Amanda Carolina Montevechi Pampaloni

**Avaliação do efeito quimiopreventivo do óleo de pequi (*Caryocar
brasiliense* Camb.) em cólon de camundongo Balb/C.**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier
Hernandez Blazquez

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

SÃO PAULO

2016

Amanda Carolina Montevechi Pampaloni

**Avaliação do efeito quimiopreventivo do óleo de pequi (*Caryocar
brasiliense* Camb.) em cólon de camundongo Balb/C.**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier
Hernandez Blazquez

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

SÃO PAULO

2016

Nome: Pampaloni, Amanda Carolina Montevechi

Título: Avaliação do efeito quimiopreventivo do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) em cólon de camundongo Balb/C.

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Aprovado (a) em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Assinatura:

*“Só conheço uma liberdade, e essa é a liberdade
do pensamento”.*

Antoine de Saint-Exupéry

Dedicatória

*À minha família e a todas as pessoas especiais que
fazem parte da minha vida. Obrigada!*

Agradecimientos

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez, por sua orientação, dedicação e paciência. É um exemplo de calma, bondade, compromisso e profissionalismo. Sempre será um modelo a ser seguido.

A Prof^a Dr^a Maria Lúcia Zaidan Dagli, nos momentos mais difíceis, ela esteve ao meu lado sempre sendo otimista em relação a este trabalho, me deu muita força e me animou muito.

A Dr^a Paula R. P. da Silva que me apresentou o projeto deste trabalho e me acompanhou no início dessa caminhada me ensinando muito.

Aos técnicos Diogo Palermo (LAMIH) e Marguite (Laboratório de oncologia experimental) por todos os ensinamentos e ajuda nos momentos mais importantes do experimento.

Aos amigos e companheiros do Laboratório (LAMIH), Letícia Palmeira, Juliana Ferrão, Vânia, Willian Reina, Beatriz Calixto, João e Renan. Amigos estes que me ajudaram a realizar este trabalho sempre agregando conhecimento e novas experiências e também pelos momentos de boa convivência juntos, risadas e descontração.

Também quero agradecer a outras pessoas especiais em minha vida que também fizeram parte desta caminhada: aos meus pais Adnei Pampaloni e Rosemary Pampaloni pelo apoio e paciência que sempre tiveram comigo e mesmo nos momentos mais difíceis sempre estavam ao meu lado demonstrando amor e dedicação. A minha irmã Fernanda e ao Andrey sempre pela força, carinho e apoio. Amo Vocês.

E por fim, mas não menos importante agradeço a Deus pela oportunidade de conhecer pessoas tão maravilhosas nesta caminhada, por aprender tantas coisas e por me tornar uma pessoa melhor a cada dia com a força que só vem Dele.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marivalda de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª edição. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Sumário

Lista de Figuras.....	12
Lista de Tabelas.....	14
Lista de Siglas.....	15
Resumo	16
1 Introdução	19
2 Objetivos	25
3 Revisão da literatura	27
3.1 Anatomia e Fisiologia do Cólon.....	27
3.1.1 Cólon	27
3.2 Carcinogênese do Câncer de Cólon	28
3.2.1 Vias e mecanismos da Carcinogênese do Cólon	29
3.3 Carcinogênese – modelo experimental.....	32
3.4 A espécie <i>Caryocar brasiliense</i> – Pequi.....	32
3.5 Fatores de quimioprevenção e a ação dos extratos do Pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb).	35
4 Materiais e Métodos	42
4.1 Animais e ambiente de experimentação	42
4.2 Administração do carcinógeno	42
4.3 Preparo e administração do óleo do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i>).....	43
4.4 Delineamento Experimental	44
4.5 Sacrifícios	45
4.6 Processamento do material para avaliação histológica	46
4.7 Avaliações histológicas e imuno histoquímicas	46
4.7.1 Avaliação histológica da altura da mucosa em H.E.....	30
4.7.2 Índice de Proliferação Celular (PCNA).....	48

4.7.3 Imuno-histoquímica para evidênciação de 5-mc e quantificação do índice de metilação do DNA	49
4.7.4 Imuno-histoquímica para evidênciação de c-Myc	52
4.7.5 Coloração de PAS (Ácido periódico - reativo de Schiff).....	35
4.8 Análises Estatísticas	53
5 Resultados	55
5.1 Análise histológica em HE (hematoxilina e eosina).....	55
5.2 Coloração Ácido Periódico de Schiff (PAS)	55
5.3 Análise de reação imuno-histoquímica para a evidênciação da expressão do gene 5-mc e quantificação da intensidade de metilação do DNA	57
5.4 Análise de reação imuno-histoquímica para a evidênciação do c-Myc.....	43
5.5 Índice de proliferação celular pelo PCNA.....	62
6 Discussão.....	66
7 Conclusão	79
8 Referências	81

