UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Bianca Gasparotto

**Efeitos da síntese epitelial de serotonina sobre o
desenvolvimento da carcinogênese de cólon**

Ribeirão Preto

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeitos da síntese epitelial de serotonina sobre o
desenvolvimento da carcinogênese de cólon**

Bianca Gasparotto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco, e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Oncologia.

Opção: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Kannen
Cardoso

Ribeirão Preto

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Gasparotto, Bianca

Efeitos da síntese epitelial de serotonina sobre o desenvolvimento da carcinogênese de cólon, 2017.

78p. : il.; 30cm

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco, e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Oncologia. Opção: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica

1. Cólon. 2. Câncer. 3. Carcinogênese. 4. Serotonina. 5. Dano DNA

1. Colon. 2. Cancer. 3. Carcinogenesis. 4. Serotonin. 5. DNA damage

Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve.

A vida é muito para ser insignificante.

Charles Chaplin

ÍNDICE

FOLHA DE AVALIAÇÃO	8
DEDICATÓRIA	9
AGRADECIMENTO	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Um sistema extremamente complexo	14
1.1.1 O sistema neuroendócrino colônico	14
1.1.2 Serotonina	15
1.1.3 A atividade serotoninérgica na carcinogênese de cólon	16
1.2 Incidência e fatores de risco para o câncer de cólon	17
1.2.1 Aspectos gerais da carcinogênese de cólon	18
1.2.2 Um modelo experimental para a carcinogênese de cólon	20
2 OBJETIVO	22
2.1 Objetivos Gerais	23
2.1.1 Objetivos Específicos	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Animais	25
3.1.1 Manutenção e expansão de colônias	25
3.1.2 Preparo e aplicação do carcinógeno AOM	25
3.1.3 Eutanásia	26
3.2 Experimentos	26
3.2.1 Experimento I	26
3.2.2 Experimento II	27

3.2.3	Experimento III	27
3.2.4	Experimento IV	28
3.2.5	Experimento V	28
3.2.6	Experimento VI	28
3.2.7	Experimento VII	28
3.3	Quantificação de 5-HT	28
3.4	Técnicas histopatológicas	29
3.4.1	Coloração e detecção de ACFs	30
3.4.2	Análise de proliferação	31
3.4.3	Análise de cripta altamente marcadas por β -Catenin	32
3.4.4	Análise de Tunel	32
3.5	Análises genéticas	33
3.5.1	Genotipagem de animais	33
3.5.2	Quantificação da expressão gênica e número de cópias de DNA	35
3.5.1	Sequenciamento por SANGER	36
3.6	Análise colonoscópica	37
3.7	Análise estatística	37
4	RESULTADOS	38
4.1	O carcinógeno azoximetano modula o sistema serotoninérgicos no cólon intestinal	39
4.2	O carcinógeno azoximetano altera mecanismos de reparo celular induzindo a formação de lesões preneoplásicas no cólon intestinal	43
4.3	A serotonina modula o desenvolvimento de tumores no cólon intestinal	49

4.4	A serotonina modula o desenvolvimento de tumores no cólon intestinal	51
4.5	A síntese serotoninérgica modula o número de lesões preneoplásicas e a intensidade de dano ao DNA de células epiteliais colônicas	54
5	DISCUSSÃO	57
5.1	Padronização da resposta serotoninérgica em um modelo experimental de carcinogênese de cólon	58
5.2	Efeitos da síntese de 5-HT no desenvolvimento da carcinogênese de cólon experimental	60
6	CONCLUSÃO	63
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
8	ANEXOS	77

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GASPAROTTO, Bianca

Título: Efeitos da síntese epitelial de serotonina sobre o desenvolvimento da carcinogênese de cólon

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco, e Terapia Celular para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais Gislaine e José, e à minha irmã Beatriz, que sempre acreditaram no meu potencial e me incentivaram.

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador Prof. Dr. Vinicius Kannen Cardoso, pela oportunidade que me foi concedida, pela paciência e por compartilhar seu conhecimento acadêmico, me proporcionando um amadurecimento profissional ao longo desses anos.

Ao Professor Sergio Akira pela disponibilização do laboratório, equipamentos e discussões pertinentes.

A todos os docentes e funcionários da FCFRP-USP e FMRP-USP pela disponibilidade de equipamentos e demais contribuições.

À secretaria do Departamento de Oncologia, pela disponibilidade, eficiência e prontidão.

Aos professores titulares e suplentes da banca examinadora, por aceitarem a participação e pela colaboração com importantes sugestões.

Aos técnicos por toda dedicação, paciência e conhecimento.

À minha família, pelo total apoio sempre.

Aos colegas de trabalho pela harmoniosa convivência.

Aos amigos que fiz durante o período de mestrado e vou levar para vida, agradeço por cada abraço, desabafo e risadas.

Aos meus amigos de Rio Claro, que me apoiaram, incentivaram e me acalmaram nos momentos difíceis.

À FAPESP, pela bolsa e pela reserva técnica concedida durante o desenvolvimento deste trabalho.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

GASPAROTTO, B. **Efeitos da síntese epitelial de serotonina sobre o desenvolvimento da carcinogênese de cólon.** 2017. 78f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A serotonina (5-HT) é um neuro-hormônio com complexos efeitos em humanos e animais. Embora se acredite que a sinalização serotoninérgica promova o desenvolvimento de tumores de cólon, também tem sido observado que a redução dos níveis de 5-HT aumenta o risco de malignidades neste órgão. Assim, é necessário investigar como a síntese de 5-HT modula a carcinogênese de cólon. Esta hipótese será explorada em experimentos mecanísticos envolvendo a exposição ou não de camundongos a um agente carcinogênico (azoximetano). Estes experimentos revelaram que a exposição carcinogênica aumentou a síntese de 5-HT no cólon, uma vez que os processos de liberação e degradação de 5-HT foram reduzidos, enquanto que a sua síntese e recaptação aumentaram. Após 24 semanas da 1ª exposição carcinogênica, a deleção da síntese de 5-HT promoveu a multiplicidade tumoral no cólon, enquanto que ao longo de 12 semanas ocorreu um aumento de lesões preneoplásicas e proliferação celular. É interessante que 72 hrs após a sexta e última exposição carcinogênica o número de criptas aberrantes foram detectadas reduzidas na ausência de 5-HT, o que ocorreu em conjunto com uma redução da atividade proliferativa, aumento de células apoptóticas, e maior dano de DNA. Finalmente, a 5-HT modulou mecanismos de reparo genômico. Concluímos que a síntese serotoninérgica parece ser um fator de proteção do cólon intestinal, que caso inibida facilitaria o desenvolvimento tumoral neste tecido.

ABSTRACT

GASPAROTTO, B. Effects of serotonin epithelial synthesis on the development of colon carcinogenesis. 2017. 78f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Serotonin (5-HT) is a neurohormone with complex effects in humans and animals. Although serotonergic signaling has been suggested to promote the development of colon tumors, the reduction in 5-HT levels was reported to increase the risk of colon cancer. Here, we sought to investigate how 5-HT synthesis modulates colon carcinogenesis. This hypothesis was explored in mechanistic experiments that carcinogenically exposed or not mice to azoxymethane. It revealed that carcinogenic exposure increased the synthesis of 5-HT in the colon since 5-HT release and decay were inhibited, while its synthesis and reuptake are promoted. After 24 weeks from the first carcinogenic exposure, the deletion of 5-HT synthesis increased tumor multiplicity, while following 12 weeks it promoted the development of preneoplastic lesions, and cell proliferation in the colon. Interestingly, 72 hrs after the sixth and last carcinogenic exposures the number of aberrant crypts were detected reduced in the absence of 5-HT, which occurred together with a reduced proliferation, but increased apoptosis and DNA damage. Finally, 5-HT modulated genomic repair mechanisms. We conclude that serotonergic synthesis seems to be a protective factor of the intestinal colon, which inhibited case facilitates tumor development in this tissue.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Um sistema extremamente complexo

Composto por glândulas altamente vascularizadas, o sistema neuroendócrino apresenta um grande número de células granulares secretoras e vacuolares. A sua regulação sobre funções metabólicas, de crescimento, de sono-vigília, cognitivas, entre outras, ocorre a partir da liberação na circulação sanguínea de moléculas sinalizadoras ou hormônios (Axelrod 1974, Santos *et al.* 2000).

1.1.1 O sistema neuroendócrino colônico

As células neuroendócrinas apresentam uma atividade altamente especializada. Estas células agem primariamente e fisiologicamente como parte do sistema de ativação e controle da secreção de neurotransmissores do reflexo peristáltico, o que permite a comunicação entre epitélio e nervos vagais aferentes. Isto significa que o sistema neuroendócrino intestinal é capaz de, em associação com neurônios entéricos, produzir e liberar uma vasta gama de neuro-hormônios na circulação sanguínea. É necessário salientar que células-tronco epiteliais localizadas na base das criptas intestinais se diferenciam em células neuroendócrinas, sendo estas últimas responsáveis pela síntese de até 90% do volume total de serotonina (5-HT) circulante (Hubel 1985, Thompson *et al.* 1990, Costedio *et al.* 2007, Rindi *et al.* 2010).

1.1.2 Serotonina

Há mais de meio-século sabemos que as mais altas concentrações de 5-HT são detectadas no trato gastrointestinal (Erspamer and Testini 1959). Na verdade, a 5-HT controla o processo digestivo desde o momento em que a comida entra na cavidade oral, uma vez que a ativação de células sensoriais na língua ativa a sua liberação em neurônios sensoriais aferentes que transmitem a informação ao sistema nervoso central. Isto significa que o sistema serotoninérgico controla os movimentos peristálticos que empurram o bolo alimentar através do trato gastrointestinal, além de também regular a liberação de enzimas pancreáticas (Walther *et al.* 2003, Berger *et al.* 2009, Paulmann *et al.* 2009)

Os efeitos do sistema serotoninérgico são amplos, pois podem afetar desde funções gastrointestinais, aprendizado, ciclo sono-vigília, comportamento, crescimento, até atividades reprodutivas (Hubel 1985, Banerjee *et al.* 2007, Costedio *et al.* 2007). Especificamente, em células neuroendócrinas intestinais, a interação entre duas enzimas [triptofano hidroxilase I (Tph1), descarboxilase de aminoácidos L-aromáticos (DDC)] é essencial para a síntese de 5-HT a partir do triptofano; ou seja, enquanto que a Tph1 metaboliza o triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP), a DDC transforma o 5-HTP em 5-HT (Cote *et al.* 2003, Walther *et al.* 2003, Spiller 2008).

Um dos mecanismos serotoninérgicos melhor caracterizados é a liberação de 5-HT a partir da atividade de ATP (trifosfato de adenosina) por estimulação mecânica. Neste modelo, receptores mecanosensitivos estimulam a liberação de ATP e sua metabolização em ADP (difosfato de adenosina) por

ATPases ectópicas. Ao ser liberado, a ADP ativa receptores de proteína G na membrana celular. Isto induz a hidrólise de fosfolipídeos pela fosfolipase-C, que sintetiza IP3 (trifosfato de inositol). Então, IP3 se liga ao seu receptor no retículo endoplasmático mobilizando cálcio de estoques intracelulares, o que aumenta a liberação de 5-HT a partir de grânulos secretórios em células neuroendócrinas (Xue *et al.* 2007, Spiller 2008).

