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

**Avaliação da potencial ação anti-neoplásica de
resveratrol isolado e associado a etanol na
carcinogênese induzida por N-metil-N'-nitro-N-
nitrosoguanidina (MNNG) no cólon de ratos**

EVERTON FELIX CESAR

ORIENTADOR: PROF. DR.SÉRGIO BRITTO GARCIA

RIBEIRÃO PRETO

2017

EVERTON FELIX CESAR

Avaliação da potencial Ação anti-neoplásica de resveratrol isolado e associado a etanol na carcinogênese induzida por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) no cólon de ratos

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

Área de concentração: Patologia.

Opção: Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia

Versão Corrigida

RIBEIRÃO PRETO

2017

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

Felix Cesar, Everton.

Avaliação da potencial ação anti-neoplásica de resveratrol isolado e associado a etanol na carcinogênese induzida por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) no cólon de ratos. 2017.

79p. : il. ; 30 cm.

Orientador: Garcia, Sérgio Britto.

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

Everton Felix Cesar

Avaliação da potencial ação anti-neoplásica de resveratrol isolado e associado a etanol na carcinogênese induzida por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) no cólon de ratos.

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

*Área de concentração: Patologia
Experimental.*

Banca Examinadora

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

Instituição: _____

Julgamento:_____Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Julgamento:_____Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Julgamento:_____Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Não poderia começar esses agradecimentos sem citar a minha mãe Maria Aparecida Felix Cesar (in memoriam).

Por causa dela estou aqui hoje, por causa dela vim para o interior de São Paulo estudar medicina, por causa dela estou fazendo ciência para ajudar aqueles que padecem de câncer, por causa dela me tornei o homem que eu sou. Eu tenho certeza de que onde quer que ela esteja ela deve estar muito orgulhosa do seu filho e do novo caminho que resolvi traçar.

Este trabalho trata sobre o câncer, a mesma doença que a levou tão cedo. Infelizmente não consegui ajudá-la como queria, mas espero poder contribuir com mais uma gota d'água no imenso mar da ciência e ajudar aqueles que ainda sofrem. Mãe, sem o seu incentivo e apoio a execução desse trabalho não seria possível.

*Agradeço imensamente à minha companheira **Veridiana Ederli Sunega** por todo amor, compreensão, parceria e apoio incondicional. Eu sou extremamente afortunado por compartilhar com você essa existência. Muito obrigado por encarar comigo o desafio de começar uma nova vida e por estar presente em mais uma conquista.*

*Agradeço ao meu orientador, Profº Dr. **Sérgio Britto Garcia** por ter acreditado em mim e ter me oferecido essa oportunidade única. Serei eternamente grato por toda a ajuda, ensinamentos e conselhos que me passou. O senhor é exemplo para todos nós.*

*Agradeço à Stê (**Stefania Bovo Minto**) por toda ajuda, compreensão e por sempre estar disposta a ajudar e compartilhar conhecimentos. Stê, sem sua ajuda este trabalho não existiria.*

*Agradeço aos meus queridos amigos da 64ª Turma de Medicina da FMRP-USP **Alexandre Garcia, Carlos Santos, Felipe Carolo, Felipe Cassis e Felipe Chodraui** que sempre me incentivaram na execução do mestrado e me ajudaram a conciliar o mestrado com a graduação, compartilhando resumos, me explicando a matéria e ouvindo minhas reclamações.*

*Às amigas que o mestrado me proporcionou e que me ajudaram a executar esse trabalho: **Isabela C. S. Marques, Ana Carolina Alvarenga, Laís Natario, Carlos Henrique C. Ribeiro, Ana Carolina L. Veloni, Rosângela O. Lopes e Érika P. D. Gualé** aos amigos: **Célia R. L. Marino, Áureo Favaretto Júnior, Mariane L. Quaglio e Carolina L. Carezzatto**, meus sinceros agradecimentos.*

*A todas as amigas que o Departamento de Patologia me proporcionou, em especial a Secretária **Camila Zambonini** por toda paciência e orientações. Aos funcionários, colaboradores e professores, meu muito obrigado.*

*Finalmente, ao **CNPq**, por todo o suporte financeiro e por proporcionar a realização deste trabalho.*

“A quem o sofrimento pessoal é poupado, deve sentir-se chamado a diminuir o sofrimento dos outros.”

(Albert Schweitzer)

RESUMO

Resveratrol (RESV), um polifenol presente em diversos compostos naturais, incluindo o vinho, tem sido associado a um efeito quimiopreventivo em diversos tipos de câncer, inclusive no câncer colorretal (CCR). Esse efeito benéfico observado em diversos estudos vem sendo atribuído, sobretudo, à sua ação anti-oxidante; muito embora o RESV também esteja envolvido em diversos outros mecanismos celulares, incluindo a apoptose. Não obstante, uma análise mais acurada sobre a potencial ação anti-neoplásica do RESV na promoção do CCR ainda se faz necessária. O CCR é um dos tipos de câncer mais frequentes no mundo ocidental, cuja incidência vem aumentando nos países em desenvolvimento e apesar dos esforços dos cientistas e do surgimento de novas drogas, esse tipo de câncer ainda possui altas taxas de morbidade e mortalidade. O presente estudo avaliou a potencial ação anti-neoplásica do RESV, puro e associado ao etanol (EtOH), na carcinogênese do câncer de cólon induzido por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) em ratos através da análise de estresse oxidativo com malondialdeído (MDA) e imunoexpressão de Caspase-3 (Casp-3), gamma-H2AX (H2AX), iPCNA (PCNA) e Caveolina-1 (CAV-1). O experimento foi realizado com 48 ratos wistar, os quais foram submetidos à indução da carcinogênese (0.5 ml de solução de MNNG (5 mg/ml) e tratados com placebo, RESV (1mg/kg/dia) e RESV (1mg/kg/dia) associado com EtOH (0,377g/kg/dia). Os ratos foram subdivididos em 6 grupos: controle (G1), MNNG (G2), RESV (G3), RESV+MNNG (G4), RESV + EtOH (G5) e RESV + EtOH + MNNG (G6). Como resultado, o RESV diminuiu a produção de MDA em todos os grupos tratados, evidenciando seu efeito antioxidante sistêmico. RESV aumentou o número de corpúsculos apoptóticos e da apoptose nas criptas displásicas, levando ao aparecimento de espaços criptais acelulares (ECA) e, conseqüentemente, a uma redução estatisticamente significativa no número de criptas displásicas nos grupos tratados. Através da diminuição da expressão de H2AX, PCNA e CAV1, observamos que o RESV apresentou um efeito protetor no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas na carcinogênese induzida por MNNG. Atribuímos esse efeito à sua ação pró-apoptótica que demonstrou ser um mecanismo efetivo na carcinogênese colônica em ratos, diminuindo o número de criptas displásicas e levando a formação de ECA's, um fenômeno ainda não descrito na literatura. Diferente da hipótese inicial, o EtOH mitigou os efeitos pró-apoptóticos do RESV, sem, contudo, diminuir sua ação antioxidante. Assim, concluímos que a ação anti-neoplásica e quimiopreventiva do RESV é efetiva na fase de promoção da carcinogênese colônica induzida por MNNG e que a associação entre RESV + EtOH, a mesma encontrada nos vinhos, não demonstrou ser tão efetiva quanto ao RESV isolado.

Palavras-chave: Resveratrol, Carcinoma Colorretal, MNNG, Apoptose.

CESAR E.F. **Avaliação da potencial Ação anti-neoplásica de resveratrol isolado e associado a etanol na carcinogênese induzida por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) no cólon de ratos, 2017.** Dissertação de Mestrado Acadêmico. Departamento de Patologia e Medicina Legal – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2017.

ABSTRACT

Resveratrol (RESV), a polyphenol present in several natural compounds, including wine, has been associated with a chemopreventive effect in different types of cancer, including colorectal cancer (CRC). This beneficial effect observed in several studies has been attributed especially due to its anti-oxidant action; more than that, RESV also is involved in several other cellular mechanisms, including apoptosis. Despite of it, a more accurate analysis of a potential anti-neoplastic action of RESV in the promotion phase of CRC is still ongoing. CRC is one of the most frequent types of cancer in the Western world, with incidence increasing in developing countries and despite the efforts of scientists and the development of new drugs, this type of cancer still has high rates of morbidity and mortality. The present study evaluated a potential anti-neoplastic action of RESV, pure and associated with ethanol, on the carcinogenesis of colorectal cancer induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in rats through the analysis of oxidative stress with malondialdehyde (MDA) and immunoexpression of Caspase-3 (Casp-3), gamma-H2AX (H2AX), iPCNA (PCNA) and Caveolina-1 (CAV-1). Our experiments were performed with 48 wistar rats, which were subjected to carcinogenesis (0.5 ml of MNNG solution (5 mg / ml) and treated with placebo, RESV (1 mg / kg / day) and RESV (1 mg / kg / (G1), RESV + EtOH (G5), RESV + MNNG (G4), RESV + EtOH (G5) and RESV + EtOH + MNNG (G6). As a result, RESV decreases the production of MDA in all treated groups, evidencing its systemic antioxidant effect. RESV increased the number of apoptotic corpuscles and apoptosis in dysplastic crypts, leading to the appearance of acellular cryptic spaces (ACE) and, consequently, to a statistically significant reduction in the number of dysplastic crypts in the treated groups. By decreasing expression of H2AX, PCNA and CAV1, we observed that RESV had a protective effect on the development of pre-neoplastic lesions in MNNG-induced carcinogenesis. We attributed this effect to its pro-apoptotic action, which has been shown to be an effective mechanism in colonic carcinogenesis in rats, decreasing the number of dysplastic crypts and leading to the formation of ACE's, a phenomenon not yet described in the literature. Unlike the initial hypothesis, EtOH mitigated the pro-apoptotic effects of RESV, but did not diminish its antioxidant action. Thus, we conclude that the anti-neoplastic and chemopreventive action of RESV is effective in the promotion phase of MNNG-induced colonic carcinogenesis and that the association between RESV + EtOH, the same as that found in wines, has not been shown to be as effective as isolated RESV.

Key-words: Resveratrol, Colorrectal Carcinoma, MNNG, Apoptosis.

CESAR E.F. **Evaluation of potential antineoplastic action of resveratrol, isolated and associated to ethanol, in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)-induced carcinogenesis in the colon of rats, 2017.** Master of Sciences Dissertation. Department of Pathology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2017.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS-	American Cancer Society
APC -	Adenomatous polyposis coli
AOM -	Azoxymethane
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
COX-2 -	Ciclooxigenase-2
CASP-3 -	Caspase-3
CAV-1	Caveolina-1
CCR -	Câncer colorretal
DII-	Doença Inflamatória Intestinal
DNA -	Deoxyribonucleic acid
DSB-	Double Strand Brake
ECA-	Espaços Criptais Acelulares/
EGF-	Epidermalgrowthfactor
EGFR-	Epidermal growth factor receptor
EMT-	Epithelial-Mesenchymal transition
EtOH-	Etanol
EROs -	Espécies reativas do oxigênio
FCA-	Foco de Criptas Aberrantes
FDA-	Food and Drug Administration
GSK3 β -	Glycogen synthase kinase 3 beta
GTP-	Guanosine-5'-triphosphate
H2AX -	Histona gamma H2AX
H.E. -	Hematoxilina-Eosina
HNPCC -	Hereditary Nonpolypoid Colorectal Cancer
IARC-	International Agency for Research on Cancer

IDH-	Índice de Desenvolvimento Humano
IMC-	Índice de Massa Corpórea
INCA-	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
kDa-	KiloDaltons
K-RAS -	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
MAPK-	Mitogen Activated Protein Kinases
MDA-	Malondialdeído
MDR-	Multidrug Resistance
MMR-	Mismatch Repair
MNNG -	N-Metil-N-nitroso-N-guanidina
OMS-	Organização Mundial da Saúde
PAF-	Polipose Adenomatosa Familiar
PCNA -	Proliferating Cell Nuclear Antigen
RESV-	Resveratrol
SG-	Sobrevida Global
TNF- α -	Tumoral Necrosis Factor – alfa
TNF- β -	Tumoral Necrosis Factor – beta
VEGF -	Vascular Endothelial Growth Factor
Wnt -	Wingless-type

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Incidência e Mortalidade do Cancer Colorretal em 2012	19
Figura 2: Estrutura química do trans-Resveratrol.....	31
Figura 3: Vias moleculares envolvidas na carcinogênese colorretal.....	27
Figura 4: Diagrama esquemático dos Grupos Experimentais.....	38
Figura 5: Desenho do delineamento experimental da carcinogênese.....	39
Figura 6: Delineamento experimental dos tratamentos.....	40
Figura 7: Concentração de Malondialdeído no fígado (sem exposição ao MNNG).....	46
Figura 8: Concentração de Malondialdeído no fígado (com exposição ao MNNG).....	47
Figura 9: Fotomicrografia das criptas displásicas nos grupos expostos ao carcinógeno.....	48
Figura 10: Porcentagem de Espaços Criptais Acelulares nos grupos expostos ao carcinógeno.....	49
Figura 11: Porcentagem de Criptais Displásicas nos grupos expostos ao carcinógeno.....	49
Figura 12: Número de Corpos Apoptóticos por Cripta Displásica.....	50
Figura 13: Fotomicrografia da imunomarcção para caspase-3.....	51
Figura 14: Número de células marcadas positivamente com caspase-3.....	52
Figura 14A: Criptas Displásicas.....	52
Figura 14B: Criptas Normais.....	52
Figura 15: Fotomicrografia da imunomarcção de H2AX.....	53
Figura 16: Expressão imunoistoquímica de H2AX.....	53
Figura 17: Fotomicrografia da imunomarcção de PCNA.....	55
Figura 18: Porcentagem de células marcadas com PCNA por Cripta.....	55
Figura 19: Fotomicrografia da imunomarcção para caveolina-1.....	57
Figura 20: Expressão imunoistoquímica de caveolina-1 nas intercriptas.....	58
Figura 21: Expressão imunoistoquímica de caveolina-1 nas Criptas Displásicas.....	58
Figura 22: Dupla ação da Caveolina na tumorigênese.....	65

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Agentes quimioterápicos aprovados no FDA.....24

Tabela 1 - Variação de peso e taxa de mortalidade dos animais no período experimental.....45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Câncer Colorretal.....	18
1.1.1 Etiologia.....	18
1.1.2 Fatores de Risco.....	20
1.1.3 Tratamento.....	23
1.2 Carcinogênese.....	24
1.3 Avaliação Imunoistoquímica da Carcinogênese.....	28
1.3.1 gamma-H2AX.....	29
1.3.2 Caspase -3.....	29
1.3.3 iPCNA.....	30
1.3.4 Caveolina -1.....	30
1.4 Resveratrol.....	31
2. JUSTIFICATIVA.....	34
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo Geral.....	35
3.2 Objetivos Específicos.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Animais	36
4.2 Delineamento experimental.....	37
4.3 Carcinogênese.....	39
4.3.1 Aplicação do Carcinógeno.....	39
4.4 Tratamentos: Administração do RESV e RESV + EtOH.....	40
4.5 Eutanásia dos Animais.....	41
4.6 Coleta e processamento dos tecidos.....	41
4.7 Análise Bioquímica para as dosagens de MDA.....	42
4.8 Avaliação das Criptas Displásicas.....	42
4.9 Imunoistoquímica.....	43

4.10 Análises Imunoistoquímicas.....	44
4.11 Análise Estatística.....	44
5 RESULTADOS.....	45
5.1 Análise de estresse oxidativo.....	45
5.1.1 Análise Bioquímica de Malondialdeído.....	46
5.2 Classificação histológica das criptas displásicas.....	47
5.2.1 Avaliação das Criptas Displásicas e das Criptas Vazias.....	48
5.2.2 Efeito do RESVI e RESV + EtOH na incidência do n° de corpos apoptóticos.....	50
5.2.3 Análise da imunomarcção de caspase-3.....	51
5.2.4 Análise da imunomarcção de H2AX.....	52
5.2.5 Análise da imunomarcção de PCNA.....	54
5.2.6 Análise da imunomarcção de caveolina – 1.....	56
6 DISCUSSÃO.....	59
7 CONCLUSÃO.....	67
8 REFERÊNCIAS.....	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer Colorretal:

1.1.1 Etiologia

A população mundial está crescendo e envelhecendo devido às mudanças na fertilidade e na expectativa de vida. Como resultado, a magnitude dos casos de câncer está aumentando substancialmente, com mais de 20 milhões de novos casos de câncer projetados para 2025 (Fidler *et al.*, 2016), comparados aos 14,1 milhões de novos casos em 2012 calculados pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC). O câncer colorretal (CCR) é um dos tipos de câncer mais frequentes no mundo ocidental, cuja incidência vem aumentando nos países em desenvolvimento (Robertson *et al.*, 2012). O CCR foi o terceiro colocado em incidência (1.3 milhões de novos casos) e o quarto colocado em mortalidade por câncer (694 mil óbitos) em 2012 (Stewart & Wild, 2014). Estudos epidemiológicos indicam que fatores como a dieta e o estilo de vida modificam o risco de desenvolver esse tipo de câncer (Jacobsen *et al.*, 2006). Segundo a estimativa do GLOBOCAN em 2012, mais do que 65% dos novos casos de CCR ocorreram em países com alto ou muito alto índice de desenvolvimento humano (IDH). Este fato foi corroborado pelo estudo realizado posteriormente por Fidler *et al.*, em 2016, onde os autores avaliaram a forte correlação entre o IDH e a incidência de câncer (Figura 1). De acordo com este estudo, uma das associações positivas mais fortes observadas foi para o CCR, onde a taxa foi seis a sete vezes maior em regiões com IDH muito alto comparadas a regiões com baixo IDH em ambos os sexos. Com uma etiologia ligada ao estilo de vida e ao ambiente, incluindo alterações nos fatores dietéticos e metabólicos, o CCR pode ser considerado um marcador claro dessa correlação (Fidler *et al.*, 2016).

