, constipação e o CCR .....	23
1.4 SNE e o CCR .....	25
1.5 O SNE e a modulação do estresse oxidativo e da inflamação do cólon .....	28
1.6 O SNE e a expressão do Receptor de Potencial Transitório Vanilóide do Tipo 1 – TRPV1 .....	29
1.7 Consideração Geral .....	31
2. Justificativa e relevância.....	32
3. Objetivos .....	34
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivos específicos .....	35
4. Material e métodos.....	36
4.1 Animais – Consideração Geral .....	37
4.2 Delineamento Experimental.....	38
4.3 Indução da carcinogênese colônica experimental .....	40
4.4 Modelo experimental de desnervação mientérica com BAC.....	41
4.5 Modelo experimental de megacólon obstrutivo.....	41
4.6 Coleta e processamento do material .....	42
4.7 Análise de criptas displásicas .....	43
4.8 Imunoistoquímica.....	43
4.8.1 Reações imunoistoquímicas .....	43
4.8.2 Análises imunoistoquímicas.....	44
4.9 Análise de GSH e MDA no cólon.....	45
5. Análises estatísticas.....	47
6. Resultados .....	49
6.1 Resultados experimento 1 .....	50
6.1.1 Análise de criptas displásicas (CD).....	50
6.1.2 Índice de proliferação celular é atenuado pelo BAC .....	51
6.1.3 Danos ao DNA induzidos pelo DMH .....	53
6.1.4 Inflamação é atenuada pela desnervação .....	54
6.1.5 Diminuição no número de neurônios mientéricos pela desnervação .....	54



.....	56
6.2 Resultados experimento 2 .....	57
6.2.1 Análise histopatológica das células das criptas – criptas displásicas .....	57
6.2.2 Danos ao DNA induzidos pelo MNNG .....	58
6.2.3 Níveis de proliferação celular.....	60
6.2.4 $\beta$ -galactosidase – média de células positivas por cripta imunomarcada .....	61
6.2.5 MDA e GSH – Níveis proteicos no cólon .....	62
6.2.6 COX-2 estromal e epitelial .....	63
6.2.7 UCHL (PGP 9.5) .....	64
6.2.8 TRPV1 .....	65
6.3 Resultados experimento 3 .....	66
6.3.1 Criptas displásicas nos animais TRPV1 <sup>-/-</sup> .....	66
7. Discussão.....	67
7.1 Experimento 1.....	68
7.2 Experimento 2 .....	71
7.3 Experimento 3.....	76
8. Conclusão .....	77
9. Referências bibliográficas .....	79
10. Anexos .....	97
10.1 Anexo 1: Aprovação no Comitê de Ética de Experimentação Animal .....	98
10.2 Anexo 2: Artigo científico referente ao Doutorado.....	99

## **1. INTRODUÇÃO**

---

## 1.1 Câncer colorretal: contextualização epidemiológica

O câncer colorretal (CCR) é, atualmente, o terceiro tipo de câncer mais incidente e o segundo com maior mortalidade em homens e mulheres, podendo variar de acordo com a faixa etária, etnia e localização geográfica dos pacientes (NFONSAM; JECIUS; CHEN; OMESIETE *et al.*, 2019; SIEGEL; MILLER; FEDEWA; AHNEN *et al.*, 2017; SIEGEL; MILLER; GODING SAUER; FEDEWA *et al.*, 2020; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016; WHO, 2018). Atualmente, a Classificação Internacional de Doenças para Oncologia (CID-O) dividem os casos de CCR em duas regiões distintas, de acordo com sua localização: cólon ou reto. No Brasil, a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o triênio 2020-2022 sugere que sejam diagnosticados 40.990 novos casos de CCR. Desse total de casos, 20.520 seriam diagnosticados em homens e 20.470 em mulheres (Instituto Nacional do Câncer, 2020). Apesar de acometer ambos os sexos, uma mortalidade maior (80%) é encontrada em homens com idade superior a 60 anos de idade quando comparados as mulheres – como elucida um estudo realizado em nosso país, entre os anos de 2002 e 2016.

Nos Estados Unidos da América (EUA), Siegel e colaboradores estimaram para o ano de 2020 aproximadamente 147.950 novos casos de CCR, mais de cem mil casos se compararmos à estimativa para um triênio no Brasil (SIEGEL; MILLER; FEDEWA; AHNEN *et al.*, 2017; SIEGEL; MILLER; GODING SAUER; FEDEWA *et al.*, 2020). A questão da influência de características regionais sobre o CCR também pode ser observada em outros países, como os EUA. Siegel e colaboradores, em 2017, realizaram um importante estudo sobre a prevalência do CCR nos EUA, no qual constataram que as taxas de incidência desta doença são maiores em negros não-hispânicos e menores em americanos de origem asiática ou de ilhas do oceano Pacífico. Acredita-se que isto ocorra devido ao menor fator socioeconômico (ALBANO; WARD; JEMAL; ANDERSON *et al.*, 2007; DOUBENI; LAIYEMO; MAJOR; SCHOOTMAN *et al.*, 2012), ao menor acesso à saúde e às maiores taxas de tabagismo e etilismo, por exemplo, quando em comparação às outras populações habitantes dos EUA (SIEGEL; MILLER; FEDEWA; AHNEN *et al.*, 2017).

Há, ainda, fatores que caracterizam o perfil de pacientes diagnosticados com CCR que vão além de gênero e regionalidade, como por exemplo, a dieta. Há uma maior incidência de CCR no Alaska, EUA, quando em comparação a outras regiões (KELLY; ALBERTS; SACCO; LANIER, 2012) – o que pode ser decorrente da dieta adotada por essa população, baseada em um alto consumo de gorduras animais e em um baixo consumo de frutas e vegetais. A deficiência de vitamina D, tabagismo, obesidade, presença de *Helicobacter pylori* e diabetes encontrados nessa população também são outros fatores que podem contribuir para uma maior incidência de CCR (MCMAHON; BRUCE; KOCH; GOODMAN *et al.*, 2016; ZUMKELLER; BRENNER; ZWAHLEN; ROTHENBACHER, 2006).

## 1.2 Carcinogênese e inflamação

A maioria dos casos de CCR ocorre de maneira esporádica, ou seja: não possui correlação hereditária, sendo detectada geralmente nos estágios já avançados da doença, como exemplificado anteriormente. Além de detectados tardiamente, esses casos possuem histologia pouco diferenciada, com presença de células em anel de sinete e focos de mucina (NFONSAM; JECIUS; CHEN; OMESIETE *et al.*, 2019), aumentando o potencial de malignidade tumoral. Assim, o CCR esporádico inicia-se pelo acúmulo de instabilidades genômicas, como instabilidade de microssatélites e cromossômicas, por exemplo. Essas instabilidades culminam em aneuploidias, segregação cromossômica e perda de material cromossômico, levando a uma perda na funcionalidade dos genes supressores tumorais APC e p53, por exemplo. Em suma, com o acúmulo dessas mutações ocorre a formação dos adenomas colorretais, classificados de acordo com os protooncogenes ou oncogenes envolvidos nas instabilidades apresentadas. Por exemplo: a indução do oncogene k-ras e a perda de função dos genes supressores tumorais DCC e DPC4 levam à formação de adenomas intermediários, que posteriormente evoluem para adenomas tardios. Ao ocorrer a perda funcional do gene supressor tumoral p53, o adenoma tardio evolui, finalmente, para carcinoma.

Na tentativa de ilustrar didaticamente todo esse processo multifatorial de evolução da carcinogênese colônica, os pesquisadores Fearon e Vogelstein (FEARON; VOGELSTEIN, 1990) deram origem ao modelo clássico de estudo do CCR na década de noventa: a sequência adenoma-adenocarcinoma. Esse modelo é caracterizado didaticamente em três fases distintas: iniciação, promoção e progressão tumoral. Desde então, agentes carcinogênicos químicos são amplamente utilizados para o estudo dessas três fases tumorais, sendo os carcinógenos Metil-N-nitro-N-nitrosoguanedina (MNNG), azoximetano (AOM) e dimetil-hidrazina (DMH) mundialmente conhecidos no estudo do CCR experimental (KASDAGLY; RADHAKRISHNAN; REDDIVARI; VEERAMACHANENI *et al.*, 2014). Os carcinógenos caracterizam-se como substâncias capazes de induzir o desenvolvimento tumoral através de alterações no material genético do animal, como por exemplo: metilação na guanidina, alquilação do DNA ou mutações pontuais no DNA da célula iniciada. Após a exposição do material genético ao carcinógeno, inicia-se o desenvolvimento da carcinogênese colônica propriamente dita, através das três principais vias moleculares: i. via de desenvolvimento do CCR devido a perda funcional do gene APC; ii) via de instabilidade de microssatélites e iii) via de metilações das ilhas CpG.

Além disso, em paralelo ao processo carcinogênico, algumas doenças gastrointestinais (o CCR não-polipóide hereditário, a polipose adenomatosa familiar e as doenças inflamatórias intestinais) são capazes de fornecerem ao organismo condições genéticas e moleculares predisponentes também ao CCR. Portanto, pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn, por exemplo, possuem maiores chances de desenvolvimento de CCR, sendo que o aumento na chance de desenvolver CCR em decorrência de doenças inflamatórias intestinais parece estar relacionado mais à inflamação crônica da mucosa gastrointestinal do que à predisposição genética. Para obtenção do modelo experimental de CCR associado à colite são utilizados agentes pró-inflamatórios concomitantemente aos carcinógenos químicos, a fim de mimetizar o processo de interação entre carcinogênese e inflamação que ocorre espontaneamente nos humanos. O Dextran Sulfato de Sódio (DSS) e o ácido acético são exemplos dos agentes utilizados, sendo o primeiro geralmente mais utilizado para estudos relacionados à progressão tumoral mediada pela colite crônica (colite ulcerativa ou doença de Crohn). Ainda, quando dissolvido

em água potável, o DSS é altamente tóxico para o epitélio colônico, resultando na colite grave caracterizada por diarréia sanguinolenta (OKAYASU; HATAKEYAMA; YAMADA; OHKUSA *et al.*, 1990).

Concluimos, assim, que a inflamação é um fator diretamente relacionado ao câncer, uma vez que as células inflamatórias são alguns dos principais componentes de um microambiente tumoral colônico, exercendo um papel crucial nas fases de promoção, progressão e metástases tumorais (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Ainda, a ativação das células imunes frente a estímulos inflamatórios promove a liberação de citocinas, quimiocinas, espécies reativas do oxigênio (EROs) e do nitrogênio (ERNs), resultando na oxidação de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios – fatores capazes de induzir a formação de lesões mutagênicas ao DNA.

### **1.3 Megacólon, constipação e o CCR**

A constipação é caracterizada pela presença de pelo menos dois dos seguintes sintomas: i. Defecação infrequente (menos de 3 vezes na semana); ii. Fezes sólidas; iii. Esforço excessivo ao defecar; iv. Sensação de bloqueio anorretal e vi. Sensação de evacuação incompleta após a defecação (LONGSTRETH; THOMPSON; CHEY; HOUGHTON *et al.*, 2006). Uma dieta pobre em fibras, a síndrome do intestino irritável ou outras possíveis complicações gastrointestinais e endócrinas podem corroborar ao desenvolvimento dessa característica. Contudo, complicações relacionadas ao SNC ou SNE também podem dar origem à constipação, como por exemplo, a síndrome de Parkinson e a Esclerose múltipla. Ainda, a constipação divide-se em duas vertentes, de acordo com os sintomas apresentados pelo paciente: 1 - Constipação funcional, caracterizada por dois dos sintomas acima descritos e desconforto abdominal, e 2 - Constipação relacionada à síndrome do intestino irritável (SII), caracterizada também pela associação de dois dos sintomas acima descritos, mas também ao menos dois dos seguintes: i. alívio do desconforto após peristaltismo intestinal; ii. Desconforto associado a fezes sólidas e iii. Desconforto associado à defecação menos freqüente (LONGSTRETH; THOMPSON; CHEY; HOUGHTON *et al.*, 2006). Além disso, estudos mostraram que

pacientes constipados têm alterações no trânsito intestinal – o que, acredita-se ser ocasionado pela propulsão efetiva colônica deficiente ou até mesmo por disfunção do assoalho pélvico.

Geralmente, o estágio final de uma constipação caracterizada pelo trânsito intestinal lento é representado pelo megacólon crônico, ou seja, não relacionado à doença de Hirschsprung ou outras patologias. Essa constipação lenta culmina em um acúmulo de matéria fecal no cólon, gerando, assim, o megacólon (MC). Dessa forma, o MC é subdividido em três vertentes: megacólon agudo, caracterizado pela mediação simpática em resposta a intervenções medicamentosas ou cirúrgicas em pacientes com idade avançada, megacólon tóxico, que pode ocorrer em resposta a uma inflamação colônica e megacólon crônico, que pode ser congênito (doença de Hirschsprung) ou representar o estágio final de uma constipação de trânsito intestinal lento, como mencionado anteriormente (BHARUCHA; PHILLIPS, 1999; HANAUER; WALD, 2007).

A constipação e o megacólon alteram alguns fatores histopatológicos colônicos. Por exemplo, há maior presença de neurônios agirofílicos no plexo mientérico, diminuição de neurofilamentos nos gânglios entéricos e alterações na expressão de peptídeo vasointestinal (VIP), substância P, PACAP, óxido nítrico e serotonina, por exemplo (KNOWLES; MARTIN, 2000). Ainda, desde o início do século 20, sabe-se que as Células Intersticiais de Cajal (ICC) e fibras nervosas possuem uma menor expressão em casos de constipação por trânsito lento e no MC crônico, indicando uma possível alteração neuromotora intestinal, uma vez que as ICC são essenciais na geração de ondas lentas intestinais e na transdução e amplificação de sinais entre nervos e músculo liso (HE; BURGART; WANG; PEMBERTON *et al.*, 2000; LYFORD; HE; SOFFER; HULL *et al.*, 2002). Ainda, pacientes com constipação têm maiores chances de desenvolverem cânceres gastrointestinais (SUNDBØLL; THYGESSEN; VERES; LIAO *et al.*, 2019) – contudo, o mesmo não é observado em pacientes com megacólon chagásico, os quais apresentam uma menor probabilidade de desenvolvimento de câncer (GARCIA; OLIVEIRA; PINTO; MUCCILLO *et al.*, 1996) – demonstrando, assim, um possível papel protetor exercido pelo megacólon contra o CCR.

## 1.4 SNE e o CCR

O sistema nervoso entérico é uma rede neural composta por aproximadamente  $5 \times 10^8$  neurônios, os quais distribuem-se em mais de 5 classes diferentes e controlam todas as funções intestinais, como por exemplo, a motilidade (FURNESS; HIND; NGUI; ROBBINS *et al.*, 2006). É formado pelo plexo mientérico (também denominado “plexo de Auerbach”) e pelo plexo submucoso (também denominado “plexo de Meissner”). O SNE independe, em partes, do sistema nervoso central (SNC), uma vez que todos os elementos responsáveis pela motilidade intestinal, por exemplo, são exclusivos desse órgão e pertencentes ao SNE (FURNESS; RIVERA; THACKER; PONTELL *et al.*, 2012). Ainda, o SNE permite que ocorra uma interação entre a sinalização de células epiteliais e microvasos presentes no microambiente intestinal, promovendo uma interação entre as células epiteliais colônicas, endoteliais, gliais e neurais entéricas, estimulando o estabelecimento de mutações no tecido colônico (GARCIA; STOPPER; KANNEN, 2014a). Corroborando com essa ideia, um estudo histopatológico de adenocarcinomas invasivos realizado em 2014 demonstrou a presença de nichos de células epiteliais tumorais ao redor de células da glia presentes no plexo mientérico intestinal, demonstrando a possível ação do sistema nervoso entérico na carcinogênese colorretal (UENO; SHIROUZU; SHIMAZAKI; KAWACHI *et al.*, 2014). Além disso, recentemente foi descoberto que o SNE é capaz de induzir a migração de células tumorais colônicas, principalmente através da sinalização de E-caderina e de L1CAM (DUCHALAIS; GUILLUY; NEDELLEC; TOUVRON *et al.*, 2018). Portanto, distúrbios do SNE podem culminar em alterações histopatológicas e funcionais colônicas, podendo levar ao desenvolvimento de doenças específicas ou câncer.

Nesse sentido, acredita-se que uma das doenças originadas a partir de um distúrbio do SNE seja o megacólon, o qual caracteriza-se por um aumento crônico colônico que pode associar-se à constipação extrema (KOEBERLE, 1963). O megacólon pode surgir devido a diversos estímulos, como por exemplo: doenças congênitas (doença de Hirschsprung), doenças adquiridas, medicamentos, infecções (*Clostridium difficile* ou *Trypanosoma cruzi*), inflamação intestinal, ou, ainda, estímulos idiopáticos (STABILE; KAMM; HAWLEY; LENNARD-JONES, 1991; STABILE; KAMM;



PHILLIPS; HAWLEY *et al.*, 1992). Embora o megacólon seja uma doença rara, sua forma infecciosa pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) geralmente é diagnosticada na população sul-americana, incluindo algumas regiões subdesenvolvidas do Brasil (KANNEN; DE OLIVEIRA; MOTTA; CHAGURI *et al.*, 2015). Curiosamente, estudos pioneiros na área relataram uma diminuição na incidência de CCR em animais ou pacientes com megacólon decorrente da doença de Chagas. Oliveira e colaboradores mostraram, em 2001, que os ratos infectados com *T. cruzi* tiveram risco reduzido de desenvolverem CCR (OLIVEIRA; LEITE; MIRANDA; ANDRADE *et al.*, 2001). Corroborando essa ideia, um estudo clínico retrospectivo realizado em nosso laboratório com 894 pacientes diagnosticados com megacólon chagásico, mostrou que os tumores não se desenvolveram dentro da área colônica aumentada pelo megacólon (GARCIA; ARANHA; GARCIA; BASILE *et al.*, 2003). Doze anos após esse achado, nosso laboratório confirmou que a desnervação mientérica encontrada no megacólon chagásico poderia estar relacionada à diminuição do risco de CCR tanto em pacientes, quanto em modelos experimentais (KANNEN; DE OLIVEIRA; MOTTA; CHAGURI *et al.*, 2015).

Desse modo, modelos experimentais de megacólon tornam-se essenciais para o estudo desta condição no CCR. Assim, Sakata e colaboradores, no ano de 1979, desenvolveram um modelo cirúrgico de laparotomia utilizado como importante referência para obtenção do megacólon proveniente da desnervação com a substância Cloreto de benzalcônio (BAC) (SAKATA; KUNIEDA; FURUTA; SATO, 1979). Os sais de benzalcônio compreendem um grupo de alquilaminas tensoativas carregadas positivamente (PATARCA; ROSENZWEIG; ZUNIGA; FLETCHER, 2000), sendo o BAC um potente detergente catiônico que possui propriedades bactericidas e atua através da destruição da célula bacteriana por toxicidade epitelial. Por essa propriedade, é amplamente utilizado como antisséptico cirúrgico. Além disso, o BAC é também um agente surfactante, ou seja: possui a capacidade de reduzir a tensão superficial da água. Essa substância foi descrita primeiramente no ano de 1950 como “um agente desinfetante para a pele” (PRICE, 1950). A técnica de desnervação colônica pelo BAC se fundamenta, basicamente, na exposição tecidual ao BAC, na qual a alça intestinal exposta é envolvida em gaze previamente embebida na solução de BAC e mantida na região durante trinta minutos (POLLI-LOPES; ZUCOLOTO;

CUNHA; FIGUEIREDO *et al.*, 2003). Assim, quando a camada serosa intestinal é exposta a esse agente surfactante catiônico, ocorre uma destruição seletiva e parcial dos neurônios presentes no plexo mientérico. Essa destruição neuronal parcial ocorre, provavelmente, devido à diferença de cargas entre célula e composto, uma vez que o BAC possui carga positiva e a membrana da célula muscular intestinal possui carga negativa, ocorrendo assim, a ação do BAC sobre a mesma (SATO; YAMAMOTO; IMAMURA; KASHIKI *et al.*, 1978). Desse modo, o BAC vem sendo utilizado em diversos modelos experimentais, principalmente em modelos gastrointestinais (GARCIA; MINTO; MARQUES; KANNEN, 2019). Foi observado que no modelo experimental de megacólon chagásico reproduzido pela desnervação com o BAC, há menores taxas de desenvolvimento tumoral quando comparado a casos em que não há formação dessa adaptação colônica – o que poderia ser explicado por fatores neuronais e/ou componentes luminais que atuam durante o desenvolvimento de megacólon (GARCIA; OLIVEIRA; PINTO; MUCCILLO *et al.*, 1996). Ainda, em um modelo de câncer gástrico com posterior exposição do estômago ao BAC, houve uma significativa diminuição no número de neurônios mientéricos, na incidência e no tamanho de adenocarcinomas gastrointestinais (POLLI-LOPES; ZUCOLOTO; CUNHA; FIGUEIREDO *et al.*, 2003; ZUCOLOTO; ROMANELLO; GARCIA; SOBREIRA *et al.*, 2002). Outros estudos demonstraram que o BAC aumenta a capacidade de esvaziamento gástrico, bem como a área mucosa de toda a porção gástrica - sugerindo um possível papel protetor deste composto contra tumores e outras patologias (SOBREIRA; ZUCOLOTO; GARCIA; TRONCON, 2002).

Até agora, os mecanismos do SNE presentes no megacólon chagásico que poderiam atuar como agentes protetores contra o CCR permanecem amplamente desconhecidos, mesmo considerando-se as evidências significativas de que os neurônios entéricos modulariam o desenvolvimento do CCR (RADEMAKERS; VAES; SCHONKEREN; KOCH *et al.*, 2017). Assim, devido à complexidade e importância do SNE e sua forte interação com o desenvolvimento do CCR, o estudo dessa interação se torna crucial para o estabelecimento de novos estudos relacionados a essa doença.

## 1.5 O SNE e a modulação do estresse oxidativo e da inflamação do cólon

Há evidências da participação do SNE em diversas doenças e síndromes intestinais (CORNET; SAVIDGE; CABARROCAS; DENG *et al.*, 2001; DUCHALAIS; GUILLUY; NEDELLEC; TOUVRON *et al.*, 2018; GARCIA; STOPPER; KANNEN, 2014b; GULBRANSEN; BASHASHATI; HIROTA; GUI *et al.*, 2012; IANTORNO; BASSOTTI; KOGAN; LUMI *et al.*, 2007; LIU; ZHANG; WU, 2018; RADEMAKERS; VAES; SCHONKEREN; KOCH *et al.*, 2017). Por exemplo, células-tronco derivadas da crista neural do SNE atuam como alternativa terapêutica para o tratamento da doença de Hirschsprung, caracterizada principalmente pela ausência ou perda de células neuronais intestinais (BURNS; PASRICHA; YOUNG, 2004). Ainda, indivíduos idosos ou com doenças neurodegenerativas apresentam frequentemente constipação crônica oriunda da perda de neurônios do plexo mientérico, culminando em disfunção do SNE (RAO; GERSHON, 2016).

Nesse sentido, o SNE modula processos inflamatórios e oxidativos gastrointestinais. Células gliais entéricas são capazes de diminuir os níveis de glutathiona reduzida (GSH), culminando em proteção intestinal contra o estresse oxidativo (ABDO; DERKINDEREN; GOMES; CHEVALIER *et al.*, 2010). Ainda, compostos antioxidantes como o resveratrol, ácido caprílico e o café desempenham efeitos benéficos ao atuarem sobre o SNE, uma vez que protegem o plexo mientérico intestinal contra os efeitos do estresse oxidativo e da inflamação (CANSIZ; ÜNAL; ÜSTÜNDAĞ; ALTURFAN *et al.*, 2021; FERREIRA; BERARDI; BORGES; NATALI *et al.*, 2018; SOARES; KANNEN; JORDÃO JUNIOR; GARCIA, 2019). O dano ao SNE ocasionado pela inflamação está relacionado a uma capacidade antioxidante comprometida (BROWN; GULBRANSEN, 2018).

Portanto, além do estresse oxidativo, a inflamação também pode alterar a função e a sobrevivência de neurônios entéricos, promovendo uma neuropatia entérica (MOYNES; LUCAS; BEYAK; LOMAX, 2014). Assim, há alterações neuronais funcionais ou deletérias durante desordens intestinais como a colite (GULBRANSEN; BASHASHATI; HIROTA; GUI *et al.*, 2012; LINDEN; COUVRETTE; CIOLINO; MCQUOID *et al.*, 2005; NEUNLIST; AUBERT; TOQUET; ORESHKOVA *et al.*, 2003), a doença de Crohn (CORNET; SAVIDGE; CABARROCAS; DENG *et al.*, 2001; VON

BOYEN; SCHULTE; PFLÜGER; SPANIOL *et al.*, 2011) e a síndrome da resposta inflamatória experimental (ROSENBAUM; SCHICK; WOLLBORN; HEIDER *et al.*, 2016).

Em adição, as células gliais são responsivas frente a um microambiente inflamatório (ROSENBAUM; SCHICK; WOLLBORN; HEIDER *et al.*, 2016), podendo secretar moléculas de sinalização inflamatórias e outros componentes, como o óxido nítrico e a proteína S100B (CIRILLO; SARNELLI; ESPOSITO; GROSSO *et al.*, 2009). Ainda, durante a doença inflamatória intestinal, as células gliais entéricas dão origem ao processo de gliogênese, em uma tentativa de balancear os efeitos deletérios neuronais originados na inflamação (JOSEPH; HE; QUINTANA; KIM *et al.*, 2011). Em biópsias de pacientes com colite ulcerativa, regiões inflamadas apresentam níveis consideravelmente elevados de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), enquanto biópsias de regiões não-inflamadas da mucosa de pacientes com doença de Crohn apresentam níveis menores de GFAP, comprovando, assim, a relação do SNE com o processo inflamatório (CORNET; SAVIDGE; CABARROCAS; DENG *et al.*, 2001; VON BOYEN; SCHULTE; PFLÜGER; SPANIOL *et al.*, 2011).

Desse modo, o SNE modula fatores que, por sua vez, têm papel já bem estabelecido na carcinogênese do cólon: a inflamação, o estresse oxidativo e, somados a eles, modula também a expressão do receptor de potencial transitório vanilóide do tipo1 (TRPV1).

## **1.6 O SNE e a expressão do Receptor de Potencial Transitório Vanilóide do Tipo – 1 (TRPV1)**

A fim de melhor entender o papel do SNE sobre a carcinogênese colorretal, o estudo dos receptores de potencial transitório vanilóides, como o TRPV1, é uma importante chave para nossa hipótese. O TRPV1 é caracterizado como um canal permeável ao cálcio que pode ser ativado pelo seu agonista exógeno, a capsaicina, sendo o principal responsável pelos efeitos nociceptivos deste composto. Foi primeiramente identificado e clonado no final da década de 1990 e pertence a uma família de receptores ionotrópicos, que possui propriedades catiônicas não-seletivas.

Contudo, demonstra certa seletividade pelo cálcio (SZALLASI; CORTRIGHT; BLUM; EID, 2007). Existem alguns neurônios específicos que são sensíveis para capsaicina: as fibras nervosas do tipo C, os gânglios da raiz dorsal e trigeminal e as fibras A $\delta$ . A expressão de TRPV1 é aumentada durante alguma injúria nervosa, como hiperalgesia ou diabetes neuropática, sendo este receptor, portanto, um importante alvo para tratamento da dor (SZALLASI; CORTRIGHT; BLUM; EID, 2007). Ainda, a porção terminal de neurônios sensíveis à capsaicina atua como um sítio de liberação de diversos neuropeptídeos pró-inflamatórios, como a substância P e os peptídeos relacionados ao gene da calcitonina (CGRP), que, por sua vez, estão relacionados ao início da cascata da inflamação neurogênica – presente em doenças como a síndrome do intestino irritável. Assim, demonstrada sua relação com o trato gastrointestinal, estudos pré-clínicos exploram o papel do TRPV1 no intestino (HOLZER, 2004). Nesse sentido, modelos animais de camundongos homocigotos nulos para TRPV1 (animais TRPV1 *knockouts* ou TRPV1<sup>-/-</sup>) são desprovidos da hipersensibilidade térmica que ocorre naturalmente como resposta a agentes pró-inflamatórios, o que sugere o possível uso de antagonistas do TRPV1 como novas drogas analgésicas (CATERINA; LEFFLER; MALMBERG; MARTIN *et al.*, 2000; DAVIS; GRAY; GUNTHORPE; HATCHER *et al.*, 2000), como a Capsazepina. Assim, estes antagonistas representam uma nova estratégia terapêutica no alívio da dor, pois ao contrário de agentes analgésicos tradicionais que bloqueiam a resposta inflamatória e a propagação e transmissão da dor, os mesmos objetivam prevenir a dor principalmente através do bloqueio de um transdutor de estímulos nocivos em neurônios sensoriais (SZALLASI; CORTRIGHT; BLUM; EID, 2007). Esse fato foi demonstrado em um estudo no qual a Capsazepina sistêmica foi capaz de diminuir a sinalização de nociceptores – o que foi observado através da coloração com c-fos em um modelo de pancreatite induzido por arginina (WICK; HOGE; GRAHN; KIM *et al.*, 2006) e diminuiu marcadores inflamatórios em modelos de inflamação gastrointestinais (HUTTER; WICK; DAY; MAA *et al.*, 2005). A Capsazepina, ainda, diminuiu a resposta fisiológica à distensão colorretal ou jejunal em camundongos (SUGIURA; BIELEFELDT; GEBHART, 2007), um efeito comparável às observações em camundongos TRPV1<sup>-/-</sup> (JONES; XU; GEBHART, 2005). Adicionalmente, este antagonista também foi capaz de induzir a apoptose de células tumorais colorretais através do aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas como a p53 e Bax

(SUNG; PRASAD; RAVINDRAN; YADAV *et al.*, 2012). Ainda, a administração de resiniferatoxina – um fármaco análogo da capsaicina - em baixas doses ou em curtos períodos de tempo, ativa o TRPV1, aumentando a liberação de neurotransmissores. Por outro lado, altas concentrações ou períodos de tratamento prolongados com esse fármaco culminaram em uma desfuncionalização resultante da ativação desses receptores (VIGNA, 2017).

Há indícios de que o TRPV1 exerça papéis de destaque no trato gastrointestinal. Por exemplo, uma imunoreatividade maior para TRPV1 em fibras sensoriais colônicas foi encontrada em pacientes com síndrome do intestino irritável (YIANGOU; FACER; DYER; CHAN *et al.*, 2001), em fibras sensoriais nervosas de pacientes com hipersensibilidade retal ou urgência fecal (CHAN; FACER; DAVIS; SMITH *et al.*, 2003) e em fibras sensoriais da mucosa de pacientes com refluxo gastroesofágico (MATTHEWS; AZIZ; FACER; DAVIS *et al.*, 2004). Nesse sentido, conhecer e entender melhor a função do Receptor de Potencial Transitório Vanilóide do Tipo 1 (TRPV1) é de extrema importância para uma melhor compreensão de alguns mecanismos desencadeadores de patologias do trato gastrointestinal.