Após ser liberada, a 5-HT se difunde rapidamente na lamina própria intestinal e é rapidamente reconhecida por terminais nervosos, enterócitos, e células endoteliais vasculares. Este processo é inibido através da recaptação serotoninérgica intestinal, principalmente pela atividade de SERT (transportador de 5-HT), que é ativado pelos gradientes de Na^+ na membrana plasmática através da bomba Na^+/K^+ ATPase. A atividade de SERT é inibida pela fosforilação de PKC (proteína quinase C), que induz a sua internalização (Spiller 2008, Sikander *et al.* 2009). Além do mais, a conversão de 5-HT em ácido 5-hidroxiindoleacético (5-HIAA) é realizada pela MAO (monoamina oxidase) e ALDH (aldeído desidrogenase) (Fujimiya *et al.* 1997, Sikander *et al.* 2009).

1.1.3 A atividade serotoninérgica na carcinogênese de cólon

Como descrito acima, a 5-HT age como um neurotransmissor ao nível do sistema nervoso central e entérico. No trato gastrointestinal, a 5-HT inicia e propaga os reflexos entéricos e a sinalização intestinal para cérebro (Gershon 2012). Desde as descobertas de Tutton e Barkla (Tutton and Barkla 1978), a 5-HT tem sido caracterizada como um promotor tumoral no cólon intestinal

(Nocito *et al.* 2008, Amini-Khoei *et al.* 2016). Assim, o reconhecimento da 5-HT por células malignas colônicas tem sido descrito como um elemento indutor do crescimento tumoral (Nocito *et al.* 2008). Contudo, este conceito parece controverso, uma vez que pacientes tratados com inibidores da recaptação de 5-HT apresentaram uma redução significativa do risco de câncer de cólon (Coogan *et al.* 2009, Chubak *et al.* 2011). Devemos observar que esta terapia aumenta os níveis extracelulares de 5-HT (Coogan *et al.* 2009, Chubak *et al.* 2011). Em ratos, descobriu-se que um antidepressivo aumentou os níveis de 5-HT no cólon intestinal, porém reduziu o risco de câncer de cólon (Kannen *et al.* 2011). Em dois outros modelos experimentais em que ocorreu um aumento no número de lesões preneoplásicas no cólon, os níveis de 5-HT foram detectados reduzidos (Kannen *et al.* 2012, Kannen *et al.* 2013). Isto significa que os efeitos da 5-HT na carcinogênese de cólon ainda estão longe de serem completamente elucidados.

1.2 Incidência e fatores de risco para o câncer de cólon

Ao redor do mundo, o carcinoma colorretal (CCR) é a terceira neoplasia maligna mais comum em homens e a segunda mais frequente em mulheres (Jemal *et al.* 2010). Contudo, esta malignidade ocupa a primeira posição no número de diagnóstico e mortes devido tumores gastrointestinais (Siegel *et al.* 2017). O câncer de cólon tem afligido humanos por milênios, sendo que a exposição crônica a certos fatores ambientais parece ser a chave para uma melhor compreensão do desenvolvimento desta patologia (David and Zimmerman 2010). Por exemplo, um estudo de patologia arqueológica detectou

que um faraó sofreu de câncer metastático hepático originário de um tumor maligno no cólon intestinal (David and Zimmerman 2010). De forma similar, outra investigação relatou que um rei que morreu no período da Idade Média morreu devido a um câncer de cólon (Marchetti *et al.* 1996). Em ambos os casos, que estavam separados por milhares de anos, fatores ambientais e estilo de vida parecem ter tido um efeito importante no desenvolvimento desta doença (David and Zimmerman 2010, Ottini *et al.* 2011). Na verdade, atualmente, sedentarismo e má alimentação estão classificados entre os principais fatores indutores de diferentes tipos de câncer (Nebert and Dalton 2006, David and Zimmerman 2010), o que também inclui os casos de câncer de cólon (Siegel *et al.* 2017). Na verdade, até 2030, é esperado que ocorra um aumento de até 60% nos casos de câncer de cólon em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil (Arnold *et al.* 2016).

1.2.1 Aspectos gerais da carcinogênese de cólon

Acredita-se que o entendimento da carcinogênese possa ser dividido em dois grandes grupos etiológicos: casos esporádicos e hereditários (Fearon and Vogelstein 1990). Uma vez que a maior prevalência dos casos de câncer de cólon seja aqueles esporádicos (Siegel *et al.* 2017), devemos considerar atentamente quais os fatores de risco para este grupo. Na tumorigênese esporádica do cólon ocorre um acúmulo exponencial e linear de mutações gênicas em conjunto com anomalias cromossômicas. Isto promove a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores tumorais, bem como daqueles relacionados ao reparo genômico (Matsuzaki *et al.* 2005). De fato as

transformações neoplásicas necessárias para que um colonócito normal seja transformado em uma célula maligna envolve uma série de alterações genéticas e epigenéticas melhor caracterizada pela hipótese adenoma-adenocarcinoma (Fearon and Vogelstein 1990).

Esta proposta teórica da evolução adenoma-adenocarcinoma descreve uma série de eventos distribuídos ao longo de três estágios principais, como: iniciação, promoção, e progressão (Fearon and Vogelstein 1990). Os eventos que ocorrem em cada uma destas etapas estão bem caracterizadas: (i) na iniciação ocorre um dano gênico irreversível, que é seguido por uma duplicação celular, onde a mutação inicial é fixada (Luebeck and Hazelton 2002, Peres *et al.* 2003, Girão *et al.* 2005, Meza *et al.* 2008); (ii) a etapa de promoção se inicia após a primeira replicação da célula mutada, e é estimulada por fatores endógenos e exógenos que também induzem novas mutações genéticas e epigenéticas em oncogenes e genes supressores de tumores, estando principalmente relacionada à alta atividade proliferativa (Luebeck and Hazelton 2002, Khare and Verma 2012, Migheli and Migliore 2012); e, (iii) na fase de progressão há o acúmulo de novas mutações e aumento do processo proliferativo, permitindo a expansão de clones celulares mutados e a transição de lesões tumorais benignas para malignas (Paulsen *et al.* 2000, Paulsen *et al.* 2005, Waldner and Neurath 2010).

1.2.2 Um modelo experimental para a carcinogênese de cólon

Em 1954, propôs-se pela primeira vez a teoria sobre radicais livres, aonde reações oxidativas ocorreriam no organismo gerando radicais livres, a partir da mitocôndria, o que ocasionaria múltiplos danos celulares, incluindo danos ao DNA (Anisimov 2007). Assim, espécies reativas de oxigênio adicionam ou abstraem átomos de hidrogênio das pares bases do DNA, o que facilita o desenvolvimento das primeiras alterações gênicas irreversíveis (Peres *et al.* 2003). Estas primeiras mutações também podem ocorrer durante o reparo do DNA danificado pelas espécies reativas de oxigênio (Carneiro *et al.* 1997, Oliveira and Germano 1997). Mutações gênicas também podem ser induzidas por agentes químicos chamados carcinógenos. Normalmente estas substâncias induzem mutações celulares através do aumento de radicais livres atingindo o DNA (Takahashi *et al.* 1998).

Atualmente, um dos carcinógenos mais utilizados para mimetizar em camundongos a evolução da carcinogênese de cólon que ocorre em humanos é o azoximetano (AOM) (Neufert *et al.* 2007). O carcinógeno AOM é um metabólito da 1,2 dimetilhidrazina (DMH), sendo ambos carcinógenos de ação indireta; ou seja, eles são procarcinógenos que necessitam de uma ativação metabólica para a liberação de espécies eletrofílicas que irão se ligar as bases nitrogenadas do DNA, formando estruturas químicas denominadas adutos. De fato, a CYP2E1 é a enzima responsável pelas várias reações oxidativas a nível hepático que irão transformar o AOM no carcinógeno ativo metilazoximetanol (MAM). O metabolito reativo, MAM, produz um íon metil diazóxido que pode alquilar macromoléculas no fígado e no cólon, incluindo a adição de

grupamentos metil na posição O⁶ ou N⁷ da guanina (O⁶-metil-desoxiguanosina e N⁷-metil-desoxiguanosina) (Sohn *et al.* 2001). Caso estas bases alteradas não sejam reparadas pela O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), pode ocorrer o estabelecimento de mutações, o que irá induzir o desenvolvimento de tumores de cólon em camundongos (Takahashi *et al.* 1998, Sohn *et al.* 2001, Neufert *et al.* 2007).

Assim, a exposição de roedores tanto ao AOM quanto ao DMH induz alterações muito bem caracterizadas que são denominadas focos de criptas aberrantes (ACFs). Estas lesões de apresentam na forma de criptas colônicas com luz dilatada, contorno irregular, marcada basofilia, aumento proliferativo, diminuição de células mucosas, estratificação e perda da polaridade celular (Bird 1995). Também, estas lesões são normalmente acompanhadas por uma alta atividade proliferativa na base das criptas colônicas, e por um deslocamento a cima destas áreas proliferativas (Rogers and Newberne 1975, Rodrigues *et al.* 2002). Estas lesões são consideradas precursoras de pólipos adenomatosos e lesões tumorais em roedores e humanos (Pretlow *et al.* 1991, Nucci *et al.* 1997, Rowland *et al.* 1998, Paulsen *et al.* 2000, Paulsen *et al.* 2005, Paulsen *et al.* 2006, Maurin *et al.* 2007).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivos Gerais

Este trabalho se propõe a investigar como a síntese de 5-HT pode modular o desenvolvimento da carcinogênese.

2.1.1 Objetivos Específicos

1- Verificar o efeito de diferentes doses do carcinógeno AOM sobre os níveis de 5-HT no cólon intestinal.

2- Analisar a expressão de elementos envolvidos na atividade serotoninérgica no cólon intestinal.

3- Verificar eventos chaves para o desenvolvimento de lesões preneoplásicas a nível microscópico e molecular

4-Verificar o efeito da síntese de 5-HT sobre o desenvolvimento das fases iniciais e tardias da carcinogênese de cólon.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

3.1.1 Manutenção e expansão de colônias

Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (14.1.296.53.3). A linhagem de camundongos Tph1 *knockout* (Tph1KO) foi doada pelo Prof. Dr. Michael Bader (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch, Alemanha). Colônias foram estabelecidas e expandidas no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP). Salas de cruzamento e experimentação foram mantidas em condições idênticas como se segue: temperatura ambiente constante e ciclo noite-dia 12/12h. Os animais seguiram um regime *ad libitum* que é baseado no livre acesso ao alimento e água 24h por dia, com consumo médio de 5g de ração e 6ml de água por animal adulto.

3.1.2 Preparo e aplicação do carcinógeno AOM

De acordo com descrição prévia (Neufert *et al.* 2007), o carcinógeno AOM (Sigma-Aldrich, EUA; A5486) foi preparado na dose de 10mg/kg. A diluição do carcinógeno foi feita em soro fisiológico. Alíquotas de 100 mg/ml foram conservadas à -20°C, sendo a solução de aplicação no camundongo (100 µL) preparada imediatamente antes do uso. Toda a manipulação do AOM foi realizada pelo pesquisador equipado com itens de segurança obrigatórios (jaleco, máscara, luvas), e em capela com sistema de exaustão. Todos os recipientes, ponteiras, pipetas, seringas, luvas e materiais que tenham entrado

em contato com o carcinógeno foram descartados em *descarpack* e incinerados pelo departamento responsável da universidade.