O CCR é o terceiro câncer mais comum nos homens (após cânceres de pulmão e próstata) e o segundo nas mulheres (após câncer de mama) em todo o mundo, com uma prevalência de 10,0 e 9,2%, respectivamente (Ferlay *et al.*, 2015). A *American Cancer Society* (ACS) estima que em 2017 haverá um total de 135.430 novos casos de CCR, contabilizando ambos os sexos, nos EUA. Este valor fica atrás apenas dos cânceres de Mama (255.180), Pulmão (222.500) e

Próstata (161.130). Ademais, a ACS estima que haverá 50.260 mortes por CCR, em ambos os sexos combinados, no ano de 2017 nos EUA, ficando atrás apenas do câncer de pulmão com uma estimativa de 155.870 mortes (*American Cancer Society*, 2017).

Figura 1. Incidência e Mortalidade em 2012 nos países mais e menos desenvolvidos

Figura 1- Gráfico adaptado de Ferlay et al 2015.

No Brasil, de acordo com a Estimativa do INCA para o biênio 2016-2017, espera-se registrar no país 596 mil novos casos de câncer. Entre os homens, espera-se um total 295.200 novos casos, e entre as mulheres, 300.800 novos casos. Segundo o INCA, o número de casos novos de câncer de cólon e reto estimado para o Brasil em 2016 foi de 16.660 casos em homens e de 17.620 em mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de cólon e reto em homens é o segundo mais frequente na região Sudeste e terceiro nas regiões Sul e Centro-Oeste. Nas regiões Norte e Nordeste ocupa a quarta posição. Para as mulheres é o segundo mais frequente nas regiões Sudeste e Sul. Nas regiões, Centro-Oeste, Nordeste e na região Norte é o terceiro mais frequente.

1.1.2 Fatores de Risco

Em todo o mundo, a probabilidade de sofrer de câncer colorretal é de cerca de 4%-5%. Além disso, muitos traços ou hábitos pessoais são considerados fatores de risco, pois aumentam as chances de desenvolver pólipos ou câncer colorretal.

O principal fator de risco para câncer colorretal é a idade: após a quinta década de vida, o risco de desenvolver CCR é marcadamente aumentado, enquanto o início do câncer colorretal abaixo da idade de cinquenta é raro (além de cânceres hereditários). Cerca de 90% dos casos de CCR esporádicos são diagnosticados após a quinta década de vida, sendo que o risco de desenvolver CCR continua aumentando proporcionalmente com a idade (Siegel *et al.*, 2014). Além da idade, existem outros fatores de risco inerentes que não podem ser modificados. Uma história pessoal de câncer colorretal ou doença inflamatória intestinal (DII) podem ser fatores predisponentes ao desenvolvimento do CCR. Ainda, o risco de desenvolvimento dessa neoplasia em pacientes com colite ulcerativa é aumentado em 3,7% (Eaden *et al.*, 2001), enquanto as pessoas que sofrem de doença de Crohn têm um risco 2,5% maior de desenvolver CCR (Canavan *et al.*, 2006). A inflamação crônica encontrada em DII muitas vezes produz um crescimento anormal de células conhecido como displasia. Isso ocorre devido ao aparecimento de lesões repetitivas na mucosa colônica causadas por um aumento do estresse oxidativo. Tais lesões propiciam o desenvolvimento de células displásicas e progressão para carcinoma, em um ritmo mais acelerado (Annese *et al.*, 2015). Embora as células displásicas ainda não sejam malignas, elas têm mais chances de se tornarem anaplásicas e se tornarem um tumor. Outro fator de risco que pode ser incluído neste grupo é a presença de uma história familiar positiva de CCR em parentes, especialmente em familiares com menos de 50 anos de idade no momento do diagnóstico. Um risco aumentado devido à história familiar pode ser derivado de mutações herdadas ou do ambiente (Johns *et al.*, 2001). Pacientes com CCR hereditário costumam apresentar uma história familiar importante, explicada pela herança de mutações genéticas bem caracterizadas, como no gene APC (Brosens *et al.*, 2015).

Alguns outros fatores de risco, que estão relacionados ao estilo de vida, podem ser reduzidos pela implementação de modestas mudanças de estilo de vida em termos de hábitos alimentares e atividade física. Por exemplo, pensa-se que o exercício físico através do controle da resistência à insulina e hiperinsulinemia possa ter uma ação antitumoral (Holden *et al.*, 2016). Ademais, acredita-se que um estilo de vida sedentário possa aumentar o risco de desenvolver CCR, embora esta relação entre essa doença e a inatividade não esteja completamente definida. No entanto, está provado que a atividade física moderada aumenta as taxas metabólicas e a motilidade intestinal e, a longo prazo, aumenta a eficiência metabólica e reduz a pressão arterial (Marmol *et al.*, 2017).

Um estilo de vida sedentário também está relacionado com a obesidade, outro importante fator de risco para o câncer colorretal (Martinez-Useros *et al.*, 2016). Notavelmente, este risco aumentado está ligado à ingestão de alimentos e ao aumento dos níveis de tecido adiposo visceral, um componente endocrinamente ativo da gordura corporal total que pode promover o desenvolvimento de câncer colorretal através da secreção de citocinas pró-inflamatórias, o que leva a uma inflamação no cólon e reto, resistência à insulina e modulação de enzimas metabólicas como adiponectina ou lectina (Marmol *et al.*, 2017). Uma metanálise demonstrou uma associação entre o índice de massa corpórea (IMC) e o maior risco de desenvolver CCR, contudo, tal correlação variou dependendo do local de desenvolvimento do câncer e também do gênero, havendo uma maior associação com o sexo masculino (Johnson *et al.*, 2013). Nesse contexto, a dieta está fortemente ligada ao risco de câncer colorretal de tal forma que os hábitos alimentares pouco saudáveis aumentam as chances de desenvolver câncer colorretal em até 70% (Willet *et al.*, 2005; Santarelli *et al.*, 2008). Por exemplo, a carne vermelha libera grupos heme no intestino, o que aumenta a formação de compostos N-nitrosos carcinogênicos, bem como aldeídos citotóxicos e genotóxicos por lipoperoxidação. A carne cozida a altas temperaturas produz aminas heterocíclicas e hidrocarbonetos policíclicos após a digestão, ambos os quais são considerados potenciais carcinógenos (Bastide *et al.*, 2011). Outros autores relatam que esta associação pode estar relacionada

a efeitos mitógenos da insulina endógena (Vigneri *et al.*, 2015), porém, o mecanismo exato ainda não é totalmente compreendido.

Em 2015, a Organização Mundial de Saúde (OMS), baseada em estudos com câncer colorretal, definiu a carne vermelha e a carne processada como carcinógenos para humanos (Bouvard *et al.*, 2015 - IARC). Na mesma metanálise de Johnson *et al.* de 2013, ficou demonstrada uma correlação positiva entre o CCR e o alto consumo de carne vermelha (≥ 5 porções/semana). Além disso, o tabagismo e o consumo de álcool também têm mostrado aumentar o risco de CCR (Gillen *et al.*, 1994; Gapstur *et al.*, 1994; Liang *et al.*, 2009). No caso do consumo de álcool, o acetaldeído (principal metabólito do etanol) foi descrito como carcinogênico, aumentando o risco de desenvolver CCR entre as populações, dependendo dos polimorfismos das enzimas do metabolismo do álcool (Park *et al.*, 2009). Uma visão geral da epidemiologia de sete tipos de câncer associados ao álcool (cavidade oral e faringe, carcinoma de células escamosas do esôfago, da laringe, cólon, fígado, mama e pâncreas), concluíram que o uso crônico de álcool contribui para o risco de câncer de fígado, níveis moderados de uso de álcool estão associados com aumentos modestos nos índices de câncer de cólon e de mama e que o consumo excessivo de bebidas alcoólicas pode estar relacionado a um aumento modesto no risco de câncer de pâncreas (Pöschl *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2005). No entanto, a relação entre consumo de álcool e CCR ainda não foi totalmente elucidada. Como contraponto, muitos estudos envolvendo o consumo de álcool em ambos os sexos defendem a ideia de que o consumo baixo a moderado de álcool pode ser benéfico à saúde, sendo associado à redução da mortalidade por causas gerais (Soleas *et al.*, 1997). Estudos com vinho tinto e seus compostos fenólicos, como o RESV, demonstraram um menor risco de desenvolvimento de doenças coronarianas e de CCR. Em um desses estudos foram avaliados os níveis de RESV em tecidos colônicos normais e tumorais de voluntários portadores de CCR que haviam consumido de 0,5 a 1 grama de RESV durante o período pré-operatório. Os autores observaram uma redução da proliferação tumoral relacionado ao consumo diário de RESV (Patel *et al.*, 2010).

O tabagismo, por sua vez, pode aumentar as chances de desenvolver CRC em até 10,8%, devido ao alto teor em carcinógenos como a nicotina -

metabólitos que podem facilmente chegar ao intestino e gerar pólipos (Botteri *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2009; Cross *et al.*, 2014). Johnson *et al.*, demonstraram na sua metanálise de 2013 que existe uma forte relação entre o número de maços-ano com o desenvolvimento de CCR. Embora o tabagismo aumente o risco de CCR, uma relação significativa só foi encontrada para os fumantes de longa duração, independente de se eles pararam de fumar ou não (Marmol *et al.*, 2017).

1.1.3 Tratamento

A realização de uma ressecção cirúrgica de alta qualidade é a base de todas as terapias potencialmente curativas para o CCR. O tipo de ressecção depende de vários fatores, incluindo localização, tamanho, o tipo de CCR, preferência do paciente e experiência cirúrgica. É geralmente reconhecido que a ressecção laparoscópica em mãos experientes é oncolologicamente equivalente a ressecção aberta para câncer de cólon e a excisão total do mesorreto deve ser a abordagem de rotina para ressecção do câncer, sendo que são obtidos melhores resultados quando a cirurgia é realizada por cirurgiões com alto volume de cirurgias e em centros de alto volume de procedimentos (Obuch & Ahnen, 2016), isto é, a experiência conta a favor do melhor prognóstico.

As abordagens quimioterápicas têm se expandido muito nas últimas décadas. O 5-Fluorouracil (5-FU, com ou sem leucovorina ou levamisol) tem sido utilizado para a quimioterapia em CCR desde os anos 1960 e foi essencialmente a única opção por 40 anos (Obuch & Ahnen, 2016). Desde a década de 1990, a quimioterapia com base em 5-fluorouracil (5FU) melhora a taxa de sobrevivência de pacientes com CCR metastático (mCCR). Uma sobrevida global (SG) de 12 meses e a adição de oxaliplatina e irinotecano aumentou a SG para aproximadamente 18 meses. O advento de drogas, como o bevacizumab, levou a um salto substancial na SG, que se aproximou dos 30 meses em alguns estudos (Cheng *et al.*, 2013).

Desde 2004, um total de 10 novos medicamentos receberam a aprovação da *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento do CCR (Quadro 1).

Quadro 1. Agentes quimioterápicos aprovados no FDA			
	Classe	Mecanismo	Ano de Aprovação no FDA
5-FU	Antimetabólito citotóxico	Inibição da Timidilato Sintetase	1962
Bevacizumabe	Anticorpo monoclonal	Bloqueia o VEGF	2004
Cetuximabe	Anticorpo monoclonal	Bloqueia o EGFR	2004
Panitumumabe	Anticorpo monoclonal	Bloqueia o EGFR	2006
Irinotecano	Citotóxico	Inibição da Topoisomerase	2008
Oxaliplatina	Agente Alquilante Citotóxico	Ligação ao DNA	2009
Regorofanib	Inibidor de Angiogênese oral	Bloqueio de multiplaskinases	2012
Afibercept	Proteína de fusão Inibidora da Angiogênese	Análogo de Receptor bloqueando a ligação de moléculas como o VEGF	2012
Capecitabine	Antimetabólito citotóxico oral	Inibição da Timidilato Sintetase via oral	2013
Ramucirumabe	Anticorpo monoclonal	Bloqueia o receptor de VEGF	2015
Trifluridint-tipiracil	Antimetabólito citotóxico oral	Inibição da Timidilato Sintetase Timidina Fosforilase via oral	2015

Quadro 1. Traduzido de Gustavsson B, Carlsson G, Machover D, et al. A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer.

Além da quimioterapia tradicional, terapias alternativas estão sendo estudadas com o objetivo de aumentar a eficácia do tratamento e reduzir os efeitos colaterais, bem como o risco de desenvolver tumores secundários. As linhas de pesquisa mais importantes atualmente em andamento são o uso de drogas anti-inflamatórias, probióticos e drogas à base de ouro.