## 1.7 Consideração geral

O presente trabalho foi dividido em 3 experimentos distintos, de acordo com as questões centrais enumeradas a seguir, a fim de estabelecer os possíveis mecanismos envolvidos na proteção desempenhada pela desnervação do plexo mientérico pelo BAC durante a carcinogênese experimental química colônica:

**Experimento 1** – Qual é a relação entre megacólon, desnervação e a carcinogênese colônica?

**Experimento 2** – A desnervação com BAC seria capaz de reduzir a carcinogênese colônica por um eventual efeito no estresse oxidativo desse órgão?

**Experimento 3** – Os receptores TRPV1 seriam capazes de modular a carcinogênese experimental colônica?

## **2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA**

---

Com o intuito de responder às questões anteriormente formuladas, foram delineados os seguintes experimentos:

**Experimento 1** – Pacientes com constipação têm maior probabilidade de desenvolvimento do CCR. Por outro lado, pacientes que apresentam megacólon chagásico possuem menores chances de desenvolvimento dessa doença. Portanto, estabelecer os mecanismos pelos quais essa proteção contra o CCR ocorre é um dos fatores-chave para o entendimento do papel do SNE no CCR.

**Experimento 2** – A inflamação está estritamente ligada ao CCR, já que a presença de células inflamatórias no microambiente tumoral colônico e a ativação de células imunes ocasionada por estímulos inflamatórios promovem a liberação de EROs, por exemplo, induzindo a carcinogênese. Assim, a análise do papel da inflamação no mecanismo protetor exercido pelo BAC sobre o CCR é crucial para melhor elucidar esse processo.

**Experimento 3** - O TRPV1 é expresso em diversas alterações intestinais, como na síndrome do intestino irritável. Ainda, seu agonista induz o processo de apoptose em células cancerosas do cólon. Nesse sentido, determinar se esses receptores modulam o processo carcinogênico colônico é essencial para o estabelecimento dos mecanismos possivelmente envolvidos nesse processo.





### 3.1 Objetivo geral

Determinar quais os mecanismos envolvidos no papel protetor exercido pela desnervação com o BAC contra o CCR, através do estudo histopatológico do cólon e de imunomarcadores carcinogênicos, inflamatórios e neuronais, somados à análise de estresse oxidativo. Ainda, animais TRPV1<sup>-/-</sup> foram utilizados, a fim de avaliar a possível atuação desse receptor na proteção desempenhada pela desnervação contra o CCR.

### 3.2 Objetivos específicos

**3.2.1 Estudo histopatológico colônico:** As lâminas histológicas de tecido colônico serão submetidas à técnica de H.E. para posterior análise do número de criptas displásicas – lesões precursoras de CCR.

**3.2.2 Imunomarcadores carcinogênicos:** Realização da técnica de imunistoquímica para análise de células das criptas colônicas positivas para os seguintes anticorpos primários:  $\gamma$ H2AX, PCNA,  $\beta$ -galactosidase e COX-2 para avaliar, respectivamente: quebras na dupla-fita de DNA, proliferação e senescência celulares e inflamação no tecido colônico.

**3.2.3 Imunomarcadores neuronais:** Para avaliar o papel da desnervação sobre os neurônios mientéricos colônicos, será realizada a técnica de imunistoquímica para análise dos anticorpos primários UCHL1 e TRPV1, marcadores de neurônios e fibras nervosas.

**3.2.4 Análise de estresse oxidativo:** A técnica de espectrofotometria será realizada para análise da presença de MDA e GSH no tecido colônico de ratos, a fim de estudar o papel da desnervação com BAC sobre o estresse oxidativo.

**3.2.5 Animais TRPV1<sup>-/-</sup>:** Criptas displásicas colônicas serão avaliadas em camundongos TRPV1<sup>-/-</sup>, a fim de estabelecer o papel desse receptor no mecanismo protetor da desnervação contra o CCR.

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

#### 4.1 Animais – Consideração geral

Todos os animais utilizados neste experimento (85) foram provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Brasil. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em salas com ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura controlada ( $22\pm 2$  °C), em caixas plásticas, com 55% de umidade e livre acesso de ração padrão Purina® para roedores e água de torneira filtrada, *ad libitum*. Foram mantidos no máximo 5 animais por caixa e todos os animais foram aclimatados por pelo menos 1 semana antes do início dos experimentos. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (169/2014).

Tabela 1 - Relação dos animais utilizados em cada experimento.

Experimento	Animal	Gênero	Peso	Quantidade
<b>E1</b>	Ratos Wistar	Machos	150±20g	36
<b>E2</b>	Ratos Wistar	Machos	150±20g	23
<b>E3</b>	Camundongos			
	C57BL/6J	Machos	20±2g	14
	TRPV1 <sup>-/-</sup>			12

## 4.2 Delineamento experimental

Após o período de aclimatação de 1 semana, os animais foram divididos em seus respectivos grupos, de acordo com o experimento em questão.

**Experimento 1** - No Experimento 1, 36 ratos machos Wistar foram subdivididos em 6 grupos de 6 animais cada, sendo: C (controle, sem procedimentos), M (megacólon obstrutivo), B (BAC 1,5 mM), D (DMH 125mg/kg), DM (DMH 125mg/kg + Megacólon obstrutivo) e DB (DMH 125mg/kg + BAC 1,5mM). A eutanásia de todos os grupos ocorreu dois meses após a o início dos experimentos e o intervalo entre os procedimentos foi de 1 semana (Figura 1).

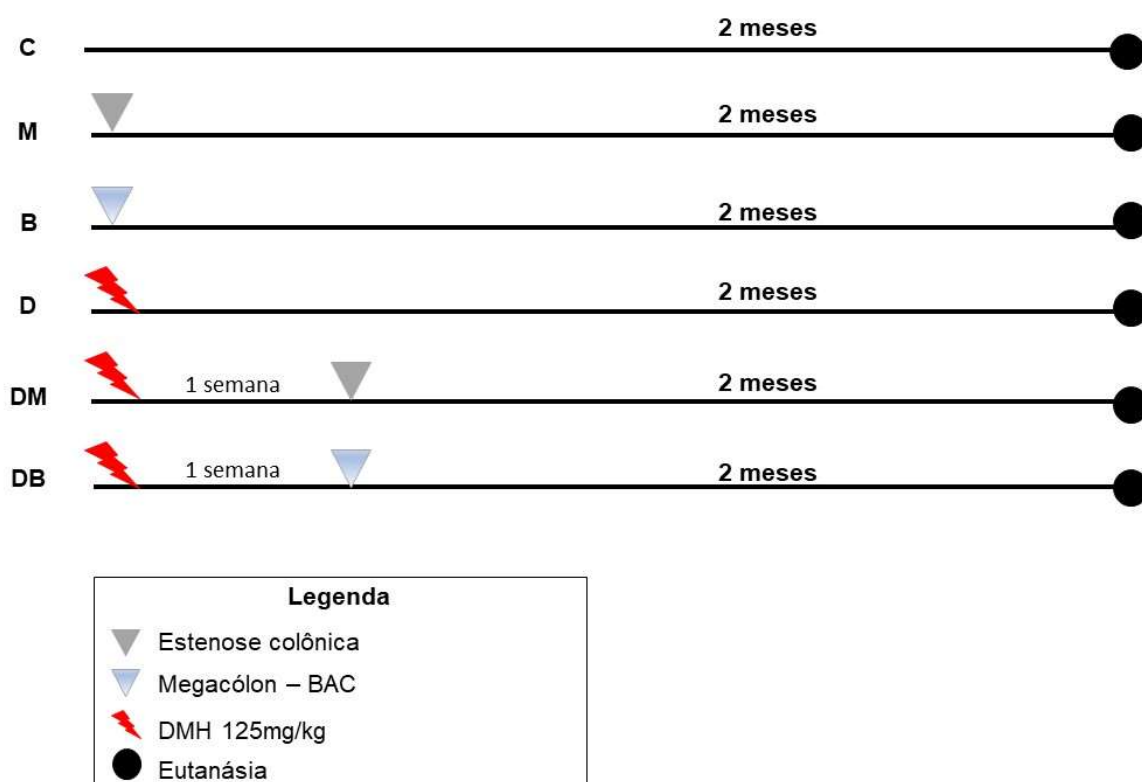


Figura 1 – Delineamento experimental referente ao Experimento 1.

**Experimento 2** - Para análise dos mecanismos envolvidos no efeito protetor exercido pela desnervação com BAC no CCR, o Experimento 2 foi subdividido em 3 grupos distintos, sendo eles: C (controle; sem procedimentos; n=7), M (MNNG 60mg/kg; n=8) e BM (BAC 0,3% + MNNG 60 mg/kg; n=8). Todos os animais foram mortos 7 semanas após o início dos experimentos (Figura 2).

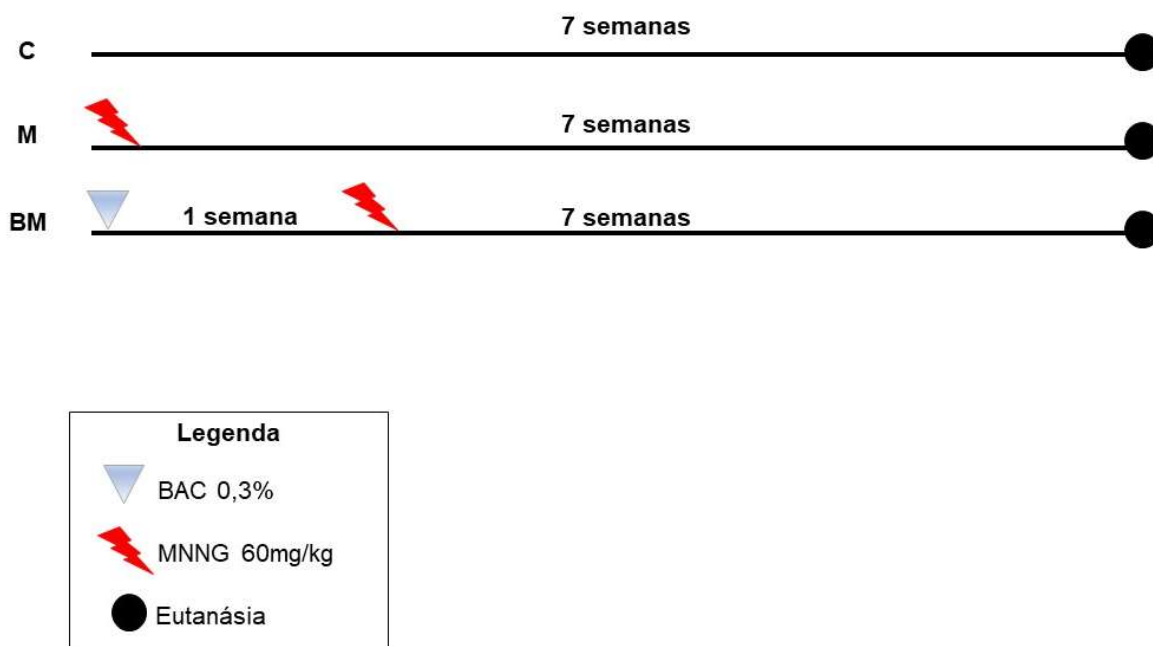


Figura 2 – Delineamento experimental referente ao Experimento 2.

**Experimento 3** - O Experimento 3 baseou-se na análise do papel do TRPV1 sobre a desnervação mientérica promovida pelo BAC contra o CCR. Assim, os animais foram subdivididos de acordo com os procedimentos aos quais foram expostos: C (n=7; animais *wild-type*, sem procedimentos); CM (n=4; animais *wild-type* expostos ao MNNG 60 mg/kg); TK (n= 7; TRPV1<sup>-/-</sup>; sem procedimentos) e TKM (n=5; TRPV1<sup>-/-</sup> + MNNG 60 mg/kg). Todos os animais foram mortos 6 semanas após o início dos experimentos (Figura 3).

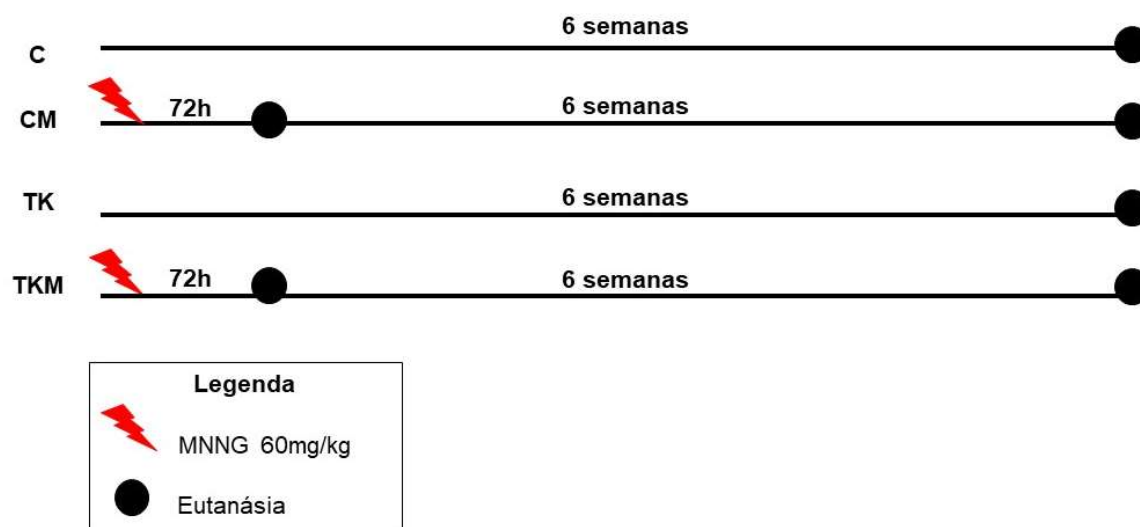


Figura 3 – Delineamento experimental referente ao Experimento 3.

### 4.3 Indução da carcinogênese colônica experimental

Dois carcinógenos distintos foram administrados neste trabalho, de acordo com seu mecanismo de metabolização: N-Metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) (Experimentos 2 e 3) e Dimetilhidrazina (DMH) (Experimento 1). Assim, o carcinógeno DMH foi escolhido para indução do CCR no experimento 1, já que é metabolizado diretamente no fígado, sendo mais seguro para associação da carcinogênese à obstrução colônica. O carcinógeno químico MNNG foi escolhido para os estudos dos experimentos 2 e 3, pois tem ação direta e seu uso é tópico e prático, uma vez que pode ser aplicado diretamente no reto do animal (NARISAWA; MAGADIA; WEISBURGER; WYNDER, 1974).

Todos os animais receberam uma única instilação intra-retal (100  $\mu$ L/animal) do carcinógeno MNNG (60 mg/Kg; Sigma-Aldrich®, Louis, MO, USA), como descrito pela literatura (KANNEN; HINTZSCHE; ZANETTE; SILVA *et al.*, 2012). O carcinógeno DMH, por sua vez, foi administrado na dose de 125 mg/kg, via intra-peritoneal (i.p.), também em uma única dose.

As soluções de MNNG e DMH foram preparadas no momento da sua aplicação e diluídas em água destilada e solução salina (NaCl 0,9%), respectivamente. O

preparo das soluções, bem como a sua administração, foi realizado com equipamentos de proteção individual (aventais descartáveis, luvas, óculos de proteção e máscaras contra gases). Após a manipulação dos carcinógenos, os materiais de laboratório foram acondicionados em lixos hospitalares e encaminhados diretamente para incineração.

#### **4.4 Modelo experimental de desnervação mientérica com BAC**

Para realização do procedimento cirúrgico de desnervação colônica, foi realizada uma única aplicação tópica de Cloreto de Benzalcônio (BAC) (0,3%; Benzyl dimethyl Tetradecyl Ammonium Chloride, SIGMA®) na serosa colônica, conforme técnica padronizada por Zucoloto e colaboradores (ZUCOLOTO; DE DEUS; MARTINS; MUGLIA *et al.*, 1997). A anestesia foi realizada com associação de Ketamina (80mg/Kg Ketamine®; Pfizer; Sao Paulo-Brazil) e Xilazina (14mg/Kg; Rompum®; Bayer; Sao Paulo-Brazil) e administrada em uma quantidade de 100 µL/animal, via intraperitoneal. Aproximadamente dez minutos depois, os animais foram submetidos a laparotomia da linha mediana, com aproximadamente 3 cm de extensão. Um segmento do cólon distal de aproximadamente 2 cm foi isolado e, com o auxílio de pinças cirúrgicas, uma gaze umedecida com BAC a 0,3% (experimento II) ou BAC a 1,5 mM (experimento I) foi envolta no segmento distal colônico, permanecendo durante 15 minutos (SHU; MENG; JIN; CHEN *et al.*, 2013). Após esse período, toda a cavidade peritoneal foi lavada com solução salina estéril (NaCl 0,9%), a fim de evitar necrose em órgãos subjacentes. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram suturados e encaminhados para observação e recuperação pós-cirúrgica.

#### **4.5 Modelo experimental de megacólon obstrutivo**

Os animais foram anestesiados com a associação de Ketamina (80mg/Kg Ketamine®; Pfizer; Sao Paulo-Brazil) e Xilazina (14mg/Kg; Rompum®; Bayer; Sao



Paulo-Brazil), administrada via i.p. em uma dose de 100 µL/animal. Os animais foram expostos à laparotomia da linha mediana e um anel de silicone foi posicionado ao redor do cólon esquerdo, em contato com a camada serosa, cerca de 3cm abaixo do reflexo peritoneal, como descrito pela literatura (SYK; MIRASTSCHIJSKI; JEPPSSON; AGREN, 2003).

#### **4.6 Coleta e processamento do material**

Os animais foram mortos por exposição ao gás dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) em câmara de CO<sub>2</sub> e submetidos à laparotomia mediana com posterior isolamento e retirada do cólon distal. Assim, os cólons foram abertos a partir de sua borda mesentérica, limpos com solução salina (NaCl 0,9%) e cuidadosamente estendidos em uma placa de vidro para realização dos cortes histológicos (2cmX2cm) para armazenamento em cassetes (Labor Import<sup>®</sup>; ref. 13254) para posterior realização das análises histopatológicas e imunoistoquímicas ou armazenados em criotubos de 2 mL (Corning<sup>®</sup>; ref.430659), para análise de estresse oxidativo. Para a realização das futuras análises histopatológicas e imunoistoquímicas, os cólons foram, então, posicionados entre papéis de filtro dentro de cassetes histológicos previamente identificados, que foram imediatamente imersos em solução de formalina tamponada a 10% (Merck<sup>®</sup> - Darmstadt, Alemanha) para fixação do material em um período de 48 a 72 horas. Depois de fixadas, as amostras foram submetidas à desidratação através de submersão em crescentes concentrações de alcoóis (70%, 80%, 90% e 100%) por 60 minutos em cada concentração. Os materiais foram, então, submetidos a banhos de xilol 100% (Merck<sup>®</sup> - Darmstadt, Alemanha - 80 minutos) para que ocorresse sua diafanização. Os cólons processados foram incluídos em parafina líquida (Histosec<sup>®</sup> - Merck<sup>®</sup> - Darmstadt, Alemanha), em temperatura de 60°C por um período de 4 horas, para a realização dos cortes histológicos para confecção das lâminas. Através de um micrótomo rotativo, os blocos de parafina contendo as amostras colônicas foram cortados a uma espessura de 4-5 µm, aderidos à lâminas silanizadas e levados à estufa aquecida a 60°C para otimização da adesão do material na lâmina. Anteriormente à técnica de imunoistoquímica ou coloração por H.E., as lâminas foram

desparafinizadas e hidratadas. Finalmente, a recuperação antigênica do material foi realizada através de método físico-químico, por exposição do material à vaporização em solução-tampão de citrato, com o pH 6,0.

#### **4.7 Análise de criptas displásicas**

As lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris por 3 minutos e contra coradas com a solução de Eosina Floxina alcoólica por 10 segundos. Para posterior desidratação, a lâmina foi submersa em concentrações crescentes de álcoois e em seguida diafanizadas em xilol. As lâminas foram analisadas em microscopia de luz para identificação e quantificação das criptas displásicas (CD) na mucosa colônica, caracterizadas pelo seu aumento de tamanho, lúmen com aspecto de dente de serra, células caliciformes hiperestendidas, redução nos focos de mucina, pseudoestratificação, espessamento da membrana da cripta, hiper celularidade e núcleo aumentado e estratificado, com perda de polaridade (BIRD, 1987; PERE; CERAR, 2014).

Foi calculado o número total de criptas displásicas no corte histológico, de acordo com a área da lâmina analisada, em cm<sup>2</sup>.

#### **4.8 Imunoistoquímica:**

##### **4.8.1 Reações imunoistoquímicas**

A técnica de imunoistoquímica foi realizada em cortes histológicos colônicos transversais, aquecidos a 60°C durante 75 minutos, e ocorreu através da reação antígeno-anticorpo, seguida da reação com marcador visível ao microscópio. Para a marcação dos cortes histológicos, os mesmos foram aderidos em lâminas silanizadas (Star Frost®; Knittel-Glaeser, Braunschweig, Alemanha), desparafinizados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de etanol até água destilada. A

recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato pH 6,0 (em panela de vapor) por 20 minutos. Para inibir reações com peroxidases teciduais, peróxido de hidrogênio a 3% foi adicionado sobre as lâminas. Para a realização do bloqueio de ligações teciduais inespecíficas – o que poderia causar marcação inespecífica, foi utilizado soro normal de cavalo diluído em solução-tampão de fosfato (PBS) pH 7,4 (PBS), em uma concentração de 10%. Entre cada etapa as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS para evitar formação de precipitados. As lâminas foram incubadas com seus respectivos anticorpos primários, como exemplificado na Tabela 2: anti-gamma H2A.X (phospho S140 - ab22551, Abcam, UK – 1:50), anti-PCNA (Antígeno Nuclear Anti-proliferação celular, clone PC10, Abcam®, Massachusetts, USA – 1:100), anti-TRPV-1 (PA1-748; ThermoFisher Scientific, 1:100), anti-COX-2 (NCL-COX-2 [4H12]; Novocastra®; 1:200), anti- $\beta$ -galactosidase (PA5-85195; Invitrogen; 1:200) e anti-UCHL1 (WH0007345M1; Clone 1B8-4D2; Sigma Aldrich; 1:200) para avaliar, respectivamente: presença de danos no DNA, proliferação celular, neurônios/fibras sensoriais, células inflamatórias, senescência e neurônios. Após lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário biotilado durante 30 minutos e, após nova lavagem, foram incubadas com polímero conjugado também por 30 minutos. Para revelação, as lâminas receberam solução reagente contendo o cromógeno DAB (3,3'- diaminobenzidina), durante 1 a 3 minutos, até o aparecimento de precipitado de coloração marrom – atribuída à redução do DAB pela reação. Todos os reagentes foram disponibilizados com PicTure™ Max PolymerDetection Kit (Invitrogen). As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris diluída por cerca de 1 minuto e desidratadas e diafanizadas novamente. Para montagem das lâminas, foi utilizado Entelan.

#### **4.8.2 Análises imunoistoquímicas**

A contagem das células positivamente marcadas que apresentaram coloração marrom oriunda da redução do cromógeno DAB (3,3'- diaminobenzidina) foi feita manualmente com uso de microscópio óptico da marca Zeiss® (Jenamed - Oberkochen, Alemanha). As contagens foram realizadas em objetiva de aumento de

400x, e foi considerada toda a extensão de cada corte. Todas as avaliações imunistoquímicas foram realizadas nas células das criptas colônicas, variando conforme a localização do antígeno específico.

**Tabela 2** – Anticorpos utilizados nesse trabalho.

<b>Anticorpo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Sítio de marcação</b>	<b>Alvo</b>
$\gamma$ -H2AX	1:50	Núcleo	Quebras na dupla-fita de DNA
PCNA	1:100	Núcleo	Proliferação celular
$\beta$ -galactosidase	1:200	Citoplasma	Senescência celular
COX-2	1:200	Citoplasma (membrana microssomal/retículo endoplasmático)	Inflamação
TRPV-1	1:100	Neurônios – Citoplasma (membrana pós-sináptica ou espinha dendrítica)	Neurônios e fibras neuronais
UCHL1	1:200	Neurônios - Citoplasma (membrana do retículo endoplasmático)	Neurônios e fibras neuronais

#### 4.9 Análise de GSH e MDA no cólon

A análise da presença de GSH foi feita de acordo com a metodologia utilizada por Sedlak e Lindsay (1968). Amostras de 100 mg de tecido colônico foram adicionadas a tubos de ensaio de 10 ml, contendo 2 ml de EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) 0,02 M, colocados no gelo. A solução foi homogeneizada com um homogeneizador de tecidos portátil Marconi® (Piracicaba, Brasil), modelo MA-102 (Mini), 125W, adicionando-se mais 2 ml de EDTA 0,02M. Desse homogenato, 2,5 ml

foram retirados e transferidos para um outro tubo de ensaio de 10 ml, adicionando-se 2 ml de água milli Q e 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) 50% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) ao tubo. Este permaneceu 15 minutos em repouso, foi agitado na metade do tempo de espera e, então, centrifugados em centrífuga Hettich® (Tuttlingen, Alemanha), modelo Universal 320 R, a 4000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. Transferiu-se 1 ml do sobrenadante para um microtubo *Eppendorf*® de 5 ml, ao qual foi adicionado 2 ml de tampão TRIS-HCl 0,4 M (pH 8,9) e 50 µl de 5,5'-diti-biois-2-ácido nitrobenzóico – DTNB (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Após 5 minutos, a absorbância foi lida a 412 nm, contra um branco composto por 1 ml de EDTA 0,02 M, 2 ml de de TRIS -HCl 0,4 M (pH 8,9) e 50 µl de DTNB. A quantidade de MDA foi mensurada pelo método proposto por Gerard-Monnier et al. (1998), com algumas adaptações. Amostras de 200 mg de tecido foram pesadas e homogeneizadas em 1 ml de tampão fosfato (PBS), 0,2 M pH 7.4, com auxílio do mesmo homogeneizador mecânico de tecidos. Desse homogenato, 200µl foram transferidos para um micro tubo *Eppendorf*® de 1,5 ml, adicionando-se 650µl de solução 10mM de 1-metil-fenilindol em acetonitrila e metanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), 2:1, v/v e 150µl de ácido clorídrico (HCl) puro (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) a 37%. Em seguida, os *Eppendorfs*® foram agitados em vortex (Phoenix Luferco®, Araraquara, Brasil - modelo AP 59/130W) e incubados em banho-maria (Marconi®, Piracicaba, Brasil - modelo MA-156) a 45°C por 40 minutos. Após o banho, as amostras foram resfriadas em gelo e os microtubos *Eppendorf*® foram centrifugados a 4000rpm em centrífuga Hettich® (Tuttlingen, Alemanha), modelo Universal 320 R, por 10 minutos. A leitura da absorbância do sobrenadante foi feita, em seguida, em comprimento de onda de 586nm em um espectrofotômetro modelo SpectraMax® M5 com SoftMax® Pro Data Acquisition & Analysis Software (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). Os valores de absorbância foram padronizados pela equação da curva de 1,1,3,3- tetrametoxipropano (TMP) hidrolisado (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e corrigidos pela concentração de proteínas de cada amostra.



Os resultados foram submetidos à análise estatística com o auxílio do *software* Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software Inc. San Diego, Califórnia, US). A análise de variância de uma via (One-way ANOVA) foi utilizada para determinação das médias entre todos os grupos, com pós-teste de Tukey para confirmação das diferenças estatísticas encontradas. Para confirmação da diferença entre apenas dois grupos de estudo, o Teste T de *Student* foi escolhido, através da análise de Mann-Whitney. Foi adotado um nível de significância de  $P < 0,05$  e a média foi calculada  $\pm$  erro padrão da média.

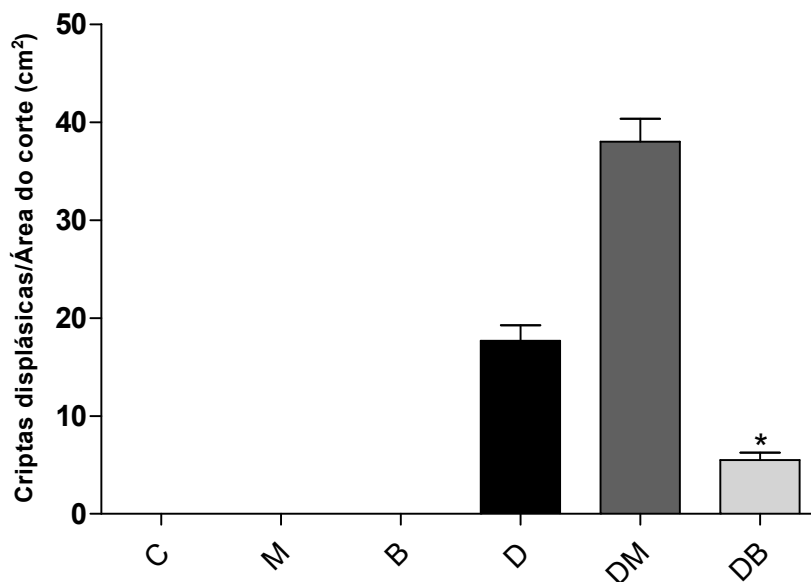




## 6.1 Resultados - Experimento 1

### 6.1.1 Análise de criptas displásicas (CD)

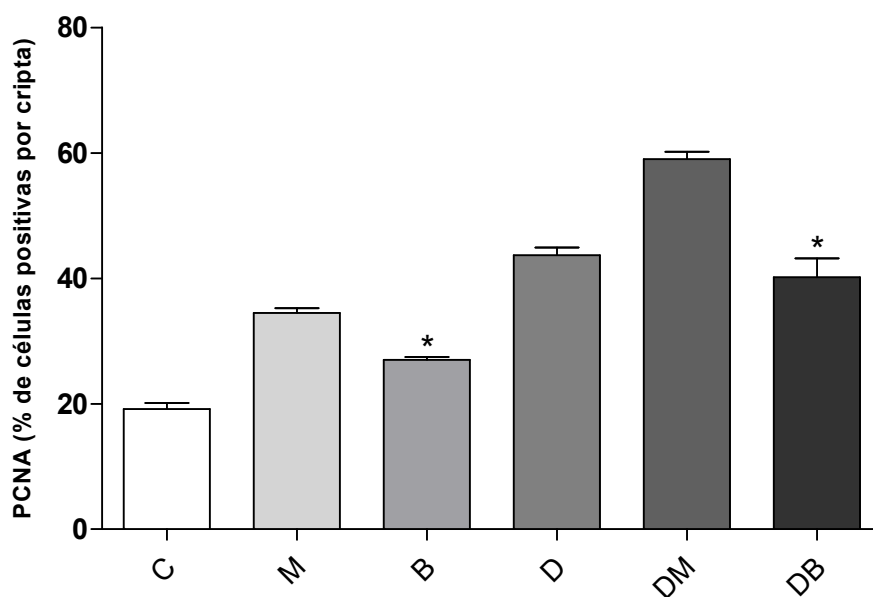
As CD são lesões precursoras do CCR. Nesse sentido, avaliamos sua presença nos cólons dos animais do E1. Como esperado, não observamos presença de CD nos grupos C, M e B, uma vez que os mesmos não foram expostos ao carcinógeno DMH ( $P > 0,05$ ). Observamos que houve o aparecimento de um número significativo de CD no grupo D (exposto ao DMH 125 mg/kg) – o qual foi muito maior quando em associação ao modelo de megacólon obstrutivo (grupo DM) ( $P < 0,05$ ), quando em comparação aos demais grupos do estudo. A desnervação foi capaz de atenuar significativamente esse número de CD ( $P < 0,05$ ), quando em comparação aos grupos expostos ao DMH 125 mg/kg (Grupo DB vs D;  $P = 0,0022$ ) ou à associação do carcinógeno somada ao megacólon obstrutivo (Grupo DB vs DM;  $P = 0,0022$ ). Desse modo, concluímos que o modelo de megacólon obstrutivo aumenta consideravelmente o número de CD colônicas – o qual é atenuado pela desnervação com BAC.