3.1.3 Eutanásia

Animais foram anestesiados com o anestésico tribromoetanol (TBE) (aproximadamente 60ul/animal). Então, após abertura completa da cavidade abdominal, o cólon foi retirado e lavado com solução salina, após a peça foi aberta longitudinalmente pela borda mesentérica e submetida ao exame macroscópico. Em seguida o cólon foi seccionado em amostras de 1cm cada. As duas primeiras amostras distais foram colocadas em papéis filtro e em cassetes e fixadas em formol tamponado 10% durante 24 horas para análises histopatológicas, enquanto que o restante foi armazenado em criotubos e conservado primeiramente no nitrogênio líquido e depois transferido para um freezer de -80°C.

3.2 Experimentos

3.2.1 Experimento I

Camundongos machos Tph1 selvagens (WT; idade de 8 semanas) foram expostos ao carcinógeno AOM de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 1. Desenho experimental I

<i>Grupos</i>	<i>AOM</i>	<i>Eutanásia</i>	<i>Nºanimais/grupo</i>
1	Controle		
2	1º dose		
3	2º dose		
4	3º dose	72 horas	8
5	4º dose		
6	5º dose		
7	6º dose		

3.2.2 Experimento II

Camundongos Tph1 selvagens (Tph1WT) foram expostos as 6 aplicações de AOM, sendo eutanasiados 72h e 1 semana após a última aplicação de AOM.

3.2.3 Experimento III

Camundongos Tph1WT foram expostos a 1, 2, 3, ou 6 aplicações de AOM, sendo eutanasiados 72h e 1 semana após cada uma destas exposições carcinogênicas.

3.2.4 Experimento IV

Camundongos Tph1WT e Tph1KO foram expostos a seis doses de AOM ao longo de 6 semanas. Após outras 18 semanas, camundongos foram eutanasiados.

3.2.5 Experimento V

Camundongos Tph1WT e Tph1KO foram expostos a seis doses de AOM ao longo de 6 semanas. Após outras 6 semanas, camundongos foram eutanasiados.

3.2.6 Experimento VI

Camundongos Tph1WT e Tph1KO foram expostos a seis doses de AOM ao longo de 6 semanas. Após 1 semana, camundongos foram eutanasiados.

3.2.7 Experimento VII

Camundongos Tph1WT e Tph1KO foram expostos a seis doses de AOM ao longo de 6 semanas. Após 72 horas, camundongos foram eutanasiados.

3.3 Quantificação de 5-HT

Para quantificação de 5-HT as amostras foram homogeneizadas em ácido perclórico 0,2 M contendo dihidroxibenzilamina (DHBA), centrifugadas a

15000 rpm durante 20 min a 6°C e armazenadas a -70°C. Cinquenta microlitros foram injetados num sistema de HPLC-EC. O sistema de HPLC foi equipado com uma coluna de fase inversa (Hypurity Elite C18, tamanho de partícula de 250 mm x 4,6 mm, diâmetro de poro de 5m e 100 Å, Hypersil, Cheshire, UK) acoplada com detecção eletroquímica. A adição de DHBA aos extratos de tecido de camundongos não expostos e expostos ao AOM serviu como um padrão interno para controlar a perda de conteúdo de tecido. O sistema de HPLC consistiu num cromatógrafo Shimadzu LC-10 AD com um módulo de barramento de comunicação CBM-10A, uma unidade de desgaseificação DGU-14A em linha e um detector electroquímico L-ECD-6A com um eletrodo de carbono vítreo e uma bomba LC-10 AD. O potencial foi ajustado para 850 mV (versus um elétrodo de referência Ag/AgCl). Filtrou-se a fase móvel contendo 150 mM de ácido cloroacético, 120 mM de NaOH, 0,67 mM de EDTA, 0,86 mM de octilsulfato de sódio, 3,5% de acetonitrilo e 2,6% de tetrahidrofurano, ajustou-se para pH 3,0, com um caudal de 1,2 mL/Min. Todas as substâncias foram quantificadas através da comparação das áreas dos picos com as curvas padrão.

3.4 *Técnicas histopatológicas*

O processamento do tecido foi realizado por passagens consecutivas das amostras em uma série de alcoóis, xilol e parafina. Após a última etapa de parafinização, foi realizado o emblocamento dessas amostras. Assim, com uma placa aquecedora a 60°C e formas de inclusão aquecidas contendo parafina líquida, as amostras de cólon foram posicionadas para emblocamento. Estes blocos de parafina foram seccionados a 4µm de espessura em micrótomo

LEICA LM2125 RTS (Leica; DE); após, amostras teciduais foram posicionados sobre lâminas histológicas de vidro.

3.4.1 Coloração e detecção de ACFs

Lâminas foram colocadas em estufa a 60°C, para retirar excesso de parafina do tecido fixado. Os processos de desparafinização e reidratação estão descritos na tabela abaixo:

Tabela 2. Protocolo de coloração Hematoxilina e Eosina.

<i>REAGENTE</i>	<i>CONCENTRAÇ</i>	<i>TEMPO</i>
Xilol	100%; 100%	10min; 10min
Álcool	100%,	10 seg
H2O destilada		10 seg
Hematoxilina de		1min30seg
H2O corrente		Aproximadament
HCL	1%	Passada rápida
H2O destilada		
H2O com 5 gotas de		Passada rápida
H2O destilada		
Álcool	70%	Algumas
Solução Eosina-		30 seg
Álcool	80%, 95%,	10 seg
Xilol + Álcool	50%	10 seg
Xilol de montagem e	100%; 100%	10 seg

Para a análise histopatológica as amostras de cólon foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Após, adenomas foram analisados de acordo com a descrição de Ekelung e Lindström (Ekelund and Lindstrom 1974); ou seja, tumores foram classificados em lesões de alto (HD) ou baixos (LD)

grau displásico. Também, lesões preneoplásicas foram enumeradas de acordo com descrição prévia (Kannen *et al.* 2012). Esta análise foi realizada com um aumento óptico microscópico de 20x, o que permitiu a identificação de focos de cripta aberrantes displásicos (ACF) e criptas aberrantes (AC). A área total (mm^2) de cada seção analisada foi determinada com uma lente graduada (10x, Nikon, Japão). A densidade de ACF e AC por amostra foi determinado como seus valores totais por mm^2 . Análises foram realizadas em microscópio Zeiss Imager 2 (Carl-Zeiss, Alemanha).

3.4.2 Análise de proliferação

Lâminas pré-seccionadas a 4 μm foram marcadas com o anticorpo primário anti-Ki67 (ab16667; Abcam, EUA; 1:150) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras foram desparafinadas e submetidas à recuperação antigênica em tampão citrato durante 30 minutos. Em seguida, as amostras foram incubadas com um tampão de H_2O_2 a 30% (MERCK, EUA). Outro bloqueio com 3% de albumina de soro bovino (BSA) foi realizado durante 15 min. As amostras foram então expostas aos anticorpos anti-Ki67 primários monoclonais durante 16 horas a 4 ° C. A reação foi então revelada pelo kit PictureTM-MAX Polymer Detection Kit – Invitrogen Polymer Detection System, conforme indicado nas instruções do fabricante. Finalmente, as seções de tecido foram contracoradas com hematoxilina de Harris. Índice de proliferação foi determinado como o n° de células positivas pelas negativas para Ki67 por cripta.

3.4.3 Análise de cripta altamente marcadas por β -Catenin

Conforme descrito acima, amostras colônicas foram marcadas com anticorpos primários anti- β -Catenina (ab32572; 1: 400; Abcam, EUA). Os valores foram determinados como o número de criptas altamente marcadas com β -Catenina por criptas moderadamente marcadas ou negativas ($i\beta$ -Catenin).

3.4.4 Análise de Tunel

Esta reação foi realizada seguindo as instruções do fabricante para o kit APO-BRDU-IHC (Bio-Rad, Estados Unidos; APO002), que detecta células apoptóticas por IHC-P. Resumidamente, após os processos de desparafinização e reidratação, cortes histológicos foram incubados com proteinase K (1:100 em 10mM Tris pH) por 20 minutos. A inativação de peroxidases endógenas foi realizada em 3% H_2O_2 por 5 minutos. As amostras foram então expostas a solução de anticorpo (Biotin anti BRDU+Blocking buffer) por 90min. Este passo foi seguido de incubação com solução de bloqueio e solução conjugada diluída, o que precedeu a exposição ao cromógeno DAB por 15min. Finalmente, lâminas foram contra coradas com methyl Green (3min), desidratadas e cobertas com lamínulas fixadas com meio de montagem Entellan (MERCK). O índice de apoptose foi determinado como o nº de eventos apoptóticos por cripta.

3.5 Análises genéticas

3.5.1 Genotipagem de animais

Amostras auriculares (± 30 mg) foram digeridas em 10 μ L de proteinase K + 500 μ L de solução de lise (SNET) por 2h à 56°C (sob agitação de 70G) em ThermoMixer C (Eppendorf; EUA). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 min (23°C; 11200 G). O sobrenadante foi então separado em um novo tubo e o precipitado descartado. O DNA foi precipitado com 800 μ L de 2-Propanol (MERCK) e, em seguida, centrifugado (30min; 23°C; 11200 G), sendo o sobrenadante descartado. A amostra concentrada de DNA foi lavada em álcool 70% (600 μ L, MERCK), e centrifugada por outros 5min (4°C; 11200 G). Após o sobrenadante ser descartado, o DNA foi desidratado por outros 10 minutos (TA) e, finalmente, resuspendido em 50 μ L de H₂O (UltraPure Distilled Water – Invitrogen).

A metodologia básica para as reações em cadeia da polimerase (PCR) consiste na replicação *in vitro* de moléculas de DNA. Para isto utilizou-se amostras de DNA, dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), primers (*Forward* [F] e *Reverse* [R]), e uma enzima Taq-polimerase em uma solução tampão. Toda esta mistura foi colocada em um termociclador, onde esses primers flaquearam as regiões de interesse do DNA, sendo apenas estas amplificadas. As PCRs foram realizadas em um Termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Alemanha). A genotipagem de animais Tph1KO ou Tph1WT foi realizada com 3 oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) em uma única reação. Isto é possível porque o primer R (GTPH3) apresenta

complementaridade tanto para a sequência alvo do gene KO (Neo52, 303bp) quanto para a do gene WT (GTPH5, 570bp).

Tabela 3. Desenho dos *primers* Tph1 e parâmetros de ciclagem.