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da via de sinalização Wnt.....31

Figura 2 – Fruto do pequi, Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). A flecha na foto está indicando a polpa do fruto. Foto: Daniella Colares. Fonte: Agência Embrapa de Informação Tecnológica.....35

Figura 3 – Delineamento experimental de 110 dias. C (grupo controle de ração), PQ400 (grupo controle do óleo de pequi, dosagem de 400mg/kg/dia), AMO (grupo controle do azoximetano em apenas uma única dose), e AMOPQ400 (azoximetano 10mg/kg + 400mg/kg de óleo de pequi/dia).....45

Figura 4. Figura adaptada de Hans et al., 1983. Como foi feito a marcação da altura da mucosa intestinal. Mostra a medida da altura total da mucosa intestinal (W) e as medidas de altura e largura das criptas intestinais.....47

Figura 5 – Fotomicrografias de cólon de camundongo com células mucosas cuja secreção foi corada pelo PAS. (A) C, (B) PQ400, (C) AMO e (D) AMOPQ400.....56

Figura 6- Marcação de núcleos nas criptas observadas. Imuno-histoquímica por Metilação. (A) C; (B) PQ400; (C) AMO; (D) AMOPQ400.....59

Figura 7- Marcação de núcleos das criptas observada pela reação muno histoquímica para o c-Myc. (A) C; (B) PQ400; (C) AMO; (D) AMOPQ400.....62

Figura 8- Fotomicrografia de cortes histológicos de cólon de camundongo mostrando a marcação pelo PCNA revelada pela reação da peroxidase - DAB

nas criptas intestinais em todos os grupos experimentais. (A) C; (B) PQ400; C) AMO e (D) AMOPQ400.....64

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição relativa do óleo da polpa de Pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb). Adaptada de Miranda-Vilela et al. (2011).....	42
Tabela 2 – Tabela de média e desvio padrão da intensidade de reação ao PAS pelo muco celular medida pela densitometria média das regiões do corte.....	56
Tabela 3 – Tabela de média e desvio padrão da densitometria média de metilação do DNA.....	58
Tabela 4 – Diferenças entre intensidade de metilação dos núcleos e quantidade de muco dos grupos analisados.....	60
Tabela 5 – Média e desvio padrão da intensidade de marcação do c-Myc nos grupos analisados classificada em escores proporcionais a esta intensidade..	61
Tabela 6 - Comparação dos índices de proliferação celular pelo PCNA entre todos os grupos experimentais.....	63

Lista de Siglas

OMA	Azoximetano
FCA	Foco de criptas aberrantes
TCF	Fatores de Transcrição
ROS	Espécies relativas de oxigênio
GSH	Enzima glutathiona
DMH	1,2-Dimetilhidrazina
HE	Hematoxilina e eosina
5-mC	5-metilcitosina
PAS	Ácido periódico-reativo de Shiff
C	Grupo Controle
PQ400	Grupo controle óleo de pequi (400mg/kg)
OMAPQ400	Grupo de tratamento com óleo de pequi
CCR	Câncer de Cólon Retal

Resumo

Pampaloni ACM. Avaliação do efeito quimiopreventivo do óleo de pequi (Caryocar brasiliense Camb.) em cólon de camundongos BALB/c [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

A flora brasileira possui plantas com grande potencial de investigação na carcinogênese humana, sendo uma delas o Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). Esta fruta da região central do Brasil contém na sua polpa e principalmente no extrato do óleo da sua polpa, várias substâncias antioxidantes, as quais estão relacionadas com a redução do risco de doenças degenerativas. Neste estudo propomos avaliar o potencial quimiopreventivo do *C. brasiliense* contra mecanismos pré-neoplásicos no cólon induzidas quimicamente pelo azoximetano (AMO) em camundongos. O iniciador AMO na concentração 10mg/kg foi injetado por injeção subcutânea em camundongos de 40 dias de idade. Foram formados quatro grupos experimentais: C (controle sem tratamento); AMO (azoximetano 10mg/kg), PQ400 (óleo de pequi 400mg/kg) e OMAPQ400 (OMA+ 400mg/kg de óleo de pequi). Estes dois últimos grupos receberam o óleo de pequi a partir do 40º dia até o 110º dia de vida. A altura das criptas intestinais analisadas, não revelou diferença em nenhum dos grupos. O óleo de *C. brasiliense* reduziu em 18,7% a proliferação celular no grupo OMAPQ400 quando comparado com os grupos C e AMO. Houve aumento da produção de muco neutro no grupo AMO quando comparado com o C e diminuição no grupo AMOPQ400. Houve hipermetilação do DNA no grupo AMO, e hipometilação no grupo AMOPQ400, sendo estes iguais ao grupo controle (C). A expressão do gene oncogênico (c-Myc) diminuiu no grupo tratado com óleo de pequi em comparação com o grupo tratado com o iniciador AMO. Todos esses efeitos podem ser devidos à presença de antioxidantes na polpa do óleo. Por isso, concluímos que o óleo de *C. brasiliense* possui efeito protetor contra alguns mecanismos precursores de lesões pré-neoplásicas do cólon.