1.2 Carcinogênese

A mucosa do cólon é composta pelas denominadas criptas de Lieberkuhn – estruturas formadas por células epiteliais colunares dispostas em formato de invaginações exercendo a função de absorção e de conformação epitelial. Milhões de criptas compõem o cólon, sendo que cada uma é composta por aproximadamente 250 células (Booth & Potten, 2000). No fundo de cada cripta do cólon, cerca de 4 a 6 células-tronco dão origem à enorme quantidade de colonócitos e, também, a um grande potencial de acúmulo de alterações

genéticas e epigenéticas (Zhao & Michor, 2013). Como resultado da rápida e contínua proliferação, os colonócitos se movem das partes inferiores das criptas em direção ao lúmen colônico a uma velocidade de aproximadamente 1 posição de célula por hora. Assim, uma cripta é totalmente renovada de 2 a 8 dias. A taxa de proliferação total é 3-10 bilhões de colonócitos por dia (Potten *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1985). Interessantemente, o epitélio do intestino delgado murino se renova a cada 5 dias (Barker *et al.*, 2009). Com toda essa taxa proliferativa, não é de se estranhar o fato de o câncer colorretal ser um dos mais prevalentes cânceres na nossa população. Garcia *et al.* em 2000 demonstraram que a fissão de uma dessas criptas desempenha um papel importante na geração de microadenomas policlonais precoce, que é um pré-requisito para a cancerização no campo do epitélio colônico. Estudos de proliferação mostraram que o rápido “turnover” e o imenso número de mitoses no cólon resultam em dezenas de milhares de mutações na mucosa colônica por dia (Worthley *et al.*, 2007). Ademais, há evidências que sugerem que a fissão da cripta é o principal mecanismo de ampliação do tumor após a iniciação. Além disso, diferentes criptas dentro dos adenomas devem interagir e cooperar para que um microadenoma policlonal inicial seja formado (Wong & Garcia, 2002). Há algumas teorias sobre o desenvolvimento da carcinogênese do câncer de cólon. As duas principais bases já bem estabelecidas para o desenvolvimento do CCR se norteiam em alterações genéticas: (1) instabilidade cromossômica caracterizando CCR esporádico; e (2) instabilidade de microssatélites) este sendo principalmente envolvido no câncer de cólon hereditário não-polipose, sigla em inglês (HNPCC) (Raskov *et al.*, 2014). A primeira teoria foi proposta por Fearon e Vogelstein em 1990. No modelo desses dois cientistas, a carcinogênese colônica se desenvolveria a partir de uma cadeia de eventos mutagênicos, denominados de “sequência adenoma-adenocarcinoma” (Fearon & Vogelstein, 1990). Esta via é caracterizada pelo acúmulo de mutações em genes-chave que controlam o ciclo celular, comunicação intercelular e apoptose. Até 85% dos casos de CCR se desenvolvem através da sequência adenoma-adenocarcinoma. Dentre os genes que sofrem mutações nesta via, destacam-se o gene K-ras, o gene APC e P53.

O gene APC (*adenomatous polyposis coli*) é um importante gene supressor de tumor na carcinogênese do CCR. O gene APC é o responsável pela produção da proteína APC e tem várias funções relacionadas à comunicação intercelular, orientação celular, transcrição e proliferação, sendo sua principal função é a regulação da via de sinalização Wnt (Raskov *et al.*, 2014). Essa via de sinalização de Wnt / β -catenina é fundamental para a renovação do epitélio intestinal e é um regulador crítico da proliferação celular normal e maligna (Figura 3). No CCR esporádico, as mutações que conduzem à ativação da via Wnt / β -catenina ocorrem cedo em mais de 90% dos cânceres, incluindo as mutações mais frequentes no gene supressor tumoral APC, a quinase GSK3 β , que controla a estabilidade de APC e da β -catenina e, ainda, a própria β -catenina (Grivennikov *et al.*, 2013). O produto genético - a proteína APC, assegura a função de algumas junções muito importantes entre os colonócitos e as caderinas (aderências dependentes de cálcio) através do qual ocorre grande parte da comunicação intercelular. Para manter o bom funcionamento das caderinas, a proteína APC deve se ligar ao domínio citoplasmático da molécula de caderina juntamente com outras duas moléculas: a β -catenina e GSK3- β . A ligação destas três proteínas ao domínio da caderina assegura a função normal das junções (Tian *et al.*, 2011). Além disso, a ligação da β -catenina ao complexo de caderina assegura baixos níveis de β -catenina livre no citoplasma. Caso contrário, se a β -catenina permanecer em grandes quantidades livres no citoplasma, ela, então, se translocará para o núcleo da célula através de ligação com fatores de transcrição, culminando em aumento da expressão do gene cMyc. Isso resultará em um aumento da proliferação celular e no prejuízo da apoptose, levando assim aos primeiros eventos da carcinogênese do cólon (Jass *et al.*, 2002). A mutação do APC é encontrada em CCR esporádico e na doença hereditária PAF (polipose adenomatosa familiar). Indivíduos com PAF carregam uma mutação herdada em um alelo do APC. Quando há o segundo “*hit*” no outro alelo, geralmente ocorrerá a inativação do gene nos primeiros 30 anos de vida, resultando em centenas de milhares de adenomas e subsequentes carcinomas (Raskov *et al.*, 2014).

Figura 3. Vias moleculares envolvidas na carcinogênese colorretal.

Figura 3. Vias moleculares envolvidas na carcinogênese colorretal. As mutações que afetam as proteínas envolvidas nas vias WNT (laranja), MAPK / PI3K (verde), SMAD / TGF- β (azul) ou reparação do DNA (roxo) podem aumentar a proliferação e sobrevivência das células, induzindo assim o crescimento excessivo tumoral e iniciando a carcinogênese. Reproduzido de Marmol et al, 2017.

O gene K-ras é um protooncogene e a mutação nesse gene é encontrada em 30% a 50% dos casos de CCR. Sabe-se que os colonócitos nesses casos possuem uma vantagem de crescimento, uma vez que a perda da atividade da guanosinatrifosfatase (GTP) é perdida com a mutação. O aumento dos níveis de GTP resulta em uma sinalização constante através da via a jusante. Sozinho, a mutação do K-ras não é suficiente ou necessária para conduzir a transformação maligna, que precisa de *drivers* adicionais (Moon et al., 2014). As mutações de K-ras são freqüentemente encontradas em até 95% das displasias precoces, incluindo focos de criptas aberrantes (FCA) e também em pólipos hiperplásicos (Takayama et al., 1998; Feng et al., 2011).

A via de instabilidade dos microssatélites representa outro marco fundamental na história natural do CCR. A via de instabilidade dos microssatélites (IS) resulta de uma falha do sistema de reparo de incompatibilidade do DNA - do inglês "*mismatch repair*" (MMR) - para corrigir erros de base e manter a estabilidade genômica à medida que as células com MMR anormalmente funcionando acumulam erros ao invés de corrigi-los. Pelo menos dois mecanismos podem resultar em um defeito MMR (Wimmer *et al.*, 2014): Uma mutação no gene MMR resultando em um produto genético defeituoso (proteína) como na HNPCC, ou uma produção silenciada ou subprodução de produto do gene MMR por hipermetilação, o que pode ser visto no CCR esporádico. A hipermetilação de um gene geralmente leva a uma subexpressão ou "silenciamento", denominado de "evento epigenético".

É válido dizer que a compreensão molecular da carcinogênese do cólon continua a evoluir rapidamente. Ambos os CCRs hereditários e esporádicos são doenças geneticamente conduzidas e as síndromes hereditárias do CCR são causadas por mutações germinativas enquanto que o CRC esporádico ocorre por alterações na estrutura do DNA (mutações) ou na sua função (epigenética) (Obuch & Ahnen, 2016). Esta última pode ser gerada por agentes alquilantes como, por exemplo, o MNNG, utilizado neste trabalho.

O N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) é um agente de alquilação bem conhecido e que induz câncer em vários órgãos de animais experimentais, especialmente no esôfago, no estômago e no cólon. É considerado que ele promove a carcinogênese colorretal, através de uma mutação pontual no oncogene K-ras em animais experimentais (Taniguchi *et al.*, 2002). O MNNG é um composto que não necessita de metabolização para ativação, podendo assim, ser utilizado de forma tópica. A instilação intra-retal em roedores induz tumores colorretais.

1.3 - Avaliação Imunoistoquímica da Carcinogênese

A resposta ao dano do DNA pode ser iniciada em resposta a uma variedade de sinais de estresse que são encontrados durante processos fisiológicos ou em resposta a sinais exógenos, tais como radiação ionizante ou agentes terapêuticos que danificam o DNA. Vários métodos foram desenvolvidos

para examinar as alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares que ocorrem durante a resposta ao dano ao DNA.

1.3.1 gamma-H2AX

Quando as células são expostas a radiações ionizantes ou agentes quimioterapêuticos prejudiciais ao DNA, são geradas rupturas na dupla hélice. Essas quebras de dupla fita estão entre os primeiros procedimentos que ocorrem na formação e progressão do câncer como resultado de fatores endógenos e exógenos. Esse fenômeno resulta rapidamente na fosforilação da variante H2AX da histona H2A. Desta maneira, a detecção de H2AX pode potencialmente servir como biomarcador para a transformação de tecido normal em tecidos pré-malignos e, conseqüentemente, em malignos. O H2AX já foi investigado em uma variedade de tipos de câncer, incluindo mama, pulmão, cólon, colo do útero e câncer de ovário (Palla *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2012).

O H2AX pode ser detectado por imunotransferência e imunocoloração utilizando detecção microscópica - técnica utilizada no presente trabalho - ou por citometria de fluxo (Sharma *et al.*, 2012).

1.3.2 – Caspase 3

Caspases são mediadores cruciais da morte celular programada (apoptose). Entre eles, a caspase-3 é uma protease frequentemente ativada, catalisando a clivagem específica de muitas proteínas celulares chave durante o processo de apoptose. Ainda, a literatura aponta para a participação desta caspase no processo apoptótico induzido por diversos fatores em adenocarcinoma de cólon, como diferentes quimioterápicos, e pode ocorrer retardo ou até inibição da apoptose por mutação ou ação farmacológica inibitória sobre as caspases-3 (Gomes *et al.*, 2008). A caspase-3 é também necessária para algumas características típicas da apoptose e é indispensável para a condensação apoptótica da cromatina e a fragmentação do DNA em todos os tipos de células examinadas. Deste modo, a caspase-3 é essencial para certos processos associados ao desmantelamento da célula e à formação de corpos apoptóticos, mas também pode funcionar antes ou durante a fase em que se efetua o compromisso com a perda de viabilidade celular (Porter *et al.*, 1999).

Estudos imunoistoquímicos têm demonstrado que a caspase-3 tem sua expressão reduzida em diversos tumores primários, sendo essa redução da expressão associada ao aumento do potencial maligno do tumor e, consequentemente, à diminuição da sobrevida global (Wang *et al.*, 2014).

1.3.3 PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)

A PCNA é uma proteína nuclear não histamínica com massa molecular de 36 kDa e é um marcador específico de divisão celular. Sua ação está associada à polimerase de DNA, sintetizada pouco antes da fase S do ciclo celular. Verificou-se que a expressão de PCNA se correlaciona com o grau de malignidade, infiltração vascular, metástase à distância e sobrevivência. Este antígeno foi descrito como um biomarcador de adenocarcinoma colorretal (Guzinska *et al.*, 2009). Ainda, o PCNA foi descrito como um marcador capaz de identificar adenomas mais agressivos que podem se transformar em cânceres malignos (Lavezzi *et al.*, 2002).

1.3.4 CAV -1 (Caveolina-1)

A Caveolina-1 (CAV-1) é uma proteína estrutural essencial na formação das invaginações endocíticas da membrana plasmática. A CAV-1 está presente na maioria das células de mamíferos, tais como adipócitos, células endoteliais, pneumócitos, fibroblastos e células musculares lisas. Atualmente, os papéis funcionais atribuídos a caveolas e CAV-1 são bastante diversos, variando do transporte vesicular (transcitose, endocitose e pinocitose) e homeostase do colesterol, à supressão da transformação celular e à regulação da transdução de sinal (Razani *et al.*, 2002). A CAV-1 desempenha um papel importante na modulação de processos tumorigênicos por meio de várias funções, tais como a regulação genética, tráfico e transdução de sinal. Vários autores propuseram que a expressão elevada de CAV-1 em células prediz uma baixa sobrevivência celular (Qian *et al.*, 2011; Steffens *et al.*, 2011). No CCR foram demonstrados resultados que sugerem que a perda da expressão de CAV-1 no estroma pode ser um preditor de resultados clínicos deficientes (Zhao *et al.*, 2015).

1.4 Resveratrol

Nos últimos anos, a atividade quimiopreventiva dos polifenóis do vinho tinto em relação ao câncer tem sido muito estudada, com relatos de ação dos polifenóis no bloqueio à carcinogênese e inibição do crescimento tumoral em animais e em culturas celulares. Os possíveis efeitos benéficos do consumo de bebidas alcoólicas, particularmente do vinho tinto, sobre a incidência de câncer ocorrem principalmente devido à presença de substâncias além do etanol, como os polifenóis, presentes em quantidade de 10 a 20 vezes maior nos vinhos tintos comparados ao vinho branco (Soleas *et al.*, 1997).

Micallef *et al.*, no ano de 2007, em trabalho com 40 voluntários submetidos ao consumo de 400ml de vinho tinto/dia por duas semanas, observaram que o consumo de vinho tinto em curto prazo induziu a um aumento no teor total de antioxidantes plasmáticos ($p < 0.03$) e a um decréscimo nos teores plasmáticos de MDA ($p < 0.001$) e GSH ($p < 0.004$), comprovando que o consumo de vinho tinto nessas condições pode melhorar o status antioxidante do organismo e diminuir o estresse oxidativo na circulação sanguínea.

O resveratrol (RESV), 3,4, 5-tri-hidroxi-trans-estilbeno, é uma fitoalexina aromática do tipo estilbeno encontrada principalmente em uvas, amendoim, bagas, cúrcuma e outros produtos alimentares (Sautter *et al.*, 2005). Este composto está presente particularmente em altas concentrações na pele das uvas vermelhas (50-100 μ g/g) e no vinho tinto (1,5-20mg/L) (Delmas *et al.*, 2003). Existem duas estruturas de RESV diferentes (cis-RESV e trans-RESV), mas geralmente nos referimos à sua estrutura trans (figura 2) (Wang *et al.*, 2017).

Figura 2. Estrutura química do trans-Resveratrol

Figura 2. Disponível em www.sigmaaldrich.com

Recentemente, constatou-se que o RESV diminuiu o crescimento tumoral num modelo de tumor de rato. A administração de RESV em ratos AH-130 causou uma diminuição muito significativa (25%) no teor de células tumorais causando apoptose nas mesmas. Os extensos estudos realizados nas últimas décadas mostraram que o RESV tem potencial para efeitos quimiopreventivos e quimioterapêuticos. Além disso, estudos recentes descobriram que o RESV mostrou ter muitas atividades biológicas relacionadas com a prevenção e o tratamento do câncer através da regulação da divisão celular e crescimento de células cancerosas, apoptose, angiogênese e metástase (Athar *et al.*, 2007; Ndiaye *et al.*, 2011; Saiko *et al.*, 2008). O RESV ainda tem demonstrado apresentar essa atividade quimiopreventiva em ensaios avaliando os três principais estágios da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão) (Landrault *et al.*, 2002). Além disso, estas ações quimiopreventivas do RESV foram extensivamente estudadas nos níveis molecular e celular, tais como sinalizações celulares, vias enzimáticas e apoptose mediada por p53 (Kroon *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2002; Shih *et al.*, 2004).

Estudos farmacocinéticos de RESV em humanos e modelos animais demonstraram que RESV foi eficientemente absorvido após administração oral com presença no plasma e urina. A natureza e a quantidade de metabolitos de RESV podem variar entre os indivíduos devido à variabilidade interindividual. Uma vez na corrente sanguínea, os metabolitos podem ser submetidos ao metabolismo de segunda passagem com conversões adicionais que ocorrem no fígado, onde o transporte enterohepático na bile pode resultar em alguma reciclagem de volta ao intestino delgado (Cottart *et al.*, 2010). Apesar disso, a atividade biológica do RESV pode ser limitada pela fraca absorção e pelo metabolismo de primeira passagem, e estas limitações levam a uma baixa biodisponibilidade (Aires *et al.*, 2013).