<i>PRIMER</i>	<i>SEQUÊNCIA</i>
GTPH5	5'-GCTTGCAGGAGTTGGTTCTC
GTPH3	5'-CAGCTCTGTGATGGACGGTA
NEO52	5'-CGTTGGCTACCCGTGATATT
<i>Temperatura</i>	<i>Ciclagem</i> <i>Tempo</i>
95°C	5 minutos
35 ciclos	
95° C	30 segundos
55° C	30 segundos
72° C	30 segundos
Término da reação	
72° C	5 minutos
4° C	Forever

A eletroforese foi realizada em gel de agarose. Assim, os géis foram preparados dissolvendo a agarose em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE). Os produtos da reação de PCR foram preparados para análise adicionando-se 3µl de *gel red*, 3µl de *loading buffer* (Invitrogen), e 10µl da amostra. Um marcador de peso molecular de 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) também foi utilizado. A mistura foi então aplicada em gel de agarose 1% submerso em tampão TAE em uma cuba de eletroforese, intercalando-se uma amostra WT e outra KO. A eletroforese foi realizada por 40 minutos em tensão de 90V. Para a visualização do resultado foi utilizado o sistema de foto-documentação ChemiDoc (BIO-RAD).

3.5.2 Quantificação da expressão gênica e número de cópias de DNA

Para a extração de DNA e RNA o Mini Kit AllPrep DNA/RNA (Ref. 80204) foi utilizado segundo o protocolo do fabricante. O kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies, EUA) foi utilizado para a síntese de cDNA, de acordo as instruções do fabricante.

A análise de expressão gênica utilizou uma variação da técnica de PCR convencional que permite o monitoramento da PCR em tempo real (qPCR). Isto possibilita a quantificação do número de cópias do alvo gênico ao término de cada ciclo. O sistema de sonda TaqMan foi utilizado.

Tabela 4. Sondas TaqMan usadas neste trabalho.

SONDA	SI	DESCRIÇÃO
Triptofano hidroxilase 1	TPH1	Mm01202614_m1
Ubiquitina C-terminal hidrolase L1	UCH1	Mm00495900_m1
Descarboxilase de aminoácidos	DDC	Mm00516688_m1
Transportador vesicular de	VMAT2	Mm00553058_m1
Transportador de serotonina	SERT	Mm00439391_m1
Monoamina oxidase	MAO	Mm00558004_m1
β -Catenin	Ctnnb1	Mm00483039_m1
O ⁶ -metilguanina-DNA	MGMT	Mm00485014
Alcano monooxigenase 1	ALKB1	Mm012968822
Gliceraldeído 3-fosfato	GADPH	Mm99999915_g1

Os *primers* descritos na Tabela 5 foram utilizados para amplificação de sequências de DNA específicas com um kit PowerUp™ SYBR® Green Master Mix para a tecnologia qRT-PCR baseada em SYBR Green de acordo com as instruções do fabricante (ThermoFisher Scientific, EUA).

Tabela 5. Desenho de *primers* MGMT, Ctnnb1, e Trp53.

<i>PRIMER</i>	<i>SEQUÊNCIA</i>
MGMT - F	CTCCCAGAGCCACGCCCCGCGT
MGMT - R	GTGCACGGGGTGGGGGCGGGG
Ctnnb1 Exon 3 - F	GCTGACCTGATGGAGTTGGA
Ctnnb1 Exon 3 - R	GCTACTTGCTCTTGCGTGAA
Trp53 CpG - F	ATGAGCGTGACGAGACCTCTC
Trp53 CpG - R	TCTCCATCGCGCTGAGTC
Trp53 E5 - F	TGGTGCTTGGACAATGTGTT
Trp53 E5 - R	TAGCACTCAGGAGGGTGAGG
Trp53 E6 - F	CCATGCTAAGCAAGTGTTGG
Trp53 E6 - R	CCCTAAGCCCAAGAGGAAAC
Trp53 E7 - F	GTTTCCTCTTGGGCTTAGGG
Trp53 E7 - R	ATGCGAGAGACAGAGGCAAT
Trp53 E8 - F	CAAAACAAAAACCTGTAAGTGGA
Trp53 E8 - R	GACACCATACCTTGTCCCTCA

3.5.1 Sequenciamento por SANGER

A incorporação de desoxinucleotídeos (dNTPs) e de didesoxinucleotídeos (ddNTPs) a uma cadeia de DNA em crescimento é a base para o sequenciamento por SANGER, uma vez que o alvo gênico já esteja determinado por primers. No presente estudo o alvo foi Trp53 E5. Ao se adicionar as ddNTPs marcadas ocorreu uma interrupção da extensão da cadeia, o que permitiu a identificação da sequência de nucleotídeos desejada (Trp53 E5). Aqui, se utilizou um sistema de eletroforese em capilar (3500 Genetic Analyzer - Applied Biosystem). As etapas de ciclagem foram realizadas em um termociclador, que consistiu de desnaturação (96°C, 2 min), anelamento (50°C, 15 seg), e extensão (60°C, 4 min). Após esta etapa, as amostras foram purificadas e submetidas à eletroforese capilar, o que permitiu a identificação

de cada base nitrogenada da sequência alvo. Finalmente, uma análise de bioinformática foi realizada para interpretação dos dados coletados.

3.6 *Análise colonoscópica*

De acordo com a descrição prévia (BECKER; FANTINI; NEURATH, 2007), camundongos foram primeiramente sedados com Forane (Merck; 1,5%; 98,5% O₂; 2L/min). O colonoscópio utilizado foi Telepack X (-Karl Storz, Alemanha). Antes do início do procedimento o endoscópio é esterilizado (álcool 70%). Sob o efeito do anestésico, o camundongo é colocado em posição supina, e tem o endoscópio cuidadosamente inserido em seu reto até a profundidade ~4 cm. Vale salientar que o fluxo de ar da bomba deve ser lento porém constante para a manutenção da insuflação do cólon. O sistema de análise foi realizado de acordo com descrição prévia.

3.7 *Análise estatística*

Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism 5.0 (Graph Pad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA). O teste de Mann Whitney foi aplicado para analisar experimentos com dois grupos diferentes. O teste de one-way ANOVA (pós-teste de Kruskal-Wallis) foi utilizado para analisar experimentos com mais de dois grupos. A probabilidade de $P < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa. Todos os valores estão apresentados como média $\pm$ erro padrão (SEM).

4 RESULTADOS

4.1 O carcinógeno azoximetano modula o sistema serotoninérgico no cólon intestinal

Uma vez que o composto AOM é um dos carcinógenos mais utilizados para a formação de tumores no cólon de roedores, desenvolveu-se um desenho experimental aonde os efeitos de doses consecutivas de AOM sobre os níveis colônicos de 5-HT pudessem ser observados. Animais foram eutanasiados 72h após a aplicação de cada uma das 6 doses de AOM, totalizando 7 grupos diferentes (um grupo controle [CTRL], e 6 experimentais [1 grupo para cada dose do carcinógeno]). É importante salientar que este protocolo induziu a formação de tumores ao longo de 24 semanas. As 1°, 3°, 4°, e 6° aplicações de AOM aumentaram os níveis colônicos de 5-HT em comparação com o grupo controle (**Fig. 1**).

Figura 1 – Quantificação de 5-HT por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) associada à detecção eletroquímica. O teste estatístico One-Way ANOVA foi aplicado em conjunto com pós-teste de Kruskal-Wallis (* $P < 0.05$).

Em seguida, detectou-se que a expressão da enzima Tph1, esta converte triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP), estava aumentada 1 semana após a 6° dose de AOM (**Fig. 2**).

Figura 2 – Expressão gênica de Tph1 foi calculada a partir de um controle endógeno (GAPDH). O teste estatístico de Mann Whitney foi aplicado (* $P < 0.05$).

Considerando que uma 2ª isoforma de Tph foi sugerida sintetizar 5-HT em neurônios (Tph2) (Gross *et al.* 2012), e o cólon é ricamente irrigado pelos plexos neuronais entéricos (Kannen *et al.* 2015), a expressão de Tph2 foi analisada. A expressão de Tph2 não foi detectada no cólon (**Fig. 3**).

Figura 3 – Figura ilustrativa para a expressão gênica de Tph1 (**A**), e Tph2 (**B**).

Vale salientar que enquanto a expressão de Tph1 está restrita ao cólon intestinal, a Tph2 é expressa no tecido cerebral (**Fig. 4**).

Figura 4 – Expressão gênica de Tph1 (**A**), e Tph2 (**B**). Expressão gênica relativa foi calculada a partir de um controle endógeno (GAPDH).

Para se confirmar a presença de neurônios no cólon intestinal, e que estes podem ser modulados por exposições carcinogênicas, a enzima neuronal UCH1 foi avaliada. Isto revelou que UCH1 estava aumentada 1 semana após a 6ª aplicação de AOM (**Fig. 5A**). Esta descoberta instigou a análise da enzima DDC, uma vez que esta converte 5-HTP em 5-HT. A expressão gênica de DDC estava reduzida na semana subsequente a última aplicação de AOM (**Fig. 5B**).

Figura 5 – Expressão gênica de UCH1 (**A**), e DDC (**B**). Expressão gênica relativa foi calculada a partir de um controle endógeno (GAPDH). O teste estatístico de Mann Whitney foi aplicado (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$).

Uma vez que a maior influencia da atividade serotoninérgica sobre a carcinogênese de cólon esteja a nível epitelial, a expressão do transportador de liberação de 5-HT (VMAT2) também foi analisado, sendo detectado reduzido uma semana após a 6ª e última dose de AOM (**Fig. 6A**). Então, a expressão gênica do recaptador serotoninérgico intestinal (SERT) se apresentou aumentada neste mesmo período de tempo (**Fig. 6B**). Vale salientar que a principal enzima responsável pelo catabolismo serotoninérgico estava reduzida (**Fig. 6C**).

Figura 6 – Expressão gênica de VMAT2 (A), SERT (B), e MAO (C) por qPCR. Expressão gênica relativa foi calculada a partir de um controle endógeno (GAPDH). O teste estatístico de Mann Whitney foi aplicado (*P<0.05;).

A **Fig. 8** demonstra claramente que a formação de ACs também ocorreu entre as 3ª e 4ª doses.

Figura 8 – Análise histopatológica de lesões preneoplásicas. O gráfico demonstra o número de AC por mm² em cada camundongo. O teste estatístico One-Way ANOVA foi aplicado em conjunto com pós-teste de Kruskal-Wallis (**P<0.01).

Para melhor se caracterizar as principais alterações moleculares induzidas por AOM, um novo desenho experimental foi determinado. Animais foram assim eutanasiados em intervalos de 72 h e 1 semana após a aplicação das 1ª, 2ª, 3ª, e 6ª doses de AOM. Esta estratégia revelou que entre as 2ª e 3ª doses de AOM ocorreu uma supressão da quantidade de cópias gênicas do 3º exon da β -catenina (**Fig. 9**; Ctnnb1; este exon é traduzido em uma região protéica de acoplamento entre GSK-3 e β -catenina. Desta forma, a GSK-3 modula a atividade transcricional de β -catenina (Takahashi *et al.* 1998)).

Figura 9 – Quantificação do número de cópias de DNA do 3º exon de CTNNB1 ou β -catenina. O teste estatístico One-Way ANOVA foi aplicado em conjunto com pós-teste de Kruskal-Wallis (*P<0.05).

Após a 6ª dose de AOM, também ocorreu uma significativa redução da expressão da região codificadora do gene O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT; uma proteína responsável pelo reparo genômico de danos induzidos por compostos alquilantes como o AOM; **Fig. 10**).

Figura 10 – Quantificação do número de cópias de DNA da região codificadora (CpG) de MGMT. O teste estatístico One-Way ANOVA foi aplicado em conjunto com pós-teste de Kruskal-Wallis (*P<0.05).