Descritores: *Caryocar brasiliense*, Cólon, antioxidante, quimioprevenção, camundongos.

Abstract

Pampaloni ACM. Evaluation of chemopreventive effect of pequi (Caryocar brasiliense Camb.) em cólon de camundongos BALB/c [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

The Brazilian native flora has several plants which have thigh research potential, among those the Pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*). This fruit from the central region of Brazil contains several antioxidant substances in its pulp and mainly in its pulp oil extract, which are related with the reduction of the risk of degenerative diseases. In this study we propose to evaluate the chemopreventive potential of *C. brasiliense* against neoplastic mechanisms in the colon induced chemically by azoximetano (AMO) in mice. AMO 10mg/kg concentration initiator was subcutaneous injection in mice of 40 days of age. Four experimental groups were formed: C (untreated control); AMO (azoximetano 10mg/kg), PQ400 (pequi oil 400mg/kg) and AMOPQ400 (AMO 400mg/kg pequi oil). These last two groups received the pequi. The height of the intestinal crypts analyzed revealed no difference among groups. The oil of *C. brasiliense* reduced the cell proliferation by 18.7% in AMOPQ400 group when compared with the groups C and AMO. There was increased production of neutral mucus in the group AMO when compared with the C group and decrease in the AMOPQ400 group. The pequi oil induced DNA hipomethylation in the AMOPQ400 group and hipermethylation in AMO group. The expression of the oncogenic gene c-Myc decreased in the group treated with pequi oil compared to the group treated with the initiator AMO alone. All these effects can be due to the presence of antioxidants in pulp oil. Therefore, we conclude that the oil of *C. brasiliense* has protective effect against some mechanisms that precede of neoplastic lesions of the colon.

Descriptors: *Caryocar brasiliense*, colon, antioxidant, chemoprevention, mice.

Introdução

1 Introdução

Fatores ambientais, especialmente na dieta, podem contribuir substancialmente para o risco de desenvolvimento do câncer de cólon (Newmark et al., 2009; Dougherty et al., 2011). O consumo excessivo de energia como os carboidratos refinados, carne vermelha e processadas, são prováveis contribuintes para os altos índices de câncer de cólon nos países ocidentais. (Giovanucci, 2002).

As plantas representam uma importante fonte de compostos biologicamente ativos. Atualmente muitos medicamentos são desenvolvidos a partir de plantas e usados no tratamento de várias doenças, incluindo o câncer (Varanda, 2006; Souza-Moreira et al., 2008). Sua aplicação medicinal é antiga, sendo por muito tempo a única fonte de cura para as enfermidades (Martins et al., 1995; De La Cruz, 2008).

Há evidências de que algumas plantas possuem efeitos protetores na carcinogênese humana, o que tem estimulado a investigação do potencial das plantas medicinais na quimioproteção (Kelloffe e Boone, 1994; De Marini, 1998; Surh, 2003; Serpeloni et al., 2008). Alguns compostos podem interagir com o material genético das células, promovendo atividade antimutagênica, atuando na proteção de macromoléculas como o DNA, RNA e proteínas, inibindo a transformação maligna de células iniciadas ou retardando o desenvolvimento e progressão de células pré-cancerosas em tumores malignos (Park et al., 2003; Surh, 2003).

Os agentes quimioprotetores podem agir como bloqueadores (antimutagênicos), antiproliferativos e antioxidantes. Os últimos podem atuar

tanto como antimutagênicos e como antiproliferativos e são substâncias encontradas naturalmente em frutas, cereais e diferentes vegetais (Kellofe e Boone, 1994; Park et al., 2003; Surh, 2003). Os tocóis e tocotrienóis (vitamina E), carotenóides (pró-vitamina A), ácidos ascórbicos (vitamina C) e compostos fenólicos como taninos, ácidos fenólicos e flavonóides são exemplos de substâncias antioxidantes que estão presentes nos vegetais e podem ser incorporados no organismo através da alimentação (Surh, 2003; Cerqueira et al., 2007; Ferreira, 2009). Por isso, as plantas são consideradas fonte de compostos que podem ser utilizados como estratégia quimiopreventiva de baixo custo, acessível e de fácil aplicabilidade no controle do câncer.