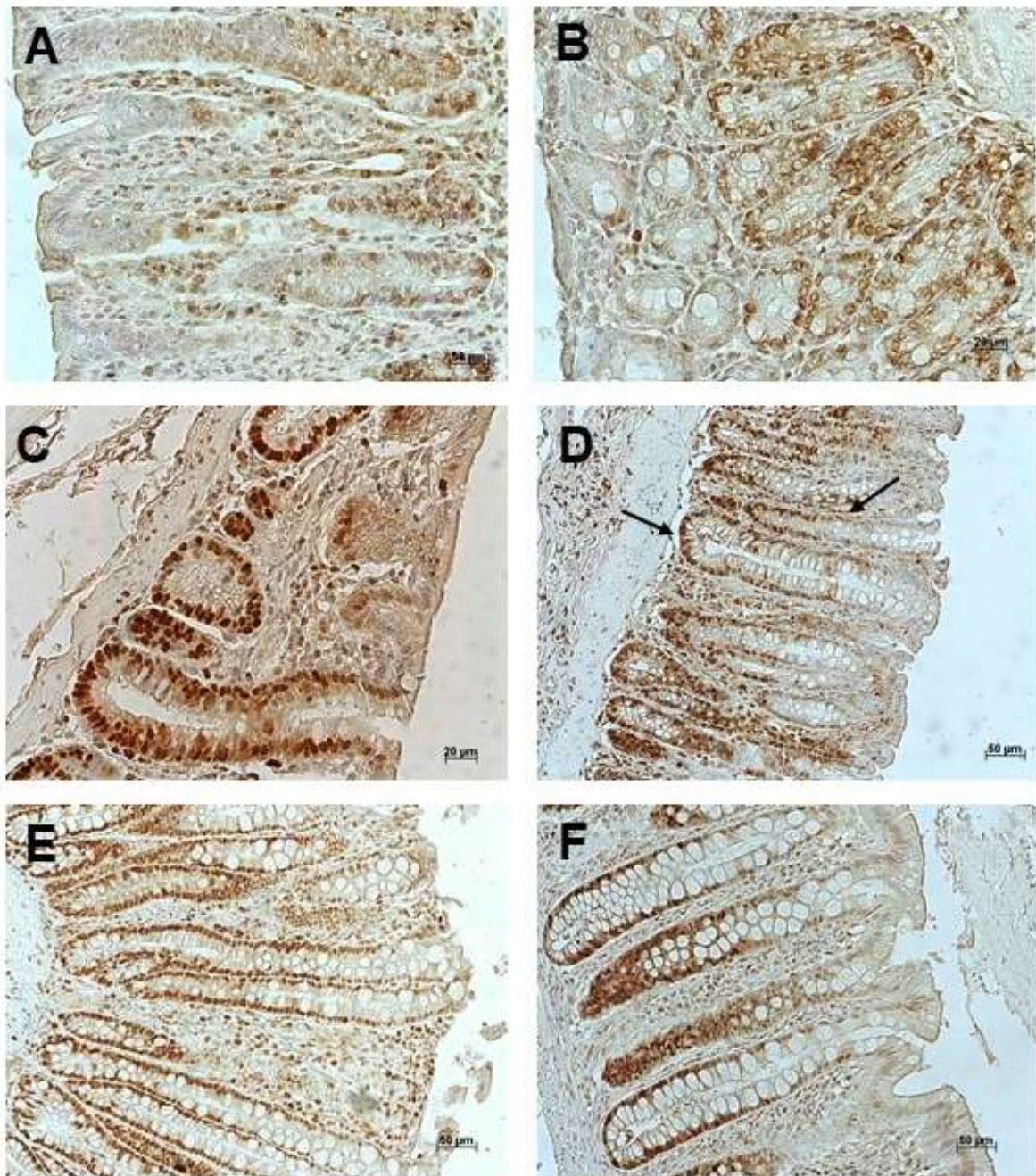
**Figura 4 – Número de criptas displásicas colônicas – E1** – O carcinógeno DMH (125 mg/kg) levou ao aparecimento de criptas displásicas ( $P < 0,05$ ; Grupo D). O modelo de megacólon obstrutivo foi capaz de potencializar significativamente esse número de CD (Grupo DM vs D;  $P < 0,05$ ). A desnervação diminuiu o número de criptas displásicas (Grupo DB vs D e Grupo DB vs DM;  $P = 0,0022$ ). One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Teste confirmatório de Mann Whitney ( $P = 0,0022$ ).

### 6.1.2 Índice de proliferação celular é atenuado pelo BAC

Assim como as CD, o aumento da proliferação celular também é um fator característico precursor do CCR. Encontramos índices proliferativos em todos os grupos de estudo, inclusive no grupo controle (Grupo C). Entretanto, houve um aumento na proliferação de células criptais colônicas nos grupos expostos ao DMH (125mg/kg), quando em comparação aos outros grupos do estudo (Grupos D, DM e DB;  $P < 0,05$ ) (Figura 5) (Figura 6 – C, E e F). O modelo de desnervação do plexo mientérico com o BAC foi capaz de atenuar o aumento da proliferação celular no cólon de maneira efetiva, comprovando, assim, a ação protetora da desnervação contra o CCR cólon (Figura 5 - Grupos B e DB vs M, D e DM;  $P < 0,05$ ) (Figura 6-F).



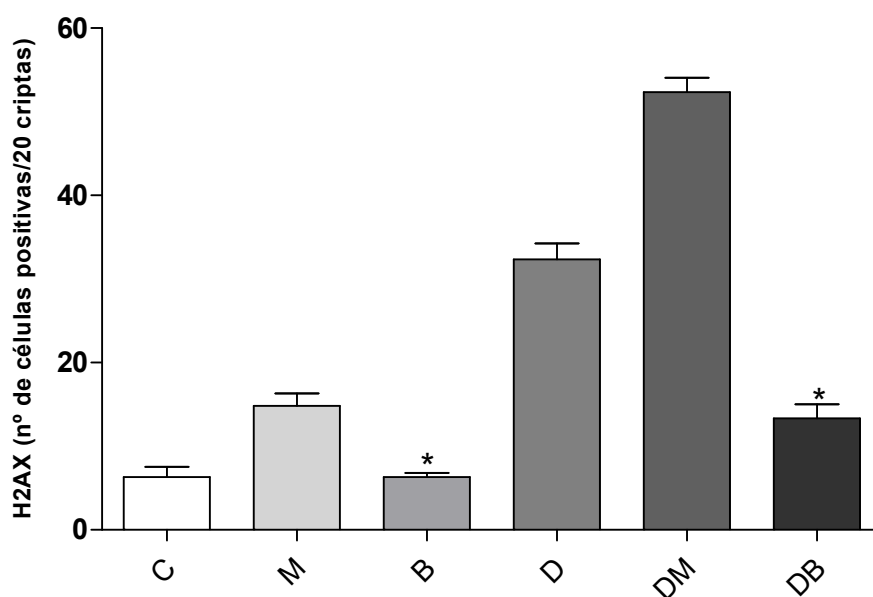
**Figura 5 – PCNA (%) em células colônicas – E1** – Houve um aumento nos índices proliferativos nos grupos expostos ao carcinógeno DMH, quando em comparação aos demais grupos de estudo (Grupos D, DM e DB vs C, M e B;  $P < 0,05$ ). A associação do DMH ao megacólon obstrutivo apresentou os maiores níveis de PCNA colônico, quando comparado aos demais grupos ( $P < 0,05$ ). O tratamento com o BAC associado ao DMH (Grupo DB) foi capaz de reduzir esse aumento (DB vs DM;  $P = 0,0022$ ). One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Teste confirmatório de Mann Whitney ( $P = 0,0022$ ).



**Figura 6 – Fotomicrografias de imunomarcção nuclear para PCNA** – **A.** Controle, com fraca positividade para PCNA; **B.** Grupo B - poucas células colônicas em proliferação; **C.** Grupo D - o DMH 125 mg/kg aumentou a positividade de células das criptas colônicas para PCNA, observado pelo excesso de coloração marrom nuclear oriunda do cromógeno DAB; **D.** Grupo M – O modelo de megacólón obstrutivo apresentou um considerável aumento na imunomarcção para PCNA. Ainda, apresentou marcação para PCNA mais evidente no botão das criptas colônicas (setas); **E.** Grupo DM – A associação do DMH ao megacólón obstrutivo manteve o alto número de células das criptas positivas para PCNA, de maneira não-difusa; **F.** Grupo DB – O tratamento com BAC 1,5mM diminuiu a imunomarcção para PCNA.

### 6.1.3 Danos ao DNA induzidos pelo DMH

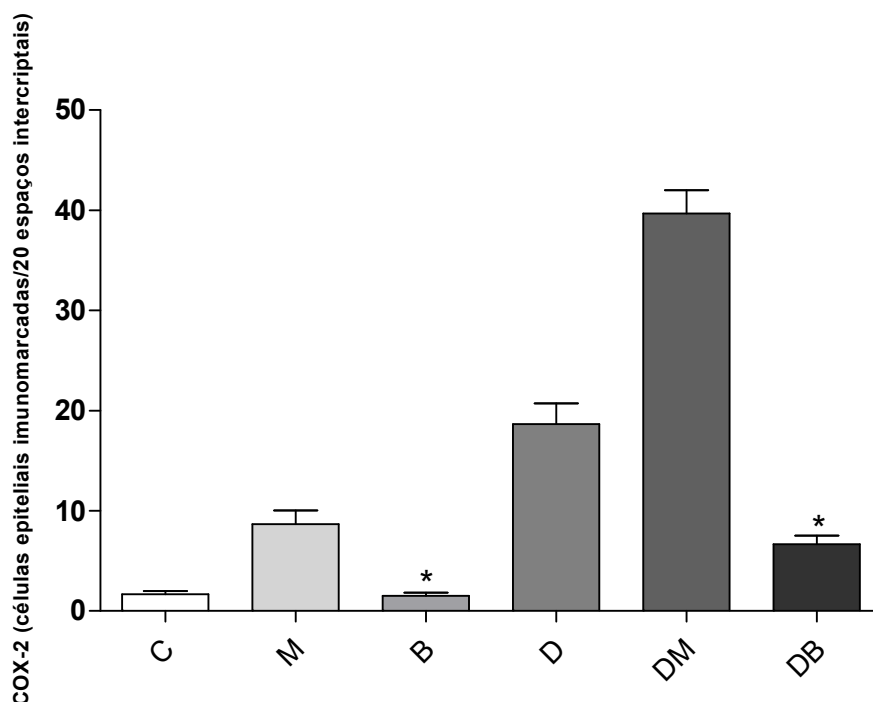
Para analisar a potencialidade do carcinógeno DMH (125 mg/kg), avaliamos a presença de danos na dupla-fita de DNA nas células colônicas. Desse modo, podemos observar na Figura 7 que a exposição ao carcinógeno aumentou significativamente o número de células positivas para  $\gamma$ H2AX, quando em comparação aos demais grupos (Grupos D e DM vs demais grupos;  $P < 0,05$ ). O modelo de megacólon obstrutivo foi capaz de potencializar os danos no DNA causados pelo carcinógeno (Grupo DM vs D;  $P = 0,0022$ ). A desnervação, por sua vez, diminuiu esse aumento (Grupo DB vs DM;  $P = 0,0050$ ). O próprio modelo de megacólon obstrutivo aumentou os danos no DNA nas células colônicas quando em comparação ao grupo controle (Grupo M vs C;  $P = 0,0078$ ). O grupo de animais tratados somente com BAC (1,5 mM) apresentou menores números de células positivas para  $\gamma$ H2AX, quando comparado ao grupo exposto somente ao DMH (Grupo B vs M;  $P = 0,0050$ ) (Figura 7).



**Figura 7 –  $\gamma$ H2AX – E1** – O DMH aumentou o número de células positivas para  $\gamma$ H2AX, quando em comparação aos demais grupos do estudo (Grupos D e DM vs demais grupos;  $P < 0,05$ ). A desnervação foi capaz de atenuar esse aumento (Grupo DB vs DM;  $P = 0,0050$ ). One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Teste confirmatório de Mann Whitney ( $P = 0,0050$ ).

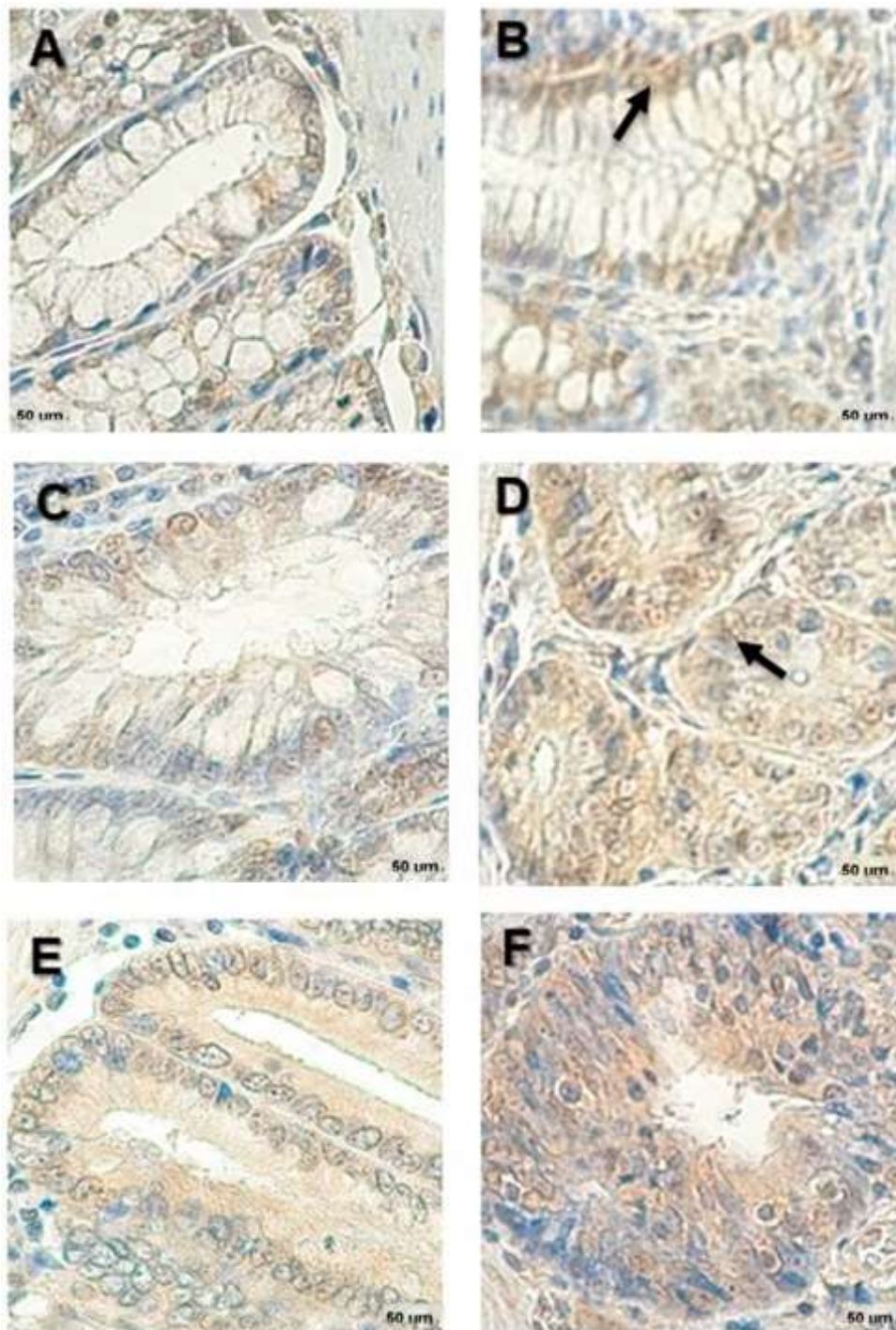
### 6.1.4 Inflamação é atenuada pela desnervação

Para avaliar os níveis inflamatórios das células das criptas colônicas, analisamos a positividade para COX-2 das mesmas. Assim, a exposição dos animais ao carcinógeno DMH (125 mg/kg) aumentou o número de células epiteliais positivas para COX-2, quando em comparação aos demais grupos de estudo (Figura 8; Grupos D e DM vs C, M e B;  $P < 0,05$ ). O megacólon obstrutivo associado ao carcinógeno (Grupo DM) foi o grupo no qual apresentou o maior número de células positivas para COX-2, o que foi revertido significativamente pela desnervação (Figura 8; Grupo DB vs DM;  $P = 0,0022$ ) (Figura 9-F). Além disso, a desnervação obtida pelo tratamento com BAC foi capaz de atenuar a positividade para COX-2 das células epiteliais colônicas a níveis semelhantes ao controle ( $P < 0,05$ ), quando em comparação aos grupos de animais expostos somente ao carcinógeno (Grupo D vs B;  $P = 0,0043$ ) ou ao modelo de megacólon obstrutivo (Grupo M vs B;  $P = 0,0050$ ) (Figura 8).



**Figura 8 – COX-2 – E1** – O DMH aumentou o número de células positivas para COX-2, quando em comparação aos demais grupos do estudo (Grupos D, DM e DB vs demais grupos;  $P < 0,05$ ). A desnervação foi capaz de atenuar esse aumento (Grupo DB vs DM;  $P = 0,0022$ ). One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Teste confirmatório de Mann Whitney ( $P = 0,0022$ ).

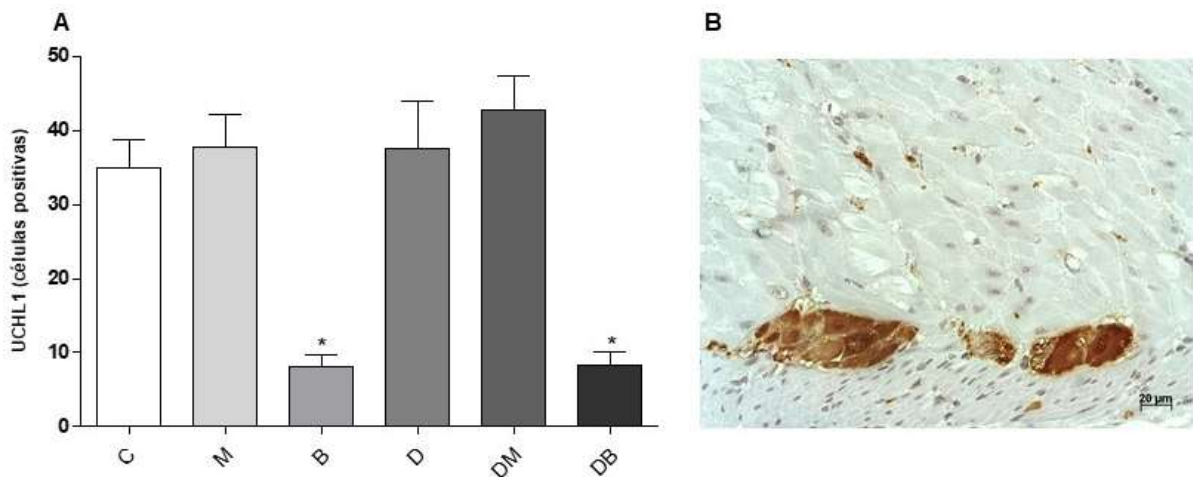




**Figura 9 – Fotomicrografias de imunomarcção para COX-2.** **A.** Grupo C – menor número de células positivas para COX-2. **B.** Grupo M – aumento no número de células imunomarcadas para COX-2 observado pela coloração marrom citoplasmática (setas), resultante da redução do DAB pela reação imunoistoquímica. **C.** Grupo B – a desnervação atenuou o aumento na imunomarcção para COX-2 encontrado em B, observado pela redução na coloração marrom citoplasmática. **D.** Grupo D – O carcinógeno DMH 125 mg/kg induziu um aumento no número de células positivas para COX-2 (seta). **E.** Grupo DM – aumento na coloração marrom citoplasmática, indicativo de aumento no número de células positivas para COX-2. **F.** Grupo DB – redução na marcação citoplasmática de COX-2, observada pela redução na coloração marrom. **Aumento de 400x.**

### 6.1.5 Diminuição do número de neurônios mientéricos pela aplicação de BAC

Tanto os grupos expostos (Grupos D e DM) ou não (Grupos C e M) ao carcinógeno do presente estudo apresentaram níveis elevados de células neuronais positivas para UCHL1. Contudo, a desnervação (Grupos B e DB) foi capaz de diminuir significativamente esse aumento quando em comparação aos demais grupos do estudo (Grupos B e DB vs demais grupos;  $P < 0,05$ ) (Figura 10-A). Nosso resultado confirma a ação ablativa neuronal desempenhada pelo BAC.

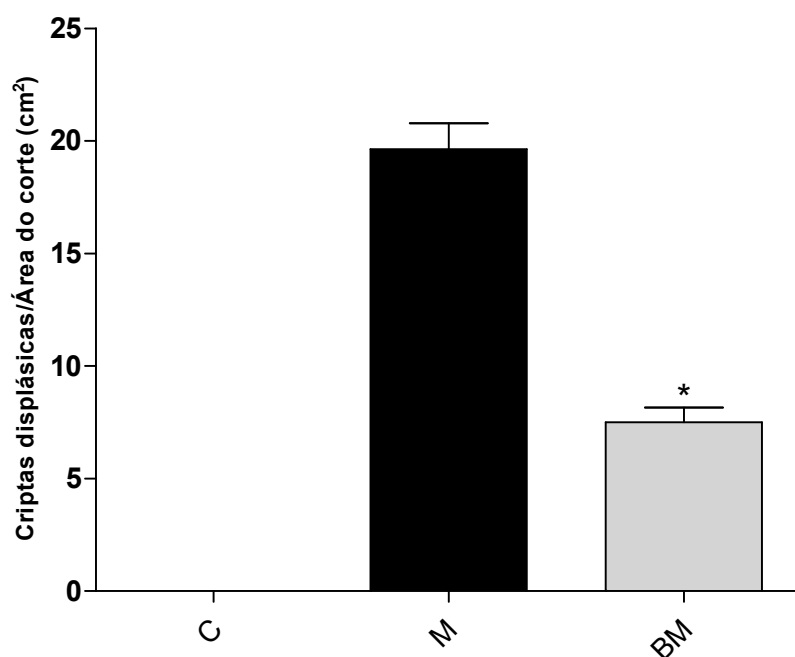


**Figura 10 – UCHL1 – E1 – A.** A desnervação com o BAC foi capaz de diminuir o número de células neuronais colônicas positivas para UCHL1 (Grupos B e DB vs demais grupos de estudo;  $P < 0,05$ ). **B.** Fotomicrografia de imunomarcagem para UCHL1 no grupo DM demonstrando um perfil de marcação muito forte nesse grupo. One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey ( $P < 0.05$ ).

## 6.2 Resultados – Experimento 2

### 6.2.1 Análise histopatológica das células das criptas – criptas displásicas

Como esperado, encontramos um número significativo de criptas displásicas nos ratos expostos ao carcinógeno MNNG (60 mg/kg), como observado na Figura 11. A desnervação promovida pela administração de BAC (0,3%) diretamente no cólon dos animais reduziu o número de criptas displásicas por unidade de área (Grupo BM vs M;  $P=0,0009$ ), comprovando, portanto, sua ação protetora frente à carcinogênese colônica experimental.

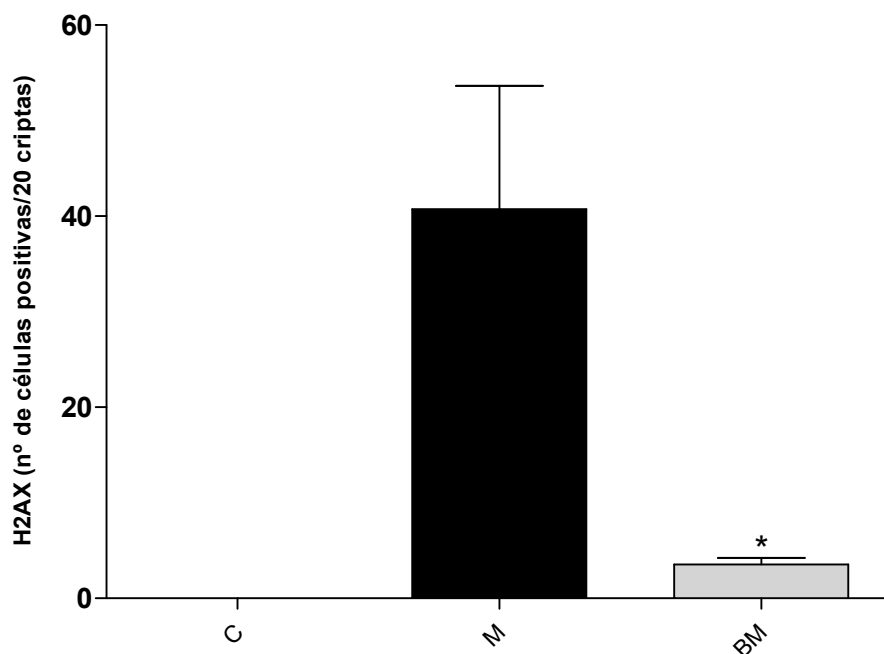


**Figura 11 – Criptas displásicas – E2** – A desnervação promovida pelo tratamento com BAC reduziu o número de criptas displásicas encontrado nos animais expostos ao carcinógeno MNNG 60 mg/kg (Grupo BM vs M;  $P=0,0009$ ). One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ( $P<0.05$ ). Teste confirmatório de Mann Whitney ( $P=0,0009$ ).

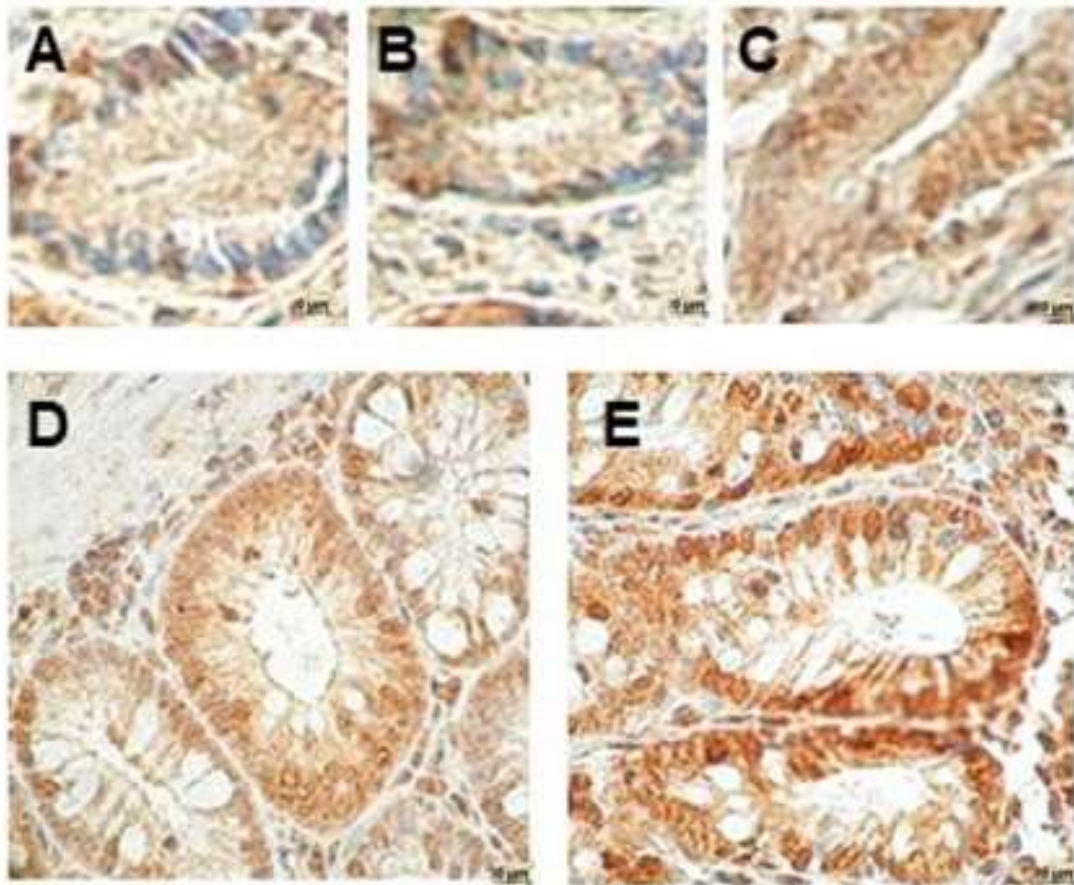


### 6.2.2 Danos ao DNA induzidos pelo MNNG

Danos na dupla-fita de DNA caracterizam-se como marcadores genéticos do câncer colorretal experimental, já que os carcinógenos químicos são substâncias químicas capazes de afetar o material genético por alquilação, por exemplo. Nesse sentido, no presente trabalho objetivamos avaliar os níveis de expressão da histona  $\gamma$ H2AX para quantificarmos essas alterações no DNA das células colônicas. Como esperado, o grupo de animais exposto ao MNNG (60 mg/kg) mostrou um aumento significativo no número de células das criptas colônicas positivas para essa histona (Figura 12;  $P < 0,001$  - grupo M) (Figura 13 – C, D e E). Esse aumento foi consideravelmente atenuado pela desnervação ( $P < 0,05$  - grupo BM), demonstrando que a desnervação com BAC é capaz de proteger o material genético das células colônicas contra o MNNG. Não foram observadas células positivas para H2AX no grupo controle (Figura 12).