Para se confirmar os efeitos de AOM sobre a expressão de MGMT foi utilizado *primers* TaqMan. Uma semana após a última aplicação de AOM observou-se uma redução de aproximadamente mais de 100x na expressão gênica de MGMT (**Fig. 11**).

Figura 11 – Expressão gênica de MGMT por qPCR. Valores relativos calculados a partir de um controle endógeno (GAPDH). O teste estatístico de Mann Whitney foi aplicado (***P<0.001).

Considerando que o gene Trp53 (Tp53) tem uma ação central em mecanismos de reparo celular e controle do ciclo celular, os efeitos de AOM

sobre o mesmo foram investigados. A 6° dose de AOM induziu uma redução na expressão de Trp53 após 1 semana (**Fig. 12**).

Figura 12 – Expressão gênica de Trp53 por qPCR (TaqMan; Mm01731290_g1). Valores relativos calculados a partir de controle endógeno de cada reação (β -actina). O teste estatístico de Mann Whitney foi aplicado (** $P < 0.01$).

É interessante salientar que uma supressão da região codificadora de Trp53 foi observada 72h após a 6° dose de AOM, apesar do número de cópias desta CpG ter sido restabelecida a níveis fisiológicos 7 dias após a última exposição carcinogênica (**Fig. 13A**).

Figura 13 – Quantificação do número de cópias de DNA da região codificadora (CpG; **A**), e do exon 5 de Tp53 (**B**). O teste estatístico One-Way ANOVA foi aplicado em conjunto com pós-teste de Kruskal-Wallis (** $P < 0.001$; * $P < 0.05$; # $P < 0.05$; & $P < 0.05$).

O número de cópias do 5° exon de Tp53 também sofreu uma redução pela 1° dose de AOM. Apesar da 2° dose aumentar a expressão desta sequência gênica após 72 h, se observou uma redução no número de suas cópias após 1 semana. Então, a 3° dose de AOM aumentou o número de cópias deste exon (**Fig. 13B**). O 6° exon de Tp53 foi então investigado, porém se mostrou inalterado durante as exposições ao carcinógeno AOM (**Fig. 14**).

Figura 14 – Quantificação do número de cópias de DNA do exon 6 de Tp53. O teste estatístico One-Way ANOVA foi aplicado em conjunto com pós-teste de Kruskal-Wallis ($P > 0.05$).

Apesar do 7° exon de Tp53 ter se mantido inalterado (**Fig. 15**), a expressão do 8° exon foi aumentada pela 1ª aplicação de AOM (**Fig. 16**).

Figura 15 – Quantificação do número de cópias de DNA do exon 7 de Tp53. O teste estatístico One-Way ANOVA foi aplicado em conjunto com pós-teste de Kruskal-Wallis ($P > 0.05$).

Uma vez que o 5° exon de Tp53 mostrou severas alterações em seu número de cópias durante as aplicações de AOM, amostras de camundongos expostos ao tratamento carcinogênico foram sequenciadas pelo método de SANGER. Nenhuma mutação foi detectada nesta sequência genômica (**Fig. 17**).

Figura 17 – Sequenciamento Sanger do 5° exon de Tp53 de acordo com protocolo padrão. Imagem ilustrativa da análise de amostras coletadas 1 semana após a 6ª aplicação de AOM.

4.3 A serotonina modula o desenvolvimento de tumores no cólon intestinal

Considerando que a exposição carcinogênica prolongada altera os níveis de 5-HT, tumores de cólon foram induzidos em camundongos normais (Tph1WT) ou com a síntese de 5-HT geneticamente deletada (Tph1KO; **Fig. 18A**). Isto revelou que a deleção de Tph1 promoveu a multiplicidade tumoral no cólon de camundongos (**Fig. 18B, C, D**). Quando estes tumores foram examinados macroscopicamente, observamos a presença de fendas intervenientes com uma superfície lisa ou um tanto lobular (**Fig. 18B**). Na verdade, o tamanho destes tumores foi maior na ausência da síntese de 5-HT (**Fig. 18E e F**).

Fig. 18. Ilustração (Superior; azoximetano, AOM) resume o desenvolvimento de tumores de cólon (**A**). Imagens representativas do exame de colonoscopia de colon normal (N) e tumores (T; linha seccionada preta circunda um tumor)

no tipo selvagem da triptofano hidroxilase I (Tph1; WT) e *knockout* em camundongos (KO; linha branca circunda 2 tumores). As imagens no lado direito mostram linhas seccionadas em preto que envolvem tumores de colon (Escala = 1 cm; **B**). (**C – E**) Porcentagem de incidência de tumor do cólon, multiplicidade, avaliação colonoscópica e macroscópica.

Em seguida, nossa análise microscópica revelou que esses tumores eram lesões pedunculadas, arredondadas e circunscritas com túbulos epiteliais compactados. Os adenomas LD não possuíam vacúolos de secreção, mas apresentavam um número marcadamente aumentado de figuras mitóticas, polaridade nuclear ligeiramente irregular e células epiteliais colunares basofílicas atípicas. Os adenomas HD não apresentavam formações fibrosas. Em vez disso, tumores HD tinham inúmeras figuras mitóticas, localização nuclear desigual, formas glandulares irregulares, células epiteliais que eram fortemente basofílicas e atípicas. Ao invés de tumores HD que eram ~1,5 vezes mais frequentes em camundongos Tph1 WT, o desenvolvimento de lesões LD aumentou 1,14 vezes em animais Tph1 KO (**Fig. 19A**). De fato, a proliferação celular foi reduzida em tumores LD desenvolvidos em camundongos Tph1 KO, embora tenha sido promovida em tumores HD em condições semelhantes (**Fig. 19B e C**). Esses dados indicam que a síntese de 5-HT pode proteger o cólon do desenvolvimento tumoral induzido pela exposição ao AOM.

Fig. 19. Imagens histopatológicas representativas de tumores displásicos de baixo grau (LD) e de alto grau (HD, ampliação de 10x). Imagens IHC representativas de tumores corados com um anticorpo anti-Ki-67 (ampliação 40x; **A**). Os gráficos demonstram valores para o índice Ki67 (iKi67; [+] vs. [-] células) em tumores LD (**B**) e tumores HD (**C**). Barras de escala = 20 μ m. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. * $P < 0,05$; teste de Mann Whitney.

4.4 A serotonina modula o desenvolvimento de tumores no cólon intestinal

Em seguida, verificamos a possibilidade de que a síntese de 5-HT pudesse alterar os estágios iniciais da carcinogênese do cólon. A inibição da síntese de serotonina não apenas aumentou o processo de proliferação preneoplásica (**Fig. 20A**), mas também promoveu o desenvolvimento de lesões preneoplásicas (**Fig. 20B**). Estes resultados foram validados pela análise do número de criptas que altamente expressavam β -catenina. Isto revelou que número de criptas altamente marcadas para β -catenina estavam aumentadas no cólon de camundongos Tph1 KO (**Fig. 20C**).

Fig. 20. A ilustração (lado superior, U-S, azoximetano, AOM) resume o desenvolvimento de focos abertos de cripta (ACF). Imagens representativas de lâminas de cólon coradas com um anticorpo anti-Ki-67 em camundongos do tipo selvagem (WT) e knockout (KO) de triptofano (Tph1) (seta preta mostra uma célula Ki67 [+], ampliação 40x). O gráfico mostra valores para o índice Ki67 (iKi67; [+]/[-] células; **A**). (**B**) Imagens representativas de lâminas de cólon coradas com H & E (um trecho preto envolve um ACF, ampliação 40x). Os gráficos mostram valores para ACF e criptas aberrantes (AC). (**C**) Imagens representativas de lâminas de cólon coradas com um anticorpo anti- β -Catenina (ampliação de 40x). O gráfico mostra valores para o índice de β -catenina (i β -cat; [+]/[-] criptas). Barras de escala = 20 μ m. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. * $P < 0,05$; teste de Mann Whitney.

Para se verificar o desenvolvimento inicial dessas lesões preneoplásicas, análises histopatológicas foram realizadas 17 semanas antes dos tumores serem detectados. Novamente detectou-se que o maior desenvolvimento de lesões preneoplásicas iniciais (AC; **Fig. 21A**) estava

relacionada com o aumento no número de criptas intensamente marcadas para β -catenina (**Fig. 21B**). Além disso, nesta etapa inicial da carcinogênese colônica, a deficiência de 5-HT promoveu a proliferação celular (**Fig. 21C**), enquanto que a apoptose foi reduzida no cólon preneoplásico (**Fig. 21D**).

Fig. 21. A ilustração (lado superior, U-S, azoximetano, AOM) resume o desenvolvimento de AC. Os gráficos mostram valores para focos de cripta aberrantes (ACF) e AC em camundongos do tipo selvagem (WT) e *knockout* (KO) para triptofano I (Tph1; **A**). (**B**) Imagens representativas da expressão da proteína β -Catenina (β -Cat; 86kDa) e GAPDH (37kDa). A análise histopatológica determinou o índice de β -Catenina (i β -Cat; [+] vs. [-] criptas). Expressão da proteína β -catenina. (**C**, **D**) Os gráficos mostram valores para o índice Ki67 (iKi67; [+] / [-] células; **C**) e índice apoptótico (iAPO; **D**). Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. * $P < 0,05$; Calculado pelo teste de Mann Whitney.

4.5 A síntese serotoninérgica modula o número de lesões preneoplásicas e a intensidade de dano ao DNA de células epiteliais colônicas

Para se investigar potenciais reações precoces do sistema serotoninérgico contra uma indução carcinogênica, analisamos amostras de cólon ~17,5 semanas antes da detecção de tumores. Surpreendentemente, descobrimos que os números de AC estavam reduzidos no cólon de camundongos Tph1KO (**Fig. 22A**). Verificamos essa descoberta analisando o número daquelas criptas altamente marcadas para β -catenina em conjunto com a expressão gênica de β -catenina. Ambos os parâmetros foram detectados diminuídos (**Fig. 22B**).

Fig. 22. A ilustração (lado superior, U-S, azoximetano, AOM) resume a indução de quebras de DNA de dupla cadeia (DSBs). Os gráficos demonstram valores para os focos de cripta aberrantes (ACF) e as criptas aberrantes AC em camundongos do tipo selvagem (WT) e knockout (KO) de triptofano hidroxilase I (Tph1; **A**). (**B**) Imagens representativas de criptas de cólon coradas com anticorpos anti- β -Cat. Os gráficos mostram valores para o índice de β -catenina (i β -cat; [+] / [-] criptas) e a expressão do gene β -Cat (Cnntb1). Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. * $P < 0,05$; Calculado pelo teste de Mann Whitney.

Ao a atividade proliferativa colônica ser analisada, detectou-se estar a mesma reduzida (**Fig. 23A**), enquanto que o número de eventos apoptóticos estava aumentado (**Fig. 23B**). Considerando que estes eventos poderiam ocorrer devido um aumento na intensidade do dano ao DNA, analisamos a fosforilação da histona H2A.X. Isto revelou que camundongos Tph1KO sofreram um maior dano de DNA colônico em comparação com os seus controles (**Fig. 23C**).