Considerando que o RESV é metabolizado em formas sulfatadas e glucuronidas, dentro de 15 minutos seus metabólitos já se encontram na corrente sanguínea, os quais podem ser o princípio ativo que circulam no soro por até 9 h (Kim *et al.*, 2016). Por esta razão, alguns pesquisadores estudaram os efeitos inibitórios dos metabólitos do RESV ou seus análogos na progressão do câncer e metástase (Savio *et al.*, 2016). Por exemplo, um estudo revelou efeitos

anticancerígenos do metabólito do RESV em células de câncer do cólon altamente metastático (Aires *et al.*, 2013). Em células de câncer de cólon, o RESV ativa diversas caspases e desencadeia a apoptose, com o acúmulo das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak e redistribuição do receptor de Fas nas membranas celulares (Delmas *et al.*, 2003).

Administrado por via oral a 200 mg/kg/dia na água potável, o RESV reduziu significativamente o número de focos de criptas aberrantes (FCA) induzidos por AOM, associado a mudanças na expressão de Bax e p21 (Tessitore *et al.*, 2000). Camundongos tratados com RESV (0,01% na água de beber por 7 semanas) mostraram uma redução de 70% na formação de pequenos tumores intestinais, impedindo o desenvolvimento do tumor de cólon.

Muitos estudos mostraram que o RESV inibe a progressão da invasão e metástase do tumor através da inibição das vias de sinalização associadas a transição epitélio-mesênquima (*do inglês EMT*) (Xu *et al.*, 2015). O EMT é um processo crítico através do qual células epiteliais perdem a sua interação célula-célula e geram um fenótipo mesenquimatoso, levando a maior capacidade migratória, invasão, resistência elevada à apoptose, aumento da produção de componentes da matriz extracelular e rearranjo de citoesqueletos (Jeon *et al.*, 2016; Kalluri & Weinberg, 2009; Son & Moon, 2010). O RESV demonstrou contornar as alterações morfológicas das células de um fenótipo mesenquimatoso clássico para um fenótipo epitelial induzido por TGF- β (Blobe *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2013).

Recentemente foi demonstrado durante a fase II de um estudo clínico que os níveis de RESV e de seus metabólitos (R3S, R3G e R4G), medidos nas amostras de tecido colônico humano, após a ingestão repetida de 1g de RESV, foram correlacionados com uma redução de 5% ($P < 0,05$) na proliferação de células tumorais, sugerindo propriedades potencialmente anticancerígenas dos metabolitos do RESV (Patel *et al.*, 2010). Nesse sentido, embora as extensas pesquisas com resveratrol realizadas nas últimas décadas demonstraram que o resveratrol tem potencial para efeitos quimiopreventivos e quimioterápicos, ainda existem várias limitações e dúvidas baseadas na eficácia do resveratrol no CCR.

2. JUSTIFICATIVA

Os tratamentos medicamentosos do CCR têm avançado no sentido de oferecer uma maior sobrevida global aos pacientes. Contudo, muitas vezes esse aumento na sobrevida não necessariamente significa aumento da qualidade de vida e melhora dos sintomas, quer seja pelo fato de que esses medicamentos não funcionam para todos os pacientes - devido à sua especificidade, quer seja pelos inúmeros efeitos adversos produzidos por essas drogas, fazendo com que mesmo as terapias mais modernas ainda não alcancem o real sucesso no tratamento dos pacientes oncológicos, a despeito dos grandes investimentos feitos. Um outro problema relacionado às novas terapias biológicas é o custo do tratamento, muitas vezes inviabilizando a utilização de uma nova droga ou, ainda, aumentando extensivamente os gastos do sistema único de saúde, constituindo um cenário de grande desafio para a medicina.

Diante desse cenário, nosso grupo procura identificar esquemas terapêuticos que atuem na quimioprevenção, isto é, através do estudo com moléculas já consagradas, tentamos verificar sua ação anti-neoplásica nas fases de iniciação e promoção da carcinogênese do CCR. Nesse contexto, o RESV é um conhecido forte candidato a desempenhar esse papel na quimioprevenção do CCR.

Nesse sentido, analisar os efeitos do RESV - associado ou não ao etanol – na carcinogênese colônica em ratos pode nos trazer uma nova luz sobre como esse composto age no CCR e, assim, propiciar um novo conhecimento em prol da prevenção e da terapia oncológica de pacientes com câncer colorretal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

A proposta deste estudo é tentar compreender a ação anti-neoplásica do RESV puro e associado ao etanol, simulando o efeito hipotético de um vinho tinto, na redução do desenvolvimento de câncer de cólon induzido por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) em ratos, através da análise de marcadores imunoistoquímicos.

3.2 Objetivos Específicos

I. Compreender como o RESV desempenha sua ação anti-neoplásica na carcinogênese colônica através de análise de estresse oxidativo e expressão de biomarcadores imunoistoquímicos;

II. Analisar a expressão por imunoistoquímica de H2AX e de PCNA a fim de identificar se há presença de danos severos ao material genético devido a administração do carcinógeno MNNG e saber como o RESV atua nesse processo;

III. Avaliar o desempenho de RESV frente a expressão do biomarcador de potencial de malignidade CAV-1.

IV. Verificar se a associação Etanol + RESV apresenta superioridade frente ao RESV isolado quanto à ação protetora anti-neoplásica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Campus Jaboticabal-SP, sob o número de protocolo 008473/17.

4.1 Animais

Estudamos a influência de RESV puro e associado ao álcool em 48 ratos wistar, machos, de aproximadamente 7 semanas de vida, com peso aproximado de 250g no início do experimento, provenientes do biotério central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Estes animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto em condições de temperatura ambiente $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$, ciclo noite-e-dia 12:12h e umidade relativa do ar de 60-70%. A alimentação foi feita com dieta padrão purina® para ratos, com composição aproximada (g/100g): de proteína 21,0; gordura 3,5; carboidratos 60,0; sais 5,3; complexo vitamínico 2,0 e cinzas (dados fornecidos pelo produtor), que prevê aproximadamente 3,5 kcal/g. (dados fornecidos pelo produtor). Quanto à dieta líquida, a água oferecida foi água de torneira *ad libitum*.

Os animais foram acomodados em grupos de 4 animais por gaiola, totalizando 12 gaiolas, referentes a 6 Grupos (n=8). Os animais passaram por um período de adaptação de 1 semana antes de iniciar o experimento.

Nos grupos tratados houve a administração de RESV na concentração de 1mg/kg, tanto na solução aquosa quanto na solução de RESV + etanol e, nos grupos controle, os animais receberam solução salina de mesmo volume; todas as administrações foram realizadas por gavagem. Os tratamentos foram realizados ao final da tarde para não prejudicar o sono dos roedores, que possuem hábitos noturnos. Os ratos foram acomodados em um número de quatro animais por caixa.

4.2 Delineamento Experimental

Os ratos foram divididos em 6 grupos com 8 animais em cada grupo, totalizando 48 animais (Figura 4).

G1 – Controle (dieta normal sem carcinógeno)

O grupo 1 (controle) recebeu dieta sólida e líquida normal, sem adição do carcinógeno MNNG.

G2 – Controle Carcinógeno (dieta normal com carcinógeno)

O grupo 2 (controle com carcinógeno) recebeu dieta sólida e líquida normal, com adição do carcinógeno MNNG.

G3 – RESV sem Carcinógeno

O grupo 3 recebeu dieta sólida e líquida normal, gavagem com solução de resveratrol, sem adição de carcinógeno.

G4 – RESV com Carcinógeno

O grupo 4 recebeu dieta sólida e líquida normal, gavagem com solução de resveratrol, com adição de carcinógeno.

G5 - RESV + Etanol sem Carcinógeno

O grupo 5 recebeu dieta sólida e líquida normal, gavagem com solução de resveratrol + etanol, sem adição de carcinógeno.

G6 – RESV + Etanol com Carcinógeno

O grupo 6 recebeu dieta sólida e líquida normal, gavagem com solução de resveratrol + etanol, com adição de carcinógeno.

Figura 4. Diagrama esquemático dos Grupos Experimentais.

Figura 4. Disposição didática dos grupos no experimento.

4.3 Carcinogênese

A carcinogênese foi induzida nos ratos Wistar com 7 semanas (49 dias) de vida nos quais foram realizados 4 depósitos intrarretais sucessivos (2 vezes/semana por 2 semanas – aos 49, 52, 56 e 59 dias de vida) de 0.5 ml da solução de MNNG (5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) a 7 cm da margem anal na altura do cólon, utilizando-se uma agulha de ponta de lâmpada (bulb-tip needle), de acordo com protocolo estabelecido (Maurin *et al.*, 2006). Nos grupos controle houve a aplicação de solução salina em igual volume e repetições, utilizando-se o mesmo procedimento (Figura 5).

Figura 5. Desenho do delineamento experimental da carcinogênese

Figura 5. Esquema didático do experimento

4.3.1 Aplicação do Carcinógeno

O MNNG foi aplicado nos animais mantidos em decúbito ventral e realizada a aplicação de 0,5ml intra-retal utilizando uma agulha de ponta de lâmpada.

4.4 Tratamentos: Administração do RESV e RESV + Etanol

O tratamento com a solução de RESV com Etanol foi feito respeitando-se as recomendações preconizadas pelo Código Europeu de Combate ao Câncer (Boyle *et al.*, 2003), que recomenda manter o consumo diário de álcool em 20 a 30 g de etanol/dia. Dentro dessa faixa, optou-se pela quantidade exata de 26,4g de etanol/dia, que corresponde à concentração de 0,377g de etanol/kg de peso vivo. Essa quantidade equivale à presente em 2 drinques/dia, reconhecida na literatura como a dose que produz mais efeitos benéficos à saúde. Após a revisão da literatura ficou constatado que a concentração de RESV presente em vinhos tintos variou de 0.1 – 14,3 mg/L (Joseph & Sinclair, 2006). Contudo, em estudos experimentais a dose mais preconizada para avaliar os efeitos do RESV foi de 1mg/kg. Desta maneira, adotamos a concentração de RESV de 1mg/kg em todos os grupos tratados com este componente. Os volumes da solução de RESV e de RESV com etanol administrados em todos os tratamentos, assim como de solução salina nos grupos controle foram os mesmos, visando evitar sobrecargas, corrigindo-se suas concentrações para atingir a mesma dose pretendida. A administração dos tratamentos se deu por gavagem gástrica, uma vez ao dia durante quatro semanas, sendo iniciada quatro dias após a última aplicação do carcinógeno (Cardoso *et al.*, 2011) (figura 6).

Figura 6. Delineamento experimental dos tratamentos

A preparação das soluções bem como a administração foram realizadas com a utilização de equipamentos de proteção individuais (EPI's) – luvas, aventais, óculos de proteção e máscara).

4.5 Eutanásia dos Animais

Todos os ratos foram sacrificados com 13 semanas (91 dias) de vida, 4 semanas após o início do tratamento, período suficiente para o aparecimento de lesões inflamatórias, como criptas, nos animais tratados com MNNG (Che *et al.*, 2010).

A eutanásia se deu através da aplicação de dose letal de ketamina intramuscular seguida de punção cardíaca com retirada de todo o sangue possível dos animais. Após esse procedimento, os ratos foram submetidos à uma laparotomia exploratória com incisão mediana, seguida da ressecção do cólon e reto, bem como a excisão do fígado para posteriormente realizar a análise bioquímica desse tecido. Os animais foram recolhidos e encaminhados para o Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) onde foram incinerados.

4.6 Coleta e processamento dos tecidos

O cólon e o fígado foram cuidadosamente isolados e retirados. Após a excisão do fígado foi coletada uma amostra de 200mg desse tecido e separada em tubos de 2ml da Axygen® para análise dos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo. O cólon foi lavado em salina e aberto longitudinalmente pela borda mesentérica. Assim, as amostras de tecidos colônicos foram devidamente recortadas para realização da técnica histológica, em 2 recortes de aproximadamente 2 cm x 1 cm cada um. Posteriormente, os recortes de cólon foram aderidos em papel de filtro e armazenados em cassetes devidamente identificadas. A fixação do material ocorreu em solução de formalina tamponada a 10%, por um período mínimo de 24 horas. Após este período, os tecidos foram retirados da formalina, recortados e processados.

Já recortadas, as peças passaram por um processo de desidratação por submersão em álcoois de concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 100%) durante um período total de aproximadamente 5 horas. Posteriormente para

diafanização do material, as mesmas foram submersas em banhos de xilol 100% por aproximadamente 1 hora e 20 minutos.

Em seguida as amostras foram submersas em banhos de parafina líquida em uma temperatura de 60°C por um período de 4 horas, seguindo então para inclusão em blocos, onde parte da amostra foi incluída horizontalmente com a mucosa para baixo, e verticalmente para obtenção de cortes longitudinais e transversais respectivamente. Os blocos foram cortados em micrótomo para obtenção de cortes com 5 µm de espessura; posteriormente foram montados em lâminas. As lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris por 3 minutos e contra- corada com 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 para montagem das lâminas.

4.7 Análise Bioquímica para as dosagens de MDA

Foram utilizados 0,5 ml do homogenato de fígado para análise da concentração de MDA, onde foi adicionado 1 ml da solução TBA-TCA-HCL e aquecido por 15 minutos em banho de água fervente. Depois de esfriadas as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e utilizado para leitura em espectrofotômetro a 535 nm.

4.8 Avaliação de Criptas Displásicas

Após coloração com Hematoxilina e Eosina, foi feita análise da mucosa da porção distal do cólon através do exame com lupa adequada. As análises microscópicas e macroscópicas foram realizadas com a supervisão de patologista habilitado e experiente. Na análise macroscópica foi analisado edema e hiperemia da mucosa além da presença de tumores. Na análise microscópica as criptas displásicas foram identificadas, qualificadas, e calculada a frequência por unidade de área em cm², além da análise de corpos apoptóticos.

4.9 Imunoistoquímica

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, estes foram aderidos em lâminas salinizadas, desparafinizados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de etanol até água. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato pH 6,0 (em panela de vapor) por 20 minutos. Para inibir reações com peroxidases teciduais, peróxido de hidrogênio a 3% foi adicionado sobre as lâminas. Para a realização do bloqueio de ligações teciduais inespecíficas – o que poderia causar marcação inespecífica, utilizou-se soro normal de cavalo diluído em solução-tampão de fosfato (PBS) pH 7,4 (PBS), em uma concentração de 10%. Entre cada etapa as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS para evitar formação de precipitados. As lâminas foram incubadas com seus respectivos anticorpos primários: Caspase-3 (LeicaBiosystems Newcastle Ltd, UK.®, clone JHM62), e iPCNA (Novocastra®, NovocastraLaboratoriesLtd,UK, clone PC10) em diluição de 1:100; H2AX (anti-gammaH2AX phospho S140 [3F2] Abcam®; 1:200), CAV 1 (100µg (1mg/ml) anti-Caveolin-1 antibody ab2910 Abcam®) em câmara úmida e escura, durante 2 horas. Após lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário biotinilado durante 30 minutos e, após nova lavagem, foram incubadas com polímero conjugado também por 30 minutos. Para revelação, as lâminas receberam solução reagente contendo o cromógeno DAB (3,3'- diaminobenzidina), durante 1 a 3 minutos, até o aparecimento de precipitado de coloração marrom – atribuída à redução do DAB pela reação. Todos os reagentes são disponibilizados com 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, utilizou-se Entelan.

4.10 Análises Imunoistoquímicas

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

Para avaliação de células positivamente marcadas para CASP-3, foram analisados os citoplasmas das amostras colônicas, uma vez que a marcação deste anticorpo localiza-se no citoplasma celular. Para a avaliação da marcação de CAV-1 avaliou-se as membranas celulares, estroma e vasos. Para avaliação de gamma-H2AX e iPCNA, avaliou-se o núcleo celular, uma vez que essa histona atua como um marcador de quebras na fita-dupla do DNA e o iPCNA atua como um marcador de replicação celular.