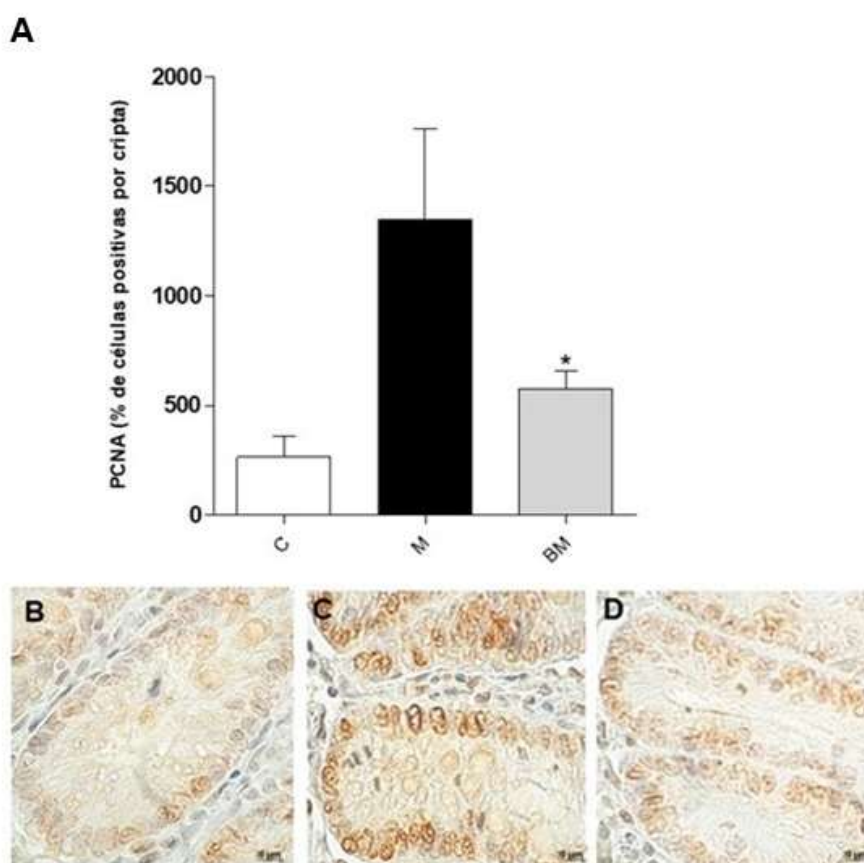
**Figura 12 -  $\gamma$ H2AX – E2** – O carcinógeno MNNG promoveu um aumento nos danos na dupla-fita de DNA (grupo M –  $P < 0,001$ ). A desnervação reverteu significativamente este aumento ( $P < 0,05$  – grupo BM). One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Mann-Whitney ( $P < 0.05$ ).



**Figura 13 – Fotomicrografias de imunomarcção para  $\gamma$ H2AX – A e B.** Criptas colônicas referentes ao grupo controle (C), apresentando pouca positividade para H2AX. **C, D e E.** Criptas colônicas referentes ao grupo exposto ao carcinógeno (M) altamente positivas para  $\gamma$ H2AX (positividade visível pela coloração marrom oriunda do cromógeno DAB). Aumento de 400x.

### 6.2.3 Níveis de proliferação celular

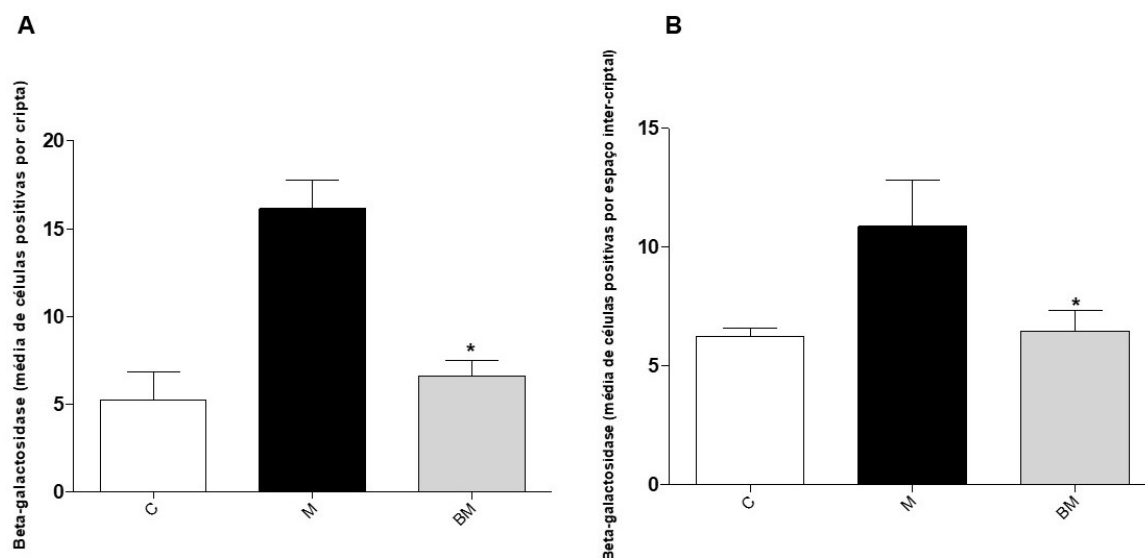
Além do H2AX, os níveis de proliferação celular também são utilizados como marcadores do câncer colorretal, uma vez que uma das principais características do câncer é a proliferação celular desordenada. Desse modo, avaliamos os índices do antígeno de proliferação celular nuclear (PCNA) nas células das criptas colônicas, através da estimativa da porcentagem de células marcadas em relação ao número total de células de cada cripta colônica. Na Figura 14 podemos observar que nossos resultados corroboram com nossos achados neste trabalho referentes à histona H2AX: o carcinógeno MNNG promoveu um aumento nos níveis de proliferação celular (Figura 14-A e C;  $P < 0,001$  - grupo M) – o que foi atenuado pela desnervação (Figura 14-A e D;  $P < 0,05$  - grupo BM).



**Figura 14 – PCNA em células colônicas.** **A.** O MNNG aumentou a imunomarcagem nuclear para PCNA significativamente ( $P < 0,001$ ; Grupo M vs C e BM). A desnervação foi capaz de diminuir esse aumento ( $P < 0,05$ ; Grupo BM vs M). One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ); **B.** Cripta com pouca imunomarcagem para PCNA referente ao grupo C; **C.** Positividade para PCNA em células das criptas colônicas, visível pelo aumento da coloração marrom. **D.** A desnervação foi capaz de atenuar o aumento nos níveis de proliferação celular ocasionado pelo MNNG.

### 6.2.4 $\beta$ -galactosidase – média de células positivas por cripta imunomarcada

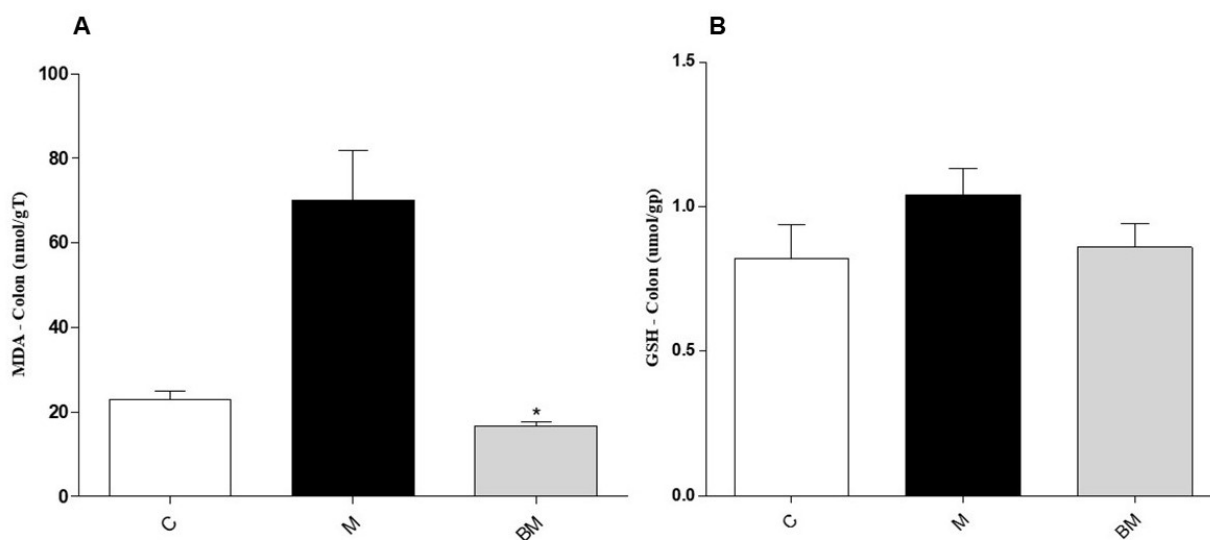
A  $\beta$ -galactosidase tem sido utilizada como um marcador de senescência celular, principalmente no Sistema Nervoso. Contudo, atualmente este marcador também é utilizado em diversos tipos de câncer, sendo sua presença indicativa de senescência celular. Devido a isso, já que nosso trabalho avalia os efeitos protetores da ablação neuronal do plexo mientérico durante a carcinogênese química colônica, este marcador foi escolhido. Na Figura 15 (A e B) podemos observar que encontramos altos níveis de  $\beta$ -galactosidase nos animais expostos ao carcinógeno MNNG ( $P < 0,001$ ; grupo M), indicando que a carcinogênese promove o envelhecimento celular e neuronal, tanto em células das criptas (Figura 15-A), quanto em células presentes no espaço inter-criptal (Figura 15-B). A desnervação com BAC foi capaz de diminuir esses níveis de maneira significativa ( $P < 0,05$ ; grupo MB), assemelhando-se ao grupo controle ( $P > 0,05$ ; grupo MB vs grupo C). Os mesmos resultados foram observados ao analisarmos as células colônicas positivas nos espaços inter-criptais (Figura 15-B).



**Figura 15 –  $\beta$ -galactosidase. A.** Imunomarcagem nas células das criptas. Animais expostos ao MNNG tiveram maiores níveis de  $\beta$ -galactosidase ( $P < 0,001$ ; Grupo M), demonstrando a capacidade de senescência celular induzida pelo câncer. A desnervação atenuou este aumento ( $P < 0,05$ ; Grupo BM), assemelhando-se ao grupo controle ( $P > 0,05$ ; grupo BM vs grupo C). **B.**  $\beta$ -galactosidase nos espaços inter-criptais. A desnervação foi capaz de diminuir o aumento no número de células imunomarcadas provocado pelo MNNG ( $P < 0,05$  – grupo BM vs grupo M). One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Mann-Whitney ( $P < 0.05$ ).

### 6.2.5 MDA e GSH – Normatização pela proteína

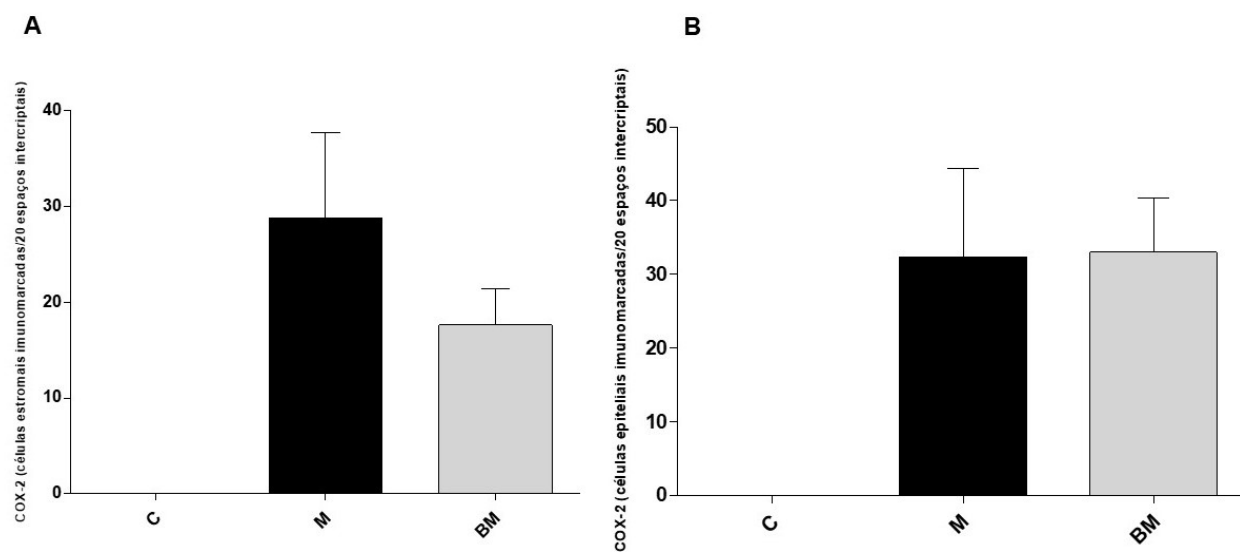
O estresse-oxidativo aumenta conforme a capacidade antioxidante celular diminui. Desta forma, atua como um conhecido marcador da capacidade antioxidante celular. Ainda, é bem-estabelecido na literatura seu papel na carcinogênese colônica. Assim, os níveis de MDA e GSH foram avaliados no presente trabalho, conforme ilustrado na Figura 16. Assim como nossos outros resultados, encontramos maiores níveis de MDA no grupo de animais exposto ao MNNG 60 mg/kg – indicando a capacidade oxidante deste carcinógeno ( $P < 0,05$  - Grupo M) (Figura 16-A). Além disso, a desnervação demonstrou atividade antioxidante, uma vez que diminuiu os níveis de MDA no tecido colônico a níveis menores que o próprio grupo Controle ( $P < 0,05$  – Grupo BM) (Figura 16-A). Na Figura 16-B podemos observar que não houve diferença significativa estatisticamente entre os três grupos de estudo ( $P > 0,001$ ). Assim, concluímos que além de diminuir a senescência, proliferação celular e danos no material genético, a desnervação também possui atividade antioxidante, por diminuir os níveis de MDA colônico e, em contrapartida, sintetizar GSH.



**Figura 16 – MDA e GSH no cólon (nmol/gP)** – Em **A** podemos observar que a desnervação demonstrou exercer atividade antioxidante através de sua atuação na cascata do MDA, uma vez que diminuiu seus níveis proteicos no cólon de animais tratados ( $P < 0,05$ ; Grupo BM vs M). **B**. Não houve diferença estatística entre os grupos com relação a análise de GSH no cólon ( $P > 0,001$ ) (B). One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ).

## 6.2.6 COX-2 estromal e epitelial

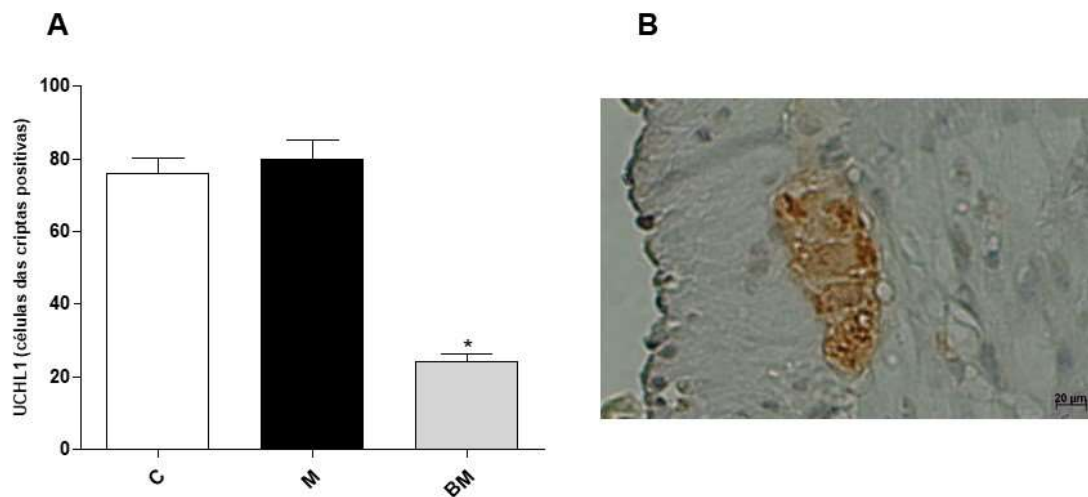
A enzima COX-2 é conhecida por ser um marcador inflamatório e de doenças diversas, como o câncer. Assim, avaliamos se a desnervação com BAC atuaria inibindo ou diminuindo a ação dessa enzima. Contudo, apesar de termos encontrado uma tendência de diminuição no número de células positivas para COX-2 no estroma (Figura 17-A), essa diminuição não foi estatisticamente significativa ( $P=0,34$ ; Grupo BM vs M). Quando analisamos as células positivas para essa enzima no epitélio colônico (Figura 17-B), não foi observada nenhuma diferença estatística entre os grupos de estudo ( $P>0,001$ ).



**Figura 17 – COX-2 estromal e epitelial – E2.** Não houve diferença estatística entre os grupos de estudo, indicando possivelmente que o mecanismo protetor desempenhado pela desnervação na carcinogênese colônica não seja atuando na inflamação. One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Mann-Whitney ( $P<0.05$ ).

### 6.2.7 UCHL (PGP 9.5)

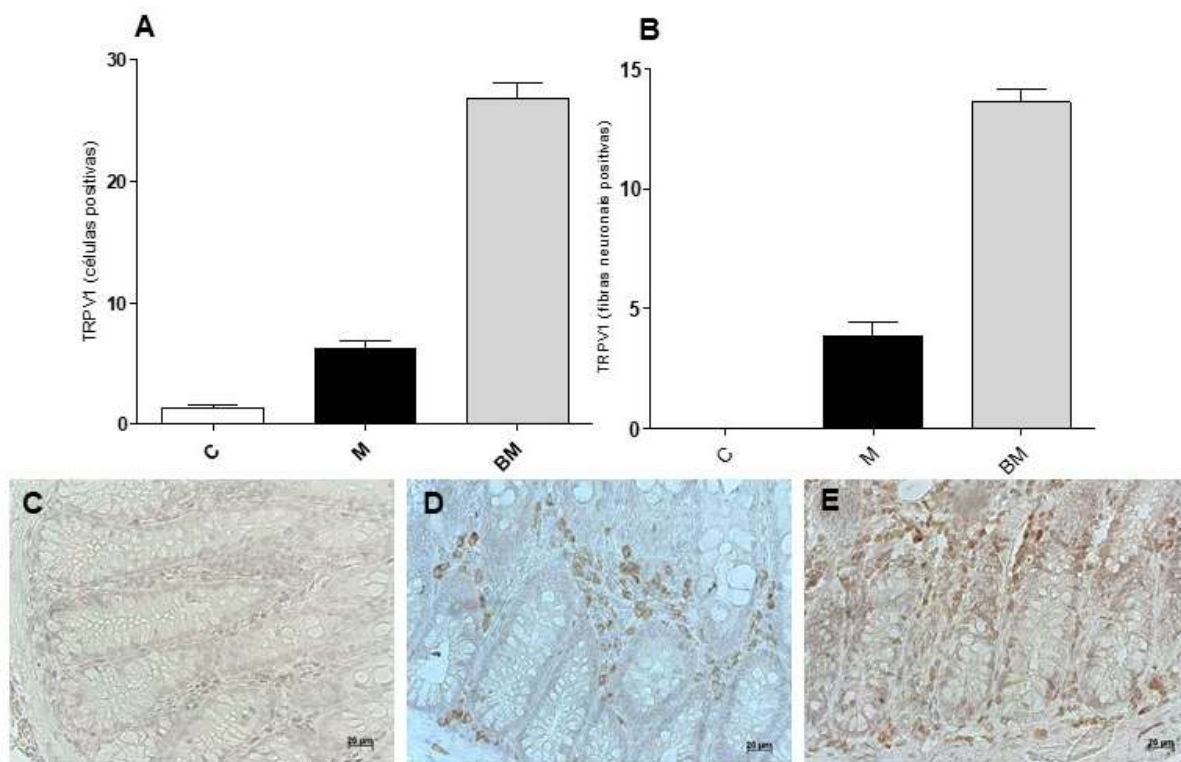
Observamos que o grupo de animais expostos ao carcinógeno MNNG (M) teve uma imunoposição para UCHL-1 similar ao grupo controle (C; sem procedimentos) ( $P < 0,05$ ) – indicando que o MNNG não é capaz de influenciar o número de neurônios mientéricos. Contudo, há uma diminuição dos gânglios mientéricos após a desnervação com BAC ( $P < 0,05$ ; Grupo BM), mesmo após uma exposição ao MNNG (Figura 18-A).



**Figura 18 – UCHL-1 nas células das criptas – E2. A.** A desnervação com BAC foi capaz de reduzir a imunomarcção para UCHL-1 no tecido colônico, mesmo após exposição ao MNNG. **B.** Exemplificação da marcação para TRPV1 em tecido colônico. One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Mann-Whitney ( $P < 0.05$ ).

## 6.2.8 TRPV1

Os receptores TRPV1 são conhecidamente associados a diversas desordens gastrointestinais, como por exemplo a doença de Hirschprung e no refluxo gastroesofágico. Em nosso trabalho encontramos um alto número de células e fibras neuronais positivas para TRPV1 nos grupos de animais tratados com BAC ( $P < 0,05$ ; Grupo BM), quando em comparação com outros grupos de estudo (C e M) (Figura 19 A, B e E).



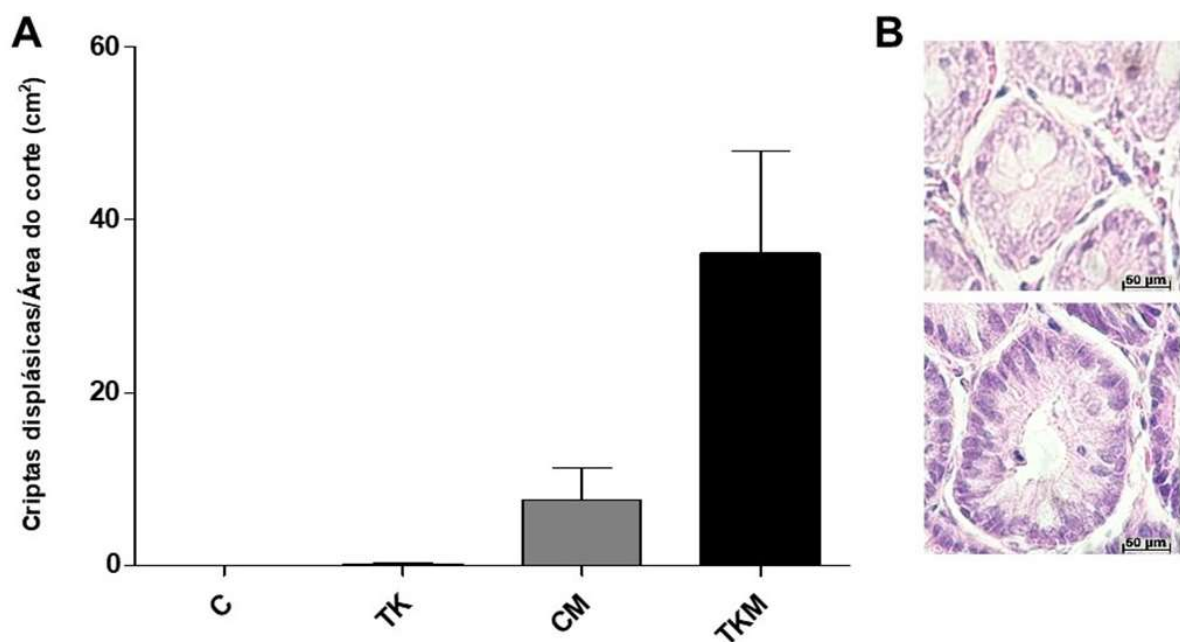
**Figura 19 – TRPV1 nas células das criptas e em fibras neuronais. A e B** - Foi encontrado um maior número de células e fibras neuronais positivamente imunomarcadas para TRPV1 no grupo de animais tratados com o BAC ( $P < 0,05$ ; Grupo BM), em comparação aos outros grupos de estudo (C e M). **C, D e E** – Fotomicrografias de imunomarcção para TRPV1. One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Mann-Whitney ( $P < 0.05$ ).



### 6.3 Resultados – Experimento 3

#### 6.3.1 Criptas displásicas nos animais TRPV1<sup>-/-</sup>

Encontramos um considerável aumento no número de criptas displásicas em animais TRPV1<sup>-/-</sup> quando em comparação aos demais grupos do estudo (Figura 20-A;  $P < 0,05$ ; Grupo TKM). Assim, concluímos que os receptores TRPV1 estão diretamente relacionados à proteção contra o MNNG, uma vez que a ablação desses receptores aumentou o número de CD em animais expostos ao carcinógeno.



**Figura 20 – Criptas displásicas em animais TRPV1<sup>-/-</sup>.** **A.** Foi encontrado um maior número de criptas displásicas em animais TRPV1<sup>-/-</sup> expostos ao MNNG, quando em comparação aos demais grupos de estudo ( $P < 0,05$ ; Grupo TKM), One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ). **B.** Fotomicrografia de H.E. exemplificando uma cripta normal (acima) e uma cripta displásica (abaixo).



O objetivo principal deste estudo foi elucidar os possíveis mecanismos envolvidos no papel protetor desempenhado pela desnervação do plexo mientérico com o BAC sobre a carcinogênese química colônica em animais. Para testar nossa hipótese, induzimos a carcinogênese experimental através da exposição dos animais aos carcinógenos MNNG (60 mg/kg; Experimentos 2 e 3) e DMH (125 mg/kg; Experimento 1), de acordo com o mecanismo de metabolização mais adequado para o experimento em questão. Desse modo, os resultados encontrados serão divididos em tópicos, de acordo com o número do experimento (E1, E2 ou E3).

### 7.1 Experimento 1

O megacólon obstrutivo associado a constipação é capaz de alterar fatores histopatológicos colônicos, sendo um deles o fator neuronal (KNOWLES; MARTIN, 2000). Assim, há alterações no peristaltismo (HE; BURGART; WANG; PEMBERTON *et al.*, 2000; LYFORD; HE; SOFFER; HULL *et al.*, 2002) e, conseqüentemente, um aumento no desenvolvimento de cânceres gastrointestinais (SUNDBØLL; THYGESEN; VERES; LIAO *et al.*, 2019). Curiosamente, contudo, nosso laboratório e outros grupos de estudo observaram que em pacientes ou em modelos experimentais de megacólon chagásico há uma menor probabilidade de desenvolvimento de CCR (GARCIA; ARANHA; GARCIA; BASILE *et al.*, 2003; GARCIA; OLIVEIRA; PINTO; MUCCILLO *et al.*, 1996; OLIVEIRA; LEITE; MIRANDA; ANDRADE *et al.*, 2001; VESPÚCIO; TURATTI; MODIANO; OLIVEIRA *et al.*, 2008) – sendo os mecanismos pelos quais essa proteção acontece desconhecidos até agora. Nesse sentido, objetivamos identificar esses possíveis mecanismos de ação e associá-los ao modelo experimental de megacólon obstrutivo, a fim de melhor entendê-los. Para isso, foi realizado o E1, no qual utilizamos o carcinógeno DMH (125 mg/kg) para indução do processo carcinogênico colônico, uma vez que este é metabolizado no fígado, ao contrário do MNNG, diminuindo possíveis complicações ao animal. O modelo de megacólon obstrutivo experimental foi utilizado para mimetizar o megacólon obstrutivo encontrado em pacientes, enquanto o modelo de desnervação do plexo mientérico com o BAC foi utilizado para mimetizar o megacólon chagásico. Como resultados, observamos um maior número de lesões precursoras do CCR – as criptas displásicas

– nos grupos expostos ao carcinógeno, quando em comparação aos outros grupos de estudo ( $P < 0,05$ ). Os animais expostos ao DMH 125 mg/kg e ao modelo de megacólon obstrutivo experimental apresentaram um aumento ainda mais expressivo no número de CD quando em comparação aos outros grupos expostos ao carcinógeno ( $P < 0,05$ ). Esse achado corrobora os dados encontrados na literatura que mostram um aumento na incidência de CCR em casos de megacólon obstrutivo (SUNDBØLL; THYGESSEN; VERES; LIAO *et al.*, 2019). A desnervação promovida pelo BAC foi capaz de atenuar significativamente esse aumento ( $P = 0,0022$ ), mostrando-se eficaz em proteger o tecido colônico contra propriedades carcinogênicas encontradas na fase de iniciação do processo carcinogênico (CD).

Além das CD, outros marcadores são utilizados a fim de elucidar processos carcinogênicos, como a análise do índice de proliferação celular através de imunomarcagem para o anticorpo PCNA (BLAS-MACHADO; TAYLOR; MEANS, 2000; KUBBEN; PEETERS-HAESEVOETS; ENGELS; BAETEN *et al.*, 1994; LU; YU; XU; CHEN *et al.*, 2010). Desse modo, observamos a presença de proliferação celular em todos os grupos do estudo, sendo que os grupos expostos ao DMH apresentaram um aumento significativo quando em comparação aos outros grupos ( $P < 0,05$ ). O modelo experimental de megacólon obstrutivo também aumentou os níveis proliferativos das células das criptas colônicas quando comparado aos outros grupos de estudo ( $P < 0,05$ ), como observamos em nossa análise de CD. O tratamento com BAC efetivamente diminuiu o número de células imunomarcadas para PCNA ( $P < 0,05$ ), principalmente quando comparado ao grupo exposto ao megacólon obstrutivo e ao carcinógeno ( $P = 0,0022$ ).

Danos na quebra da dupla-fita de DNA são lesões pré-neoplásicas características em diversos tipos de câncer, representando geralmente um prognóstico ruim (DENIZ; KAUFMANN; STAHL; GUNDELACH *et al.*, 2016; LEE; YIN; CHEN; CHAI *et al.*, 2015; MEI; HU; PENG; RUAN *et al.*, 2015). Avaliamos esse marcador em nosso estudo para elucidar a potencialidade do carcinógeno DMH e do modelo de megacólon obstrutivo. Encontramos um aumento no número de células imunomarcadas para H2AX em todos os grupos expostos ao carcinógeno (Grupos D, DM e DB), quando em comparação aos demais grupos ( $P < 0,05$ ). O megacólon obstrutivo apresentou um aumento significativo de danos no material genético quando

comparado aos outros grupos ( $P < 0,05$ ) – o que foi revertido pela desnervação do plexo mientérico promovida pelo uso do BAC ( $P = 0,0050$ ).