Fig. 23. Imagens representativas de criptas colônicas marcadas com anticorpo anti-Ki67. Os gráficos demonstram valores para o índice proliferativo (iKi67), bem como a expressão gênica de Ki67 (**A**). (**B**) Imagens representativas de criptas colônicas marcadas com o teste TUNEL. O gráfico demonstra os valores do índice apoptótico (iAPO). (**C**) Imagens representativas da expressão da proteína histona H2AX (γ-H2AX; 15kDa) fosforilada e GAPDH (37kDa). O gráfico demonstra valores para a expressão da proteína γ-H2AX. Os dados são apresentados como média ± SEM. * P <0,05; Calculado pelo teste de Mann Whitney.

Essas descobertas indicam a possibilidade de que se a síntese de 5-HT protege o cólon contra o dano de DNA, as múltiplas exposições carcinogênicas em camundongos Tph1KO poderiam ter modificado os mecanismos de reparação de dano do DNA (DDR). De fato, as injeções carcinogênicas consecutivas em camundongos Tph1KO reduziram a expressão gênica de MGMT (**Fig. 24A**), ALKB (**Fig. 24B**), e Trp53 (**Fig. 24C**). A síntese de

5-HT tem o potencial de proteger o colonócitos contra o dano de DNA pela modulação de elementos do reparo genômico.

Fig. 24. Imagens representativas de criptas de cólon marcadas com anticorpo anti-O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT). O gráfico mostra valores para a expressão do gene MGMT (A). Expressão de gene para alceno monooxygenase 1 (ALKB1; B) e p53 (C). Barras de escala = 20 μm. Os dados são apresentados como média ± SEM. ** P < 0,01, * P < 0,05; Calculado pelo teste de Mann Whitney.

5 DISCUSSÃO

5.1 Padronização da resposta serotoninérgica em um modelo experimental de carcinogênese de cólon

O desenvolvimento da carcinogênese de cólon a partir da exposição de colonócitos normais a um carcinógeno requer a transformação celular ao longo de várias etapas. Um dos pontos centrais deste processo é a mutação do gene codificador da β -Catenina. O trabalho de Wakabayashi e colaboradores demonstrou que mutações pela exposição de colonócitos ao carcinógeno AOM são induzidas em β -Catenina em ratos; estas alterações mutagênicas apresentam grande semelhança ao processo que ocorre em humanos (Takahashi *et al.* 1998, Takahashi *et al.* 2000). É interessante observar que o gene da β -Catenina apresenta-se mutado em 63% dos adenomas esporádicos, e em mais de 80% dos adenocarcinomas colorretais esporádico (CHENG *et al.* 2015).

Devemos também considerar que apesar de alterações no número de cópias e expressão de determinados genes chaves para o desenvolvimento da carcinogênese de cólon estarem relacionados à detecção de lesões preneoplásicas, pelo menos no 5º exon de Trp53, o tratamento com AOM não foi capaz de induzir mutações isoladamente. É interessante observar que este exon foi sugerido ser mais susceptível a mutações (Liu *et al.* 2008). Contudo, Gerner e colaboradores descreveram que a exposição ao carcinógeno AOM é incapaz de promover mutações em Trp53 (Erdman *et al.* 1997). De fato, mutações em p53 permitem que ocorra a progressão de adenomas para adenocarcinomas em humanos (Fearon and Vogelstein 1990, Vogelstein and Kinzler 2015).

Na verdade, um evento necessário para o desenvolvimento de cânceres em geral é o aumento de dano ao DNA (Sakita *et al.* 2017). As duplas quebras da cadeia de DNA são lesões deletérias que podem levar a anomalias cromossômicas, instabilidade genômica e câncer (Orthwein *et al.* 2014). A histona H2AX é um elemento de sinalização na resposta contra o dano de DNA das células eucarióticas, e sua fosforilação (γ -H2AX) tem sido utilizado como um biomarcador para detecção de dano genômico (Deckbar *et al.* 2007). A expressão de γ -H2AX desempenha um papel crítico no controle tanto do reparo do DNA quanto da ativação do ponto de controle (Gorgoulis *et al.* 2005). Assim, antes da instabilidade genômica e da conversão maligna, ocorre à ativação de múltiplos elementos de reparo do DNA. Deste modo, nossos resultados evidenciam que o carcinógeno AOM danificou o DNA, sendo que posteriormente ocorreu uma redução dos principais agentes de reparo contra este dano.

Os experimentos iniciais deste estudo ainda demonstram que o aumento nos níveis de 5-HT após a 6^o dose de AOM estava relacionado a uma complexa modulação da atividade serotoninérgica. Desta forma, fica evidente que a metabolização de 5-HTP em 5-HT por DDC precedeu a transformação de triptofano em 5-HTP. Além disto, o processo de liberação extracelular de 5-HT (VMAT2) também foi reduzido juntamente com sua degradação (MAO), apesar de coincidentemente ter ocorrido uma maior recaptação desta monoamina (SERT). Isto ilustra que a atividade serotoninérgica pode ser modulada durante a iniciação carcinogênica do cólon intestinal. A descrição destes eventos apoia nossa hipótese anteriormente relatada de a atividade serotoninérgica ser um elemento de proteção do cólon intestinal contra eventos carcinogênicos (Kannen *et al.* 2011, Kannen *et al.* 2012, Kannen *et al.* 2013).

Outro ponto chave de nossas descobertas é a confirmação de que a síntese de 5-HT no cólon intestinal é promovida por Tph1 em células neuroendócrinas, sem a participação de Tph2 a partir de neurônios entéricos e mioentéricos. Esta controversa hipótese de que neurônios intestinais poderiam sintetizar 5-HT via Tph2 foi proposta e defendida pelo pesquisador americano Prof. Dr. Michael Gershon (Li *et al.* 2011, Gershon 2013). Em contrapartida, o Prof. Dr. Michael Bader já demonstrou que a enzima Tph1 é responsável pela síntese periférica de 5-HT, enquanto que a isoforma Tph2 sintetiza este neurotransmissor no sistema nervoso central (Walther *et al.* 2003). Estas considerações demonstram a importância da atividade serotoninérgica para o desenvolvimento da carcinogênese de cólon.

5.2 Efeitos da síntese de 5-HT no desenvolvimento da carcinogênese de cólon experimental

Indubitavelmente, a sinalização de 5-HT promove o desenvolvimento de tumores do cólon através de seus receptores; fato muito bem demonstrado há quase 40 anos por Tutton e Barkla, e confirmado por outros grupos de pesquisa (Tutton and Barkla 1978, Nocito *et al.* 2008, Amini-Khoei *et al.* 2016). Aqui, deve-se salientar que nossos estudos anteriores haviam demonstrado que os níveis de 5-HT no cólon intestinal tem o potencial de modular o desenvolvimento de lesões preneoplásicas (Kannen *et al.* 2011, Kannen *et al.* 2012, Kannen *et al.* 2013). De fato, as descobertas atuais em conjunto com estes relatos anteriores de nosso grupo de pesquisa parecem controversas frente à hipótese corrente de que a 5-HT é um fator de promoção do crescimento tumoral. Por exemplo, se a 5-HT apenas promove o

desenvolvimento do câncer de cólon (Tutton and Barkla 1978, Amini-Khoei *et al.* 2016), ainda não estava claro o porquê o aumento dos níveis de 5-HT através da inibição de sua recaptação reduziu o risco para esta malignidade em ratos (Kannen *et al.* 2011). Também é interessante que uma redução do risco para o câncer de cólon foi descoberto de forma semelhante em humanos (Lee *et al.* 2012).

Ao se analisar cuidadosamente as descobertas de Tutton e Barkla torna-se claro que estes pesquisadores já haviam determinado que a 5-HT promove a multiplicação de células tumorais de cólon, porém não a proliferação de colonócitos normais (Tutton and Barkla 1978). Tais fatos reforçam a hipótese de que o sistema serotoninérgico pode ser a primeira linha de reação em caso de agressão ao cólon (Gershon 2012). Ou seja, é possível que a síntese de 5-HT possa ser um mecanismo de proteção primário contra um insulto cancerígeno, sendo que a sinalização serotoninérgica poderia mais tarde torna a promover o crescimento tumoral via seus receptores. Aqui, os efeitos da sinalização do fator de crescimento transformante- β devem ser considerados, uma vez que este pode tanto promover quanto suprimir o crescimento tumoral de acordo com a etapa cancerígena de sua ativação (Ikushima and Miyazono 2010).

Embora pareça inesperado que a síntese de 5-HT proteja o cólon do dano ao DNA, podemos considerar que a 5-HT metabolicamente precede a melatonina, que é um neurotransmissor com potentes propriedades antioxidantes que protegem células do dano de DNA induzido pelo estresse oxidativo e cancerígeno (Vician *et al.* 1999, Kannen *et al.* 2011). Especificamente, uma N-acetiltransferase acetila a 5-HT antes de sua metilação por uma hidroxindol-ortometiltransferase que libera melatonina (Noda

et al. 1999, Kannen *et al.* 2011). O potencial antioxidante da melatonina está relacionado à sua capacidade de eliminar os radicais livres, bem como estimular a atividade da glutathione peroxidase que controla os níveis de óxido nítrico (Noda *et al.* 1999). Na verdade, a 5-HT parece bloquear a peroxidação de lipídios e fosfolípidos nas membranas celulares (Miura *et al.* 1996). De fato, a 5-HT possui propriedades antioxidantes, pois doa prótons para compostos como: radicais peroxil, ácido hipocloroso, e óxido nítrico (Herraiz and Galisteo 2004).

Além disto, os resultados atuais indicam que a síntese de 5-HT pode ter o potencial de modular mecanismos centrais no reparo do DNA contra os adutos de DNA induzidos por AOM. De fato, o procarcinógeno AOM requer transformações metabólicas complexas antes que a sua hidroxilação libere o carcinógeno ativo metilazoximetanol (MAM) (Rosenberg *et al.* 2009). Imediatamente, o MAM produz um íon de metildiazônio que metila principalmente o O⁶ da guanina, dando origem a O⁶-metilguanina (O⁶MeG) (Rosenberg *et al.* 2009, Fahrer and Kaina 2013). Parece que AlkB e MGMT removem O⁶MeG do DNA de colonócitos. Considerando que o MGMT desloca para a sua fenda catalítica o grupo metil O⁶MeG, um evento que promove a decomposição de MGMT dependente da ubiquitina-proteassoma, a reação de AlkB com O⁶MeG libera formaldeído e uma base de DNA não-modificada após gerar um intermediário hidroxilado (Fahrer and Kaina 2013). Além disso, p53 foi relatado para regular a atividade de MGMT (Grombacher *et al.* 1998).

6 CONCLUSÃO

Assim concluímos que a síntese de 5-HT protege o cólon do dano de DNA através da modulação de elementos de reparo ao dano carcinogênico no DNA. Esses fatos esclarecem que a inibição da síntese de 5-HT tem o potencial o desenvolvimento da carcinogênese de cólon. Finalmente, acreditamos que a síntese 5-HT é um alvo em potencial para estratégias de prevenção contra o câncer de cólon.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMINI-KHOEI, H., MOMENY, M., ABDOLLAHI, A., DEHPOUR, A. R., AMIRI, S., HAJ-MIRZAIAN, A., TAVANGAR, S. M., GHAFARI, S. H., RAHIMIAN, R. and MEHR, S. E. Tropisetron suppresses colitis-associated cancer in a mouse model in the remission stage. Int Immunopharmacol, v. 36, n. Jul, p. 9-16. 2016.