Um estudo feito com cultura de células animais e vegetais mostrou que a vitamina E, a vitamina C, o β -caroteno (pró-vitamina A), e o mineral selênio podem prevenir a transformação de células normais em células cancerosas (Borek C, 1997). O tratamento combinado com selênio, β -caroteno e as vitaminas E e A, resulta em menor incidência na mortalidade de câncer no esôfago e estômago reduzindo em 10% e em 32% a mortalidade de câncer de cólon (Greenwald e Clifford, 2001).

O Brasil é um país com uma flora bastante diversificada e com grande potencial medicinal, porém pouco estudada (Varanda, 2006). Alguns trabalhos já foram feitos testando diversas plantas como fitoterápicos para várias doenças, inclusive o câncer. Em 2006, foi realizado um trabalho que teve como objetivo avaliar informações de dez plantas medicinais comercializadas como medicamentos fitoterápicos no Brasil, as plantas escolhidas para este estudo foram: *Passiflora incarnata* (maracujá); *Ginkgo biloba*; *Aesculus*

hippocastanum (castanha-da-índia); *Plantago ovata* (no Brasil conhecida como sementes de Agiolax); *Panax ginseng*; *Piper methysticum* (kava-kava); *Valeriana officinalis* (Valeriana); *Hypericum perforatum* (erva de São-João); *Cimicifuga racemosa* (erva de São-Cristóvão) e *Rhamnus purshiana* (cáscara sagrada), e depois de diversos teste concluiu-se que nestas plantas existe baixo fator de toxicidade, sendo utilizado para tratamento quimiopreventivo de várias doenças (Turolla e Nascimento, 2006). Foi realizado também um trabalho de avaliação quimiopreventiva da planta *Paullinia cupana* (mais conhecida como guaraná), neste trabalho foi demonstrado que os animais tratados com o guaraná tiveram diminuição de células no carcinoma, e acredita-se que o efeito do tratamento com essa planta diminuiu essas células na fase G1 do ciclo celular (Fukumaso et al., 2011). Assumindo o desafio em descobrir novas plantas da biota sulamericana com propriedades quimiopreventivas, propomos avaliar o óleo de Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb).

O Pequi é uma fruta nativa do cerrado brasileiro, distribuída nas regiões centro-oeste, sudeste, sul, nordeste e norte. Na medicina popular o óleo é utilizado como tônico, por suas propriedades antioxidantes naturais (Mariano et al., 2009). A polpa de *C. brasiliense* é rica em lipídios (33,4%), possuindo um considerável teor de proteína. Na composição do óleo, verifica-se a presença de diversos ácidos graxos como o palmítico, oléico, palmitoléico, esteárico, linoléico e linolênico (Facioli e Gonçalves, 1997; Lima et al., 2007). É uma fruta que possui alto teor de vitaminas B1 e B2 (Oliveira et al., 2006), vitamina C com 78,3 mg/100g (Almeida et al., 1998; Da Silva et al., 2009) e vitamina E com 0,607 mg/100g (Enes et al., 2011). Na sua composição ainda são

encontrados carotenóides como β -caroteno, licopeno (Oliveira et al., 2006), ζ -caroteno, criptoflavina, β -criptoxantina, anteraxantina, zeaxantina e 8 mutatoxantina (Ramos et al., 2001; Oliveira et al., 2006). A este grupo de compostos é atribuída a propriedade antioxidante que está relacionada com a intensificação do sistema imunológico e a redução do risco de doenças degenerativas como o câncer, entre outras (Britton, 1995; Rodriguez-Amaya, 1997; Ramos et al., 2001). Em estudos já realizados com *C. brasiliense* foram demonstrados efeitos antioxidativos (Lima e Mancini, 2005; Kiouri et al., 2007; Miranda-Vilela et al., 2011; Barbosa et al., 2015). Quando administrado em atletas, o óleo de pequi reduziu os danos no DNA e injúria nos tecidos, diminuiu o colesterol total e o LDL no sangue e também apresentou atividade anti-inflamatória (Miranda et al., 2011). Em um trabalho feito para avaliar efeitos genotóxicos de extratos aquosos de óleo de pequi em moscas *Drosophila melanogaster* em pontos na asa usando a recombinação e mutação genética, verificou-se que em concentrações mais baixas o extrato do óleo de pequi pode ter produzido efeitos antioxidantes e em concentrações mais altas o extrato aumentou significativamente a frequência de pontos mutantes quando comparado com o controle negativo (Castro et al., 2008). Em estudo recente, foi verificado que o óleo de pequi reduziu a quantidade de lesões pré-neoplásicas no fígado de camundongos (Palmeira et al; 2015).