A inflamação caracteriza-se como um dos principais fatores carcinogênicos, uma vez que há presença de células inflamatórias e liberação de citocinas, por exemplo, no microambiente tumoral (CAMMAROTA; BERTOLINI; PENNESI; BUCCI *et al.*, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011; MEIRA; BUGNI; GREEN; LEE *et al.*, 2008; PHILLIPSON; KUBES, 2011). A COX-2 é uma enzima frequentemente associada ao processo inflamatório no CCR, já que atua sobre macrófagos e sobre as vias wnt e ras. Além disso, é conhecido pela literatura que a COX-2 regula a angiogênese e apresenta altos níveis de expressão em modelos de polipose adenomatosa e CCR (ARAKI; OKAMURA; HUSSAIN; NAGASHIMA *et al.*, 2003; BOOLBOL; DANNENBERG; CHADBURN; MARTUCCI *et al.*, 1996; EBERHART; COFFEY; RADHIKA; GIARDIELLO *et al.*, 1994; FOURNIER; GORDON, 2000; HULL; BOOTH; TISBURY; SCOTT *et al.*, 1999; SINICROPE; GILL, 2004; TSUJII; KAWANO; TSUJI; SAWAOKA *et al.*, 1998; WILLOUGHBY; MOORE; COLVILLE-NASH, 2000). Encontramos um grande número de células criptais imunomarcadas para COX-2 nos grupos expostos ao DMH 125 mg/kg, corroborando os achados da literatura, como por exemplo o de Dubois e colaboradores, em 1996 (DUBOIS; RADHIKA; REDDY; ENTINGH, 1996). A desnervação produzida pelo BAC reduziu significativamente esse aumento ( $P = 0,0022$ ). Ainda, a desnervação com BAC isolada, sem associação ao carcinógeno, também apresentou uma diminuição no número de células imunomarcadas para COX-2, quando comparada ao grupo submetido ao megacólon obstrutivo (Grupo B vs M;  $P = 0,0050$ ).

Para avaliarmos os mecanismos neuronais possivelmente envolvidos na proteção exercidos pelo BAC contra o CCR, utilizamos o anticorpo UCHL1, também conhecido como PGP 9.5. O UCHL1 está relacionado à ubiquitinação e, portanto, é usado como neuromarcador (DAY; THOMPSON, 2010). Encontramos neurônios positivos para esse anticorpo em todos os grupos de estudo. Entretanto, os grupos tratados com BAC, expostos ou não ao DMH (DB e B) apresentaram uma diminuição significativa nessa positividade ( $P < 0,05$ ), confirmando a especificidade desempenhada pela desnervação com BAC por neurônios do plexo mientérico colônico encontrada na literatura (FOX; BASS, 1984; GARCIA; KAWASAKY; SILVA;

GARCIA-RODRIGUES *et al.*, 1999; ZUCOLOTO; DE DEUS; MARTINS; MUGLIA *et al.*, 1997).

Em conjunto, nossos resultados referentes ao E1 sugerem que a exposição dos animais ao carcinógeno DMH (125 mg/kg) aumentou parâmetros carcinogênicos, inflamatórios e neuronais – o que foi significativamente revertido pela desnervação obtida através da administração de BAC. Por outro lado, o modelo experimental de megacólon obstrutivo aumentou expressivamente esses parâmetros, corroborando a literatura que aborda a constipação e o megacólon obstrutivo como fatores predisponentes ao CCR. Assim, concluímos que a desnervação obtida com o BAC protege contra o CCR – e não o megacólon em si, sugerindo, portanto, que os mecanismos envolvidos na proteção contra o CCR são associados a esse processo de ablação neuronal.

Isto posto, concluímos que o megacólon obstrutivo aumenta fatores carcinogênicos colônicos, excluindo, portanto, sua ação como mecanismo protetor contra o CCR. Ainda, elucidamos que a ablação do plexo mientérico obtida pelo BAC é responsável pelo papel protetor da desnervação contra o CCR, já que diminuiu a inflamação e outros marcadores carcinogênicos analisados no presente estudo.

## **7.2 Experimento 2**

Para obtenção do modelo de carcinogênese colônica experimental, utilizamos o carcinógeno químico MNNG (60 mg/kg), já que seu uso é tópico e prático. O carcinógeno foi aplicado por enema, diretamente no cólon dos animais. Para avaliar a resposta citotóxica das células criptais frente a esse agente, analisamos o número de CD das amostras de tecido colônico através da análise histopatológica das lâminas coradas em H.E.. Como esperado, o carcinógeno promoveu um aumento considerável no número de CD, quando em comparação ao grupo controle (Grupo M vs C;  $P < 0,05$ ). A desnervação do plexo mientérico obtida pela administração de BAC foi capaz de reduzir esse aumento de maneira muito significativa (Grupo BM vs M;  $P = 0,0009$ ). Assim, elucidamos o papel protetor do BAC observado na análise de CD do E1.

A instabilidade genômica compõe um dos principais efeitos deletérios encontrados em vários tipos de câncer, sendo a histona  $\gamma$ -H2AX amplamente utilizada

para avaliar essa instabilidade (BURNS; TANG; WU; SCHMID, 2015; DENIZ; KAUFMANN; STAHL; GUNDELACH *et al.*, 2016; MATSUDA; WAKAI; KUBOTA; OSAWA *et al.*, 2013; MEI; HU; PENG; RUAN *et al.*, 2015; SEDELNIKOVA; BONNER, 2006). Essa histona se agrupa em focos dentro do núcleo celular promovendo quebras na dupla-fita de DNA (ROGAKOU; BOON; REDON; BONNER, 1999), atuando como marcador de início e progressão tumorais (BASSING; SUH; FERGUSON; CHUA *et al.*, 2003). Assim, analisamos a imunexpressão de H2AX, a fim de estabelecer o potencial carcinogênico do MNNG, bem como de analisar se a desnervação seria capaz de atenuar esse processo. Como resultados, observamos que houve um aumento estatisticamente significativo nos níveis de H2AX no grupo exposto ao MNNG ( $P < 0,05$ ; Grupo M). O BAC foi capaz de atenuar muito significativamente ( $P < 0,05$ ; Grupo MB) esse aumento – mostrando seu papel protetor contra alterações no material genético (do tipo de quebra na dupla-fita de DNA). Nosso resultados corroboram com os encontrados por Risques e colaboradores (RISQUES; LAI; BRETNALL; LI *et al.*, 2008), os quais realizaram um estudo clínico com tecido de pacientes que apresentavam colite ulcerativa e, como resultado, encontraram altos níveis de H2AX expressos nos colonócitos, sendo esse aumento relacionado a um pior prognóstico, além de estar diretamente relacionado a um diagnóstico tardio do CCR (LEE; YIN; CHEN; CHAI *et al.*, 2015). Ainda, nossos achados estão de acordo com o que foi encontrado por nosso grupo de pesquisa ao estudarmos os efeitos do café, café descafeinado e cafeína na carcinogênese experimental colônica induzida pelo MNNG, uma vez que o grupo de animais expostos ao carcinógeno também mostrou um significativo aumento de H2AX – que foi revertido pelo tratamento (SOARES; KANNEN; JORDÃO JUNIOR; GARCIA, 2019). Staszewski e colaboradores também obtiveram maiores níveis de focos nucleares de H2AX em células cancerosas ovarianas cultivadas *in vitro* após sua exposição ao MNNG de modo concentração e dose-dependentes. Além disso, observaram que os focos de H2AX eram consideravelmente reduzidos se as células fossem tratadas em condições não-favoráveis a sua proliferação – sugerindo, portanto, a participação dessa histona no ciclo celular (STASZEWSKI; NIKOLOVA; KAINA, 2008). Dessa forma, analisamos também os níveis proliferativos das células do cólon, através da realização da técnica de imunistoquímica para detecção do anticorpo PCNA.

É conhecido na literatura que o MNNG é capaz de aumentar os níveis de PCNA em modelos experimentais de câncer (JASCUR; FOTEDAR; GREENE; HOTCHKISS *et al.*, 2011). Assim, objetivamos avaliar os níveis proliferativos das células criptais colônicas durante a exposição ao MNNG e após o tratamento com BAC. Como resultado, observamos um maior número de células criptais proliferativas no grupo M, exposto previamente ao MNNG 60 mg/kg quando comparado aos demais grupos de estudo ( $P < 0,05$ ). Houve uma tendência de diminuição no número de células positivas para PCNA pelo tratamento com BAC 0,3%. Contudo, não houve diferença estatística entre os grupos (Grupo MB vs M;  $P = 0,1490$ ). Essa tendência de diminuição no índice proliferativo de células colônicas pode sugerir que este agente surfactante proteja contra a carcinogênese colônica principalmente através de sua atuação contra danos no material genético. Nossos resultados estão de acordo com os encontrados por Lu e colaboradores, já que observaram um aumento nos níveis de PCNA na mucosa gástrica de ratos ocasionado pela exposição ao MNNG (LU; YU; XU; CHEN *et al.*, 2010). Além disso, Blas-Machado e colaboradores encontraram o mesmo aumento ao exporem fígados de peixes a esse mesmo carcinógeno (BLAS-MACHADO; TAYLOR; MEANS, 2000), que foi revertido pelo tratamento com curcumina.

A  $\beta$ -galactosidase, juntamente ao H2AX e ao PCNA, também atua como marcador de diversas patologias, apresentando elevados níveis de expressão no câncer de cólon, por exemplo (WASZKIEWICZ; SZAJDA; WASZKIEWICZ; WOJTULEWSKA-SUPRON *et al.*, 2013; YU; FANG; SUN, 2010). Nossos resultados mostram uma significativa diminuição nos níveis dessa enzima após o tratamento com o BAC em comparação aos grupos C e M ( $P < 0,05$ ), sugerindo que este surfactante possa atuar também no ciclo celular, retardando/revertendo a senescência originada durante a carcinogênese experimental de cólon ( $P < 0,05$ ; Grupo MB vs M).

Foi discutido acima a influência da inflamação sobre o estresse oxidativo, já que células inflamatórias são exemplos de fontes endógenas de produção de EROs (SULLIVAN; CHANDEL, 2014). Nesse sentido, as espécies reativas do oxigênio (EROs) são moléculas altamente reativas e instáveis, produzidas em condições normais. Contudo, uma produção exacerbada de EROs ocorre em resposta a diversas patologias, incluindo o câncer, e provocam danos ao material genético, proteínas e lipídios, alterando sua função (NOURAZARIAN; KANGARI; SALMANINEJAD, 2014).



Nesse trabalho, optamos por avaliar a produção de MDA e GSH no tecido colônico de animais expostos ou não ao MNNG e tratados ou não com BAC, a fim de elucidar a participação do BAC sobre a formação de EROs. O MDA é um subproduto da cascata de peroxidação lipídica e se encontra aumentado no câncer de próstata, mama e cólon, por exemplo (DILLIOGLUGIL; MEKIK; MUEZZINOGLU; OZKAN *et al.*, 2012; NOURAZARIAN; KANGARI; SALMANINEJAD, 2014; SOARES; KANNEN; JORDÃO JUNIOR; GARCIA, 2019). Assim, o MDA é bastante utilizado como indicador da intensidade de peroxidação que ocorreu em determinado organismo (KERKSICK; WILLOUGHBY, 2005). A GSH também é utilizada como marcador no câncer, além de alvo terapêutico (CORSO; ACCO, 2018; TRAVERSO; RICCIARELLI; NITTI; MARENCO *et al.*, 2013) e é produzida pelos eritrócitos como uma fonte antioxidante sanguínea. Se localiza na mitocôndria e no citoplasma, e a forma oxidada de glutathiona é rapidamente convertida em GSH por ação da glutathiona redutase (JANIAK; SUSKA; DUDZIŃSKA; SKOTNICKA, 2010). Nesse sentido, analisamos os níveis dessas duas moléculas em resposta ao MNNG e ao tratamento com BAC. Como esperado, encontramos uma alta concentração de MDA no tecido colônico de animais expostos ao carcinógeno MNNG (60 mg/kg), quando em comparação aos demais grupos de estudo ( $P < 0,05$ ; Grupo M vs C e MB). O tratamento com BAC 0,3% reverteu esse aumento (Grupo MB vs M;  $P < 0,05$ ) a níveis menores que o próprio grupo controle ( $P < 0,05$ ; Grupo MB vs C), indicando uma provável atuação desse agente sobre a peroxidação lipídica. Entretanto, não foi observada diferença estatística entre os grupos de estudo com relação à GSH ( $P > 0,05$ ). Esse resultado pode ser explicado analisando o trabalho de Abdo e colaboradores, ao relatarem que a GSH é capaz de proteger o intestino contra o estresse oxidativo apenas quando há níveis consideráveis de estresse oxidativo na amostra analisada (ABDO; DERKINDEREN; GOMES; CHEVALIER *et al.*, 2010). Assim, como a desnervação com o BAC diminuiu os níveis de MDA, não houve níveis suficientes de moléculas oxidativas que pudessem promover uma diminuição nos níveis de GSH colônico. Um estudo de metanálise realizado em 2020 corrobora nossos achados, já que mostra que a suplementação com zinco diminui os níveis plasmáticos de MDA, enquanto aumenta os níveis de GSH (MOUSAVI; HAJISHAFIEE; CLARK; BORGES DO NASCIMENTO *et al.*, 2020).

A inflamação está estritamente ligada aos diversos estágios do processo de carcinogênese (DAI; XIANG; LI; BAI, 2016; HÖLZEL; TÜTING, 2016; MARIANI; SENA; RONCUCCI, 2014; SUN; WANG; WANG; REN *et al.*, 2021). Assim, a enzima COX-2 tem seus níveis de expressão aumentados no câncer de intestino, sendo utilizada como um marcador desta patologia (ADEGBOYEGA; OLOLADE; SAADA; MIFFLIN *et al.*, 2004). Contudo, nossos resultados não mostram diferenças significativamente relevantes no número de células positivas para COX-2 entre os grupos do estudo, apesar de indicar uma tendência de diminuição no grupo de animais expostos ao MNNG e tratados com BAC (P=0,34). Possivelmente essa tendência explica-se pelo fato de que o carcinógeno MNNG pode não atuar induzindo uma grande resposta inflamatória, como é o caso do DMH. Assim, maiores estudos serão necessários para avaliar essa hipótese.

Nos últimos 20 anos o SNE vêm sendo estudado no trato gastrointestinal e em suas desordens (RADEMAKERS; VAES; SCHONKEREN; KOCH *et al.*, 2017). Nosso laboratório estuda sua influência no CCR e em desordens gástricas desde os anos 90, tendo contribuído com relevantes trabalhos na área (CARVALHO; BASILE; VESPÚCIO; IGLESIAS *et al.*, 2006; FEBRÔNIO; BRITTO-GARCIA; DE OLIVEIRA; ZUCOLOTO, 1997; GARCIA, 2009; GARCIA; ARANHA; GARCIA; BASILE *et al.*, 2003; GARCIA; DEMARZO; VINHADELI; LLORACH-VELLUDO *et al.*, 2002; GARCIA; KAWASAKY; SILVA; GARCIA-RODRIGUES *et al.*, 1999; GARCIA; MINTO; MARQUES; KANNEN, 2019; GARCIA; OLIVEIRA; PINTO; MUCCILLO *et al.*, 1996; GARCIA; PAULA; GIOVANNETTI; ZENHA *et al.*, 1999; GARCIA; PINTO; ZUCOLOTO; OLIVEIRA, 1995; GARCIA; STOPPER; KANNEN, 2014b; KANNEN; DE OLIVEIRA; MOTTA; CHAGURI *et al.*, 2015; OLIVEIRA; LEITE; MIRANDA; ANDRADE *et al.*, 2001; POLLI-LOPES; ZUCOLOTO; CUNHA; FIGUEIREDO *et al.*, 2003; SOBREIRA; ZUCOLOTO; GARCIA; TRONCON, 2002; VESPÚCIO; TURATTI; MODIANO; OLIVEIRA *et al.*, 2008; VESPÚCIO; PASCHOAL; ZUCOLOTO; GARCIA *et al.*, 2005; ZUCOLOTO; DE DEUS; MARTINS; MUGLIA *et al.*, 1997; ZUCOLOTO; ROMANELLO; GARCIA; SOBREIRA *et al.*, 2002). Contudo, os mecanismos pelos quais o BAC protege contra a carcinogênese colônica eram até então desconhecidos. Nesse sentido, estudamos os marcadores neuronais UCHL1 e TRPV1 no presente estudo, a fim de completar nossa hipótese de associação do SNE no papel protetor

exercido pelo BAC. Como resultado, notamos que o tratamento com essa substância foi capaz de diminuir significativamente o aumento no número de células neuronais positivas para UCHL1 encontrado nos animais expostos ao carcinógeno ( $P < 0,05$ ; Grupo M vs Grupo MB), comprovando mais uma vez a ação ablativa neuronal exercida pelo BAC.

Desordens gastrointestinais alteram a atividade dos receptores TRPV1, culminando em um desbalanço que ocasiona diversas doenças, como a síndrome de Hirschsprung. Assim, avaliamos também o número de células criptais e de fibras neuronais positivas para TRPV1. Como resultado, encontramos um aumento desse receptor em animais tratados com o BAC quando em comparação aos grupos de animais controle ( $P < 0,05$ ; Grupo MB vs C) e expostos ao MNNG ( $P < 0,05$ ; Grupo MB vs M). Nossos resultados possivelmente indicam que os receptores TRPV1 estão diretamente envolvidos no papel protetor do BAC contra o CCR, uma vez que seu aumento mostra conseqüentemente uma maior atividade desses receptores durante a desnervação com BAC.

### 7.3 Experimento 3

Para confirmar o papel do TRPV1 sobre o mecanismo protetor desempenhado pela desnervação com BAC contra o CCR, avaliamos o número de CD em animais TRPV1<sup>-/-</sup>. Para isso, o processo de carcinogênese química experimental do cólon foi induzido pela administração do carcinógeno MNNG (60 mg/kg) em animais *wild types* ou TRPV1<sup>-/-</sup>. Animais não expostos ao carcinógeno foram utilizados como controles. Como resultado observamos um aumento no número de CD nos animais expostos ao MNNG, quando em comparação aos grupos controle (Grupo CM vs C; Grupo TKM vs TK;  $P < 0,05$ ). O grupo de animais TRPV1<sup>-/-</sup> expostos ao MNNG apresentou um aumento significativamente maior no número de CD, quando comparado ao grupo de animais *wild types* exposto ao carcinógeno (Grupo TKM vs CM;  $P < 0,05$ ), confirmando nossa hipótese elaborada no E2 de que o TRPV1 atuaria ativamente contra a carcinogênese colônica. Maiores estudos relacionados ao papel protetor exercido pela desnervação com BAC sobre o CCR em animais TRPV1<sup>-/-</sup> são necessários para um melhor entendimento de seus mecanismos.



Através de nossos achados, concluímos que a desnervação do plexo mientérico através da administração de BAC:

- 1) É a responsável pela proteção contra o CCR, e não o megacólon.
- 2) Atua sobre a inflamação, uma vez que diminuiu a imunoexpressão para COX-2 no E1 e apresentou uma tendência de diminuição dessa enzima no E2.
- 3) Atua sobre o SNE, uma vez que diminuiu o número de neurônios mientéricos imunomarcados para UCHL1 em animais tratados com BAC.
- 4) Aumentou a imunomarcagem de TRPV1 no tecido colônico, sugerindo que esse pode ser um mecanismo para a desnervação levar à proteção contra a carcinogênese colônica.
- 5) Exerce atividade antioxidante, já que diminuiu os níveis de MDA no tecido colônico.

## **9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ABDO, H.; DERKINDEREN, P.; GOMES, P.; CHEVALIER, J. *et al.* Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. **FASEB J**, 24, n. 4, p. 1082-1094, Apr 2010.

ADEGBOYEGA, P. A.; OLOLADE, O.; SAADA, J.; MIFFLIN, R. *et al.* Subepithelial myofibroblasts express cyclooxygenase-2 in colorectal tubular adenomas. **Clin Cancer Res**, 10, n. 17, p. 5870-5879, Sep 2004.

ALBANO, J. D.; WARD, E.; JEMAL, A.; ANDERSON, R. *et al.* Cancer mortality in the United States by education level and race. **J Natl Cancer Inst**, 99, n. 18, p. 1384-1394, Sep 2007.

ALPIZAR, Y. A.; BOONEN, B.; GEES, M.; SANCHEZ, A. *et al.* Allyl isothiocyanate sensitizes TRPV1 to heat stimulation. **Pflugers Arch**, 466, n. 3, p. 507-515, Mar 2014.

ANAVI-GOFFER, S.; MCKAY, N. G.; ASHFORD, M. L.; COUTTS, A. A. Vanilloid receptor type 1-immunoreactivity is expressed by intrinsic afferent neurones in the guinea-pig myenteric plexus. **Neurosci Lett**, 319, n. 1, p. 53-57, Feb 2002.

ARAKI, Y.; OKAMURA, S.; HUSSAIN, S. P.; NAGASHIMA, M. *et al.* Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways. **Cancer Res**, 63, n. 3, p. 728-734, Feb 2003.

BASNET, U.; PATIL, A. R.; KULKARNI, A.; ROY, S. Role of Stress-Survival Pathways and Transcriptomic Alterations in Progression of Colorectal Cancer: A Health Disparities Perspective. **Int J Environ Res Public Health**, 18, n. 11, May 2021.

BASSING, C. H.; SUH, H.; FERGUSON, D. O.; CHUA, K. F. *et al.* Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. **Cell**, 114, n. 3, p. 359-370, Aug 08 2003.

BHARUCHA, A. E.; PHILLIPS, S. F. Megacolon: Acute, Toxic, and Chronic. **Curr Treat Options Gastroenterol**, 2, n. 6, p. 517-523, Dec 1999.

BIGGS, J. E.; YATES, J. M.; LOESCHER, A. R.; CLAYTON, N. M. *et al.* Changes in vanilloid receptor 1 (TRPV1) expression following lingual nerve injury. **Eur J Pain**, 11, n. 2, p. 192-201, Feb 2007.

BIRD, R. P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Lett**, 37, n. 2, p. 147-151, Oct 1987.

BLAS-MACHADO, U.; TAYLOR, H. W.; MEANS, J. C. Apoptosis, PCNA, and p53 in *Fundulus grandis* fish liver after in vivo exposure to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and 2-aminofluorene. **Toxicol Pathol**, 28, n. 4, p. 601-609, 2000 Jul-Aug 2000.

BODE, A. M.; CHO, Y. Y.; ZHENG, D.; ZHU, F. *et al.* Transient receptor potential type vanilloid 1 suppresses skin carcinogenesis. **Cancer Res**, 69, n. 3, p. 905-913, Feb 2009.

BOOLBOL, S. K.; DANNENBERG, A. J.; CHADBURN, A.; MARTUCCI, C. *et al.* Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. **Cancer Res**, 56, n. 11, p. 2556-2560, Jun 1996.

BROWN, I. A. M.; GULBRANSEN, B. D. The antioxidant glutathione protects against enteric neuron death in situ, but its depletion is protective during colitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 314, n. 1, p. G39-G52, 01 01 2018.

BUJAK, J. K.; KOSMALA, D.; SZOPA, I. M.; MAJCHRZAK, K. *et al.* Inflammation, Cancer and Immunity-Implication of TRPV1 Channel. **Front Oncol**, 9, p. 1087, 2019.

BURNS, A. J.; PASRICHA, P. J.; YOUNG, H. M. Enteric neural crest-derived cells and neural stem cells: biology and therapeutic potential. **Neurogastroenterol Motil**, 16 Suppl 1, p. 3-7, Apr 2004.

BURNS, F. J.; TANG, M. S.; WU, F.; SCHMID, E. Linking Gamma-H2AX Foci and Cancer in Rat Skin Exposed to Heavy Ions and Electron Radiation. **Health Phys**, 109, n. 2, p. 157-170, Aug 2015.

CAMMAROTA, R.; BERTOLINI, V.; PENNESI, G.; BUCCI, E. O. *et al.* The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker. **J Transl Med**, 8, p. 112, 2010.

CANSIZ, D.; ÜNAL, İ.; ÜSTÜNDAĞ, Ü.; ALTURFAN, A. A. *et al.* Caprylic acid ameliorates rotenone induced inflammation and oxidative stress in the gut-brain axis in Zebrafish. **Mol Biol Rep**, 48, n. 6, p. 5259-5273, Jun 2021.

CAPRODOSSI, S.; AMANTINI, C.; NABISSI, M.; MORELLI, M. B. *et al.* Capsaicin promotes a more aggressive gene expression phenotype and invasiveness in null-TRPV1 urothelial cancer cells. **Carcinogenesis**, 32, n. 5, p. 686-694, May 2011.

CARINI, F.; MAZZOLA, M.; RAPPA, F.; JURJUS, A. *et al.* Colorectal Carcinogenesis: Role of Oxidative Stress and Antioxidants. **Anticancer Res**, 37, n. 9, p. 4759-4766, 09 2017.

CARVALHO, C. E.; BASILE, F. V.; VESPÚCIO, M. V.; IGLESIAS, A. C. *et al.* [Effects of intrinsic denervation of the jejunum after extensive enterectomy in the rat bowel syndrome]. **Acta Cir Bras**, 21, n. 1, p. 43-46, 2006 Jan-Feb 2006.

CATERINA, M. J.; LEFFLER, A.; MALMBERG, A. B.; MARTIN, W. J. *et al.* Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, 288, n. 5464, p. 306-313, Apr 2000.

CHAN, C. L.; FACER, P.; DAVIS, J. B.; SMITH, G. D. *et al.* Sensory fibres expressing capsaicin receptor TRPV1 in patients with rectal hypersensitivity and faecal urgency. **Lancet**, 361, n. 9355, p. 385-391, Feb 2003.



CHEN, Z.; HU, G.; LI, D.; CHEN, J. *et al.* Synthesis and vasodilator effects of rutaecarpine analogues which might be involved transient receptor potential vanilloid subfamily, member 1 (TRPV1). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 17, n. 6, p. 2351-2359, 2009-03-01 2009.

CHIU, L. Y.; HO, F. M.; SHIAH, S. G.; CHANG, Y. *et al.* Oxidative stress initiates DNA damager MNNG-induced poly(ADP-ribose)polymerase-1-dependent parthanatos cell death. **Biochem Pharmacol**, 81, n. 3, p. 459-470, Feb 2011.

CHUNG, Y. C.; BAEK, J. Y.; KIM, S. R.; KO, H. W. *et al.* Capsaicin prevents degeneration of dopamine neurons by inhibiting glial activation and oxidative stress in the MPTP model of Parkinson's disease. **Exp Mol Med**, 49, n. 3, p. e298, 03 2017.

CIRILLO, C.; SARNELLI, G.; ESPOSITO, G.; GROSSO, M. *et al.* Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglial-derived S100B protein. **Neurogastroenterol Motil**, 21, n. 11, p. 1209-e1112, Nov 2009.

COLOMBEL, J. F.; ORDÁS, I.; ULLMAN, T.; RUTGEERTS, P. *et al.* Agreement Between Rectosigmoidoscopy and Colonoscopy Analyses of Disease Activity and Healing in Patients With Ulcerative Colitis. **Gastroenterology**, 150, n. 2, p. 389-395.e383, Feb 2016.

CORNET, A.; SAVIDGE, T. C.; CABARROCAS, J.; DENG, W. L. *et al.* Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98, n. 23, p. 13306-13311, Nov 06 2001.

CORSO, C. R.; ACCO, A. Glutathione system in animal model of solid tumors: From regulation to therapeutic target. **Crit Rev Oncol Hematol**, 128, p. 43-57, Aug 2018.

D'ERRICO, F.; GOVERSE, G.; DAI, Y.; WU, W. *et al.* Estrogen receptor  $\beta$  controls proliferation of enteric glia and differentiation of neurons in the myenteric plexus after damage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 115, n. 22, p. 5798-5803, 05 2018.

DAI, X.; XIANG, L.; LI, T.; BAI, Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. **J Cancer**, 7, n. 10, p. 1281-1294, 2016.

DAVIS, J. B.; GRAY, J.; GUNTHORPE, M. J.; HATCHER, J. P. *et al.* Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. **Nature**, 405, n. 6783, p. 183-187, May 2000.

DAY, I. N. M.; THOMPSON, R. J. UCHL1 (PGP 9.5): Neuronal biomarker and ubiquitin system protein. **Progress in Neurobiology**, 90, n. 3, p. 327-362, 2010-03-01 2010.

DENIZ, M.; KAUFMANN, J.; STAHL, A.; GUNDELACH, T. *et al.* In vitro model for DNA double-strand break repair analysis in breast cancer reveals cell type-specific associations with age and prognosis. **FASEB J**, 30, n. 11, p. 3786-3799, 11 2016.

DILLIOGLUGIL, M. O.; MEKIK, H.; MUEZZINOGLU, B.; OZKAN, T. A. *et al.* Blood and tissue nitric oxide and malondialdehyde are prognostic indicators of localized prostate cancer. **Int Urol Nephrol**, 44, n. 6, p. 1691-1696, Dec 2012.

DOMINGUEZ, R. G. S.; BIERRENBACH, A. L. HOSPITAL MORBIDITY AND COLORECTAL CANCER MORTALITY: IMPLICATIONS FOR PUBLIC HEALTH IN BRAZIL. **Arq Gastroenterol**, 57, n. 2, p. 182-187, 2020 Apr-Jun 2020.

DOUBENI, C. A.; LAIYEMO, A. O.; MAJOR, J. M.; SCHOOTMAN, M. *et al.* Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: an analysis of more than a half million adults in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. **Cancer**, 118, n. 14, p. 3636-3644, Jul 2012.

DUBOIS, R. N.; RADHIKA, A.; REDDY, B. S.; ENTINGH, A. J. Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. **Gastroenterology**, 110, n. 4, p. 1259-1262, Apr 1996.

DUCHALAIS, E.; GUILLUY, C.; NEDELLEC, S.; TOUVRON, M. *et al.* Colorectal Cancer Cells Adhere to and Migrate Along the Neurons of the Enteric Nervous System. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**, 5, n. 1, p. 31-49, 2018.

EBERHART, C. E.; COFFEY, R. J.; RADHIKA, A.; GIARDIELLO, F. M. *et al.* Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. **Gastroenterology**, 107, n. 4, p. 1183-1188, Oct 1994.

FACER, P.; KNOWLES, C. H.; TAM, P. K.; FORD, A. P. *et al.* Novel capsaicin (VR1) and purinergic (P2X3) receptors in Hirschsprung's intestine. **J Pediatr Surg**, 36, n. 11, p. 1679-1684, Nov 2001.

FEARON, E. R. Molecular genetics of colorectal cancer. **Annu Rev Pathol**, 6, p. 479-507, 2011.

FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, 61, n. 5, p. 759-767, Jun 1990.

FEBRÔNIO, L. H.; BRITTO-GARCIA, S.; DE OLIVEIRA, J. S.; ZUCOLOTO, S. Megaesophagus in rats. **Res Exp Med (Berl)**, 197, n. 2, p. 109-115, 1997.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, 136, n. 5, p. E359-386, Mar 2015.