ANISIMOV, V. N. Biology of aging and cancer. Cancer Control, v. 14, n. 1, Jan, p. 23-31. 2007.

ARNOLD, M., SIERRA, M. S., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A. and BRAY, F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. Gut, v. n. Jan 27, p. 2016.

AXELROD, J. The pineal gland: a neurochemical transducer. Science, v. 184, n. 4144, Jun 28, p. 1341-8. 1974.

BANERJEE, S., AKBAR, N., MOORHEAD, J., RENNIE, J. A., LEATHER, A. J., COOPER, D. and PAPAGRIGORIADIS, S. Increased presence of serotonin-producing cells in colons with diverticular disease may indicate involvement in the pathophysiology of the condition. Int J Colorectal Dis, v. 22, n. 6, Jun, p. 643-9. 2007.

BERGER, M., GRAY, J. A. and ROTH, B. L. The expanded biology of serotonin. Annu Rev Med, v. 60, n. p. 355-66. 2009.

BIRD, R. P. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. Cancer Lett, v. 93, n. 1, Jun 29, p. 55-71. 1995.

CARNEIRO, M. R. G., PINTO, L. F. R. and PAUMGARTTEN, F. J. R. Environmental risk factors for gastric cancer: the toxicologist's standpoint. . Cad Saúde Pública, v. 13, n. Suppl.1, p. 27-38. 1997.

CHUBAK, J., BOUDREAU, D. M., RULYAK, S. J. and MANDELSON, M. T. Colorectal cancer risk in relation to antidepressant medication use. Int J Cancer, v. 128, n. 1, Jan 01, p. 227-32. 2011.

COOGAN, P. F., STROM, B. L. and ROSENBERG, L. Antidepressant use and colorectal cancer risk. Pharmacoepidemiol Drug Saf, v. 18, n. 11, Nov, p. 1111-4. 2009.

COSTEDIO, M. M., HYMAN, N. and MAWE, G. M. Serotonin and its role in colonic function and in gastrointestinal disorders. Dis Colon Rectum, v. 50, n. 3, Mar, p. 376-88. 2007.

COTE, F., THEVENOT, E., FLIGNY, C., FROMES, Y., DARMON, M., RIPOCHE, M. A., BAYARD, E., HANOUN, N., SAURINI, F., LECHAT, P., DANDOLO, L., HAMON, M., MALLET, J. and VODJDANI, G. Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 100, n. 23, Nov 11, p. 13525-30. 2003.

DAVID, A. R. and ZIMMERMAN, M. R. Cancer: an old disease, a new disease or something in between? Nat Rev Cancer, v. 10, n. 10, Oct, p. 728-33. 2010.

DECKBAR, D., BIRRAUX, J., KREMPLER, A., TCHOUANDONG, L., BEUCHER, A., WALKER, S., STIFF, T., JEGGO, P. and LOBRICH, M. Chromosome breakage after G2 checkpoint release. J Cell Biol, v. 176, n. 6, Mar 12, p. 749-55. 2007.

EKELUND, G. and LINDSTROM, C. Histopathological analysis of benign polyps in patients with carcinoma of the colon and rectum. Gut, v. 15, n. 8, Aug, p. 654-63. 1974.

ERDMAN, S. H., WU, H. D., HIXSON, L. J., AHNEN, D. J. and GERNER, E. W. Assessment of mutations in Ki-ras and p53 in colon cancers from azoxymethane- and dimethylhydrazine-treated rats. Mol Carcinog, v. 19, n. 2, Jun, p. 137-44. 1997.

ERSPAMER, V. and TESTINI, A. Observations on the release and turnover rate of 5-hydroxytryptamine in the gastrointestinal tract. J Pharm Pharmacol, v. 11, n. Oct, p. 618-23. 1959.

FAHRER, J. and KAINA, B. O6-methylguanine-DNA methyltransferase in the defense against N-nitroso compounds and colorectal cancer. Carcinogenesis, v. 34, n. 11, Nov, p. 2435-42. 2013.

FEARON, E. R. and VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell, v. 61, n. 5, Jun 01, p. 759-67. 1990.

FUJIMIYA, M., OKUMIYA, K. and KUWAHARA, A. Immunoelectron microscopic study of the luminal release of serotonin from rat enterochromaffin cells induced by high intraluminal pressure. Histochem Cell Biol, v. 108, n. 2, Aug, p. 105-13. 1997.

GERSHON, M. D. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, v. 20, n. 1, Feb, p. 14-21. 2013.

GERSHON, M. D. Serotonin is a sword and a shield of the bowel: serotonin plays offense and defense. Trans Am Clin Climatol Assoc, v. 123, n. p. 268-80; discussion 80. 2012.

GIRÃO, C., GIRÃO, H., CORTES, L. and C., F. Polimorfismo - 160C/A no promotor do gene da E-caderina e risco de cancro da próstata numa população portuguesa. . Acta Urol., v. 22, n. 1, p. 27-42. 2005.

GORGOLIS, V. G., VASSILIOU, L. V., KARAKAIDOS, P., ZACHARATOS, P., KOTSINAS, A., LILOGLOU, T., VENERE, M., DITULLIO, R. A., JR., KASTRINAKIS, N. G., LEVY, B., KLETSAS, D., YONETA, A., HERLYN, M., KITTAS, C. and HALAZONETIS, T. D. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. Nature, v. 434, n. 7035, Apr 14, p. 907-13. 2005.

GROMBACHER, T., EICHHORN, U. and KAINA, B. p53 is involved in regulation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) by DNA damaging agents. Oncogene, v. 17, n. 7, Aug 20, p. 845-51. 1998.

GROSS, E. R., GERSHON, M. D., MARGOLIS, K. G., GERTSBERG, Z. V. and COWLES, R. A. Neuronal serotonin regulates growth of the intestinal mucosa in mice. Gastroenterology, v. 143, n. 2, Aug, p. 408-17 e2. 2012.

HERRAIZ, T. and GALISTEO, J. Endogenous and dietary indoles: a class of antioxidants and radical scavengers in the ABTS assay. Free Radic Res, v. 38, n. 3, Mar, p. 323-31. 2004.

HUBEL, K. A. Intestinal nerves and ion transport: stimuli, reflexes, and responses. Am J Physiol, v. 248, n. 3 Pt 1, Mar, p. G261-71. 1985.

IKUSHIMA, H. and MIYAZONO, K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. Nat Rev Cancer, v. 10, n. 6, Jun, p. 415-24. 2010.

JEMAL, A., CENTER, M. M., DESANTIS, C. and WARD, E. M. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v. 19, n. 8, Aug, p. 1893-907. 2010.

KANNEN, V., DE OLIVEIRA, E. C., MOTTA, B. Z., CHAGURI, A. J., BRUNALDI, M. O. and GARCIA, S. B. Trypanosomiasis-induced megacolon

illustrates how myenteric neurons modulate the risk for colon cancer in rats and humans. PLoS Negl Trop Dis, v. 9, n. 4, Apr, p. e0003744. 2015.

KANNEN, V., FERNANDES, C. R., STOPPER, H., ZANETTE, D. L., FERREIRA, F. R., FRAJACOMO, F. T., CARVALHO, M. C., BRANDAO, M. L., ELIAS JUNIOR, J., JORDAO JUNIOR, A. A., UYEMURA, S. A., WAAGA-GASSER, A. M. and GARCIA, S. B. Colon preneoplasia after carcinogen exposure is enhanced and colonic serotonergic system is suppressed by food deprivation. Toxicology, v. 312, n. Oct 04, p. 123-31. 2013.

KANNEN, V., FERNANDES, C. R., STOPPER, H., ZANETTE, D. L., FERREIRA, F. R., FRAJACOMO, F. T., CARVALHO, M. C., BRANDAO, M. L., JUNIOR, J. E., JUNIOR, A. A., UYEMURA, S. A., WAAGA-GASSER, A. M. and GARCIA, S. B. Colon preneoplasia after carcinogen exposure is enhanced and colonic serotonergic system is suppressed by food deprivation. Toxicology, v. n. Aug 23, p. 2013.

KANNEN, V., HINTZSCHE, H., ZANETTE, D. L., SILVA, W. A., JR., GARCIA, S. B., WAAGA-GASSER, A. M. and STOPPER, H. Antiproliferative effects of fluoxetine on colon cancer cells and in a colonic carcinogen mouse model. PLoS One, v. 7, n. 11, p. e50043. 2012.

KANNEN, V., MARINI, T., TURATTI, A., CARVALHO, M. C., BRANDAO, M. L., JABOR, V. A., BONATO, P. S., FERREIRA, F. R., ZANETTE, D. L., SILVA, W. A., JR. and GARCIA, S. B. Fluoxetine induces preventive and complex effects against colon cancer development in epithelial and stromal areas in rats. Toxicol Lett, v. 204, n. 2-3, Jul 28, p. 134-40. 2011.

KANNEN, V., MARINI, T., ZANETTE, D. L., FRAJACOMO, F. T., SILVA, G. E., SILVA, W. A., JR. and GARCIA, S. B. The melatonin action on

stromal stem cells within pericryptal area in colon cancer model under constant light. Biochem Biophys Res Commun, v. 405, n. 4, Feb 25, p. 593-8. 2011.

KANNEN, V., ZANETTE, D. L., FERNANDES, C. R., FERREIRA, F. R., MARINI, T., CARVALHO, M. C., BRANDAO, M. L., ELIAS JUNIOR, J., MAUAD, F. M., SILVA, W. A., JR., STOPPER, H. and GARCIA, S. B. High-fat diet causes an imbalance in the colonic serotonergic system promoting adipose tissue enlargement and dysplasia in rats. Toxicol Lett, v. 213, n. 2, Sep 3, p. 135-41. 2012.

KHARE, S. and VERMA, M. Epigenetics of colon cancer. Methods Mol Biol, v. 863, n. p. 177-85. 2012.

LEE, H. K., EOM, C. S., KWON, Y. M., AHN, J. S., KIM, S. and PARK, S. M. Meta-analysis: selective serotonin reuptake inhibitors and colon cancer. Eur J Gastroenterol Hepatol, v. 24, n. 10, Oct, p. 1153-7. 2012.

LI, Z., CHALAZONITIS, A., HUANG, Y. Y., MANN, J. J., MARGOLIS, K. G., YANG, Q. M., KIM, D. O., COTE, F., MALLET, J. and GERSHON, M. D. Essential roles of enteric neuronal serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons. J Neurosci, v. 31, n. 24, Jun 15, p. 8998-9009. 2011.

LIU, Z., CHOI, S. W., CROTT, J. W., SMITH, D. E. and MASON, J. B. Multiple B-vitamin inadequacy amplifies alterations induced by folate depletion in p53 expression and its downstream effector MDM2. Int J Cancer, v. 123, n. 3, Aug 1, p. 519-25. 2008.

LUEBECK, E. G. and HAZELTON, W. D. Multistage carcinogenesis and radiation. J Radiol Prot, v. 22, n. 3A, Sep, p. A43-9. 2002.