Baseando-nos em estudos já realizados sobre o *C. brasiliense* e na sua composição rica em substâncias conhecidas pelas suas potenciais propriedades terapêuticas, avaliamos a hipótese de que o óleo de pequi possui efeito quimiopreventivo contra alguns mecanismos que podem conduzir ao

câncer de cólon em lesões pré-neoplásicas induzidas quimicamente pela AMO (azoximetano) em camundongos.

Os focos de criptas aberrantes (FCA) também têm sido propostos como marcadores morfológicos intermediários do câncer de cólon e utilizados em estudos experimentais como indicadores de indução neoplásica precoce ou efeito quimiopreventivo (Bird, 1995; Park et al., 1997). Porém no presente estudo não serão avaliados os FCA, mas sim outros parâmetros de alterações e marcadores teciduais e celulares anteriores aos FCA como proliferação celular, presença de células produtoras de muco, metilação do DNA e presença de genes oncogênicos (c-Myc), mecanismo estes anteriores aos FCA ou até mesmo às lesões pré-neoplásicas que podem ser fatores determinantes para o desenvolvimento do câncer de cólon.

Objetivos

2 Objetivos

Avaliar o efeito quimiopreventivo do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) contra vias de mecanismos iniciadas por azoximetano (AMO) no cólon de camundongos BALB/c pelos seguintes testes:

- ✓ Avaliação da altura da mucosa do cólon.
- ✓ Quantificação da proliferação celular.
- ✓ Quantificação da secreção de células caliciformes.
- ✓ Quantificação do grau de metilação do DNA nas células das criptas.
- ✓ Quantificação da presença de genes oncogênicos pela expressão de c-Myc nas células das criptas do cólon.

3 Revisão da literatura

3.1 Anatomia e Fisiologia do Cólon

Os mecanismos biológicos do cólon e do reto estão estritamente relacionados com a sua anatomia, fisiologia e histologia. Assim, pretende-se caracterizar a funcionalidade do cólon e do reto no organismo humano ao fornecer informações sobre estas estruturas.

O sistema digestivo compreende os órgãos relacionados com a ingestão, mastigação, deglutição, digestão dos alimentos, absorção dos nutrientes e a eliminação de alimentos não absorvíveis. Anatomicamente o sistema digestivo é descrito como sendo constituído por um longo tubo que tem início na fissura oral (a fenda entre os lábios superior e inferior) e termina no ânus, sendo convencionalmente dividido pelas suas características anatômicas, histológicas e fisiológicas em: cavidade oral, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado com as três porções designadas duodeno, jejuno e íleo e intestino grosso com segmentos designados cegos, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente, cólon sigmóide, reto e canal anal (Cidre, 2011).

3.1.1 Cólon

O cólon mede 1.5 a 1.8 m de comprimento e divide-se em quatro partes: cólon ascendente, transverso, descendente e sigmóide. O cólon ascendente estende-se superiormente do cego ao ângulo hepático junto do bordo inferior

direito do fígado. O cólon transverso estende-se do ângulo cólico direito até ao ângulo esplênico e o cólon descendente estende-se do ângulo cólico esquerdo até à abertura superior da pequena bacia, onde se torna cólon sigmóide. O cólon sigmóide é um tubo em forma de 'S' que se prolonga para o interior da bacia e termina no reto (Cidre, 2011).

3.2 Carcinogênese do Câncer de Cólon

O crescimento tumoral no intestino é, geralmente, silencioso, não apresentando qualquer tipo de sintomatologia, pelo menos numa fase inicial. Esta característica do tumor colorectal reduz significativamente as hipóteses de diagnóstico precoce, fato que condiciona de alguma forma o seu tratamento e respectiva cura. Estes aspectos exigem, por parte da população em geral, uma sensibilização elevada para o despiste precoce desta patologia, assim como a adoção de hábitos de vida saudáveis, tendo em conta que o aparecimento do CCR está diretamente relacionado com determinados estilos de vida, bem como soluções de diagnósticos mais eficientes (Cotrim, 2007).

Os carcinomas do cólon induzidos pelo AMO (azoximetano) e seus derivados como DMH (1,2- Dimetilhidrazina), constituem atualmente um dos modelos mais utilizados na oncologia experimental para o estudo de vários aspectos da morfologia, patogênese, prevenção e tratamento do câncer de cólon (Albertini et al., 2000). O estudo de danos no material genético em nível cromossômico é uma parte essencial da genética toxicológica, uma vez que a mutação cromossômica é um evento importante na carcinogênese, processo

pelo qual se desenvolvem as neoplasias induzidas (Albertini et al., 2000; Mainenti e Rosa, 2008).