4.11 Análise estatística

Os resultados foram submetidos a análise estatística utilizando o software Graph Pad Prism 5.0 (San Diego, Califórnia). Para verificar as diferenças entre as médias dos grupos para cada variável dependente foi utilizada a Análise de Variância em uma via (One-way) – ANOVA. Especificamente para análise da variação do peso dos animais e da taxa de mortalidade foi utilizada a Análise de Variância em duas vias (Two-way) – ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. Adotamos um nível de significância de 0,05; e a média foi dada +/- erro padrão da média. Quando se verificou diferença entre as médias ($p < 0,05$), foi utilizado pós-teste de Tukey's (One-way).

**Observação 1: As amostras referentes aos grupos controle (G1) e controle-MNNG (G2) do presente estudo já haviam sido coletadas previamente por nosso laboratório e foram utilizados nesse estudo para a comparação com os grupos referentes ao presente estudo.*

5. RESULTADOS

Os dados referentes à variação de peso (peso médio inicial e final e ganho de peso) e taxa de mortalidade dos animais (Tabela 1) foram utilizados para monitoramento das condições gerais dos ratos durante todo o período experimental. Não houve qualquer diferença estatisticamente significativa nos valores médios das pesagens realizadas, ganhos de peso ou taxas de mortalidade observadas no experimento. Nenhum rato morreu ao longo do experimento ou apresentou sinais clínicos de doença ou alterações comportamentais.

Tabela 1 – Variação de peso e taxa de mortalidade dos animais no período experimental

Grupo	Peso Médio Inicial (g)	Peso Médio Final (g)	Ganho de Peso Médio (g)	Taxa de Mortalidade (%)
G1	262,00±13,26	571,38±30,48	309,38±22,52	Zero
G2	260,63±11,03	552,25±16,09	291,62±14,76	Zero
G3	256,85±9,40	578,75±54,90	321,93±40,33	Zero
G4	250,25±14,60	536,12±42,20	285,87±32,82	Zero
G5	237,25±18,10	535,12±45,6	297,87±28,01	Zero
G6	247,87±22,40	535,37±54,10	287,50±38,12	Zero

Valores são expressos em média ± desvio padrão. Teste estatístico Two-Way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$

5.1 Análise do estresse oxidativo

O estresse oxidativo foi avaliado através da análise de MDA no fígado dos ratos. Essa análise foi realizada dividindo os animais em 2 grupos: expostos ao carcinógeno MNNG e não-expostos ao MNNG. Em ambas análises o efeito antioxidante do RESV tornou-se evidente, pois houve uma redução estatisticamente significativa entre os grupos tratados com RESV em comparação com àqueles que não foram tratados (Figuras 7 e 8). Todavia, não houve diferença significativa entre os animais tratados, expostos ou não ao carcinógeno.

5.1.1 Análise Bioquímica do Malondialdeído

Na análise bioquímica realizada nos animais que não foram expostos ao MNNG, os grupos G3 (RESV) e G5 (RESV + EtOH) apresentaram uma diferença estatisticamente significativa na produção de malondialdeído quando comparado ao grupo controle G1 (One-Way ANOVA $p < 0,0001$. Pós-teste de Tukey: "Controle vs RESV" - $P < 0.05$; "Controle vs RESV+EtOH"- $P < 0.05$. Os grupos G3 e G5 quando comparados entre si não apresentaram diferença estatisticamente significativa ("RESV vs RESV+EtOH" – $p > 0,05$).

Figura 7. Concentração de Malondialdeído no Fígado (SEM exposição ao MNNG)

Figura 7 –Concentração de Malondialdeído no fígado sem exposição ao MNNG. One-Way ANOVA $p < 0,0001$. Pós-teste de Tukey; "Controle vs RESV" - $P < 0.05$ "Controle vs RESV +EtOH"- $P < 0.05$ "RESV vs RESV + EtOH" – $p > 0,05$

Na análise realizada nos grupos que foram expostos ao carcinógeno, observamos o mesmo padrão apresentado nos grupos que não foram expostos. Há uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos G4 (RESV + MNNG) e G6 (RESV + Etanol + MNNG) quando comparado ao grupo G2 (Salina + MNNG) One-Way ANOVA $p < 0,0001$. Pós-teste de Tukey; "MNNG vs RESV+MNNG" – $P < 0.05$ "MNNG vs RESV+EtOH+MNNG" - $P < 0.05$. Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos G4 e G6 "RESV+MNNG vs RESV+EtOH+MNNG" – $p > 0,05$.

Figura 8. Concentração de Malondialdeído no Fígado (COM exposição ao MNNG)

Figura 8 –Concentração de Malondialdeído no fígado com exposição ao MNNG. One-Way ANOVA $p < 0,0001$. Pós-teste de Tukey; "MNNG vs RESV + MNNG" - $P < 0,05$ "MNNG vs RESV+EtOH+MNNG" - $P < 0,05$ "RESV + MNNG vs RESV+EtOH+MNNG" – $p > 0,05$

5.2 Classificação histológica das Criptas Displásicas

Através da histologia dos tecidos colônicos procuramos avaliar e identificar a presença de alterações morfofuncionais nas criptas dos grupos do trabalho. As figuras 9A, 9B e 9C demonstram, respectivamente, a presença de criptas displásicas no grupo G2, isto é, exposto ao MNNG; presença de corpúsculos apoptóticos com células descamando para o interior das criptas displásicas no grupo exposto ao MNNG e tratado com RESV (G4) e a presença de algo que traz um ineditismo ao trabalho que classificamos como Espaços Criptais Acelulares (ECA's), observados nos grupos tratados com RESV, associado ou não ao etanol, que foram expostos ao MNNG (G4 e G6) (Figura 9C). ECA's são restos celulares de células apoptóticas após o término do processo de apoptose. Esses achados serão abordados com maior profundidade na discussão. Nos grupos tratados com RESV além da presença dos corpos apoptóticos houve também um menor número de criptas displásicas. Não houve displasia nos grupos que não foram expostos ao carcinógeno.

Figura 9. Fotomicrografia das criptas displásicas do cólon nos grupos expostos ao MNNG

5.2.1 Avaliação das Criptas Displásicas e Espaços Criptais Acelulares

Durante a análise dos materiais coletados nos deparamos com um achado interessante: um certo número de criptas vazias, batizadas de Espaços Criptais Acelulares (ECA's). Elas ocorrem somente nos animais tratados com RESV (Figura 10) e só podem significar que houve uma destruição completa de algumas criptas, o que provavelmente explica o fato desses grupos terem menor quantidade de criptas displásicas (Figura 11).

Figura 10. Porcentagem de (Espaços Criptais Acelulares - ECA) Criptas vazias nos grupos expostos ao carcinógeno

Figura 10. Contagem de criptas vazias (ECA's) em porcentagem nos grupos expostos ao MNNG. As criptas vazias foram encontradas principalmente nS grupos tratados com RESV (G4 e G6). One-way ANOVA -> $P=0.0001$. Pós-teste de Tukey (grupos com significância estatística - $P<0.05$): MNNG vs RESV + MNNG; MNNG vs RESV. + Etanol + MNNG

Figura 11. Porcentagem de Criptas Displásicas nos grupos expostos ao carcinógeno

Figura 11. Contagem de criptas displásicas em porcentagem nos grupos expostos ao MNNG. Um número menor de criptas displásicas foi encontrado nos grupos tratados com RESV (G4 e G6). One-way ANOVA -> $P<0.0001$. Pós-teste de Tukey (grupos com significância estatística - $P<0.05$): todos os grupos, quando comparados entre si, apresentaram diferença estatística.

Na figura 12 são apresentadas as médias dos números de corpos apoptóticos nas criptas displásicas nos grupos expostos ao carcinógeno. Houve um significativo aumento no número total de corpos apoptóticos no grupo tratado com RESV, independentemente da associação com etanol, quando comparado ao grupo exposto ao carcinógeno MNNG sem tratamento (One-way ANOVA: $P=0.0001$). Quando comparamos o grupo RESV + MNNG com o grupo RESV + Etanol + MNNG não houve diferença estatisticamente significativa entre esses grupos, demonstrando que não houve benefício com a associação RESV + Etanol. Os resultados sugerem que o RESV foi capaz de induzir a apoptose de forma significativa nas criptas displásicas, evidenciando sua ação anti-neoplásica.

Figura 12. Número de Corpúsculos Apoptóticos por Criptas Displásicas

Figura 12 – Contagem do número de Corpos Apoptóticos nas Criptas Displásicas dos grupos G2, G4 e G6. Todos expostos ao carcinógeno MNNG. RESV demonstrou induzir um aumento do número de corpos apoptóticos nas criptas displásicas. One-way ANOVA: $P=0.0001$; Pós-teste de Tukey ($P<0.05$): MNNG vs RESV + MNNG e MNNG vs RESV + Etanol + MNNG

5.2.3 Análise da Imunomarcção de Caspase 3

Na análise imunoistoquímica da Caspase 3 observamos que nas criptas normais, onde não era esperado a indução da apoptose, não houve um aumento significativo da marcação para caspase (Figura 13A). No grupo G2, exposto ao MNNG sem tratamento, houve uma marcação discreta em células apoptóticas nas criptas displásicas, processo natural e sem influência do RESV (Figura 13B). Contudo, no grupo tratado com RESV observamos uma acentuada expressão da caspase-3, com forte marcação nas criptas displásicas (Figura 13C). Ademais, na análise numérica, quando avaliamos a marcação para caspase 3 nas criptas displásicas, constatamos que o RESV induziu significativamente a apoptose (One-way ANOVA, $P=0.0001$), indicando que o RESV é capaz de atuar sobre os tecidos pré-neoplásicos induzindo-os à morte celular programada (Figura 14). Quando comparamos o grupo RESV + MNNG com o grupo RESV + Etanol + MNNG não houve diferença estatisticamente significativa entre esses grupos, demonstrando que não houve benefício com a associação. RESV + Etanol (Figura 14). Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa (One-Way ANOVA, $P=0,4173$) entre todos os grupos analisados (G1 a G6) em relação ao número de criptas normais (Figura 15).

Figura 13. Fotomicrografia da imunomarcção para caspase-3

Figura 13A. Imunomarcção CASP-3 Resveratrol (G3)

Figura 13B. Imunomarcção CASP-3 - MNNG (G2)

Figura 13C. Imunomarcção CASP-3 Resveratrol + MNNG (G4)

Figura 13. Fotomicrografia da imunomarcção para Caspase-3. Figura 13A grupo tratado com resveratrol sem exposição ao MNNG: criptas normais a casp-3 não é marcada, marcação difusa no espaço intercriptas. Figura 13B grupo exposto ao MNNG: marcação discreta de casp-3 em células apoptóticas nas criptas displásicas. Figura 13C grupo exposto ao MNNG e tratado com resveratrol: cripta displásica devido a ação do MNNG com forte marcação de casp-3, expressão induzida pelo resveratrol, qualificando o processo de apoptose.

Figura 14. Número de células marcadas positivamente com Caspase 3

Figura 14A - Criptas Displásicas

Figura 14B - Criptas Normais

Figura 14. Contagem do número de células marcadas positivamente com caspase 3 nas criptas normais e displásicas. Todos expostos ao carcinógeno MNNG. **Figura 14A** evidencia o efeito de RESV em induzir a apoptose. Efeito observado pela marcação positiva da caspase 3 efetora. Houve diferença estatisticamente entre os grupos tratados com RESV em relação ao grupo controle MNNG. Análise estatística: One-way ANOVA -> $P=0.0001$. Pós-teste de Tukey (grupos com significância estatística - $P<0.05$): MNNG vs RESV.+MNNG; MNNG vs RESV+EtOH+MNNG. **Figura 14B** demonstra que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação às criptas normais. One-way ANOVA: $P=0.4173$;

5.2.4 Análise da Imunomarcação de H2AX

A figura 15, através da imunomarcação de H2AX, demonstra que RESV, associado ou não ao etanol, foi capaz de mitigar os danos causados à fita dupla de DNA pelo MNNG. A Figura 15A demonstra que não houve marcação nuclear nas células criptais no grupo controle. Já a Figura 15B, referente ao grupo exposto ao MNNG, observamos um aumento significativo da marcação de H2AX nas criptas, denotando um dano severo ao DNA. Um efeito interessante foi observado no grupo exposto ao MNNG e que foi tratado com RESV. O RESV atenuou a expressão de H2AX, demonstrando um efeito protetor sobre o núcleo das células (Figura 15C). Houve uma acentuada diminuição, estatisticamente significativa (One-way ANOVA - $P<0.0002$), nos grupos tratados com RESV (G4 e G6) quando comparados ao grupo exposto ao MNNG sem tratamento (G2). Confirmado tal diferença com o Pós-teste de Tukey (grupos com significância estatística - $P<0.05$): MNNG vs RESV.+MNNG; MNNG vs RESV+EtOH+MNNG.

Figura 15. Fotomicrografia da imunomarcção de H2AX

Figura 16. Expressão Imunoistoquímica de H2AX

Figura 16 – **Expressão imunoistoquímica de H2AX. Contagem de células positivas marcadas para H2AX por Criptas.** Grupo tratados com RESV demonstraram mitigar os efeitos deletérios do carcinógeno. One-way ANOVA: $P=0.0002$ Pós-teste de Tukey ($P<0.05$): MNNG vs RESV+MNNG; MNNG vs RESV+EtOH+MNNG

5.2.5 Análise da Imunomarcção do PCNA

Na figura 17 compara-se, através da imunomarcção do PCNA, os efeitos produzidos pelo MNNG e RESV sobre a divisão celular nas células das criptas. Na figura 17A a marcação do PCNA se limitou às células que compõem a base da cripta, sabidamente a região da cripta com maior taxa de divisão. Quando comparamos o grupo controle (Figura 17A) com o grupo que foi exposto ao carcinógeno identificamos uma marcação mais acentuada e que se estende até as porções superiores da cripta (Figura 17B), demonstrando o efeito sobre a divisão celular causado pelo MNNG. Contudo, no grupo exposto ao MNNG e que foi tratado com RESV, observamos uma diminuição da marcação difusamente e, mais do que isso, não vemos marcação de células nas porções superiores das criptas (Figura 17C), demonstrando que o RESV mais uma vez protegeu as células da ação do MNNG. Na figura 18 são apresentadas as médias em porcentagem (%) das criptas marcadas positivamente pelo PCNA em todos os grupos do trabalho. Observamos que o grupo MNNG (G2) apresentou quase 50% de suas criptas positivamente marcadas com PCNA, demonstrando o maior grau de malignidade nas células expostas ao carcinógeno. Interessantemente, todos os grupos que foram tratados com RESV apresentaram resultados próximos do controle, demonstrando mais uma vez um efeito protetor da molécula. Houve diferença estatísticas entre MNNG e todos os outros grupos estudados (One-way ANOVA -> $P < 0.0001$. Pós-teste de Tukey (grupos com significância estatística - $P < 0.05$).

Figura 17. Fotomicrografia da imunomarcação de PCNA.

Figura 17A. Imunomarcação PCNA (Controle G1)

Figura 17B. Imunomarcação PCNA (MNNG G2)

Figura 17C. Imunomarcação PCNA (MNNG + RESV G4)

Figura 17. Fotomicrografia da imunomarcação para PCNA. Figura 17A grupo controle: PCNA é um marcador nuclear, a base da cripta esta marcada devido a alta taxa de proliferação. Figura 17B grupo exposto ao MNNG: aumento significativo da marcação de PCNA nas criptas, observa-se células marcadas na porção superior das criptas (seta); Figura 17C grupo exposto ao MNNG e tratado com resveratrol: resveratrol atenuou a expressão de PCNA, não se observa marcação nas porções superiores das criptas.

Figura 18. Porcentagem (%) de Células marcadas com PCNA por Cripta

Figura 18 – **Contagem de células positivas para PCNA por Criptas em porcentagem.** Grupo exposto ao MNNG demonstrou maior malignidade de suas criptas em comparação com todos os outros grupos tratados com RESV. One-way ANOVA: $P=0.0001$ Pós-teste de Tukey ($P<0.05$).