MARCHETTI, A., PELLEGRINI, S., BEVILACQUA, G. and FORNACIARI, G. K-RAS mutation in the tumour of Ferrante I of Aragon, King of Naples. Lancet, v. 347, n. 9010, May 4, p. 1272. 1996.

MATSUZAKI, K., DENG, G., TANAKA, H., KAKAR, S., MIURA, S. and KIM, Y. S. The relationship between global methylation level, loss of heterozygosity, and microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. Clin Cancer Res, v. 11, n. 24 Pt 1, Dec 15, p. 8564-9. 2005.

MAURIN, N., FORGUE-LAFITTE, M. E., LEVY, P., ZIMBER, A. and BARA, J. Progression of tumors arising from large ACF is associated with the MUC5AC expression during rat colon MNNG carcinogenesis. Int J Cancer, v. 120, n. 3, Feb 1, p. 477-83. 2007.

MEZA, R., JEON, J., MOOLGAVKAR, S. H. and LUEBECK, E. G. Age-specific incidence of cancer: Phases, transitions, and biological implications. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 105, n. 42, Oct 21, p. 16284-9. 2008.

MIGHELI, F. and MIGLIORE, L. Epigenetics of colorectal cancer. Clin Genet, v. 81, n. 4, Apr, p. 312-8. 2012.

MIURA, T., MURAOKA, S. and OGISO, T. Lipid peroxidation inhibited by monoamines. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, v. 93, n. 1, Jul, p. 57-67. 1996.

NEBERT, D. W. and DALTON, T. P. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. Nat Rev Cancer, v. 6, n. 12, Dec, p. 947-60. 2006.

NEUFERT, C., BECKER, C. and NEURATH, M. F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. Nat Protoc, v. 2, n. 8, p. 1998-2004. 2007.

NOCITO, A., DAHM, F., JOCHUM, W., JANG, J. H., GEORGIEV, P., BADER, M., GRAF, R. and CLAVIEN, P. A. Serotonin regulates macrophage-mediated angiogenesis in a mouse model of colon cancer allografts. Cancer Res, v. 68, n. 13, Jul 1, p. 5152-8. 2008.

NODA, Y., MORI, A., LIBURDY, R. and PACKER, L. Melatonin and its precursors scavenge nitric oxide. J Pineal Res, v. 27, n. 3, Oct, p. 159-63. 1999.

NUCCI, M. R., ROBINSON, C. R., LONGO, P., CAMPBELL, P. and HAMILTON, S. R. Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. Hum Pathol, v. 28, n. 12, Dec, p. 1396-407. 1997.

OLIVEIRA, C. A. F. and GERMANO, P. M. L. Aflatoxins in foodstuffs: current concepts on mechanisms of toxicity and its involvement in the etiology of hepatocellular carcinoma. . Rev Saúde Pública., v. 31, n. 4, p. 417-24. 1997.

ORTHWEIN, A., FRADET-TURCOTTE, A., NOORDERMEER, S. M., CANNY, M. D., BRUN, C. M., STRECKER, J., ESCRIBANO-DIAZ, C. and DUROCHER, D. Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions. Science, v. 344, n. 6180, Apr 11, p. 189-93. 2014.

OTTINI, L., FALCHETTI, M., MARINOZZI, S., ANGELETTI, L. R. and FORNACIARI, G. Gene-environment interactions in the pre-Industrial Era: the cancer of King Ferrante I of Aragon (1431-1494). Hum Pathol, v. 42, n. 3, Mar, p. 332-9. 2011.

PAULMANN, N., GROHMANN, M., VOIGT, J. P., BERT, B., VOWINCKEL, J., BADER, M., SKELIN, M., JEVSEK, M., FINK, H., RUPNIK, M. and WALTHER, D. J. Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation. PLoS Biol, v. 7, n. 10, Oct, p. e1000229. 2009.

PAULSEN, J. E., KNUTSEN, H., OLSTORN, H. B., LOBERG, E. M. and ALEXANDER, J. Identification of flat dysplastic aberrant crypt foci in the colon of azoxymethane-treated A/J mice. Int J Cancer, v. 118, n. 3, Feb 1, p. 540-6. 2006.

PAULSEN, J. E., LOBERG, E. M., OLSTORN, H. B., KNUTSEN, H., STEFFENSEN, I. L. and ALEXANDER, J. Flat dysplastic aberrant crypt foci are related to tumorigenesis in the colon of azoxymethane-treated rat. Cancer Res, v. 65, n. 1, Jan 1, p. 121-9. 2005.

PAULSEN, J. E., NAMORK, E., STEFFENSEN, I. L., EIDE, T. J. and ALEXANDER, J. Identification and quantification of aberrant crypt foci in the colon of Min mice--a murine model of familial adenomatous polyposis. Scand J Gastroenterol, v. 35, n. 5, May, p. 534-9. 2000.

PERES, W. A. F., PAULA, T. P., SILVA, R. A. R. N. and COELHO, H. S. M. A atuação da vitamina A e carotenóides na hepatocarcinogênese. . Rev Bras Cancerol., v. 49, n. 2, p. 113-20. 2003.

PRETLOW, T. P., BARROW, B. J., ASHTON, W. S., O'RIORDAN, M. A., PRETLOW, T. G., JURCISEK, J. A. and STELLATO, T. A. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. Cancer Res, v. 51, n. 5, Mar 1, p. 1564-7. 1991.

RINDI, G., INZANI, F. and SOLCIA, E. Pathology of gastrointestinal disorders. Endocrinol Metab Clin North Am, v. 39, n. 4, Dec, p. 713-27. 2010.

RODRIGUES, M. A., SILVA, L. A., SALVADORI, D. M., DE CAMARGO, J. L. and MONTENEGRO, M. R. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. Braz J Med Biol Res, v. 35, n. 3, Mar, p. 351-5. 2002.

ROGERS, A. E. and NEWBERNE, P. M. Dietary effects on chemical carcinogenesis in animal models for colon and liver tumors. Cancer Res, v. 35, n. 11 Pt. 2, Nov, p. 3427-31. 1975.

ROSENBERG, D. W., GIARDINA, C. and TANAKA, T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. Carcinogenesis, v. 30, n. 2, Feb, p. 183-96. 2009.

ROWLAND, I. R., RUMNEY, C. J., COUTTS, J. T. and LIEVENSE, L. C. Effect of Bifidobacterium longum and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. Carcinogenesis, v. 19, n. 2, Feb, p. 281-5. 1998.

SAKITA, J. Y., GASPAROTTO, B., GARCIA, S. B., UYEMURA, S. A. and KANNEN, V. A critical discussion on diet, genomic mutations and repair mechanisms in colon carcinogenesis. Toxicol Lett, v. 265, n. Jan 04, p. 106-16. 2017.

SANTOS, G. C., ZUCOLOTO, S. and GARCIA, S. B. Endocrine cells in the denervated intestine. Int J Exp Pathol, v. 81, n. 4, Aug, p. 265-70. 2000.

SIEGEL, R. L., MILLER, K. D., FEDEWA, S. A., AHNEN, D. J., MEESTER, R. G. S., BARZI, A. and JEMAL, A. Colorectal cancer statistics, 2017. CA Cancer J Clin, v. 67, n. 3, May 06, p. 177-93. 2017.

SIKANDER, A., RANA, S. V. and PRASAD, K. K. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. Clin Chim Acta, v. 403, n. 1-2, May, p. 47-55. 2009.

SOHN, O. S., FIALA, E. S., REQUEIJO, S. P., WEISBURGER, J. H. and GONZALEZ, F. J. Differential effects of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoxymethanol. Cancer Res, v. 61, n. 23, Dec 01, p. 8435-40. 2001.

SPILLER, R. Serotonin and GI clinical disorders. Neuropharmacology, v. 55, n. 6, Nov, p. 1072-80. 2008.

TAKAHASHI, M., FUKUDA, K., SUGIMURA, T. and WAKABAYASHI, K. Beta-catenin is frequently mutated and demonstrates altered cellular location in azoxymethane-induced rat colon tumors. Cancer Res, v. 58, n. 1, Jan 01, p. 42-6. 1998.

TAKAHASHI, M., NAKATSUGI, S., SUGIMURA, T. and WAKABAYASHI, K. Frequent mutations of the beta-catenin gene in mouse colon tumors induced by azoxymethane. Carcinogenesis, v. 21, n. 6, Jun, p. 1117-20. 2000.

THOMPSON, M., FLEMING, K. A., EVANS, D. J., FUNDELE, R., SURANI, M. A. and WRIGHT, N. A. Gastric endocrine cells share a clonal origin with other gut cell lineages. Development, v. 110, n. 2, Oct, p. 477-81. 1990.

TUTTON, P. J. and BARKLA, D. H. The influence of serotonin on the mitotic rate in the colonic crypt epithelium and in colonic adenocarcinoma in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol, v. 5, n. 1, Jan-Feb, p. 91-4. 1978.

VICIAN, M., ZEMAN, M., HERICHOVA, I., JURANI, M., BLAZICEK, P. and MATIS, P. Melatonin content in plasma and large intestine of patients with colorectal carcinoma before and after surgery. J Pineal Res, v. 27, n. 3, Oct, p. 164-9. 1999.

VOGELSTEIN, B. and KINZLER, K. W. The Path to Cancer --Three Strikes and You're Out. N Engl J Med, v. 373, n. 20, Nov 12, p. 1895-8. 2015.

WALDNER, M. J. and NEURATH, M. F. The molecular therapy of colorectal cancer. Mol Aspects Med, v. 31, n. 2, Apr, p. 171-8. 2010.

WALTHER, D. J., PETER, J. U., BASHAMMAKH, S., HORTNAGL, H., VOITS, M., FINK, H. and BADER, M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. Science, v. 299, n. 5603, Jan 3, p. 76. 2003.

WALTHER, D. J., PETER, J. U., WINTER, S., HOLTJE, M., PAULMANN, N., GROHMANN, M., VOWINCKEL, J., ALAMO-BETHENCOURT, V., WILHELM, C. S., AHNERT-HILGER, G. and BADER, M. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. Cell, v. 115, n. 7, Dec 26, p. 851-62. 2003.

XUE, J., ASKWITH, C., JAVED, N. H. and COOKE, H. J. Autonomic nervous system and secretion across the intestinal mucosal surface. Auton Neurosci, v. 133, n. 1, Apr 30, p. 55-63. 2007.

Anexo I

----- Forwarded message -----

From: <medicine@us.nature.com>
Date: Mon, Jun 26, 2017 at 3:30 PM
Subject: Receipt of NMED-BC87060
To: vinicius.kannen@fcfrp.usp.br

Our ref: NMED-BC87060

26th Jun 2017

Dear Dr. Kannen,

Thank you for submitting your manuscript, "Serotonin synthesis protects the mouse colon from DNA damage in carcinogen-induced spontaneous tumor progression". We expect to have our internal review completed shortly. At that time we will email you the status of your manuscript. Please quote the manuscript number NMED-BC87060 in future correspondence.

Thank you for considering Nature Medicine as a place to publish and if you have questions please do not hesitate to contact me. Our internal review usually takes less than two weeks; if you do not hear from us, feel free to drop me a note over email and I will get back to you as soon as I can.

Yours sincerely,

Erin Hart

Editorial Assistant

Nature Medicine

medicine@us.nature.com