A carcinogênese é um processo complexo que envolve múltiplas etapas na transformação das células normais em malignas, podendo ser induzida nos organismos vivos por agentes físicos, biológicos ou químicos (Pitot et al., 1996; Surh, 2003). Ela pode ser dividida operacionalmente em três estágios: a iniciação, caracterizada pela formação de uma célula preneoplásica resultante de uma mutação fixa em torno de síntese de DNA; promoção, estágio que envolve a expressão clonal seletiva da célula iniciada através do aumento do crescimento celular ou diminuição da apoptose; progressão, um evento genotóxico que resulta na mudança do estado preneoplásico. É uma fase caracterizada pela irreversibilidade e instabilidade genética que se traduz pelo aparecimento frequente de aberrações cromossômicas nas células neoplásicas (Trosko, 2003; Surh, 2003; Gomes-Carneiro, 2007; Oliveira et al., 2007; Silva, 2009). Quando avaliado o câncer do cólon e reto, as alterações genéticas encontradas nos genes K-ras, c-Myc, C-src, p-53, DCC, MCC e APC são: instabilidade e microssatélites no cromossomo 2 e desregulação de sinais da via de tradução, como a proteína cinase (Guillem et al., 1995; Kern e Kinzler, 1995).

3.2.1 Vias e mecanismos da carcinogênese do cólon

O epitélio intestinal é o tecido que mais sofre vigorosamente auto-renovação em mamíferos adultos (Heath, 1996). A organização do epitélio intestinal é dividida em criptas e vilosidades. E há quatro tipos diferenciados de

células que residem no interior do epitélio, são elas: células caliciformes, células enteroendócrinas, células de Paneth (presentes apenas no intestino delgado, ausentes no cólon), e enterócitos, são visualizados através de coloração com marcadores específicos (Laurens et al., 2009).

A principal força motriz por trás da proliferação de células epiteliais nas criptas intestinais é a via de Wnt. A Figura 1 mostra um diagrama esquemático de representação da via de sinalização Wnt. Esta via é altamente importante em todo reino animal (Clevers, 2006; Logan e Nusse R, 2004). A componente central na via Wnt canônica é a β -catenina. Quando ocorre um sinal da via Wnt, a β -catenina é acionado com a degradação proteossômica através da fosfolarização sequencial ocorrendo na sua extremidade. Um complexo de degradação vai acabar consistindo na ação dos genes supressores tumorais e formando adenomas. Por isso a ativação da via Wnt e a sua grande variação que tem como genes alvo TCF (fatores de transcrição) representa a força dominante por trás da atividade proliferativa do epitélio intestinal saudável bem como também está por trás do câncer colorretal (CRC) (Laurens et al., 2009).

Figura 1. Representação esquemática da via de sinalização Wnt. (a) Na ausência de estimulação de Wnt, os níveis na célula de β-catenina é mantida baixa através de um complexo de destruição dedicado que consiste de polipose adenomatosa coli (APC), caseína cinase I (CKI), glicogénio sintase quinase 3 (GSK3), e axina. (b) com a sinalização da via Wnt, receptores e proteínas relacionadas realizam o processo de degradação proteossômica. O nível β-catenina na célula aumenta, resultando na translocação de β-catenina para o núcleo. Aqui β-catenina substitui em fator de célula T (TCF) fatores de transcrição. β-catenina / TCF forma um complexo transcricional ativo, o que conduz a expressão de genes alvo de Wnt (Laurens G, et al; 2009).

Fearon e Vogelstein (1990) propuseram que o CRC surge devido a uma sequencia ordenada de mutações em que é chamado de sequência adenoma carcinoma. Invariavelmente, a iniciação da mutação ocorre na via Wnt, levando a formação de adenomas de longa vida ainda que seja benignas, seguido

também de outras mutações, como por exemplo, nos genes Kras, Smad4, e p53, que em última instância resultam em metástases de carcinomas.

3.3 Carcinogênese – modelo experimental

É neste contexto, que os bioensaios de média-duração são testes que contribuem muito para a determinação das substâncias com efeito quimioprotetor, porém não são definitivos. As vantagens dos ensaios de média-duração são: boa correlação com os resultados dos testes de longa-duração, conclusões em prazo relativamente curto, relação dose-resposta nítida, detecção de cancerígenos não-genotóxicos ou quimioprotetor, poucos resultados falso-positivos e falso-negativos, uso pequenos de animais, tempo e recursos (Ito et al., 2003).