5.2.6 Análise da Imunomarcção de Caveolina 1

A imunomarcção de Caveolina foi avaliada tanto nas intercriptas quanto nas criptas displásicas. A figura 19 apresenta os diferentes padrões de expressão de CAV-1 nos grupos controle, exposto ao carcinógeno e expostos e tratados com RESV. Observa-se que o grupo controle apresentou marcação de CAV-1 somente nas células estromais e na parede dos vasos. Esse padrão era esperado, e ele nos mostra que a marcação do anticorpo foi efetiva e adequada (Figura 19A). Já no grupo exposto ao carcinógeno (G2), ocorreu a marcação de CAV-1 no interior das células. Esse padrão não acontece em células normais, o que nos sugere que o MNNG causou danos à essas células predizendo uma diminuição da sobrevivência dessas células (Figura 19B). Ademais houve uma forte marcação no estroma (Figura 19C). O RESV antagonizou o efeito do MNNG no grupo (G4), uma vez que não há marcação membranal, mesmo após essas células terem sido expostas ao MNNG (Figura 19D). Além disso, quando comparamos a marcação estromal do grupo G2 (Figura 19C) com a marcação estromal do grupo (G4) observamos que também ocorreu diminuição da marcação de CAV-1 com RESV. A figura 20 demonstra que o RESV diminuiu substancialmente a expressão de CAV-1 nos espaços intercriptas, o que nos sugere que a promoção da apoptose pelo RESV pode estar relacionado à diminuição da expressão de CAV-1. A diferença observada no gráfico 11 foi estatisticamente significativa entre MNNG e todos os outros grupos avaliados (One-way ANOVA -> $P < 0.0001$).

Na figura 21 estão apresentados os resultados das marcações imunoistoquímicas de CAV-1 nas criptas displásicas. Novamente, destaca-se o papel do RESV na diminuição da expressão de CAV-1, desta vez, nas próprias criptas displásicas. A variância entre os grupos expostos ao MNNG apresentou significância estatística ($P < 0,0001$).

Figura 19. Fotomicrografia da imunomarcção de CAV-1.

Figura 19A. Imunomarcção CAV-1 (Controle G1)

Figura 19B. Imunomarcção CAV-1 e Displasia (MNNG G2)

Figura 19C. Imunomarcção CAV-1 e Marcação Estromal (MNNG G2)

Figura 19D. Imunomarcção CAV-1 e Displasia (MNNG G4)

Figura 19E. Imunomarcção CAV-1 e Marcação Estromal (MNNG G4)

Figura 19. Fotomicrografia da imunomarcção para CAV-1. Figura 19A grupo controle: CAV-1 marca algumas células estromais e alguns vasos, demonstrando a marcação adequada. Figura 19B grupo exposto ao MNNG: marcação das membranas celulares no interior das células criptais (seta) com displasia de cripta e marcação de parede de vaso (seta vermelha). Figura 19C grupo exposto ao MNNG: grande quantidade de células estromais marcadas com CAV-1 (círculo pontilhado). Figura 19D grupo exposto ao MNNG e tratado com resveratrol: com resveratrol há uma ausência de marcação membranar, ao mesmo tempo as paredes dos vasos foram marcadas. Figura 19E grupo exposto ao MNNG e tratado com resveratrol: diminuição da marcação estromal na presença de resveratrol

Figura 20. Expressão Imunoistoquímica de CAV-1 nas Inter-Criptas

Figura 20 – **Expressão imunoistoquímica de CAV-1. Contagem de células positivas no espaço intercripta marcadas com CAV-1.** Grupo tratados com RESV demonstraram diminuir substancialmente a expressão de CAV-1. One-way ANOVA: $P=0.0001$ Pós-teste de Tukey ($P<0.05$): MNNG vsRESV.+MNNG; MNNG vsRESV+Etanol+MNNG; MNNG vsRESV.+Etanol;MNNG vsRESV+Etanol+MNNG.

Figura 21. Expressão Imunoistoquímica de CAV-1 nas Criptas Displásicas

Figura 21 – **Expressão imunoistoquímica de CAV-1. Contagem de células positivas marcadas com CAV-1 nas criptas displásicas.** Grupo tratados com RESV demonstraram diminuir substancialmente a expressão de CAV-1. One-way ANOVA: $P=0.0001$ Pós-teste de Tukey ($P<0.05$): MNNG vs RESV.+MNNG; MNNG vs RESV+EtOH+MNNG.

6. DISCUSSÃO

O RESV é uma fitoalexina natural existente nas formas cis e trans, sendo a forma trans a mais biologicamente ativa (Sharmila *et al.*, 2007). Há dados na literatura demonstrando que os polifenóis de vinho tinto inibem a proliferação de células epiteliais do cólon induzida pelo fator de crescimento epitelial (EGF) pela modulação da ativação da proteína kinase mitógena ativada (MAPK) (Briviba *et al.*, 2002; Sharmila 2007). Em 2001, Schneider *et al.*, demonstraram que camundongos tratados com RESV (0,01% na água de beber por 7 semanas) apresentavam uma redução de 70% na formação de pequenos tumores intestinais, impedindo o desenvolvimento do tumor de cólon. Eles concluíram que o tratamento com RESV levou a diminuição da expressão de genes diretamente envolvidos na progressão e proliferação do ciclo celular (ciclina D1 e D2, DP-1 fator de transcrição, e proteína Y-box binding) (Schneider *et al.*, 2001). No presente experimento, o RESV apresentou um notável efeito protetor no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas na carcinogênese induzida por MNNG no cólon de ratos. Tais efeitos serão discutidos nos próximos parágrafos.

A fim de avaliar um dos efeitos mais conhecidos do RESV - sua ação antioxidante – e verificar se a administração do composto foi feita de forma apropriada, optou-se por realizar análises bioquímicas avaliando a concentração do malondialdeído em amostras de fígados dos animais deste experimento. A concentração de MDA nessas análises foi dada em μmol por grama de tecido (gT). As figuras 7 e 8 demonstram o potente efeito antioxidante do RESV e como esse efeito foi deflagrado sistemicamente, tanto nos grupos expostos ao MNNG (G2, G4 e G6) quanto nos grupos não expostos ao carcinógeno (G1, G3 e G5). No grupo exposto ao MNNG (Figura 8) esperava-se que se desenvolvesse um certo grau de colite, sobretudo durante a fase aguda do MNNG, devido ao processo inflamatório produzido pelo carcinógeno - o que elevaria a presença de espécies reativas de oxigênio (Tennant *et al.*, 2009). Em um recente estudo, Gong W.H *et al.*, postularam que o RESV pode reduzir a taxa de proliferação das células de câncer colorretal e a expressão do gene COX-2, e o mecanismo envolvido é a inibição da geração de superóxido nas células, como o peróxido (Gong *et al.*, 2017). Os achados do presente estudo vão de encontro com a literatura, isto é, o RESV exerceu um papel inibitório na peroxidação lipídica,

indicando que seu efeito antioxidante contribuiu também para a diminuição dos danos causados pelo carcinógeno (Figura 8). Tal fato demonstra que a administração do RESV nos experimentos foi adequada e bem executada. O mesmo fenômeno também ocorreu na avaliação dos grupos sem exposição ao MNNG (Figura 7), corroborando os achados da literatura que demonstram que o RESV pode exercer seus efeitos por atividade antioxidante e anti-inflamatória (Bellaver *et al.*, 2014).

A figura 10 apresenta a contagem do número de criptas vazias - por nós denominadas “ECA’s”, encontradas nos grupos expostos ao MNNG. Os grupos tratados com RESV apresentaram um aumento substancial no número de ECA’s. Esse é um achado que ainda não havia sido reportado na literatura. As criptas vazias ou, como batizado, Espaços Criptais Acelulares (ECA’s) – são um conjunto de células apoptóticas agrupadas após sofrerem todo o processo de morte celular programada (Figura 9C). Esse fenômeno é uma consequência do intenso processo de apoptose, atividade desencadeada pelo RESV. Além da presença de ECA’s, foram identificados também a presença de corpúsculos apoptóticos e restos celulares no interior das criptas, evidenciando um momento anterior ao surgimento das ECA’s (Figura 9B). Essa ação pró-apoptótica do RESV que culminou no aparecimento das ECA’s levou a contagem de um menor número de criptas displásicas nos grupos tratados com o RESV em comparação com o grupo exposto ao MNNG sem tratamento (Figura 11). Interessantemente, no grupo exposto ao MNNG e tratado com a associação RESV + EtOH, não foi observada a mesma magnitude de ECA’s quando comparado ao grupo RESV sozinho, muito embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa entre eles (Figura 10). Ademais, na avaliação do número de células displásicas constatou-se o mesmo efeito, isto é, aparentemente o EtOH mitigou o efeito pró-apoptóticos do RESV. Neste caso, houve diferença estatisticamente significativa (Figura 11).

Durante a pesquisa na literatura foi observado que o uso do álcool e o desenvolvimento de CCR é conflitante. Estudos anteriores relataram uma associação positiva fraca entre álcool e CCR, especialmente para maiores ingestões de álcool (Cho *et al.*, 2004; Longnecker *et al.*, 1990). Alguns estudos, no entanto, sugerem uma relação inversa entre álcool e CCR, especialmente

vinho (Seth *et al.*, 2011). Cardoso *et al.*, no ano de 2011, apresentaram análises realizadas com o vinho tinto demonstrando que esse composto, o qual tentou-se reproduzir com a associação RESV + EtOH (G5 e G6), possui um grande poder antioxidante e anticâncer (Cardoso *et al.*, 2011). Muito embora, no presente trabalho o etanol possa ter atenuado os efeitos do RESV. Sugere-se que essa diferença encontrada deva estar relacionada com o processo de vinificação, isto é, devido ao grande número de variáveis presentes ao longo do processo de produção do vinho, como, por exemplo, a presença de outras fitoalexinas com poder antioxidante que devem contribuir para um maior efeito antioxidante observado nas análises do vinho tinto. Além disso, o etanol presente no vinho tinto decorre de um processo de fermentação alcoólica, o qual pode mitigar um eventual efeito inibitório do etanol sobre o RESV, como foi observado nos experimentos realizados. Apesar disso, o EtOH utilizado no experimento (G5 e G6) não teve influência estatisticamente significativa sobre o efeito antioxidante do RESV (Figuras 7 e 8). Sugerindo que outros mecanismos, que não apenas a ação antioxidante do RESV, possa contribuir para seu potencial terapêutico de prevenção do surgimento de lesões pré-neoplásicas.

Adicionalmente, todo o processo apoptótico desencadeado pelo RESV pode ser evidenciado através da análise da figura 12. Onde observa-se que a taxa de corpúsculos apoptóticos em ambos os grupos tratados com RESV (G4 e G6) foi bem superior e estatisticamente significativa em relação ao grupo exposto ao MNNG (Figura 12).

Os dados supracitados acerca da apoptose encontrados em nossas amostras foram corroborados pela marcação de caspase 3. As caspases, pertencentes à família das cisteíno-proteases, estão diretamente associadas à apoptose. A utilização de um anticorpo específico para caspase-3 ativada tem se mostrado técnica de maior eficiência para avaliar a intensidade de apoptose em tecidos humanos (Marshman *et al.*, 2001). A marcação de caspase 3 nas criptas normais (Figura 13A) esteve presente majoritariamente nos espaços intercriptas, padrão esperado de normalidade. Já nas amostras de tecidos que foram expostas ao MNNG (Figura 13B), houve marcação em algumas células apoptóticas presentes nas criptas displásicas, demonstrando que houve expressão de caspase-3 nessas células, no entanto, essa marcação foi apenas

discreta. Entretanto, na presença do RESV observa-se um grande número de células expressando a caspase 3 (Figura 13C), confirmando os achados dos corpúsculos apoptóticos. Esses achados estão alinhados com os dados encontrados na literatura, uma vez que o RESV inibe a expressão de proteínas antiapoptóticas, tais como Bcl-2 e Bcl-XL, e induz a expressão de Bax, Bak, Bad, PUMA, Noxa e Bim, atuando como um potente indutor de apoptose (Fulda S. *et al.*, 2005). Um outro parâmetro utilizado para analisar a apoptose foi a contagem do número de células marcadas positivamente com caspase 3 nas criptas normais e displásicas. A Figura 14A evidencia o efeito de RESV em induzir a apoptose. Houve diferença estatisticamente entre os grupos tratados com RESV em relação ao grupo controle MNNG ($p < 0,0001$). Quando se compara a indução da apoptose pela contagem de células marcadas com caspase-3 nas criptas normais concluímos pela análise estatística que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,4173$) (Figura 14B).

A quebra da dupla fita de DNA (em inglês “*double-strand brake*” - DSB) é uma lesão séria que pode iniciar a instabilidade genômica, levando ao câncer. Monitorar a formação de DSB em uma célula se tornou possível através da detecção da formação de H2AX, pois trata-se de meio sensível para monitorar a progressão e o tratamento do câncer (Bonner *et al.*, 2008). O MNNG é capaz de produzir tais tipos de alteração no DNA das células do colon (Tsukamoto *et al.*, 2015). No presente trabalho, o grupo exposto ao MNNG (G2) apresentou um aumento significativo da marcação de H2AX nas criptas displásicas, corroborando os dados da literatura e demonstrando sua maior expressão na carcinogênese induzida pelo MNNG Figura 15B). O grupo controle (G1) não apresentou marcação nuclear de H2AX, demonstrando que esse grupo não sofreu quaisquer danos ao seu DNA (Figura 15A). Interessantemente, no grupo exposto ao carcinógeno e tratado com RESV (G4) ficou demonstrado que RESV atenuou a expressão de H2AX, atuando como um agente protetor do dano ao DNA (Figura 15C). Na análise da porcentagem de células marcadas com H2AX por cripta, os grupos tratados com RESV demonstraram mitigar os efeitos deletérios do carcinógeno, com uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo exposto ao MNNG. Todavia, mais uma vez o grupo envolvendo a associação entre RESV e EtOH demonstrou ser menos efetivo na proteção ao

DNA quando comparado com o grupo do RESV isolado. Dessa forma, mais uma vez sugere-se que o etanol pode estar diminuindo o efeito benéfico do RESV.

Além da histona H2AX, o PCNA também é utilizado na detecção de alterações no material genético decorrentes da exposição celular a um determinado agente carcinogênico. A literatura tem mostrado que a superexpressão de PCNA está significativamente correlacionada com o tamanho e aumento do número de criptas displásicas (Qasim *et al.*, 2012). Yan-Fang *et al.*, em 2006, mostraram que a taxa positiva de expressão de PCNA está aumentada na sequência de transformação de adenoma-carcinoma. Outros autores também demonstraram que a expressão positiva de PCNA é significativamente aumentada durante a transformação do adenoma colorretal para o carcinoma (Zi-Jian & Li, 2001). Neste trabalho a exposição ao MNNG culminou em um aumento da expressão de PCNA no grupo G2 quando comparado ao grupo controle G1 (Figuras 17A e 17B). Ademais, no grupo G2 observa-se células expressando PCNA nas porções mais superiores das criptas (Figura 17B), fato não observado nas células normais. Ao tratar o grupo previamente exposto ao MNNG com RESV houve uma diminuição significativa da marcação de PCNA de maneira difusa e, ainda, não se observou a expressão de PCNA nas porções superiores da célula, demonstrando que RESV desempenhou um papel protetor na promoção da carcinogênese. Em um estudo avaliando a ação do RESV como adjuvante do tratamento de colangiocarcinoma, os autores identificaram que na presença do RESV houve uma diminuição do número de núcleos PCNA-positivos por campo em comparação com os tratamentos quimioterápicos utilizados, enquanto que a combinação de RESV e 5-FU diminuiu o número de núcleos PCNA-positivo até uma extensão ainda maior do que qualquer tratamento sozinho (Frampton G. *et al.*, 2010). A figura 18 apresenta os resultados da porcentagem de células positivamente marcadas com PCNA, no gráfico fica evidente que o grupo exposto ao MNNG (G2) demonstrou maior malignidade de suas criptas em comparação com todos os outros grupos tratados com RESV. O etanol não apresentou influência no efeito do RESV. Tais resultados sugerem mais uma vez que RESV é também capaz de mitigar os danos causados pelo carcinógeno no núcleo da célula e que esses achados corroboram os dados encontrados na literatura.