FERREIRA, P. E. B.; BERALDI, E. J.; BORGES, S. C.; NATALI, M. R. M. *et al.* Resveratrol promotes neuroprotection and attenuates oxidative and nitrosative stress in the small intestine in diabetic rats. **Biomed Pharmacother**, 105, p. 724-733, Sep 2018.

FOURNIER, D. B.; GORDON, G. B. COX-2 and colon cancer: potential targets for chemoprevention. **J Cell Biochem Suppl**, 34, p. 97-102, 2000.

FOX, D. A.; BASS, P. Selective myenteric neuronal denervation of the rat jejunum. Differential control of the propagation of migrating myoelectric complex and basic electric rhythm. **Gastroenterology**, 87, n. 3, p. 572-577, Sep 1984.

FRITZ A, P. C., JACK A, ET AL,. **International classification of diseases for oncology: ICD-O. 2000.**

FURNESS, J.; RIVERA, L.; THACKER, M.; PONTELL, L. *et al.* Effects of ischemia / reperfusion on the enteric nervous system and intestine. **Neurogastroenterology and Motility**, 24, p. 8-8, Sep 2012.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, 9, n. 5, p. 286-294, Mar 2012.

FURNESS, J. B.; HIND, A. J.; NGUI, K.; ROBBINS, H. L. *et al.* The distribution of PKC isoforms in enteric neurons, muscle and interstitial cells of the human intestine. **Histochemistry and Cell Biology**, 126, n. 5, p. 537-548, Nov 2006.

GAO, N.; YANG, F.; CHEN, S.; WAN, H. *et al.* The role of TRPV1 ion channels in the suppression of gastric cancer development. **J Exp Clin Cancer Res**, 39, n. 1, p. 206, Oct 2020.

GARCIA, S. B. [Chagas' disease: 100 years of discovery and current thought of its discoverer]. **Arq Gastroenterol**, 46, n. 4, p. 249-251, 2009 Oct-Dec 2009.

GARCIA, S. B.; ARANHA, A. L.; GARCIA, F. R.; BASILE, F. V. *et al.* A retrospective study of histopathological findings in 894 cases of megacolon: what is the relationship between megacolon and colonic cancer? **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 45, n. 2, p. 91-93, 2003 Mar-Apr 2003.

GARCIA, S. B.; DEMARZO, M. M. P.; VINHADELI, W. S.; LLORACH-VELLUDO, M. A. *et al.* No reduction with ageing of the number of myenteric neurons in benzalkonium chloride treated rats. **Neuroscience Letters**, 331, n. 1, p. 66-68, Oct 4 2002.

GARCIA, S. B.; KAWASAKY, M. C.; SILVA, J. C.; GARCIA-RODRIGUES, A. C. *et al.* Intrinsic myenteric denervation: a new model to increase the intestinal absorptive surface in short-bowel syndrome. **J Surg Res**, 85, n. 2, p. 200-203, Aug 1999.

GARCIA, S. B.; MINTO, S. B.; MARQUES, I. D. S.; KANNEN, V. Myenteric Denervation of the Gut with Benzalkonium Chloride: A Review of Forty Years of an Experimental Model. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 2019 2019.

GARCIA, S. B.; OLIVEIRA, J. S. M.; PINTO, L. Z.; MUCCILLO, G. *et al.* The relationship between megacolon and carcinoma of the colon: An experimental approach. **Carcinogenesis**, 17, n. 8, p. 1777-1779, Aug 1996.

GARCIA, S. B.; PAULA, J. S.; GIOVANNETTI, G. S.; ZENHA, F. *et al.* Nitric oxide is involved in the lesions of the peripheral autonomic neurons observed in the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Experimental Parasitology**, 93, n. 4, p. 191-197, Dec 1999.

GARCIA, S. B.; PINTO, L. Z.; ZUCOLOTO, S.; OLIVEIRA, J. S. Experimental megaileum. **Res Exp Med (Berl)**, 195, n. 4, p. 249-253, 1995.

GARCIA, S. B.; STOPPER, H.; KANNEN, V. The contribution of neuronal-glial-endothelial-epithelial interactions to colon carcinogenesis. **Cell Mol Life Sci**, May 22 2014a.

GARCIA, S. B.; STOPPER, H.; KANNEN, V. The contribution of neuronal-glial-endothelial-epithelial interactions to colon carcinogenesis. **Cell Mol Life Sci**, 71, n. 17, p. 3191-3197, Sep 2014b.

GENG, S.; ZHENG, Y.; MENG, M.; GUO, Z. *et al.* Gingerol Reverses the Cancer-Promoting Effect of Capsaicin by Increased TRPV1 Level in a Urethane-Induced Lung Carcinogenic Model. **J Agric Food Chem**, 64, n. 31, p. 6203-6211, Aug 2016.

GORGOULIS, V. G.; VASSILIOU, L. V.; KARAKAIDOS, P.; ZACHARATOS, P. *et al.* Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. **Nature**, 434, n. 7035, p. 907-913, Apr 2005.

GOUIN, O.; L'HERONDELLE, K.; LEBONVALLET, N.; LE GALL-IANOTTO, C. *et al.* TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. **Protein Cell**, 8, n. 9, p. 644-661, Sep 2017.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, 140, n. 6, p. 883-899, Mar 2010.

GULBRANSEN, B. D.; BASHASHATI, M.; HIROTA, S. A.; GUI, X. *et al.* Activation of neuronal P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis. **Nat Med**, 18, n. 4, p. 600-604, Mar 18 2012.

GÉRARD-MONNIER, D.; ERDELMEIER, I.; RÉGNARD, K.; MOZE-HENRY, N. *et al.* Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. **Chem Res Toxicol**, 11, n. 10, p. 1176-1183, Oct 1998.

HABR-GAMA, A. [Colorectal cancer: the importance of its prevention]. **Arq Gastroenterol**, 42, n. 1, p. 2-3, Jan-Mar 2005.

HAMILTON, W.; LANCASHIRE, R.; SHARP, D.; PETERS, T. J. *et al.* The risk of colorectal cancer with symptoms at different ages and between the sexes: a case-control study. **BMC Med**, 7, p. 17, Apr 2009.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144, n. 5, p. 646-674, Mar 2011.

HANAUER, S. B.; WALD, A. Acute and chronic megacolon. **Curr Treat Options Gastroenterol**, 10, n. 3, p. 237-247, Jun 2007.

HE, C. L.; BURGART, L.; WANG, L.; PEMBERTON, J. *et al.* Decreased interstitial cell of cajal volume in patients with slow-transit constipation. **Gastroenterology**, 118, n. 1, p. 14-21, Jan 2000.

HEWITSON, P.; GLASZIOU, P.; WATSON, E.; TOWLER, B. *et al.* Cochrane systematic review of colorectal cancer screening using the fecal occult blood test (hemoccult): an update. **Am J Gastroenterol**, 103, n. 6, p. 1541-1549, Jun 2008.

HOLZER, P. Vanilloid receptor TRPV1: hot on the tongue and inflaming the colon. **Neurogastroenterol Motil**, 16, n. 6, p. 697-699, Dec 2004.

HUANG, K. F.; MA, K. H.; HUNG, Y. C.; LO, L. C. *et al.* A new copper ionophore DPMQ protects cells against ultraviolet B irradiation by inhibiting the TRPV1 channel. **J Cell Physiol**, 233, n. 12, p. 9594-9610, Dec 2018.

HULL, M. A.; BOOTH, J. K.; TISBURY, A.; SCOTT, N. *et al.* Cyclooxygenase 2 is up-regulated and localized to macrophages in the intestine of Min mice. **Br J Cancer**, 79, n. 9-10, p. 1399-1405, Mar 1999.

HUTTER, M. M.; WICK, E. C.; DAY, A. L.; MAA, J. *et al.* Transient receptor potential vanilloid (TRPV-1) promotes neurogenic inflammation in the pancreas via activation of the neurokinin-1 receptor (NK-1R). **Pancreas**, 30, n. 3, p. 260-265, Apr 2005.

HÖLZEL, M.; TÜTING, T. Inflammation-Induced Plasticity in Melanoma Therapy and Metastasis. **Trends Immunol**, 37, n. 6, p. 364-374, Jun 2016.

IANTORNO, G.; BASSOTTI, G.; KOGAN, Z.; LUMI, C. M. *et al.* The enteric nervous system in chagasic and idiopathic megacolon. **Am J Surg Pathol**, 31, n. 3, p. 460-468, Mar 2007.

IIDA, T.; MORIYAMA, T.; KOBATA, K.; MORITA, A. *et al.* TRPV1 activation and induction of nociceptive response by a non-pungent capsaicin-like compound, capsiate. **Neuropharmacology**, 44, n. 7, p. 958-967, Jun 2003.

IMPERIALE, T. F.; RANSOHOFF, D. F.; ITZKOWITZ, S. H. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. **N Engl J Med**, 371, n. 2, p. 187-188, 07 2014.

JACKSON, P.; THOMPSON, R. J. The demonstration of new human brain-specific proteins by high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of the Neurological Sciences**, 49, n. 3, p. 429-438, 1981-03-01 1981.

JANIAK, M.; SUSKA, M.; DUDZIŃSKA, W.; SKOTNICKA, E. Blood glutathione status and activity of glutathione-metabolizing antioxidant enzymes in erythrocytes of young trotters in basic training. **J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)**, 94, n. 2, p. 137-145, Apr 2010.

JASCUR, T.; FOTEDAR, R.; GREENE, S.; HOTCHKISS, E. *et al.* N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) triggers MSH2 and Cdt2 protein-dependent degradation of the cell cycle and mismatch repair (MMR) inhibitor protein p21Waf1/Cip1. **J Biol Chem**, 286, n. 34, p. 29531-29539, Aug 26 2011.

JOHN, S. K.; GEORGE, S.; PRIMROSE, J. N.; FOZARD, J. B. Symptoms and signs in patients with colorectal cancer. **Colorectal Dis**, 13, n. 1, p. 17-25, Jan 2011.

JONES, R. C.; XU, L.; GEBHART, G. F. The mechanosensitivity of mouse colon afferent fibers and their sensitization by inflammatory mediators require transient receptor potential vanilloid 1 and acid-sensing ion channel 3. **J Neurosci**, 25, n. 47, p. 10981-10989, Nov 2005.

JOSEPH, N. M.; HE, S.; QUINTANA, E.; KIM, Y. G. *et al.* Enteric glia are multipotent in culture but primarily form glia in the adult rodent gut. **J Clin Invest**, 121, n. 9, p. 3398-3411, Sep 2011.

KANNEN, V.; DE OLIVEIRA, E. C.; MOTTA, B. Z.; CHAGURI, A. J. *et al.* Trypanosomiasis-induced megacolon illustrates how myenteric neurons modulate the risk for colon cancer in rats and humans. **PLoS Negl Trop Dis**, 9, n. 4, p. e0003744, Apr 2015.

KANNEN, V.; HINTZSCHE, H.; ZANETTE, D. L.; SILVA, W. A. *et al.* Antiproliferative effects of fluoxetine on colon cancer cells and in a colonic carcinogen mouse model. **PLoS One**, 7, n. 11, p. e50043, 2012.

KASDAGLY, M.; RADHAKRISHNAN, S.; REDDIVARI, L.; VEERAMACHANENI, D. N. *et al.* Colon carcinogenesis: influence of Western diet-induced obesity and targeting stem cells using dietary bioactive compounds. **Nutrition**, 30, n. 11-12, p. 1242-1256, 2014 Nov-Dec 2014.

KELLY, J. J.; ALBERTS, S. R.; SACCO, F.; LANIER, A. P. Colorectal cancer in Alaska native people, 2005-2009. **Gastrointest Cancer Res**, 5, n. 5, p. 149-154, Sep 2012.

KERKSICK, C.; WILLOUGHBY, D. The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. **J Int Soc Sports Nutr**, 2, p. 38-44, Dec 09 2005.

KHANNA, K. K.; JACKSON, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. **Nat Genet**, 27, n. 3, p. 247-254, Mar 2001.

KNOWLES, C. H.; MARTIN, J. E. Slow transit constipation: a model of human gut dysmotility. Review of possible aetiologies. **Neurogastroenterol Motil**, 12, n. 2, p. 181-196, Apr 2000.

KOCH, T. R.; TELFORD, G. L.; WALGENBACH-TELFORD, S.; KENDALL, W. F. *et al.* Total antioxidant capacity following extrinsic denervation and small intestinal transplantation in the rat. **Neurosci Lett**, 342, n. 1-2, p. 135-137, May 2003.

KOEBERLE, F. ENTEROMEGALY AND CARDIOMEGALY IN CHAGAS DISEASE. **Gut**, 4, p. 399-405, Dec 1963.

KORSGAARD, M.; PEDERSEN, L.; SØRENSEN, H. T.; LAURBERG, S. Reported symptoms, diagnostic delay and stage of colorectal cancer: a population-based study in Denmark. **Colorectal Dis**, 8, n. 8, p. 688-695, Oct 2006.

KRONBORG, O.; FENGER, C.; OLSEN, J.; JØRGENSEN, O. D. *et al.* Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. **Lancet**, 348, n. 9040, p. 1467-1471, Nov 1996.

KUBBEN, F. J.; PEETERS-HAESEVOETS, A.; ENGELS, L. G.; BAETEN, C. G. *et al.* Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a new marker to study human colonic cell proliferation. **Gut**, 35, n. 4, p. 530-535, 1994-04-01 1994.

KUMARAGURUPARAN, R.; CHANDRA MOHAN, K. V.; ABRAHAM, S. K.; NAGINI, S. Attenuation of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine induced genotoxicity and oxidative stress by tomato and garlic combination. **Life Sci**, 76, n. 19, p. 2247-2255, Mar 2005.

KURNIK, M.; GIL, K.; GAJDA, M.; THOR, P. *et al.* Neuropathic alterations of the myenteric plexus neurons following subacute intraperitoneal administration of salsolinol. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, 53, n. 1, p. 49-61, 2015-04-14 2015.

LAI, H.; TAN, B.; LIANG, Z.; YAN, Q. *et al.* Effect of the Chinese traditional prescription Suo Quan Wan on TRPV1 expression in the bladder of rats with bladder outlet obstruction. **BMC Complement Altern Med**, 15, p. 424, Dec 2015.

LEE, Y. C.; YIN, T. C.; CHEN, Y. T.; CHAI, C. Y. *et al.* High expression of phospho-H2AX predicts a poor prognosis in colorectal cancer. **Anticancer Res**, 35, n. 4, p. 2447-2453, Apr 2015.

LEE, Y. M.; LEE, J. Y.; KIM, M. J.; BAE, H. I. *et al.* Hypomethylation of the protein gene product 9.5 promoter region in gallbladder cancer and its relationship with clinicopathological features. **Cancer Sci**, 97, n. 11, p. 1205-1210, Nov 2006.

LEVIN, T. R.; FARRAYE, F. A.; SCHOEN, R. E.; HOFF, G. *et al.* Quality in the technical performance of screening flexible sigmoidoscopy: recommendations of an international multi-society task group. **Gut**, 54, n. 6, p. 807-813, Jun 2005.

LI, F. Y.; LAI, M. D. Colorectal cancer, one entity or three. **J Zhejiang Univ Sci B**, 10, n. 3, p. 219-229, Mar 2009.

LINDEN, D. R.; COUVRETTE, J. M.; CIOLINO, A.; MCQUOID, C. *et al.* Indiscriminate loss of myenteric neurones in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon. **Neurogastroenterol Motil**, 17, n. 5, p. 751-760, Oct 2005.

LIU, W.; ZHANG, L.; WU, R. Enteric Neural Stem Cells Expressing Insulin-Like Growth Factor 1: A Novel Cellular Therapy for Hirschsprung's Disease in Mouse Model. **DNA Cell Biol**, 37, n. 7, p. 642-648, Jul 2018.

LONGSTRETH, G. F.; THOMPSON, W. G.; CHEY, W. D.; HOUGHTON, L. A. *et al.* Functional bowel disorders. **Gastroenterology**, 130, n. 5, p. 1480-1491, Apr 2006.

LU, B.; YU, L.; XU, L.; CHEN, H. *et al.* The effects of radix curcumae extract on expressions of VEGF, COX-2 and PCNA in gastric mucosa of rats fed with MNNG. **Curr Pharm Biotechnol**, 11, n. 3, p. 313-317, Apr 2010.

LU, W.; LI, J.; GONG, L.; XU, X. *et al.* H<sub>2</sub>S modulates duodenal motility in male rats via activating TRPV1 and K(ATP) channels. **Br J Pharmacol**, 171, n. 6, p. 1534-1550, Mar 2014.

LYFORD, G. L.; HE, C. L.; SOFFER, E.; HULL, T. L. *et al.* Pan-colonic decrease in interstitial cells of Cajal in patients with slow transit constipation. **Gut**, 51, n. 4, p. 496-501, Oct 2002.

MAJUMDAR, S. R.; FLETCHER, R. H.; EVANS, A. T. How does colorectal cancer present? Symptoms, duration, and clues to location. **Am J Gastroenterol**, 94, n. 10, p. 3039-3045, Oct 1999.

MANDEL, J. S.; CHURCH, T. R.; BOND, J. H.; EDERER, F. *et al.* The effect of fecal occult-blood screening on the incidence of colorectal cancer. **N Engl J Med**, 343, n. 22, p. 1603-1607, Nov 2000.

MARIANI, F.; SENA, P.; RONCUCCI, L. Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development. **World J Gastroenterol**, 20, n. 29, p. 9716-9731, Aug 2014.

MARINCSÁK, R.; TÓTH, B. I.; CZIFRA, G.; MÁRTON, I. *et al.* Increased expression of TRPV1 in squamous cell carcinoma of the human tongue. **Oral Dis**, 15, n. 5, p. 328-335, Jul 2009.

MARNETT, L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutat Res**, 424, n. 1-2, p. 83-95, Mar 1999.

MATSUDA, Y.; WAKAI, T.; KUBOTA, M.; OSAWA, M. *et al.* DNA damage sensor  $\gamma$ -H2AX is increased in preneoplastic lesions of hepatocellular carcinoma. **ScientificWorldJournal**, 2013, p. 597095, 2013.

MATSUMOTO, K.; HOSOYA, T.; TASHIMA, K.; NAMIKI, T. *et al.* Distribution of transient receptor potential vanilloid 1 channel-expressing nerve fibers in mouse rectal and colonic enteric nervous system: relationship to peptidergic and nitrenergic neurons. **Neuroscience**, 172, p. 518-534, Jan 2011.



MATTHEWS, P. J.; AZIZ, Q.; FACER, P.; DAVIS, J. B. *et al.* Increased capsaicin receptor TRPV1 nerve fibres in the inflamed human oesophagus. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, 16, n. 9, p. 897-902, Sep 2004.

MCCARTY, M. F.; DINICOLANTONIO, J. J.; O'KEEFE, J. H. Capsaicin may have important potential for promoting vascular and metabolic health. **Open Heart**, 2, n. 1, p. e000262, 2015 2015.

MCMAHON, B. J.; BRUCE, M. G.; KOCH, A.; GOODMAN, K. J. *et al.* The diagnosis and treatment of Helicobacter pylori infection in Arctic regions with a high prevalence of infection: Expert Commentary. **Epidemiol Infect**, 144, n. 2, p. 225-233, Jan 2016.

MEI, L.; HU, Q.; PENG, J.; RUAN, J. *et al.* Phospho-histone H2AX is a diagnostic and prognostic marker for epithelial ovarian cancer. **Int J Clin Exp Pathol**, 8, n. 5, p. 5597-5602, 2015.

MEIRA, L. B.; BUGNI, J. M.; GREEN, S. L.; LEE, C. W. *et al.* DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. **J Clin Invest**, 118, n. 7, p. 2516-2525, Jul 2008.

MIAO, X.; LIU, G.; XU, X.; XIE, C. *et al.* High expression of vanilloid receptor-1 is associated with better prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. **Cancer Genet Cytogenet**, 186, n. 1, p. 25-32, Oct 2008.

MIYACHI, K.; FRITZLER, M. J.; TAN, E. M. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. **J Immunol**, 121, n. 6, p. 2228-2234, Dec 1978.

MIZUKAMI, H.; SHIRAHATA, A.; GOTO, T.; SAKATA, M. *et al.* PGP9.5 methylation as a marker for metastatic colorectal cancer. **Anticancer Res**, 28, n. 5A, p. 2697-2700, 2008 Sep-Oct 2008.

MORADI-MARJANEH, R.; HASSANIAN, S. M.; MEHRAMIZ, M.; REZAYI, M. *et al.* Reactive oxygen species in colorectal cancer: The therapeutic impact and its potential roles in tumor progression via perturbation of cellular and physiological dysregulated pathways. **J Cell Physiol**, 234, n. 7, p. 10072-10079, 07 2019.

MOUSAVI, S. M.; HAJISHAFIEE, M.; CLARK, C. C. T.; BORGES DO NASCIMENTO, I. J. *et al.* Clinical effectiveness of zinc supplementation on the biomarkers of oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Pharmacol Res**, 161, p. 105166, 11 2020.

MOYNES, D. M.; LUCAS, G. H.; BEYAK, M. J.; LOMAX, A. E. Effects of inflammation on the innervation of the colon. **Toxicol Pathol**, 42, n. 1, p. 111-117, Jan 2014.

NACHIAPPAN, V.; MUFTI, S. I.; CHAKRAVARTI, A.; ESKELSON, C. D. *et al.* Lipid peroxidation and ethanol-related tumor promotion in Fischer-344 rats treated with tobacco-specific nitrosamines. **Alcohol Alcohol**, 29, n. 5, p. 565-574, Sep 1994.

NARISAWA, T.; MAGADIA, N. E.; WEISBURGER, J. H.; WYNDER, E. L. Promoting effect of bile acids on colon carcinogenesis after intrarectal instillation of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. **J Natl Cancer Inst**, 53, n. 4, p. 1093-1097, Oct 1974.

NETO, J. D. C.; BARRETO, J. B. P.; FREITAS, N. S.; QUEIROZ, M. A. Câncer colorretal: características clínicas e anatomopatológicas em pacientes com idade inferior a 40 anos. **Rev Brás Coloproctologia**, 26, p. 430-435, 2006.

NEUNLIST, M.; AUBERT, P.; TOQUET, C.; ORESHKOVA, T. *et al.* Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. **Gut**, 52, n. 1, p. 84-90, Jan 2003.

NFONSAM, V. N.; JECIUS, H.; CHEN, D.; OMESIETE, P. N. *et al.* Increasing Incidence of Colon Cancer in the Young: Assessing the Tumor Biology. **J Am Coll Surg**, 229, n. 1, p. 79-90, 07 2019.

NOURAZARIAN, A. R.; KANGARI, P.; SALMANINEJAD, A. Roles of oxidative stress in the development and progression of breast cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, 15, n. 12, p. 4745-4751, 2014.

OKAYASU, I.; HATAKEYAMA, S.; YAMADA, M.; OHKUSA, T. *et al.* A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology**, 98, n. 3, p. 694-702, Mar 1990.

OLIVEIRA, E. C.; LEITE, M. S.; MIRANDA, J. A.; ANDRADE, A. L. *et al.* Chronic Trypanosoma cruzi infection associated with low incidence of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. **Carcinogenesis**, 22, n. 5, p. 737-740, May 2001.

PAIS, R.; DUMITRAȘCU, D. L. Do antioxidants prevent colorectal cancer? A meta-analysis. **Rom J Intern Med**, 51, n. 3-4, p. 152-163, 2013 Jul-Dec 2013.

PATARCA, R.; ROSENZWEIG, J. A.; ZUNIGA, A. A.; FLETCHER, M. A. Benzalkonium salts: Effects on G protein-mediated processes and surface membranes. **Critical Reviews in Oncogenesis**, 11, n. 3-4, p. 255-305, 2000 2000.

PERE, M.; CERAR, A. The Role, Significance and Applicability of Aberrant Crypt Foci in Clinical Practice. *In: Colorectal Cancer - Surgery, Diagnostics and Treatment*: InTech, 2014.

PHILLIPS, R. J.; HARGRAVE, S. L.; RHODES, B. S.; ZOPF, D. A. *et al.* Quantification of neurons in the myenteric plexus: an evaluation of putative pan-neuronal markers. **Journal of Neuroscience Methods**, 133, n. 1-2, p. 99-107, 2004-02-01 2004.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nat Med**, 17, n. 11, p. 1381-1390, 2011.

PODHORECKA, M.; SKLADANOWSKI, A.; BOZKO, P. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. **Journal of Nucleic Acids**, 2010, p. 1-9, 2010-01-01 2010.

POLLI-LOPES, A. C.; ZUCOLOTO, S.; CUNHA, F. D.; FIGUEIREDO, L. A. D. *et al.* Myenteric denervation reduces the incidence of gastric tumors in rats. **Cancer Letters**, 190, n. 1, p. 45-50, Feb 10 2003.

PRICE, P. B. BENZALKONIUM CHLORIDE (ZEPHIRAN CHLORIDE) AS A SKIN DISINFECTANT. **Archives of Surgery**, 61, n. 1, p. 23-33, 1950.

RADEMAKERS, G.; VAES, N.; SCHONKEREN, S.; KOCH, A. *et al.* The role of enteric neurons in the development and progression of colorectal cancer. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer**, 1868, n. 2, p. 420-434, Dec 2017.

RAMSEY, S. D.; MANDELSON, M. T.; BERRY, K.; ETZIONI, R. *et al.* Cancer-attributable costs of diagnosis and care for persons with screen-detected versus symptom-detected colorectal cancer. **Gastroenterology**, 125, n. 6, p. 1645-1650, Dec 2003.

RAO, M.; GERSHON, M. D. The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, 13, n. 9, p. 517-528, 09 2016.

REITMAN, F. A.; SHERTZER, H. G.; BERGER, M. L. Toxicity of methylating agents in isolated hepatocytes. **Biochem Pharmacol**, 37, n. 16, p. 3183-3188, Aug 1988.

RISQUES, R. A.; LAI, L. A.; BRETNALL, T. A.; LI, L. *et al.* Ulcerative colitis is a disease of accelerated colon aging: evidence from telomere attrition and DNA damage. **Gastroenterology**, 135, n. 2, p. 410-418, Aug 2008.

ROGAKOU, E. P.; BOON, C.; REDON, C.; BONNER, W. M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. **J Cell Biol**, 146, n. 5, p. 905-916, Sep 06 1999.

ROGAKOU, E. P.; PILCH, D. R.; ORR, A. H.; IVANOVA, V. S. *et al.* DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. **J Biol Chem**, 273, n. 10, p. 5858-5868, Mar 1998.

ROSENBAUM, C.; SCHICK, M. A.; WOLLBORN, J.; HEIDER, A. *et al.* Activation of Myenteric Glia during Acute Inflammation In Vitro and In Vivo. **PLoS One**, 11, n. 3, p. e0151335, 2016.

SAK, A.; STUSCHKE, M. Use of  $\gamma$ H2AX and other biomarkers of double-strand breaks during radiotherapy. **Semin Radiat Oncol**, 20, n. 4, p. 223-231, Oct 2010.

SAKATA, K.; KUNIEDA, T.; FURUTA, T.; SATO, A. SELECTIVE DESTRUCTION OF INTESTINAL NERVOUS ELEMENTS BY LOCAL APPLICATION OF BENZALKONIUM SOLUTION IN THE RAT. **Experientia**, 35, n. 12, p. 1611-1613, 1979 1979.

SATO, A.; YAMAMOTO, M.; IMAMURA, K.; KASHIKI, Y. *et al.* PATHOPHYSIOLOGY OF AGANGLIONIC COLON AND ANORECTUM - EXPERIMENTAL-STUDY ON AGANGLIONOSIS PRODUCED BY A NEW METHOD IN RAT. **Journal of Pediatric Surgery**, 13, n. 4, p. 399-405, 1978 1978.

SAUNDERS, C. J.; LI, W. Y.; PATEL, T. D.; MUDAY, J. A. *et al.* Dissecting the role of TRPV1 in detecting multiple trigeminal irritants in three behavioral assays for sensory irritation. **F1000Res**, 2, p. 74, 2013.

SEDELNIKOVA, O. A.; BONNER, W. M. GammaH2AX in cancer cells: a potential biomarker for cancer diagnostics, prediction and recurrence. **Cell Cycle**, 5, n. 24, p. 2909-2913, Dec 2006.

SHU, X.; MENG, Q.; JIN, H.; CHEN, J. *et al.* Treatment of aganglionic megacolon mice via neural stem cell transplantation. **Mol Neurobiol**, 48, n. 3, p. 429-437, Dec 2013.

SHUBA, Y. M. Beyond Neuronal Heat Sensing: Diversity of TRPV1 Heat-Capsaicin Receptor-Channel Functions. **Front Cell Neurosci**, 14, p. 612480, 2020.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; FEDEWA, S. A.; AHNEN, D. J. *et al.* Colorectal cancer statistics, 2017. **CA Cancer J Clin**, 67, n. 3, p. 177-193, 05 2017.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; GODING SAUER, A.; FEDEWA, S. A. *et al.* Colorectal cancer statistics, 2020. **CA Cancer J Clin**, 70, n. 3, p. 145-164, 05 2020.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA Cancer J Clin**, 66, n. 1, p. 7-30, 2016 Jan-Feb 2016.

SINICROPE, F. A.; GILL, S. Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. **Cancer Metastasis Rev**, 23, n. 1-2, p. 63-75, 2004 Jan-Jun 2004.

SOARES, P. V.; KANNEN, V.; JORDÃO JUNIOR, A. A.; GARCIA, S. B. Coffee, but Neither Decaffeinated Coffee nor Caffeine, Elicits Chemoprotection Against a Direct Carcinogen in the Colon of Wistar Rats. **Nutr Cancer**, 71, n. 4, p. 615-623, 2019.

SOBREIRA, L. F. R.; ZUCOLOTO, S.; GARCIA, S. B.; TRONCON, L. E. A. Effects of myenteric denervation on gastric epithelial cells and gastric emptying. **Digestive Diseases and Sciences**, 47, n. 11, p. 2493-2499, Nov 2002.

STABILE, G.; KAMM, M. A.; HAWLEY, P. R.; LENNARD-JONES, J. E. Colectomy for idiopathic megarectum and megacolon. **Gut**, 32, n. 12, p. 1538-1540, Dec 1991.

STABILE, G.; KAMM, M. A.; PHILLIPS, R. K.; HAWLEY, P. R. *et al.* Partial colectomy and coloanal anastomosis for idiopathic megarectum and megacolon. **Dis Colon Rectum**, 35, n. 2, p. 158-162, Feb 1992.