Portanto, devido a alguns trabalhos que mostraram o possível efeito do óleo de pequi como quimioprotetor devido a sua composição rica em propriedades antioxidantes entre outras, como por exemplo o licopeno, e que estas podem atuar como agente antimutagênicos e antiproliferativos, estamos propondo neste trabalho verificar uma possível diminuição dos mecanismos anteriores as lesões pré-neoplásicas do cólon a uma possível ação quimioprotetora do óleo de pequi.

3.4 A espécie *Caryocar brasiliense* – Pequi

O pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) é uma árvore nativa do Cerrado brasileiro e está entre as seis mais importantes espécies desta região

(Mariano-Da-Silva et al., 2009). A espécie *C. brasiliense* pertencente à família Caryocaraceae e está distribuída em Estados como Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Pará e alguns estados nordestinos, sendo consumido pela população destes Estados (Damiani, 2006; Kerr et al., 2007). Sua frutificação ocorre principalmente entre os meses de janeiro a março, podendo ser encontrados frutos fora dessas épocas (Ribeiro, 2000). Esses são constituídos pelo exocarpo ou pericarpo, mesocarpo externo, mesocarpo interno e o endocarpo que protege a semente e que constitui a porção comestível do fruto (Melo et al., 2004; Lima et al., 2005).

A polpa do fruto de pequi é rica em lipídios, fibra alimentar e proteínas (33,4%, 10,02% e 3% respectivamente). Isso mostra que o consumo da polpa de pequi poderá trazer benefícios à saúde da população, tendo em vista o conhecimento de que o consumo regular de fibra alimentar na dieta está relacionado com a redução do risco de diversos quadros patológicos (Michels et al., 2005).

Na composição da polpa e do óleo da polpa, também verifica-se a presença de diversos ácidos graxos como o palmítico, oléico, palmitoléico, esteárico, linoléico e linolênico (Facioli e Gonçalves, 1997; Lima et al., 2007). São encontrados também, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, cobre, ferro, manganês, nitrogênio, zinco e extrato etéreo (Silva et al., 2009). O pequi é uma fruta rica em vitamina A, possuindo alto teor de vitaminas B1 e B2 e vitamina C (Oliveira et al., 2006; Kerr et al., 2007; Almeida et al., 1998). Na sua composição ainda é encontrado carotenóides como β -caroteno, licopeno, ζ -caroteno, criptoflavina, β -criptoxantina, anteraxantina, zeaxantina e mutatoxantina (Ramos et al., 2001; Oliveira et al., 2006). A este grupo de

compostos é atribuída à propriedade antioxidante que está relacionada com a intensificação do sistema imunológico e a redução do risco de doenças degenerativas como o câncer, entre outras (Britton, 1995; Rodriguez-Amaya, 1997; Ramos et al., 2001). Eles podem evitar efeitos mutagênicos e carcinogênicos bem como diminuir os níveis de danos oxidativos no DNA (Duthie et al., 1996; Dusinská et al., 2003; Park et al., 2003).

O pequi é um fruto encontrado em regiões onde as árvores recebem alta incidência de raios solares, o que favorece a geração de radicais livres, além do que, tanto a polpa quanto a amêndoa do pequi são ricas em lipídios. Essas condições favorecem a biossíntese de compostos secundários com propriedades antioxidantes (compostos fenólicos e carotenóides totais).

Antioxidantes são substâncias capazes de inibir a oxidação, diminuindo a concentração dos radicais livres no organismo ou quelando íons metálicos, prevenindo a peroxidação lipídica. O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. Quando há um desbalanço entre a produção de radicais livres e os mecanismos de defesa antioxidante, ocorre o chamado “estresse oxidativo”. O que pode gerar danos à saúde, como doenças cardiovasculares, degenerativas, tumores, etc (Ferreira et al., 2010).

Figura 2 – Fruto do pequizeiro, Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). A flecha na foto está indicando a polpa do fruto. Foto: Daniella Colares. Fonte: Agência Embrapa de Informação Tecnológica.

3.5 Fatores de quimioprevenção e a ação dos extratos de Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb).

Na medicina popular o pequi é utilizado para o tratamento de doenças brônquio-respiratórias e problemas oftalmológicos e o óleo da polpa é tradicionalmente usado como agente tônico devido à presença de antioxidantes naturais (Almeida e Silva, 1994; Mariano et al., 2009).

Fortes evidências indicam que as espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenham um papel importante na iniciação, bem como a fase de promoção da carcinogênese. Estudos experimentais apoiam o papel dos ROS no câncer, e também mostram que os antioxidantes dietéticos atuam como agentes preventivos, ou seja, os antioxidantes protegem os tecidos normais dos efeitos tóxicos das ROS (Ozben, 2007). Estes incluem as vitaminas C e E,

β -caroteno e outros fitoquímicos, bem como os antioxidantes endógenos (por exemplo, glutathione), que neutralizam ou anulam a função dos ROS (Borek, 2004).