Caveolinas são uma classe de proteínas estruturais oligoméricas que são necessárias e suficientes para a formação de caveolas. Curiosamente, caveolina-1 tem sido implicada na patogênese da transformação de células oncogênicas, na tumorigênese e metástase (Williams & Lisanti, 2005). Em um estudo realizado em 2004 os autores demonstraram que a caveolina-1 é super-expressa no adenocarcinoma experimental do cólon em comparação com a mucosa normal adjacente, e sua expressão em células cancerosas do cólon humano está diretamente associada à taxa de crescimento tumoral (Patlolla *et al.*, 2004). Fine em 2001 apresentou dados argumentando que caveolina-1 apresenta níveis elevados em amostras de tumor do cólon e que, especificamente, a expressão de caveolina-1 estava aumentada em amostras de adenocarcinomas mas não em adenomas e na mucosa normal (Fine *et al.*, 2001). Por outro lado, existe uma grande quantidade de estudos na literatura que demonstram que a expressão de caveolina-1 está reduzida em diferentes tumores em diferentes estágios, sugerindo que caveolina-1 funciona como um supressor de tumor (Bender *et al.*, 2002).

No atual trabalho, o grupo exposto ao MNNG apresentou níveis de aproximadamente 3 vezes mais elevados de caveolina em comparação a todos os outros grupos estudados (Figura 20). Ademais, os grupos tratados com RESV demonstraram diminuir substancialmente a expressão de CAV-1 no espaço intercriptas e nas criptas displásicas (Figuras 20 e 21, respectivamente). A associação com etanol não influenciou o efeito produzido pelo RESV, o que nos leva a acreditar que o sinergismo esperado entre EtOH e RESV não existe, sendo necessário mais estudos para avaliar essa correlação. No segundo capítulo do livro *Caveolins in Cancer Pathogenesis, Prevention and Therapy*, os autores Quest *et al* reforçam a noção de que a caveolina-1 desempenha um duplo papel no câncer e que essa ambiguidade de função é talvez melhor entendida quando avaliamos a expressão de CAV-1 para o câncer de cólon (Figura 22). Nesse tipo de câncer, ocorre uma perda inicial de caveolina-1 seguida por uma reexpressão em fases posteriores (Quest *et al.*, 2004; Quest *et al.*, 2008). No início do ambiente celular é tal que se CAV-1 é reexpressa, desenvolve traços consistentes com um papel como um supressor de tumor levando à repressão da transcrição de genes de β -catenina-Tcf / Lef-

dependente, como ciclina D1, cox-2, survivina e c-myc. No entanto, durante a progressão do tumor, mudanças múltiplas ocorrem no nível molecular (isto é, instabilidade genômica, mutações genéticas e / ou alterações epigenéticas). Uma dessas possibilidades é a perda de E-caderina. Neste ambiente celular agora "permissivo", CAV-1 não pode mais inibir caminhos associados ao seu papel como supressor de tumor, incluindo a via de sinalização canônica Wnt. Em vez disso, prevalecem os traços da molécula que favorecem o desenvolvimento da resistência a múltiplos fármacos (MDR) e metástase. Essa visão é consistente com os dados na literatura que associam a expressão de caveolina-1 em estágios posteriores do desenvolvimento de tumores com maior potencial metastático, MDR e baixa sobrevivência do paciente (Quest *et al.*, 2012).

Figura 22. Dupla função da caveolina-1 na tumorigênese.

Adaptado de **Quest *et al.*** Caveolin-1 in Colon Cancer: The Flexible Connection to Wnt Signaling. 2012

Outros Estudos recentes demonstraram que Caveolin-1 fosforilada tem sido associada com aumento da migração de células tumorais. Ademais, a CAV-1 fosforilada aumenta migração celular através da modulação da via RHO / Rock. Assim, a aquisição de uma mutação K-RAS, seguida de consequente aumento da expressão de caveolin-1 pode auxiliar na progressão do câncer, aumentando o potencial metastático das células cancerígenas (Roy *et al.*, 2013).

Finalmente, sendo o MNNG um agente alquilante capaz de causar alterações epigenéticas (Ding *et al.*, 2014), confirmou-se que a alta expressão de CAV-1 no grupo exposto ao MNNG (G2) (Figura 19) somado a menor expressão em todos os grupos tratados com RESV (Figura 20) são dados consistentes e que indicam que naquele momento a CAV-1 não se comporta mais como um agente supressor tumoral, mas sim como um marcador de mal prognóstico associado à resistência a múltiplos fármacos e metástase. Além disso, os achados do presente trabalho sugerem que RESV pode estar implicado nas vias canônica do WNT/ β -catenina e também é capaz de modular os efeitos sobre o oncogene K-RAS.

Diante do exposto anteriormente corrobora-se a hipótese de que o RESV tem um efeito benéfico com ação anti-neoplásica, desta vez avaliado na carcinogênese colônica induzida MNNG. Os resultados deste trabalho sugerem que o RESV atue sobre as espécies reativas de oxigênio (EROs) com sua ação antioxidante de forma sistêmica, demonstrada pela análise do MDA e, que ainda, promove a apoptose com o aumento de caspases efetoras, tais como a caspase-3. Ademais, o RESV diminuiu a expressão de PCNA, H2AX e CAV-1, culminando em atenuação dos efeitos carcinogênicos. Todavia, ao contrário da primeira hipótese de que o etanol agia sinergicamente junto com o RESV, foi visto que o etanol apresentou um grau de incompatibilidade com o RESV, muitas vezes mitigando seu efeito. Assim, faz-se necessário mais estudos para avaliar essa correlação entre RESV e EtOH, com diferentes doses e com diferentes compostos, como por exemplo, o próprio vinho tinto comparado com o RESV sintético.

7. CONCLUSÃO

Baseado nos achados deste estudo podemos concluir que:

I. O RESV apresentou ação anti-neoplásica e quimiopreventiva na fase de promoção da carcinogênese induzida por MNNG no cólon de ratos. Haja vista que diminuiu o estresse oxidativo nos grupos tratados e gerou um efeito pró-apoptótico nas criptas displásicas aumentando a expressão de caspase-3. O RESV induziu a formação de Espaços Criptais Acelulares no cólon dos animais expostos ao MNNG, um achado ainda não descrito na literatura;

II. O MNNG induziu o aumento de expressão de H2AX e PCNA, evidenciando o dano severo às células das criptas colônicas. O RESV foi capaz de mitigar esse aumento de expressão de H2AX e PCNA, diminuindo substancialmente a expressão desses marcadores;

III. Houve um aumento da expressão de caveolina no grupo tratado com MNNG, atuando como um marcador de mal prognóstico. O RESV diminuiu a expressão de CAV-1, sugerindo que RESV também atue sobre as vias do Wnt/ β -catenina e sobre o oncogene K-Ras;

IV. Em algumas análises, o etanol mitigou o efeito do RESV, sugerindo não haver uma associação benéfica entre RESV e EtOH, diferente da primeira hipótese que sugeria um efeito sinérgico entre os dois compostos.

8. REFERÊNCIAS

- Aires, V. , Limagne, E. , Cotte, A.K. , Latruffe, N. , Ghiringhelli, F. , Delmas, D. Resveratrol metabolites inhibit human metastatic colon cancer cells progression and synergize with chemotherapeutic drugs to induce cell death. **Mol. Nutr. Food Res.** 57, 1170–1181. 2013.
- Annese, V et al. European evidence-based Consensus: Inflammatory Bowel Disease and Malignancies. **J Crhons Colitis**, v. 9, n 11, p. 945-65. Nov 2015.
- Athar, M. , Back, J.H. , Tang, X. , Kim, K.H. , Kopelovich, L. , Bickers, D.R. , Kim, A.L. , Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 224, 274–283 . Bailey, J.M. , Singh, P.K. , Hollingsworth, M.A. 2007.
- Barker, N., Ridgway, R.A., Johan H. van Es, van de Wetering M., Harry Begthel, Maaïke van den Born, Esther Danenberg, Alan R. Clarke, Owen J. Sansom & Hans Clevers. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. **Nature** 457, 608-611. Jan 2009.
- Bastide N.M., Pierre F.H.F., Corpet D.E. Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: A meta-analysis and a review of the mechanisms involved. **Cancer Prev. Res.** ;4:177–184. 2011.
- Bellaver, B., D.G., Souza, D.O. and A. Quincozes-Santos, A. “Resveratrol increases antioxidant defenses and decreases proinflammatory cytokines in hippocampal astrocyte cultures from newborn, adult and aged Wistar rats,” **Toxicology in Vitro**, vol. 28, no. 4, pp. 479–484, 2014.
- Bender F, Montoya M, Monardes V et al. Caveolae and caveolae-like membrane domains in cellular signaling and disease: identification of downstream targets for the tumor suppressor protein caveolin-1. **Biol Res** 35:151–167. 2002.
- Blobe, G.C. , Schiemann, W.P. , Lodish, H.F. Role of transforming growth factor beta in human disease. **N. Engl. J. Med.** 342, 1350–1358. 2000.

- Bonner W. M., Redon C. E., Dickey J. S., Nakamura A. J., Sedelnikova O. A., Solier S. and Pommier Y.. yH2AX and Cancer. **Nature Reviews**. Volume 8. 957-966.Dec. 2008.
- Booth C, Potten CS. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. **J Clin Invest**. 105(11):1493-9. Review. 2000.
- Botteri E., Iodice S., Bagnardi V., Raimondi S., Lowenfels A.B., Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: A meta-analysis. **JAMA**;300:2765–2778. 2008.
- Bouvard V. et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. On behalf of International Agency for Research on Cancer. **The Lancet - Oncology**. Vol.16. 2015.
- Boyle P, Autier P, Bartelink H, et al. European code against cancer and scientific justification: third version (2003). **Ann Oncol** 14: 973–1005. 2003.
- Briviba K, Pan L, Rechkemmer G. Red wine polyphenols inhibit the growth of colon carcinoma cells and modulate the activation pattern of mitogen-activated protein kinases. **J. Nutr**.132: 2814-2818. 2002.
- Brosens, L. A.; Offerhaus, G.J.; Giardello, F.M. Hereditary Colorectal Cancer: Genetics and Screening. **SurgClin North Am**, v 95, n. 5, p.1067-80. Oct 2015.
- Brown LM. Epidemiology of alcohol-associated cancers. **Alcohol**. 35: 161–168 (2005).
- Canavan C., Abrams K.R., Mayberry J. Meta-analysis: Colorectal and small bowel cancer risk in patients with crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Therap*;23:1097–1104. 2006.
- Cardoso JFR., Cohen C., Jordão Jr. AA, Vannuchi H., Garcia SB., Zucolotto S. Light and Moderate Doses of Ethanol in Chemical Carcinogenesis of the Colon in Rats. **Nutrition and Cancer**; 63 (7): 1029-1035. 2011.
- Che TCH, Francois S, Bouchetb S, Chapelb A, Forgue-Lafitte ME. Early lesions induced in rat colon epithelium by N-methyl-N_-nitro-N-nitrosoguanidine. **Tissue and Cell**; 42: 190–194. 2010.

- Cheng YD, Yang H, Chen GQ, Zhang ZC. Molecularly targeted drugs for metastatic colorectal cancer. **Drug Des Devel Ther.** 1;7:1315-22. 2013.
- Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, van den Brandt PA, Colditz GA, Folsom AR, Freudenheim JL, Giovannucci E, Goldbohm RA, Graham S, Holmberg L, Kim DH, Malila N, Miller AB, Pietinen P, Rohan TE, Sellers TA, Speizer FE, Willett WC, Wolk A, Hunter DJ. Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. **Ann Intern Med.** 140:603–613. 2004.
- Cottart, C. H., Nivet-Antoine, V., Laguillier-Morizot, C., Beaudeau, J. L., Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. **Mol. Nutr. Food Res.** p. 54, 7–16. 2010.
- Cross A.J., Boca S., Freedman N.D., Caporaso N.E., Huang W.Y., Sinha R., Sampson J.N., Moore S.C. Metabolites of tobacco smoking and colorectal cancer risk. **Carcinogenesis**;35:1516–1522. 2014.
- Delmas D, Rébé C, Lacour S et al. Resveratrol-induced Apoptosis Is Associated with Fas Redistribution in the Rafts and the Formation of a Death-inducing Signaling Complex in Colon Cancer Cells. **The Journal Of Biological Chemistry.** 278(42): 41482–41490, 2003.
- Ding Li, Yan Na Ding, Yuan Lin, Jian Ming Wen, Ling Xue. Proteins related to early changes in carcinogenesis of hepatic oval cells after treatment with methyl nitro nitrosoguanidine. **Experimental and Toxicologic Pathology** 66 139– 146. 2014.
- Eaden J.A., Abrams K.R., Mayberry J.F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: A meta-analysis. **Gut**;48:526–535. 2001.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell.** ;61:759–767. 1990.
- Feng Y, Bommer GT, Zhao J, Green M, Sands E, Zhai Y, Brown K, Burberry A, Cho KR, Fearon ER. Mutant KRAS promotes hyperplasia and alters differentiation in the colonepithelium but does not expand the presumptive stem cell pool. **Gastroenterology**; 141: 1003-1013. 2011.

- Ferlay J., et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n5, p. E359-86. 2015.
- Fidler M, Soerjomataram I. and Bray F. A global view on cancer incidence and national levels of the human development index. *Int. J. Cancer*: 139, 2436–2446. 2016.
- Fine SW, Lisanti MP, Galbiati F et al. Elevated expression of caveolin-1 in adenocarcinoma of the colon. **Am J Clin Pathol** 115:719–724. 2001.
- Frampton, G., Lazcano, E., Huang L., Mohamad, A. and DeMorrow S.. Resveratrol enhances the sensitivity of cholangiocarcinoma to chemotherapeutic agents. **Lab Invest**. Sep; 90(9): 1325–1338. 2010.
- Fulda, S. & K. M. Debatin: Resveratrol-mediated sensitisation to TRAIL-induced apoptosis depends on death receptor and mitochondrial signalling. **Eur J Cancer**, 41, 786-98. 2005.
- Gapstur SM, Potter JD, Folsom AR. Alcohol consumption and colon and rectal cancer in postmenopausal women. **Int J Epidemiol**; 23:50–57. 1994.
- Garcia S.B. et al. The clonal origin and clonal evolution of epithelial tumours. *Int. J. Exp. Path.* 81, 89–116. 2000.
- Gillen C D, Walmsley R S, Prior P, Andrews H A, Allan R N. Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. **Gut**; 35: 1590-1592. 1994.
- Gomes M.J., Ribas-Filho J.M., Malafaia O., Czecko N.G., Marcondes Ribas C.A.P., Nassif P.A.N., Pauletto L., Bittencourt M. Avaliação da expressão da caspase-3 no adenocarcinoma colorretal através de um sistema computadorizado de análise de imagem. **ABCD, arq. bras. cir. dig.** vol.21 no.1 São Paulo Jan./Mar. 2008.
- GONG W.-H., ZHAO N, Z.-M. ZHANG, Y.-X. ZHANG, L. YAN, J.-B. The inhibitory effect of resveratrol on COX-2 expression in human colorectal cancer: a promising therapeutic strategy. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**; 21: 1136-1143. 2017.