STAPLEY, S.; PETERS, T. J.; SHARP, D.; HAMILTON, W. The mortality of colorectal cancer in relation to the initial symptom at presentation to primary care and to the duration of symptoms: a cohort study using medical records. **Br J Cancer**, 95, n. 10, p. 1321-1325, Nov 2006.

STASZEWSKI, O.; NIKOLOVA, T.; KAINA, B. Kinetics of gamma-H2AX focus formation upon treatment of cells with UV light and alkylating agents. **Environ Mol Mutagen**, 49, n. 9, p. 734-740, Dec 2008.

SUGIURA, T.; BIELEFELDT, K.; GEBHART, G. F. Mouse colon sensory neurons detect extracellular acidosis via TRPV1. **Am J Physiol Cell Physiol**, 292, n. 5, p. C1768-1774, May 2007.

SULLIVAN, L. B.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. **Cancer Metab**, 2, p. 17, 2014.

SUN, J.; PU, Y.; WANG, P.; CHEN, S. *et al.* TRPV1-mediated UCP2 upregulation ameliorates hyperglycemia-induced endothelial dysfunction. **Cardiovascular Diabetology**, 12, n. 1, p. 69, 2013-01-01 2013.

SUN, Y.; WANG, Q.; WANG, Y.; REN, W. *et al.* Sarm1-mediated neurodegeneration within the enteric nervous system protects against local inflammation of the colon. **Protein & Cell**, 2021-04-19 2021.

SUNDBØLL, J.; THYGESEN, S. K.; VERES, K.; LIAO, D. *et al.* Risk of cancer in patients with constipation. **Clin Epidemiol**, 11, p. 299-310, 2019.

SUNG, B.; PRASAD, S.; RAVINDRAN, J.; YADAV, V. R. *et al.* Capsazepine, a TRPV1 antagonist, sensitizes colorectal cancer cells to apoptosis by TRAIL through ROS-JNK-CHOP-mediated upregulation of death receptors. **Free Radic Biol Med**, 53, n. 10, p. 1977-1987, Nov 2012.

SYK, I.; MIRASTSCHIJSKI, U.; JEPSSON, B. W.; AGREN, M. S. Experimental colonic obstruction increases collagen degradation by matrix metalloproteinases in the bowel wall. **Dis Colon Rectum**, 46, n. 9, p. 1251-1259, Sep 2003.

SZALLASI, A.; CORTRIGHT, D. N.; BLUM, C. A.; EID, S. R. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. **Nat Rev Drug Discov**, 6, n. 5, p. 357-372, May 2007.

TRAVERSO, N.; RICCIARELLI, R.; NITTI, M.; MARENCO, B. *et al.* Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. **Oxid Med Cell Longev**, 2013, p. 972913, 2013.

TSUJII, M.; KAWANO, S.; TSUJI, S.; SAWAOKA, H. *et al.* Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. **Cell**, 93, n. 5, p. 705-716, May 1998.

TÁRRAGA LÓPEZ, P. J.; ALBERO, J. S.; RODRÍGUEZ-MONTES, J. A. Primary and secondary prevention of colorectal cancer. **Clin Med Insights Gastroenterol**, 7, p. 33-46, 2014.

UENO, H.; SHIROUZU, K.; SHIMAZAKI, H.; KAWACHI, H. *et al.* Histogenesis and prognostic value of myenteric spread in colorectal cancer: a Japanese multi-institutional study. **J Gastroenterol**, 49, n. 3, p. 400-407, Mar 2014.

VESPÚCIO, M. V.; TURATTI, A.; MODIANO, P.; OLIVEIRA, E. C. *et al.* Intrinsic denervation of the colon is associated with a decrease of some colonic preneoplastic markers in rats treated with a chemical carcinogen. **Braz J Med Biol Res**, 41, n. 4, p. 311-317, Apr 2008.

VESPÚCIO, M. V. O.; PASCHOAL, R. M.; ZUCOLOTO, S.; GARCIA, F. R. B. *et al.* A new experimental model to study preneoplastic lesions in achalasia of the esophagus. **Acta Cirurgica Brasileira**, 20, n. 6, p. 418-421, 2005-12 2005.

VIGNA, S. R. Intraluminal Administration of Resiniferatoxin Protects against. **Gastroenterol Res Pract**, 2017, p. 8438172, 2017.

VINUESA, A. G.; SANCHO, R.; GARCÍA-LIMONES, C.; BEHRENS, A. *et al.* Vanilloid receptor-1 regulates neurogenic inflammation in colon and protects mice from colon cancer. **Cancer Res**, 72, n. 7, p. 1705-1716, Apr 2012.

VON BOYEN, G. B.; SCHULTE, N.; PFLÜGER, C.; SPANIOL, U. *et al.* Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. **BMC Gastroenterol**, 11, p. 3, Jan 14 2011.

WASZKIEWICZ, N.; SZAJDA, S. D.; WASZKIEWICZ, M.; WOJTULEWSKA-SUPRON, A. *et al.* The activity of serum beta-galactosidase in colon cancer patients with a history of alcohol and nicotine dependence: preliminary data. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, 67, p. 896-900, Aug 26 2013.

WHITE, J. P.; URBAN, L.; NAGY, I. TRPV1 function in health and disease. **Curr Pharm Biotechnol**, 12, n. 1, p. 130-144, Jan 2011.

WHO. **World Health Organization: IARC. Globocan 2018.** <https://gco.iarc.fr/>, 2018. Disponível em: [https://scholar.google.com/scholar?cluster=1962620397676037206&hl=en&as\\_sdt=2005&scioldt=0,5](https://scholar.google.com/scholar?cluster=1962620397676037206&hl=en&as_sdt=2005&scioldt=0,5). Acesso em: 28/07/2020.

WICK, E. C.; HOGE, S. G.; GRAHN, S. W.; KIM, E. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 1, calcitonin gene-related peptide, and substance P mediate nociception in acute pancreatitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 290, n. 5, p. G959-969, May 2006.

WILLOUGHBY, D. A.; MOORE, A. R.; COLVILLE-NASH, P. R. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. **Lancet**, 355, n. 9204, p. 646-648, Feb 2000.

XU, S.; ZHANG, L.; CHENG, X.; YU, H. *et al.* Capsaicin inhibits the metastasis of human papillary thyroid carcinoma BCPAP cells through the modulation of the TRPV1 channel. **Food Funct**, 9, n. 1, p. 344-354, Jan 2018.

YAMAZAKI, T.; HIBI, K.; TAKASE, T.; TEZEL, E. *et al.* PGP9.5 as a marker for invasive colorectal cancer. **Clin Cancer Res**, 8, n. 1, p. 192-195, Jan 2002.

YI, C.; LI, X.; CHEN, S.; LIU, M. *et al.* Natural product corynoline suppresses melanoma cell growth through inducing oxidative stress. **Phytother Res**, 34, n. 10, p. 2766-2777, Oct 2020.

YIANGOU, Y.; FACER, P.; DYER, N. H.; CHAN, C. L. *et al.* Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. **Lancet**, 357, n. 9265, p. 1338-1339, Apr 2001.

YU, Y.; FANG, L.; SUN, D. Biodistribution of HuCC49DeltaCH2-beta-galactosidase in colorectal cancer xenograft model. **Int J Pharm**, 386, n. 1-2, p. 208-215, Feb 15 2010.

ZAKIR, H. M.; MOSTAFEEZUR, R. M.; SUZUKI, A.; HITOMI, S. *et al.* Expression of TRPV1 channels after nerve injury provides an essential delivery tool for neuropathic pain attenuation. **PLoS One**, 7, n. 9, p. e44023, 2012.

ZHAO, H.; LIU, J.; PAN, S.; SUN, Y. *et al.* SOD mRNA and MDA Expression in Rectus Femoris Muscle of Rats with Different Eccentric Exercise Programs and Time Points. **PLoS ONE**, 8, n. 9, p. e73634, 2013-09-13 2013.

ZHENG, W.; SONG, H.; LUO, Z.; WU, H. *et al.* Acetylcholine ameliorates colitis by promoting IL-10 secretion of monocytic myeloid-derived suppressor cells through the nAChR/ERK pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 118, n. 11, Mar 2021.

ZHOU, Y.; WANG, X.; GUO, L.; CHEN, L. *et al.* TRPV1 activation inhibits phenotypic switching and oxidative stress in vascular smooth muscle cells by upregulating PPAR $\alpha$ . **Biochem Biophys Res Commun**, 545, p. 157-163, 03 2021.

ZUCOLOTO, S.; DE DEUS, D. A.; MARTINS, A. A.; MUGLIA, V. F. *et al.* The relationship between myenteric neuronal denervation, smooth muscle thickening and epithelial cell proliferation in the rat colon. **Res Exp Med (Berl)**, 197, n. 2, p. 117-124, 1997.

ZUCOLOTO, S.; ROMANELLO, L. M. F.; GARCIA, S. B.; SOBREIRA, L. F. R. *et al.* Topical application of benzalkonium chloride to the stomach serosa increases gastric emptying time, acid secretion, serum gastrin and size of the mucosa. **Apmis**, 110, n. 11, p. 795-801, Nov 2002.

ZUMKELLER, N.; BRENNER, H.; ZWAHLEN, M.; ROTHENBACHER, D. Helicobacter pylori infection and colorectal cancer risk: a meta-analysis. **Helicobacter**, 11, n. 2, p. 75-80, Apr 2006.





## 10.1 Anexo 1: Aprovação no Comitê de Ética de Experimentação Animal



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO



— Comissão de Ética no Uso de Animais —  
(16)3602-3301

### *CERTIFICADO*

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação n° 169/2014, sobre o projeto intitulado "*A atividade de neurônios mioentéricos sobre o desenvolvimento da carcinogênese de cólon*", sob a responsabilidade do Professor Doutor Sergio Britto Garcia está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 20 de outubro de 2014.

We certify that the protocol n° 169/2014, entitled "*The activity of enteric neurons on the development of colon carcinogenesis*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 10/20/2014.

Ribeirão Preto, 20 de outubro de 2014.



Prof. Dr. Omero Benedito Poli-Neto  
Presidente da CEUA – FMRP – USP

## 10.2 Anexo 2: Artigo científico referente ao Doutorado

### **MYENTERIC DENERVATION POTENTLY INHIBITS COLONIC CARCINOGENESIS WHILE ATTENUATING OXIDATIVE STRESS AND INCREASING TRPV1 EXPRESSION<sup>1</sup>**

Desnervação mientérica potencialmente inibe a carcinogênese colônica, enquanto atenua o estresse oxidativo e aumenta a expressão de TRPV1

<sup>1</sup>Oncopathology laboratory, Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (FMRP-USP), Brazil.

**Stefânia Bovo Minto<sup>I</sup>, Waynice N Paula-Garcia<sup>II</sup>, Alceu Afonso Jordão Jr.<sup>III</sup>, Erika Pontin Delloiagono Gual<sup>IV</sup>, Isabela Cristina de Souza Marques<sup>V</sup>, Sérgio Britto Garcia<sup>VI</sup>.**

<sup>I</sup> Fellow PhD degree, Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (FMRP-USP). Main author. Conception, design, scientific content and statistical analysis of the study.

<sup>II</sup> PhD, Full Professor, Department of Orthopedics and Anesthesiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (FMRP-USP).

<sup>III</sup> PhD, Full Professor, Department of Internal Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (FMRP-USP). Oxidative stress spectrophotometry.

<sup>IV</sup> Biomedical Scientist and Laboratory technician, Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (FMRP-USP). Histopathological and immunohistochemical techniques.

<sup>V</sup> PhD degree, Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (FMRP-USP). Anesthetic protocol, animal experiments and procedures

<sup>VI</sup> PhD, Associate Professor, Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (FMRP-USP). Conception, design, intellectual and scientific content of the study; critical revision, final approval.

## ABSTRACT

**Purpose:** This study aimed to investigate the underlying mechanisms involved in the inhibition of colonic carcinogenesis by myenteric denervation in rats, which had been previously demonstrated by us.

**Methods:** The carcinogen N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG 60mg/kg) was used as colon carcinogenesis-promoter and benzalkonium chloride (0.3% BAC) was used to achieve the myenteric plexus ablation. Animals were divided in three groups, accordingly to their procedures: C (control), M (MNNG-exposed animals) and MB (MNNG-exposed and treated with BAC animals). Then, we evaluate immunohistochemical parameters by using  $\gamma$ H2AX, PCNA and TRPV1 antibodies to assess DNA double-strand brakes, cell proliferation and neuronal rate, respectively. Oxidative stress levels were evaluated trough MDA spectrophotometry and histopathology was performed to evaluate dysplastic crypts number in the colonic samples.

**Results:** The myenteric plexus denervation was able to decrease H2AX and PCNA labeling ( $P < 0.05$ ), suggesting that the BAC-induced denervation may acts by inhibiting DNA-damage and cell proliferation. Besides that, the BAC-induced denervation also attenuated MDA protein levels in the colon, indicating an antioxidant effect. Furthermore, the BAC-induced denervation enhanced the number of TRPV1-positive cells and neuronal fibers, suggesting a new mechanism for the protection against carcinogenesis by the myenteric denervation.

**Conclusion:** The BAC-induced denervation of the myenteric plexus plays a protective effect against the colon cancer development by simultaneously decreasing oxidative stress and inducing TRPV1 expression.

**Key words:** Enteric Nervous System; BAC; Denervation; MNNG; Colon cancer.

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar os mecanismos envolvidos na inibição da carcinogênese colônica pela desnervação do plexo mientérico em ratos.

**Métodos:** O carcinógeno N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG 60 mg/kg) foi utilizado como um agente promotor da carcinogênese colônica e cloreto de benzalcônio (0.3% BAC) foi usado para obtenção da ablação do plexo mientérico. Os animais foram divididos em três grupos, de acordo com seus procedimentos: C (controle), M (MNNG) e MB (MNNG+BAC). A imunomarcagem para  $\gamma$ H2AX, PCNA e TRPV1 foram realizadas para avaliar dupla-quebra no DNA, proliferação celular e taxa neuronal, respectivamente. Níveis de estresse oxidativo foram avaliados através de espectrofotometria para MDA e o número de criptas displásicas nas amostras colônicas foi avaliado através de histopatologia.

**Resultados:** A desnervação diminuiu a imunomarcagem para  $\gamma$ H2AX e PCNA ( $P < 0,05$ ), indicando que reduziu o dano ao DNA e atenuou o aumento da proliferação celular induzido pelo MNNG. Além disso, a desnervação pelo BAC diminuiu os níveis de MDA colônico, atuando como antioxidante. Observou-se ainda que a desnervação mientérica aumentou o número de células e fibras neuronais positivas para TRPV1, indicando a existência de um novo mecanismo para a proteção contra a carcinogênese colônica induzido pela desnervação mientérica.

**Conclusão:** A desnervação do plexo mientérico com BAC exerce um efeito protetor contra a carcinogênese colônica por simultaneamente reduzir o estresse oxidativo e o dano de DNA, além de atenuar o aumento da proliferação celular induzida pelo carcinógeno químico e induzir aumento da expressão de TRPV1.

**Palavras-chaves:** Sistema Nervoso Entérico; BAC; Desnervação; MNNG; Câncer de cólon.

## INTRODUCTION

Colonic cancer (CC) is one of the leading causes of death in the world<sup>(1)</sup> and both genetic factors and environment can modulate the risk for developing this disease<sup>(2-3)</sup>. Interestingly, the participation of the enteric nervous system (ENS) in the pathogenesis of the CC has been gaining attention in the literature<sup>(4-6)</sup>. In this regard, we had previously shown that in experimental settings the myenteric denervation with benzalkonium chloride (BAC) is associated to a marked decrease in the incidence of colonic cancer<sup>(7-8)</sup>. Nevertheless, the mechanisms involved in the participation of the ENS in the pathogenesis of the CC remain largely unknown. Here we investigated the effects of myenteric denervation in two possible pathogenic factors that are known to be involved in both the colonic carcinogenesis and in the adaptations that are triggered by denervation in general: the oxidative stress and the expression of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1).

Oxidative stress is one of the most known pathogenic factors of CC<sup>(9-10)</sup>. Lipid peroxidation is a consequence of oxidative stress, causes DNA damage and may be estimated by the measurement of the levels of malondialdehyde (MDA), which is one of its by-products<sup>(11)</sup>. Oxidative stress induced DNA damage, triggers activation of repair mechanisms, including phosphorylation of the histone variant H2AX. Thus, by quantifying the phosphorylated H2AX it is possible to provide an indirect measurement of oxidative stress damage<sup>(12-13)</sup>.

TRPV1 receptors are nonselective cation channels that are sensitized from noxious stimuli<sup>(14)</sup> and can modulate oxidative stress<sup>(15)</sup>. Subsequently to the first observations of TRPV1 channels as pain receptors, there has been many other descriptions of other locations of TRPV1 expression apart from the nervous tissues and it has been associated to wide range of non-pain-related physiological and pathological conditions<sup>(16-17)</sup>, including cancer<sup>(18-20)</sup>. Taking into account that various types of denervation are associated with an increase in TRPV1 expression<sup>(21)</sup>, here we evaluated the TRPV1 expression and some oxidative stress parameters in chemically induced colonic carcinogenesis performed in the rat model of BAC-induced myenteric denervation<sup>(8)</sup>.

## MATERIAL AND METHODS

Twenty-three male Wistar rats ( $150 \pm 20$ g) were housed in controlled environment within plastic cages (55% humidity, 12-h light/dark cycle, and  $22^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ), in a number of five rats per cage and were acclimated for 1 week before starting the experiments. Then, They were randomly divided into the three experimental groups of study. All the rats were fed a standad Purina<sup>®</sup> diet for rats and mice and tap water *ad libitum*. All experiments were performed according to the protocol approved by the Ethical Committee in Animal Care and Use at the Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo (#169/2014).

### Experimental Groups

The animals were divided into the three following groups of study:

**Table 1** – Experimental groups of study.

Group	n	Experimental procedure
<b>C</b>	7	Control group; no procedures
<b>M</b>	8	MNNG-exposed group
<b>MB</b>	8	MNNG-exposed and BAC-trea group

### Chemical experimental model of colonic carcinogenesis

The chemical carcinogen N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) was used to induce the colonic carcinogenesis process due to its topical administration and for not being metabolized by the liver, avoiding any possible side effect. The MNNG was diluted in distilled water at the day of the experiment, avoiding its oxidative process. The male Wistar rats received a single-rectal instillation of MNNG (60 mg/Kg; 1mL - enema)<sup>(23)</sup>.

### **Surgical model of myenteric denervation**

The myenteric plexus denervation was achieved by using the experimental model of denervation with 0.3% Benzalkonium chloride (BAC) (Benzyltrimethyl Tetradecyl Ammonium chloride, Sigma-Aldrich®) in the colonic serosa layer of the Wistar rats, as previously described<sup>(8)</sup>. Before the surgery, the animals were anesthetized with Ketamine (80mg/Kg Ketamine®; Pfizer; Sao Paulo-Brazil) associated to Xylazine (14mg/Kg; Rompum®; Bayer; Sao Paulo-Brazil) chloride (100µL/animal; i.p.). Ten minutes later, an exploratory laparotomy was performed, by cutting the median line (three cm length) of the animal. Then, 2 cm of the distal colon was wrapped in a gauze embedded with 0.3% BAC during fifteen minutes<sup>(8)</sup>. After this time all the peritoneal cavity was washed with sterile saline solution (0.9% NaCl), animals were sutured and sent for surgery recovery process.

### **Collection and processing of colonic samples**

At the end of the experimental period, all the rats were euthanized in a carbon dioxide chamber. Median laparotomy was performed, with further isolation and removal of the distal colon. Then, the colon samples were opened by their mesenteric border, cleaned up with 0.9%NaCl solution and laid out gently on a glass petri dish. Samples were divided into snap-frozen (liquid nitrogen, -196°C) and fixed (4% paraformaldehyde), for further oxidative stress and histopathological/immunohistochemical analysis. Thus, to perform the histological cuts the samples were placed between two filter papers inside histological cassettes and fixed with a solution of 4% paraformaldehyde (72 hours). Once fixed, samples were exposed to an increasing dehydration process by using crescent alcohol concentrations. Then, the colons were immersed into 100% xylol baths for diaphanization. After that process, colonic samples were embedded in paraffin baths, so the histological cuts could be performed. By using a microtome, the paraffin blocks containing the samples were cut at 4µm of thickness and adhered to silanized slides posteriorly storage at 60 Celsius degree to optimize the material adhesion to the slide. Prior the H.E. staining or IHC technique, the slides were deparaffinized and hydrated. Finally, the material was exposed to vaporization in a Citrate buffer solution (pH 6.0), so the antigenic recovery could occur.

### **Histopathological analysis**

The carcinogenesis process in the colon was inferred by the estimation of dysplastic crypts in *en face* preparations of colon samples. Thus, the samples were stained with hematoxylin and eosin according to our previous description<sup>(8)</sup>. To avoid observer bias, all slides were coded before microscopic analysis (Leica DM 2500; Leica Mikrosysteme Vertrieb, Germany; equipped with Leica DC 300 FX camera). Dysplastic lesions were identified at 20× magnification (pathological features ranging from mild to severe dysplasia). Confirmation of the dysplastic features was carried at 40× magnification for all samples. Colon morphometry was performed with Leica Application Suite (LAS) version 3.7 software, which determined colonic area automatically. Relative values for total dysplastic lesions were calculated as their total number per colonic sample areas (cm<sup>2</sup> or mm<sup>2</sup>).

### **Immunohistochemistry analysis**

The immunohistochemical technique was performed through the antigen-antibody reaction, followed by DAB (diaminobenzidine) reaction. All the slides were deparaffinized and rehydrated in decreasing concentrations of ethanol to water. Antigen retrieval was performing by using citrate buffer pH 6.0 during 20 minutes. To inhibit tissue peroxidases, 3% hydrogen peroxide was added on the slides. Normal horse serum was used to block nonspecific immunostaining. Then, all the slides were incubated with the following primary antibodies: anti-gamma H2A.X (phospho S140 - ab22551, Abcam, UK – 1:50), anti-PCNA (clone PC10, Abcam®, Massachusetts, USA – 1:100), and anti-TRPV-1 (PA1-748; Thermo Fisher Scientific, 1:100) to evaluate respectively: DNA double-strand breaks, cell proliferation and TRPV1 immunoexpression. In this sense, cell proliferation, which is a well-established parameter of colonic carcinogenesis, was evaluated by the PCNA expression, as described<sup>(23)</sup>. The colonic denervation was confirmed by counting the myenteric neurons, previously immunostained with the Anti-Ubiquitin Carboxyl-terminal esterase L1 (UCHL-1) also known as anti-PGP-9.5, as previously described<sup>(24)</sup>. evaluate the possible activity of sensorial fibers in our samples, TRPV1 antibody was tested<sup>(25,26)</sup>. Positive reactions were displayed with Picture-MAX Polymer Kit (Invitrogen). Histone Gamma-H2AX was used to evaluate the MNNG effects in the colonic samples (anti-gammaH2AX phospho S140 [3F2] Abcam®; 1:200)<sup>(27)</sup>. Positive reactions for PCNA



and H2AX showed a brown precipitate at the nucleus, whereas TRPV1 positive neurons were found at the myenteric plexus. Proliferation was determined as the ratio between stained and unstained cells in colonic crypts.

### **Colonic oxidative stress analysis**

The colonic oxidative stress was evaluated by the measurement of malondialdehyde (MDA) levels by spectrophotometry, as proposed by literature<sup>(28)</sup>, with some adaptations. For MDA dosage, colonic sample (200mg) was homogenized with 0.2M phosphate buffer pH 7.4 (1mL). Then, 200 $\mu$ L was transferred to an Eppendorf<sup>®</sup> tube, together with 1-methyl-phenylindole solution (650 $\mu$ L) and 150  $\mu$ L of 37% hydrochloric acid (HCl). After shaking, the tubes were incubated in water-bath (45 °C; 40 minutes). Then, the colonic samples were centrifuged (4000 rpm; 10 minutes). The absorbance was read from the supernatant at a wavelength of 586nm in a SpectraMax<sup>®</sup> M5 with SoftMax<sup>®</sup> Pro Data Acquisition & Analysis Software Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA). The absorbance values were standardized by the equation of the reaction curve. Then, all the values were corrected for the protein concentration rate, with result being expressed in nmol/mg.

### **Statistical Analysis**

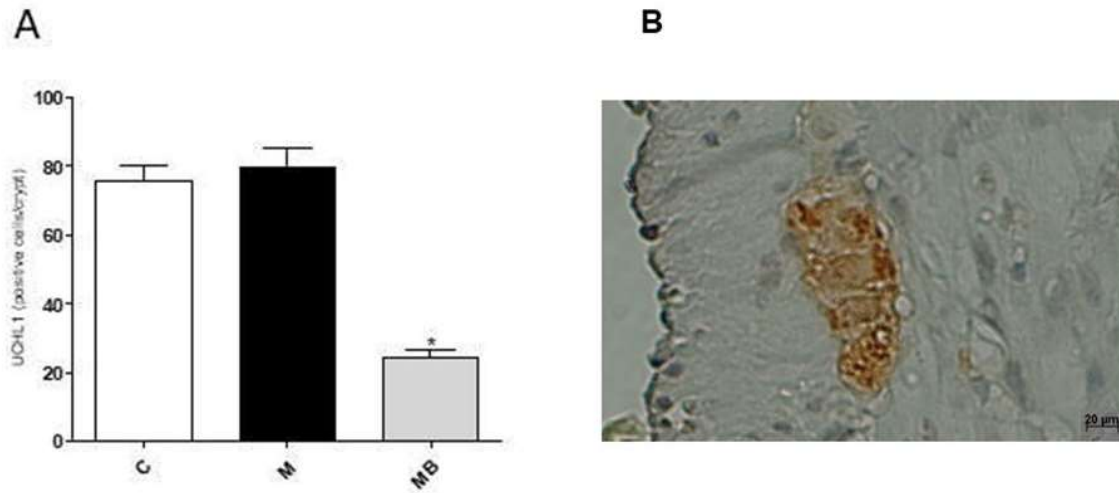
Data were analyzed using a GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA). One-way ANOVA test (Tukey's *post hoc* test) was applied for comparisons between all the groups of study. The T test (Mann-Whitney) was applied to calculate the difference between two groups.  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant. All values are expressed as mean  $\pm$  SD.

## **RESULTS**

### **Colonic myenteric neurons are ablated by BAC**

The MNNG-exposed group (M) presented UCHL1 staining levels similar to the control group (C), indicating that the carcinogen MNNG did not damage the myenteric neurons, since its value is compared to the control group ( $P > 0.05$ ). It was further

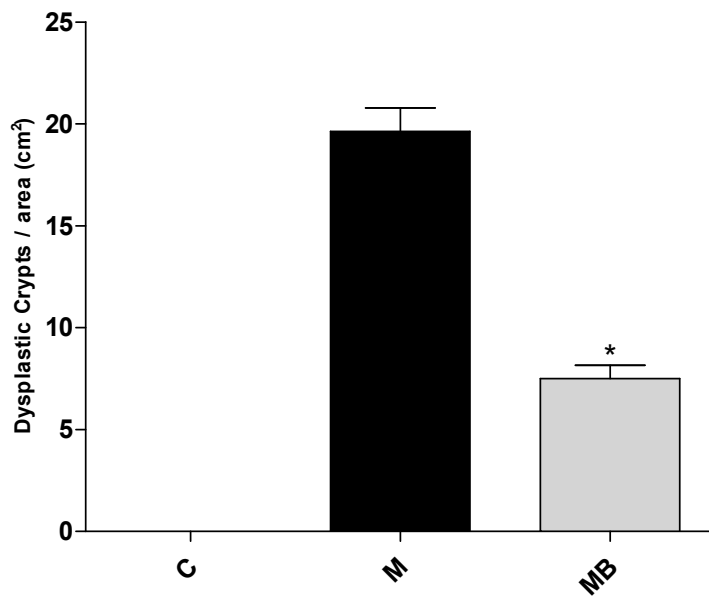
observed a marked fall in the number of myenteric neurons after the application of BAC (BM group), confirming its reported denervation properties (Figure 1).



**Figure 1 – UCHL1 positive cells.** BAC denervation (BM) decreased the number of stained neurons in the colonic wall, improving the ablative effect of this chemical agent when compared to the groups C and M. One-way ANOVA followed by Mann-Whitney's post-hoc test ( $P < 0.05$ ).

### Dysplastic crypts (DC) in the colon

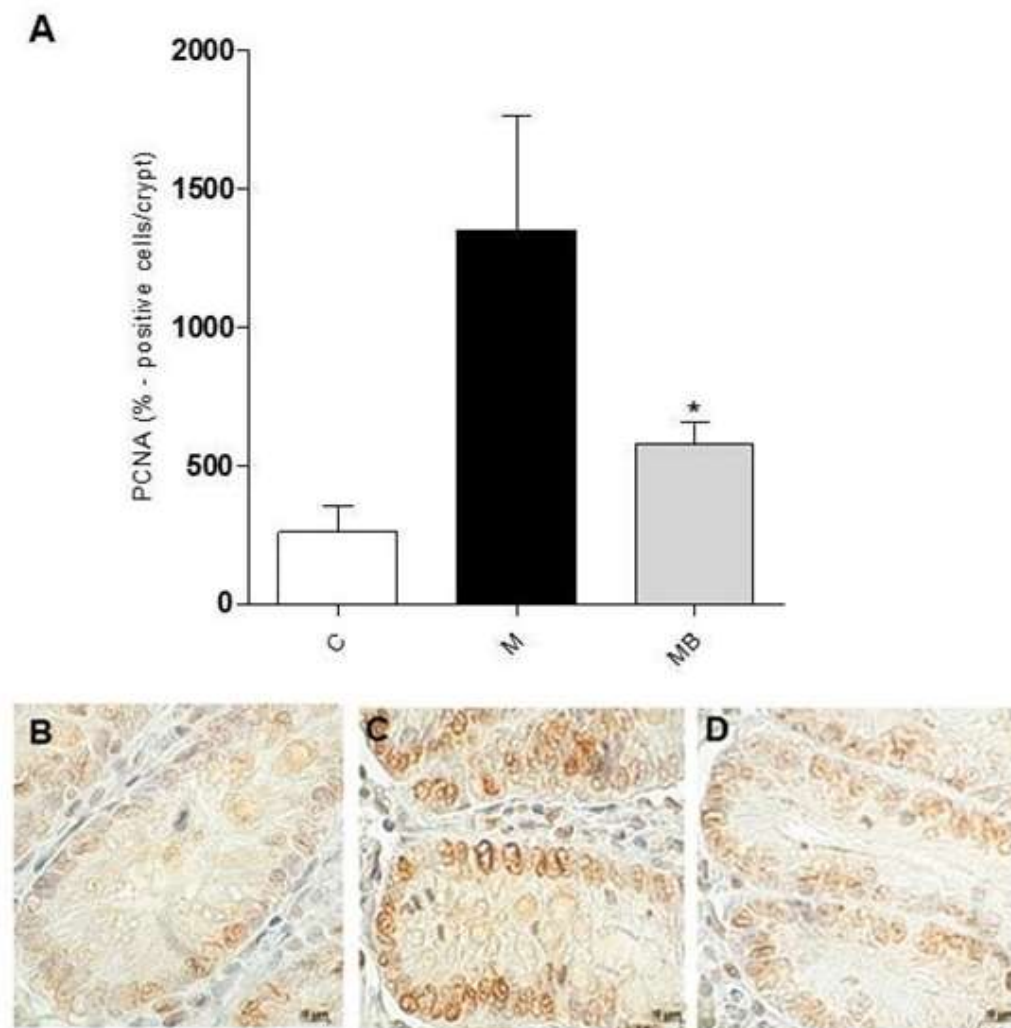
As expected, we found a high number of DC in the colon of rats exposed to the MNNG (60mg/kg) (Group M vs C; M vs BM;  $P < 0.05$ ). The denervation promoted by 0.3% BAC administration directly in the colon of animals significantly reduced the number of DC in MNNG-treated rats (Group BM vs M;  $P = 0.0009$ ) (Figure 2).