- Grivennikov S.I. Inflammation and Colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. **Semin Immunopathol.** v. 35, n.2 p.229-44. 2013.
- Gustavsson B, Carlsson G, Machover D, et al. A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. **Clin Colorectal Cancer**;14(1):1–10. 2015.
- GUZIŃSKA-USTYMOWICZ K, PRYCYNICZ A, KEMONA A. and CZYŻEWSKA J. Correlation between Proliferation Markers: PCNA, Ki-67, MCM-2 and Antiapoptotic Protein Bcl-2 in Colorectal Cancer. **Anticancer Research** vol. 29 no. 8 3049-3052. August 2009.
- Holden, S.E. Diabetes and Cancer. **Endocr Dev**, v. 31, p. 135-45, 2016.
- Jacobsen H, Poulsen M, Dragsted LO, Ravn-Haren G, Meyer O, Lindecrona RH. Carbohydrate Digestibility Predicts Colon Carcinogenesis in Azoxymethane-Treated Rats. **Nutrition and Cancer**; 55: 163–170. 2006.
- Jass JR. Pathogenesis of colorectal cancer. *Surg Clin North Am*; 82: 891-904. 2002
- Jeon, S.Y. , Hwang, K.A. , Choi, K.C. Effect of steroid hormones, estrogen and progesterone, on epithelial mesenchymal transition in ovarian cancer development. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 158, 1–8. 2016.
- Johns L.E., Houlston R.S. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. **Am. J. Gastroenterol**;96:2992–3003. 2001.
- Johnson CM1, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, Berry DA. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. **Cancer Causes Control.** 24(6):1207-22. 2013.
- Joseph A. Baur and David A. Sinclair. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY.** 493 – 506. 2006.
- Kalluri, R. , Weinberg, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J. Clin. Invest.** 119, 1420–1428. 2009.
- Kim C.W., Hwang K.A., Kyung-Chul Choi K.C. Anti-metastatic potential of resveratrol and its metabolites by the inhibition of epithelial-mesenchymal transition,

migration, and invasion of malignant cancer cells. **Phytomedicine** n.23. 1787–1796. 2016.

Kroon, P.A. , Iyer, A. , Chunduri, P. , Chan, V. , Brown, L. The cardiovascular nutraceutical pharmacology of resveratrol: pharmacokinetics, molecular mechanisms and therapeutic potential. **Curr. Med. Chem.** 17, 2442–2455. 2010.

LANDRAULT N., LARRONDE F., DELAUNAY JC., CASTAGNINO C, VERCAUTEREN J., MERILLON JM., GASC F., CROS G. AND TEISSEDRE P.L. Levels of Stilbene Oligomers and Astilbin in French Varietal Wines and in Grapes during Noble Rot Development. **J. Agric. Food Chem.** v.50, 2046-2052. 2002.

Lavezzi AM, Ottaviani G, De Ruberto F, Fichera G, Maturri L: Prognostic significance of different biomarkers (DNA content, PCNA, karyotype) in colorectal adenomas. **Anticancer Res** 22: 2077-2081, 2002.

Li, W. , Ma, J. , Ma, Q. , Li, B. , Han, L. , Liu, J. , Xu, Q. , Duan, W. , Yu, S. , Wang, F. , Wu, E. Resveratrol inhibits the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via suppression of the PI-3K/Akt/NF-kappaB pathway. **Curr. Med. Chem.** 20, 4185–4194. 2013.

Liang P.S., Chen T.Y., Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis. **Int. J. Cancer**;124:2406–2415. 2009.

Lin, H.Y. , Shih, A. , Davis, F.B. , Tang, H.Y. , Martino, L.J. , Bennett, J.A. , Davis, P.J. Resveratrol induced serine phosphorylation of p53 causes apoptosis in a mutant p53 prostate cancer cell line. **J. Urol.** 168, 748–755. 2002.

Longnecker MP, Orza MJ, Adams ME, Vioque J, Chalmers TC. A meta-analysis of alcoholic beverage consumption in relation to risk of colorectal cancer. **Cancer Causes Control**; 1:59–68. 1990.

Marmol et al. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. **Int J Mol Sci** 18 (1). Jan 19. 2017

- Marshman E, Ottewell PD, Potten CS, Watson AJ. Caspase activation during spontaneous and radiation-induced apoptosis in the murine intestine. **J Pathol.** ;195(3):275-6. 2001.
- Martinez-Useros J., Garcia-Foncillas J. Obesity and colorectal cancer: Molecular features of adipose tissue. **J. Transl. Med**;14:21. 2016.
- Maurin N, Lafitte MEF, Levy P, Zimmer A, Bara J. Progression of tumors arising from large ACF is associated with the MUC5AC expression during rat colon MNNG carcinogenesis. **Int. J. Cancer**; 120: 477–483. 2006.
- Micallef M, Lexis L, Lewandowski P. Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. **Nutr J.** 24;6:27. 2007
- Moon BS, Jeong WJ, Park J, Kim TI, Min do S, Choi KY. Role of oncogenic K-Ras in cancer stem cell activation by aberrant Wnt/ β -catenin signaling. **J Natl Cancer Inst**; 106. 2014.
- Ndiaye, M., Kumar, R., Ahmad, N. Resveratrol in cancer management: where are we and where we go from here. **Ann. NY Acad. Sci.** 1215, 144–149. 2011.
- Obuch JC., Ahnen DJ. Colorectal Cancer: Genetics is Changing Everything ;45(3):459-76. **Gastroenterol Clin North Am.** 2016.
- Palla et al; gamma-H2AX: Can it be established as a classical cancer prognostic factor? **Tumor Biology** 1–11. 2017.
- Park JY, Mitrou PN, Dahm CC, Luben RN, Wareham NJ, Khaw KT, Rodwell SA. Baseline alcohol consumption, type of alcoholic beverage and risk of colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Norfolk study. **Cancer Epidemiol**;33:347–354. 2009.
- Patel, K. R., Brown, V. A., Jones, D. J., Britton, R. G. et al., Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. **Cancer Res.** p. 70, 7392–7399. 2010.

- Patlolla JM, Swamy MV, Raju J, Rao CV. Overexpression of caveolin-1 in experimental colon adenocarcinomas and human colon cancer cell lines. **Oncol Rep.** May;11(5):957-63. 2004.
- Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death Differ.** 6(2):99-104. 1999.
- Pöschl G., Seitz H.K. Alcohol and cancer. **Alcohol Alcoholism**;39:155–165. 2004.
- Potten CS, Kellett M, Roberts SA, Rew DA, Wilson GD. Measurement of in vivo proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine. **Gut**; 33: 71-78. 1992.
- Qasim B.J., Hussam H. Ali, and Alaa G. Hussein. Immunohistochemical Expression of PCNA and CD34 in Colorectal Adenomas and Carcinomas Using Specified Automated Cellular Image Analysis System: A Clinicopathologic Study. **Saudi J Gastroenterol.** Jul-Aug; 18(4): 268–276.2012.
- Qian N, Ueno T, Kawaguchi-Sakita N, Kawashima M, Yoshida N, Mikami Y, Wakasa T, Shintaku M, Tsuyuki S, Inamoto T, Toi M. Prognostic significance of tumor/stromal caveolin-1 expression in breast cancer patients. **Cancer Sci**; 102: 1590-1596. 2011.
- Quest A.F, Torres V.A, Rodriguez D.A, Gutierrez-Pajares J. and Tapia J.C. Caveolin-1 in Colon Cancer: The Flexible Connection to Wnt Signaling. Caveolins in Cancer Pathogenesis, Prevention and Therapy. **Current Cancer Research**, Springer Science+Business Media, LLC. 2012.
- Quest AF, Gutierrez-Pajares JL, Torres VA Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer. **J Cell Mol Med** 12:1130–1150. 2008.
- Quest AF, Leyton L, Parraga M. Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. **Biochem Cell Biol** 82:129–144. 2004.
- Raskov H, Pommergaard HC, Burchardt J, Rosenberg J. Colorectal carcinogenesis--update and perspectives. **World J Gastroenterol.** 28;20(48):18151-64. 2014
- Razani B, Woodman SE, Lisanti MP Caveolae: from cell biology to animal physiology. **Pharmacol Rev** 54:431–467. 2002.

- Robertson D.J. ABC of colorectal cancer. **Gastroenterology**;143:868–869. 2012.
- Roy U.K.B., Henkhaus R.S., Loupakakis F., Cremolini C., Gerner E. W. and Ignatenko N. A.. Caveolin-1 is a novel regulator of K-RAS-dependent migration in colon carcinogenesis. **Int. J. Cancer**: 133, 43–58. 2013.
- Saiko, P. , Szakmary, A. , Jaeger, W. , Szekeres, T. Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad. *Mutat. Res.* 658, 68–94. 2008
- Santarelli R.L.L., Pierre F., Corpet D.E. Processed meat and colorectal cancer: A review of epidemiologic and experimental evidence. **Nutr. Cancer**. 60:131–144. 2008.
- Sautter CK, Denardin S, Alves A.O, Mallmann CA, Penna NG, Hecktheuer LH. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**,Campinas, 25(3): 437-442. 2005.
- Savio, M. , Ferraro, D. , Maccario, C. , Vaccarone, R. , Jensen, L.D. , Corana, F., Mannucci, B. , Bianchi, L. , Cao, Y. , Stivala, L.A. Resveratrol analogue 4,4 - dihydroxy-trans-stilbene potently inhibits cancer invasion and metastasis. **Sci. Rep.** 6, 19973 . 2016.
- Schneider Y, Duranton B, Gosse F, Schleiffer R, Seiler N, Raul, F. Resveratrol inhibits intestinal tumorigenesis and modulates host-defense-related gene expression in an animal model of human familial adenomatous polyposis. **Nutr. Cancer**. 39: 102–107. 2001.
- Seth D, Haber PS, Syn WK, Diehl AM, Day CP. Pathogenesis of alcohol-induced liver disease: classical concepts and recent advances. **J Gastroenterol Hepatol**. 26(7):1089-105. 2011.
- Sharma et al; Histone H2AX Phosphorylation: A Marker for DNA Damage. **Methods in Molecular Biology** pp 613-626. 2012.
- Sharmila Shankar, Gyanendra Singh, Rakesh K. Srivastava. Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. **Frontiers in Bioscience** 12, 4839-4854. Sep 2007.

- Shih, A. , Zhang, S. , Cao, H.J. , Boswell, S. , Wu, Y.H. , Tang, H.Y. , Lennartz, M.R. , Davis, F.B. , Davis, P.J. , Lin, H.Y. Inhibitory effect of epidermal growth factor on resveratrol-induced apoptosis in prostate cancer cells is mediated by protein kinase C-alpha. **Mol. Cancer Ther.** 3, 1355–1364. 2004.
- Siegel R., DeSantis C., Jemal, A. Colorectal Cancer Statistics, **CA Cancer J Clin**;64:104-117. 2014.
- Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention. **Journal of Clinical Laboratory Analysis** 11:287–313. 1997.
- Son, H. , Moon, A.. Epithelial-mesenchymal Transition and Cell Invasion. **Toxi- col. Res.** 26, 245–252. 2010.
- Steffens S, Schrader AJ, Blasig H, Vetter G, Eggers H, Tränkenschuh W, Kuczyk MA, Serth J. Caveolin 1 protein expression in renal cell carcinoma predicts survival. **BMC Urol**; 11: 25. 2011.
- Stewart BW, Wild CP,. World Cancer Report 2014. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**. 2014.
- Takayama T. et al. ABERRANT CRYPT FOCI OF THE COLON AS PRECURSORS OF ADENOMA AND CANCER. **N Engl J Med**;339:1277-84.1998.
- Taniguchi E., Nakajima H. Hongyo, T. Fukuda K., L.Y. Lia, M. Kurooka, H. Matsuda T. Nomura. Effects of N-methyl-N0-nitro-N-nitrosoguanidine on the human colorectal polyps consecutively maintained in SCID mice. **Cancer Letters** 182 127–133. 2002.
- Tennant D.A., Duran R., Boulahbel H.,Gottlieb E. Metabolic transformation in cancer. **In genesis** vol.30 no.8 pp.1269–1280, 2009.
- Tessitore L, Davit A, Sarotto I, et al. Resveratrol depresses the growth of colorectal aberrant crypt foci by affecting bax and p21(CIP) expression. **Carcinogenesis** 21:1619–22. 2000.
- Tian X, Liu Z, Niu B, Zhang J, Tan TK, Lee SR et al. E-cadherin/beta-catenin complex and the epithelial barrier. **J Biomed Biotechnol**. 2011.

- Tsukamoto, H., Mizoshita, T., Katano, T., Hayashi, N., Ozeki, K., Ebata, M., Takaya Shimura, T., Yoshinori M, Satoshi T, Kataoka, H., Tetsuya Tsukamoto, Masae T, Takashi J. Preventive effect of rebamipide on N-methyl-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology** 67. 271–277. 2015.
- Vigneri, P.G. et al. The insulin/IGF System in Colorectal Cancer Development and Resistance to Therapy. **Front Oncol**, v. 5, p.230, 2015.
- Wang S, Wang Z, Yang S, Yin T, Zhang Y, Qin Y, Weinreb RN, Sun X. Tissue Distribution of *trans*-Resveratrol and Its Metabolites after Oral Administration in Human Eyes. **J Ophthalmol**. 2017
- Wang X.S et al ;Caspase-3 expression in metastatic lymph nodes of esophageal squamous cell carcinoma is prognostic of survival. **World J Gastroenterol** April 21; 20(15): 4414-4420. 2014.
- Willett W.C. Diet and cancer: An evolving picture. **JAMA**. ;293:233–234.2005.
- Williams & Lisanti. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. **Am J Physiol Cell Physiol** 288: C494–C506, 2005.
- Wilson TJ, Ponder BA, Wright NA. Use of a mouse chimaeric model to study cell migration patterns in the small intestinal epithelium. **Cell Tissue Kinet**; 18: 333-344. 1985.
- Wimmer K, Kratz CP, Vasen HF, Caron O, Colas C, Entz-Werle N, Gerdes AM, Goldberg Y, Ilencikova D, Muleris M, Duval A, Lavoine N, Ruiz-Ponte C, Slavc I, Burkhardt B, Brugieres L. Diagnostic criteria for constitutional mismatch repair deficiency syndrome: suggestions of the European consortium 'care for CMMRD' (C4CMMRD). **J Med Genet**; 51: 355-365. 2014.
- Wong W-M, Mandir N., Goodlad R. A., Wong, BCY Garcia, S. B., S-K Lam, N A Wright. Histogenesis of human colorectal adenomas and hyperplastic polyps: the role of cell proliferation and crypt fission. **Gut**;50:212–217. 2002.
- Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. **World J Gastroenterol**; 13: 3784-3791. 2007.

- Xu, Q. , Zong, L. , Chen, X. , Jiang, Z. , Nan, L. , Li, J. , Duan, W. , Lei, J. , Zhang, L. , Ma, J. , Resveratrol in the treatment of pancreatic cancer. **Ann. NY Acad. Sci.** 1348, 10–19. 2015.
- Yan-Fang A, Yong M, Jing-Hua L. The expressions of PCNA and Bcl-2 in colorectal adenoma and carcinoma and their clinicopathological and prognostic significance. **Acta Acad Med Xuzhou**;6:11–17.2006.
- Zhao R, Michor F. Patterns of proliferative activity in the colonic crypt determine crypt stability and rates of somatic evolution. **PLoS Comput Biol.** 2013.
- Zhao Zhi. Loss of stromal caveolin-1 expression in colorectal cancer predicts poor survival. **World J Gastroenterol**; 21(4): 1140-1147. 2015.
- Zi-Jian T, Li D. The Expression of p53and PCNA and their significance in colorectal neoplasm. **J Basic ClinOncol**;6:40–8. 2001