**Figure 2 – Dysplastic crypts.** The denervation with BAC (MB group) was able to decrease significantly the number of dysplastic crypts found in the MNNG-exposed group (M) One-way ANOVA followed by Mann-Whitney's post-hoc test ( $P < 0.05$ ).

### **The increase of cell proliferation induced by MNNG is attenuated by denervation with BAC**

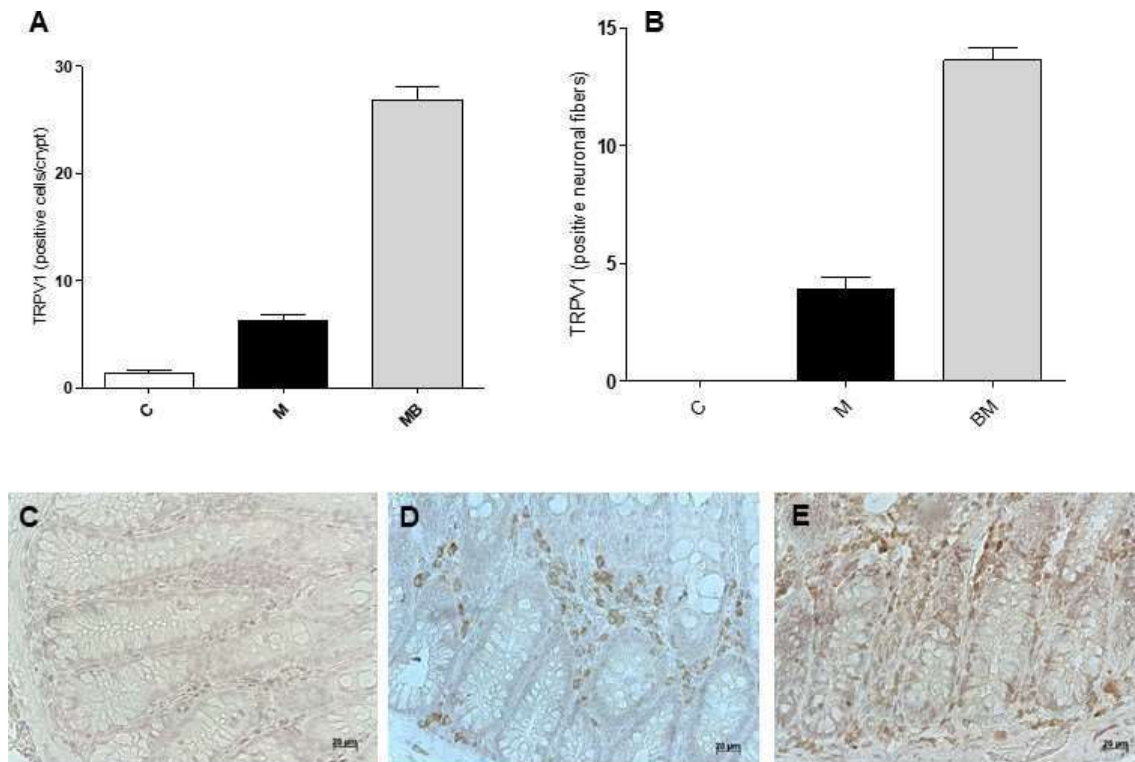
We observed that the myenteric plexus denervation by using BAC was very effective in decreasing the cell proliferative index, probably by acting in the cell cycle. The BAC-treated group (MB) showed a PCNA-positive cells decrease, while the M group presented higher levels of this marker ( $P < 0.05$ ) (Figure 3).



**Figure 3 - PCNA IHC in the colon.** A. The carcinogen exposure (M group) lead to an increased number of PCNA positive cells, which was attenuated ( $P < 0.05$ ) by the denervation (BM group). One-way ANOVA followed by Mann-Whitney's post-hoc test ( $P < 0.05$ ). B, C and D - Photomicrographs of the respective groups: Control, MNNG and MNNG+BAC.

### TRPV1 immunostaining

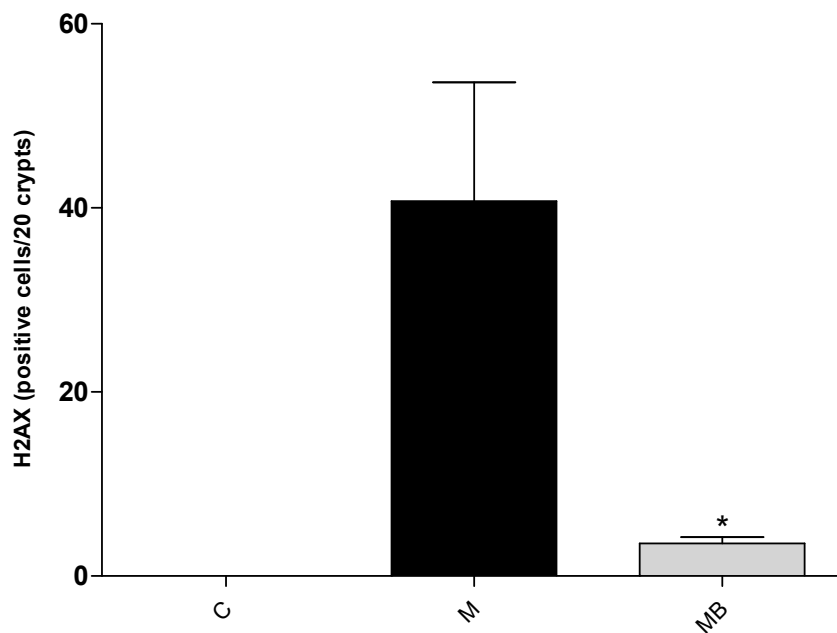
We found a higher number of TRPV1-positive cells and neuronal fibers in the group treated with BAC ( $P < 0.05$ ) (BM group) when compared to the other groups (C and M) (Figure 4)



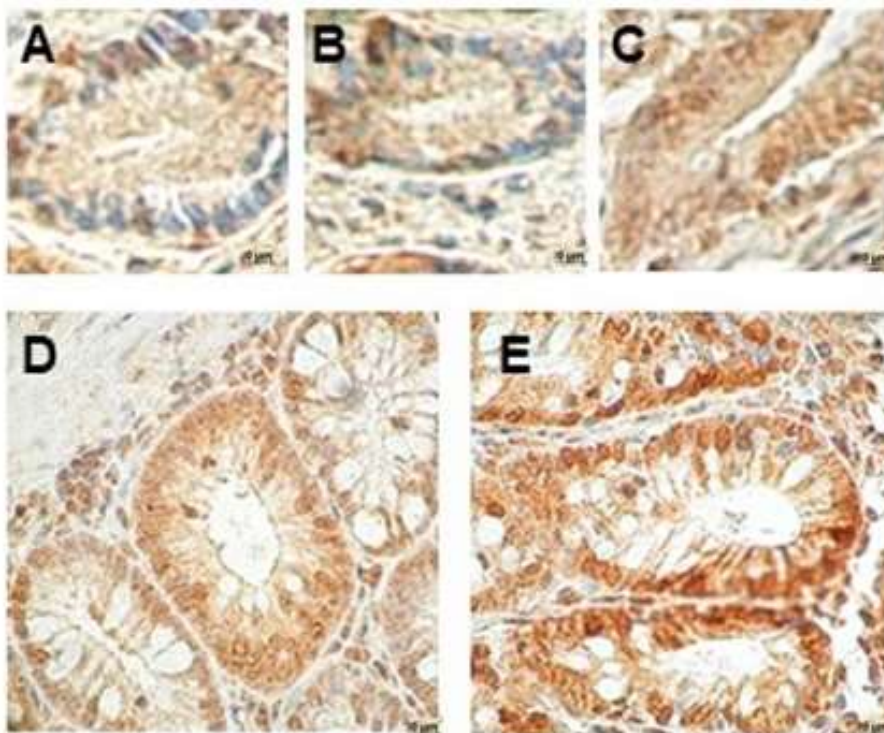
**Figure 4 – TRPV1 IHC in the colon.** A and B - Denervation enhanced TRPV1-positive cells and neuronal fibers in the colon, suggesting a “scavenger” role played by BAC on the colon carcinogenesis. C, D and E – TRPV1 photomicrographs of the respective groups: Control, MNNG and MNNG+BAC. One-way ANOVA followed by Mann-Whitney’s post-hoc test ( $P < 0.05$ ).

### MNNG effects in the colon

We found a high number of positive nuclei for  $\gamma$ H2AX labeling in the MNNG-exposed group, when compared to the others ( $P < 0.05$ ). This result suggests that the carcinogen promoted the colonic carcinogenesis process, what was partially reverted by the BAC denervation (BM group;  $P < 0.05$ ) (Figures 5 and 6).



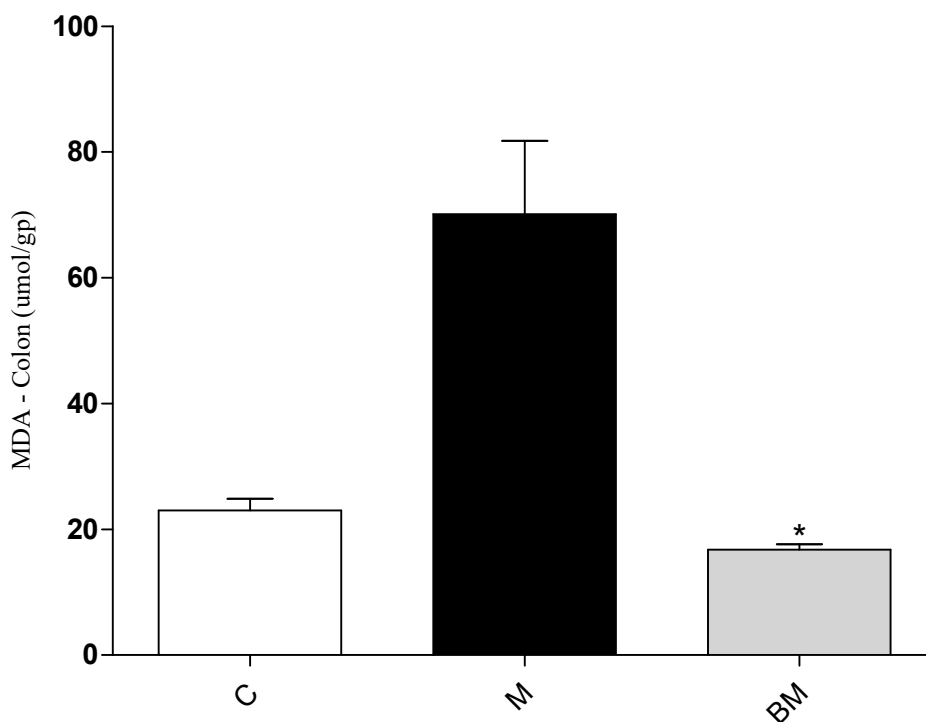
**Figure 5 - Gamma-H2AX histone - IHC.** The denervation (MB group) was able to decrease significantly the H2AX immunostaining levels found in the MNNG-exposed group (M) One-way ANOVA followed by Mann-Whitney's post-hoc test ( $P < 0.05$ ).



**Figure 6 – Photomicrographs of Gamma-H2AX histone - IHC.** A and B – Colonic crypts referring to the Control group. C, D and E – Colonic crypts related to the carcinogen-exposed group (M), showing enhanced brown color, expressed due to DAB reaction. 400x.

## MDA spectrophotometry assay

The MNNG single-dose instillation was able to increase significantly the MDA levels, illustrating its cell-damage potential by enhancing ROS in the colon (M group), on the other hand, we found a reduction of MDA levels (nmol/gP) in the group of animals treated with the BAC (MB group) ( $P < 0.05$ ), which was similar to the control group (Figure 7) ( $P < 0.05$ ).



**Figure 7 – MDA levels in the colon.** The MNNG single-dose instillation enhanced the MDA levels significantly ( $P < 0.05$ ) When compared to the other groups of study. BAC treatment was able to decrease MDA protein levels. One-way ANOVA followed by Mann-Whitney's post-hoc test ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSSION

The aim of this study was to investigate the colonic carcinogenesis, as well as the oxidative stress parameters and the TRPV1 expression following the myenteric denervation by BAC in the colon of rats.

First, our results confirmed a decrease in the number of myenteric neurons by  $55.63\% \pm 5.98$  induced by the BAC application, what is in accordance with the

literature<sup>(7,8)</sup>. We have also observed that the myenteric denervation was associated with a potent inhibition of colonic carcinogenesis, as observed by the reduced formation of dysplastic crypts and the attenuation of the increase in cell proliferation induced by the MNNG, as measured by the PCNA nuclear staining counting. These findings were also expected, taking into account the literature<sup>(7,8)</sup>. It is also well-known that the chemical carcinogens like MNNG induce oxidative stress<sup>(29)</sup>, as we have found.

As an unprecedented observation, we have found that the myenteric denervation leads to an attenuation of the oxidative stress caused by the action of the chemical carcinogen MNNG. This was observed by both the decrease in MDA levels in the BAC-treated animals that had received the carcinogen application (Fig.6) and by the decrease of H2AX immune expression in these animals (Fig.1). There are no reports in the literature in relation to the effects of myenteric denervation on the oxidative stress. Extrinsic denervation of the intestine has been associated to a reduced oxidative stress level<sup>(30)</sup>. This is similar to our findings, but further studies will be necessary to elucidate the mechanisms involved in the reduction of oxidative stress by the myenteric denervation.

We observed a weak and sparse TRPV1 expression in the nerve fibers surrounding the crypts of the normal rat colon (Fig.5), what is in accordance with the literature<sup>(31)</sup>. In all the animals exposed to the MNNG was observed a moderate increase in the number of TRPV1-stained nerve fibers surrounding most of the colonic crypts (Fig.5). Furthermore, we found that a large number of stromal cells surrounding the epithelial crypts were positively immune-stained for TRPV1, as well (Fig.4). There are no reports in the literature regarding the TRPV1 expression during the chemical induction of colonic carcinogenesis, but an increase in TRPV1-specific immunoreactivity had been previously described in the human tongue epithelium with precancerous and malignant lesions<sup>(32)</sup>. It is known that toxic and irritant chemical compounds are triggers of TRPV1 expression in various tissues<sup>(33-34)</sup>. It is very likely that the MNNG application may also trigger the TRPV1 expression, since MNNG possess cytotoxic properties<sup>(35)</sup>.

Interestingly, we have observed a further and marked increase in both the number of TRPV1 expressing nerve fibers and cells in the carcinogen-treated animals that were also submitted to the myenteric denervation with BAC (Figs. 4 and 5). TRPV1 expression has not yet been described after BAC-induced denervation but other types



of denervation have been previously associated with increased TRPV1 expression, such as after nerve injuries<sup>(36)</sup>. In our experimental model, possibly the increase in TRPV1 expression may have occurred in response to the denervation as well, but this remains to be deeper investigated.

It had been observed that the expression of TRPV1 extends beyond the sensory nerves, occurring also in mast cells, endothelial cells and other cell types<sup>(37)</sup>. Furthermore, there is a distinction between the TRPV1 effects in consequence to its activation in sensory nerve endings and non-neurogenic TRPV1 effects due to its expression in various cell types<sup>(37)</sup>. In our experimental settings, we found that in both nerve endings and cells the same pattern of TRPV1 expression was observed, being increased after carcinogen exposure with a further increase due to the myenteric denervation.

We have observed that an increase in TRPV1 expression in the BAC-treated animals was associated to a potent inhibition of the colonic carcinogenesis, as assessed by the formation of dysplastic colonic crypts and epithelial cell proliferation. This finding is coherent with reports in the literature data showing the anti-tumor properties of TRPV1<sup>(38,39)</sup>. A positive correlation between TRPV1 expression and histopathologic differentiation of human hepatocellular carcinoma (HCC) has been observed, as well as a better clinical prognosis in patients with HCC associated with high TRPV1 expression levels<sup>(40)</sup>. It has also been reported that TRPV1 is a potent suppressor of skin carcinogenesis<sup>(41)</sup> and that natural compounds that are agonists of TRPV1 can negatively control tumor progression<sup>(42)</sup>. Furthermore, an inhibitory role played by TRPV1 has been observed in urothelial cancer cell invasion and metastasis<sup>(43)</sup>. Recently, TRPV1 has been observed to suppress the gastric cancer development<sup>(76)</sup>.

Finally, it must be considered that increased TRPV1 expression is related to a reduced oxidative stress level, as observed in different experimental settings<sup>(44, 45)</sup>. This negative association is not well understood in its mechanisms, but certainly can offer a plausible mechanism to explain how the increased expression of TRPV1 may inhibit carcinogenesis, including our findings. Further studies will be necessary to elucidate the mechanisms involved in these observations.

In summary, the findings of the present study of an association between myenteric denervation, inhibition of carcinogenesis and oxidative stress, as well as an

increase in TRPV1 expression may open new lines of investigation on how the nervous system influence the development of colonic cancer.

**Conflicts of interest:** The authors have no conflicts of interest or financial ties to disclose.

**Acknowledgements:** The authors acknowledge laboratory technician Paula Payão Ovidio for her assistance with the MDA spectrophotometry assay.

**Financial support:** CAPES.

**Corresponding author:**

Sérgio Britto Garcia

USP- Ribeirão Preto – SP, Brasil

CEMEL – Centro de Medicina Legal

Rua Tenente Catão Roxo, 2418

CEP: 14.051-140

E-mail: [sbgarcia@fmrp.usp.br](mailto:sbgarcia@fmrp.usp.br)

## REFERENCES

1. Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020 05;70(3):145-64. PubMed PMID: 32133645. Epub 2020/03/05. eng.
2. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:479-507. PubMed PMID: 21090969. eng.
3. Nfonsam VN, Jecius H, Chen D, Omesiete PN, Ewongwo AN, Elquza E, et al. Increasing Incidence of Colon Cancer in the Young: Assessing the Tumor Biology. *J Am Coll Surg.* 2019 07;229(1):79-90. PubMed PMID: 30995524. Epub 2019/04/14. eng.
4. Duchalais E, Guilluy C, Nedellec S, Touvron M, Bessard A, Touchefeu Y, et al. Colorectal Cancer Cells Adhere to and Migrate Along the Neurons of the Enteric Nervous System. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2018;5(1):31-49. PubMed PMID: 29188232. PMCID: PMC5696385. Epub 2017/10/14. eng.
5. Rademakers G, Vaes N, Schonkeren S, Koch A, Sharkey KA, Melotte V. The role of enteric neurons in the development and progression of colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2017 Dec;1868(2):420-34. PubMed PMID: 28847715. Epub 2017/08/25. eng.
6. Garcia SB, Stopper H, Kannen V. The contribution of neuronal-glia-endothelial-epithelial interactions to colon carcinogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2014 Sep;71(17):3191-7. PubMed PMID: 24848584. eng.
7. Garcia SB, Oliveira JSM, Pinto LZ, Muccillo G, Zucoloto S. The relationship between megacolon and carcinoma of the colon: An experimental approach. *Carcinogenesis.* 1996 Aug;17(8):1777-9. PubMed PMID: WOS:A1996VD87500037.
8. Vespúcio MV, Turatti A, Modiano P, Oliveira EC, Chicote SR, Pinto AM, et al. Intrinsic denervation of the colon is associated with a decrease of some colonic preneoplastic markers in rats treated with a chemical carcinogen. *Braz J Med Biol Res.* 2008 Apr;41(4):311-7. PubMed PMID: 18297187. eng.
9. Carini F, Mazzola M, Rappa F, Jurjus A, Geagea AG, Al Kattar S, et al. Colorectal Carcinogenesis: Role of Oxidative Stress and Antioxidants. *Anticancer Res.* 2017 09;37(9):4759-66. PubMed PMID: 28870894. eng.
10. Moradi-Marjaneh R, Hassanian SM, Mehramiz M, Rezayi M, Ferns GA, Khazaei M, et al. Reactive oxygen species in colorectal cancer: The therapeutic impact and its potential roles in tumor progression via perturbation of cellular and physiological dysregulated pathways. *J Cell Physiol.* 2019 07;234(7):10072-9. PubMed PMID: 30515827. Epub 2018/12/04. eng.
11. Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res.* 1999 Mar;424(1-2):83-95. PubMed PMID: 10064852. eng.
12. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature.* 2005 Apr;434(7035):907-13. PubMed PMID: 15829965. eng.
13. Sak A, Stuschke M. Use of  $\gamma$ H2AX and other biomarkers of double-strand breaks during radiotherapy. *Semin Radiat Oncol.* 2010 Oct;20(4):223-31. PubMed PMID: 20832014. eng.
14. Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov.* 2007 May;6(5):357-72. PubMed PMID: 17464295. eng
15. Sun J, Pu Y, Wang P, Chen S, Zhao Y, Liu C, et al. TRPV1-mediated UCP2 upregulation ameliorates hyperglycemia-induced endothelial dysfunction. *Cardiovascular Diabetology.* 2013 2013-01-01;12(1):69.
16. White JP, Urban L, Nagy I. TRPV1 function in health and disease. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011 Jan;12(1):130-44. PubMed PMID: 20932253. eng.
17. Matthews PJ, Aziz Q, Facer P, Davis JB, Thompson DG, Anand P. Increased capsaicin receptor TRPV1 nerve fibres in the inflamed human oesophagus. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2004 Sep;16(9):897-902. PubMed PMID: 15316415. eng.
18. Xu S, Zhang L, Cheng X, Yu H, Bao J, Lu R. Capsaicin inhibits the metastasis of human papillary thyroid carcinoma BCPAP cells through the modulation of the TRPV1 channel. *Food Funct.* 2018 Jan;9(1):344-54. PubMed PMID: 29185571. eng.
19. Sung B, Prasad S, Ravindran J, Yadav VR, Aggarwal BB. Capsazepine, a TRPV1 antagonist, sensitizes colorectal cancer cells to apoptosis by TRAIL through ROS-JNK-CHOP-mediated

- upregulation of death receptors. *Free Radic Biol Med*. 2012 Nov;53(10):1977-87. PubMed PMID: 22922338. PMCID: PMC3731040. Epub 2012/08/15. eng.
20. Vinuesa AG, Sancho R, García-Limones C, Behrens A, ten Dijke P, Calzado MA, et al. Vanilloid receptor-1 regulates neurogenic inflammation in colon and protects mice from colon cancer. *Cancer Res*. 2012 Apr;72(7):1705-16. PubMed PMID: 22396497. Epub 2012/03/06. eng.
  21. Zakir HM, Mostafeezur RM, Suzuki A, Hitomi S, Suzuki I, Maeda T, et al. Expression of TRPV1 channels after nerve injury provides an essential delivery tool for neuropathic pain attenuation. *PLoS One*. 2012;7(9):e44023. PubMed PMID: 22962595. PMCID: PMC3433461. Epub 2012/09/04. eng.
  22. Zucoloto S, de Deus DA, Martins AA, Muglia VF, Kajiwara JK, Garcia SB. The relationship between myenteric neuronal denervation, smooth muscle thickening and epithelial cell proliferation in the rat colon. *Res Exp Med (Berl)*. 1997;197(2):117-24. PubMed PMID: 9380951. eng.
  23. Kannen V, Hinzsche H, Zanette DL, Silva WA, Garcia SB, Waaga-Gasser AM, et al. Antiproliferative effects of fluoxetine on colon cancer cells and in a colonic carcinogen mouse model. *PLoS One*. 2012;7(11):e50043. PubMed PMID: 23209640. PMCID: PMC3507893. ENG.
  24. Phillips RJ, Hargrave SL, Rhodes BS, Zopf DA, Powley TL. Quantification of neurons in the myenteric plexus: an evaluation of putative pan-neuronal markers. *Journal of Neuroscience Methods*. 2004 2004-02-01;133(1-2):99-107.
  25. Yiangou Y, Facer P, Dyer NH, Chan CL, Knowles C, Williams NS, et al. Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. *Lancet*. 2001 Apr;357(9265):1338-9. PubMed PMID: 11343743. eng.
  26. Chan CL, Facer P, Davis JB, Smith GD, Egerton J, Bountra C, et al. Sensory fibres expressing capsaicin receptor TRPV1 in patients with rectal hypersensitivity and faecal urgency. *Lancet*. 2003 Feb;361(9355):385-91. PubMed PMID: 12573376. eng.
  27. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*. 2001 Mar;27(3):247-54. PubMed PMID: 11242102. eng.
  28. Zhao H, Liu J, Pan S, Sun Y, Li Q, Li F, et al. SOD mRNA and MDA Expression in Rectus Femoris Muscle of Rats with Different Eccentric Exercise Programs and Time Points. *PLoS ONE*. 2013 2013-09-13;8(9):e73634.
  29. Kumaraguruparan R, Chandra Mohan KV, Abraham SK, Nagini S. Attenuation of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine induced genotoxicity and oxidative stress by tomato and garlic combination. *Life Sci*. 2005 Mar;76(19):2247-55. PubMed PMID: 15733939. Epub 2005/01/21. eng.
  30. Koch TR, Telford GL, Walgenbach-Telford S, Kendall WF, Opara EC. Total antioxidant capacity following extrinsic denervation and small intestinal transplantation in the rat. *Neurosci Lett*. 2003 May;342(1-2):135-7. PubMed PMID: 12727336. eng.
  31. Anavi-Goffer S, McKay NG, Ashford ML, Coutts AA. Vanilloid receptor type 1-immunoreactivity is expressed by intrinsic afferent neurones in the guinea-pig myenteric plexus. *Neurosci Lett*. 2002 Feb;319(1):53-7. PubMed PMID: 11814652. eng.
  32. Marincsák R, Tóth BI, Czifra G, Márton I, Rédl P, Tar I, et al. Increased expression of TRPV1 in squamous cell carcinoma of the human tongue. *Oral Dis*. 2009 Jul;15(5):328-35. PubMed PMID: 19320840. Epub 2009/03/23. eng.
  33. Alpizar YA, Boonen B, Gees M, Sanchez A, Nilius B, Voets T, et al. Allyl isothiocyanate sensitizes TRPV1 to heat stimulation. *Pflugers Arch*. 2014 Mar;466(3):507-15. PubMed PMID: 23955021. Epub 2013/08/18. eng.
  34. Saunders CJ, Li WY, Patel TD, Muday JA, Silver WL. Dissecting the role of TRPV1 in detecting multiple trigeminal irritants in three behavioral assays for sensory irritation. *F1000Res*. 2013;2:74. PubMed PMID: 24358880. PMCID: PMC3814916. Epub 2013/03/05. eng.
  35. Reitman FA, Shertzer HG, Berger ML. Toxicity of methylating agents in isolated hepatocytes. *Biochem Pharmacol*. 1988 Aug;37(16):3183-8. PubMed PMID: 3401249. eng.
  36. Biggs JE, Yates JM, Loescher AR, Clayton NM, Boissonade FM, Robinson PP. Changes in vanilloid receptor 1 (TRPV1) expression following lingual nerve injury. *Eur J Pain*. 2007 Feb;11(2):192-201. PubMed PMID: 16542859. Epub 2006/03/20. eng.
  37. Shuba YM. Beyond Neuronal Heat Sensing: Diversity of TRPV1 Heat-Capsaicin Receptor-Channel Functions. *Front Cell Neurosci*. 2020;14:612480. PubMed PMID: 33613196. PMCID: PMC7892457. Epub 2021/02/05. eng.
  38. Bujak JK, Kosmala D, Szopa IM, Majchrzak K, Bednarczyk P. Inflammation, Cancer and Immunity-Implication of TRPV1 Channel. *Front Oncol*. 2019;9:1087. PubMed PMID: 31681615. PMCID: PMC6805766. Epub 2019/10/16. eng.

39. Gao N, Yang F, Chen S, Wan H, Zhao X, Dong H. The role of TRPV1 ion channels in the suppression of gastric cancer development. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020 Oct;39(1):206. PubMed PMID: 33008449. PMCID: PMC7531167. Epub 2020/10/02. eng.
40. Miao X, Liu G, Xu X, Xie C, Sun F, Yang Y, et al. High expression of vanilloid receptor-1 is associated with better prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008 Oct;186(1):25-32. PubMed PMID: 18786439. eng.
41. Bode AM, Cho YY, Zheng D, Zhu F, Ericson ME, Ma WY, et al. Transient receptor potential type vanilloid 1 suppresses skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 2009 Feb;69(3):905-13. PubMed PMID: 19155296. PMCID: PMC2669313. Epub 2009/01/20. eng.
42. Geng S, Zheng Y, Meng M, Guo Z, Cao N, Ma X, et al. Gingerol Reverses the Cancer-Promoting Effect of Capsaicin by Increased TRPV1 Level in a Urethane-Induced Lung Carcinogenic Model. *J Agric Food Chem.* 2016 Aug;64(31):6203-11. PubMed PMID: 27436516. Epub 2016/08/01. eng.
43. Caprodossi S, Amantini C, Nabissi M, Morelli MB, Farfariello V, Santoni M, et al. Capsaicin promotes a more aggressive gene expression phenotype and invasiveness in null-TRPV1 urothelial cancer cells. *Carcinogenesis.* 2011 May;32(5):686-94. PubMed PMID: 21310942. Epub 2011/02/10. eng.
44. McCarty MF, DiNicolantonio JJ, O'Keefe JH. Capsaicin may have important potential for promoting vascular and metabolic health. *Open Heart.* 2015 2015;2(1):e000262. PubMed PMID: 26113985. PMCID: PMC4477151. Epub 2015/06/17. eng.
45. Zhou Y, Wang X, Guo L, Chen L, Zhang M, Chen X, et al. TRPV1 activation inhibits phenotypic switching and oxidative stress in vascular smooth muscle cells by upregulating PPAR $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun.* 2021 03;545:157-63. PubMed PMID: 33550097. Epub 2021/02/04. eng.