A conjugação de agentes tóxicos com o tripeptídeo glutathione é catalisada, na sua fase inicial, pela glutathione S-transferase, localizada no citoplasma e no retículo endoplasmático do fígado, intestino, rins e glândulas adrenais. As atividades citosólicas são, de regra, 5 a 40 vezes maiores do que as microssômicas. O co-fator para as reações catalisadas por essas enzimas é a glutathione (GSH) que é formada por 3 aminoácidos, a glicina, o ácido glutâmico e a cisteína. A glutathione S-transferase catalisa a reação de diversos xenobióticos eletrofílicos com a glutathione endógena nucleofílica, prevenindo dessa forma as reações dos xenobióticos com constituintes neutrofílicos teciduais, como lipídeos, DNA e proteínas. Substâncias tóxicas são biotransformadas pelo sistema enzimático do citocromo P-450 gerando metabólitos altamente reativos. Se não forem eficientemente conjugados com a glutathione, se acumulam e reagem com os constituintes endógenos, causando a toxicidade. (Camargo e Batistuzzo, 2008).

Qualquer fator que reduza a concentração de GSH pode aumentar a toxicidade de substâncias que originam metabólitos reativos, como radicais livres (Camargo e Batistuzzo, 2008).

Em um estudo, ratos induzidos com DMH (1,2-Dimetilhidrazina) e tratados com licopeno, substância que tem o seu efeito protetor geralmente atribuído à capacidade de atuar como antioxidante, (uma substância presente na polpa do pequi), chegou-se ao resultado de que alguns eventos importantes na carcinogênese como, a quantidade do foco de criptas aberrantes (FCA),

divisão celular e apoptose foram consideravelmente diminuídos com os grupos que receberam o licopeno como tratamento de prevenção, quando comparado com o grupo que recebeu apenas o iniciador, mostrando assim a ação quimioprotetora dessa substância (Barbisan et al., 2009).

Em outro estudo, ratos induzidos com azoximetano (AMO) e tratados com tomate em pó (adicionado cerca de 5% de tomate na dieta diária dos animais tratados), e sabendo que este contém muitas substâncias que também estão presentes na polpa do fruto do pequi, foi constatado a diminuição da taxa do foco de criptas aberrantes e a redução do desenvolvimento de adenocarcinomas no cólon retal. Foi demonstrado então que a suplementação de tomate em pó na dieta apresentou atividades quimioprotetoras, por isso sugere-se esse alimento como candidato natural para a prevenção de câncer cólon retal em homens (Tuzcu, et al., 2012).

Em um estudo feito com o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes antioxidantes como protetores na terapia de um tipo de tumor, constatou-se que nas administrações dos antioxidantes vitamina C e óleo de pequi, antes da administração do tumor, reduziu-se significativamente o volume do tumor (Vilela M; et al., 2010).

Outros estudos mostram que com os avanços em pesquisas para compreensão dos mecanismos moleculares, descobriu-se que a regulação da interferon (IRF-1) inibe a oncogênese quando está associada com a regulação da transcrição e interferon α e β . Além disso, numerosos estudos clínicos indicaram que a deleção do gene IRF-1 ou rearranjo correlaciona-se com o desenvolvimento de formas específicas de câncer humano. A IRF-1 é ativada

de um conjunto de genes alvo associados com a regulação do ciclo celular, apoptose e resposta imune. O papel de IRF-1 na regulação de vários tipos de tumores em humanos tem implicações importantes para a compreensão da susceptibilidade e progressão do câncer (Chen, et al., 2012).

Estudos com maratonistas mostram que a ingestão do óleo de pequi reduziu danos no DNA, lesões de tecidos, lesões musculares e peroxidação lipídicas. Por conseguinte, o óleo de pequi possui propriedades nutricionais, e é um bom candidato para uso como suplemento de antioxidantes. (Miranda-Vilela et al, 2010) . O óleo de pequi também apresentou diminuição do estresse oxidativo em inflamações musculares de maratonistas, diminuição do colesterol LDL, aumento do HDL e diminuição significativa nos valores de pressão sistólica e diastólica em maratonistas com preexistência de doenças cardiovasculares. (Miranda-Vilela et al., 2009). Em um outro estudo mostrou que o tratamnto com o óleo de pequi impediu o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas no fígado de camundongos induzidos (Palmeira et al., 2015).

Na avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso e das frações de ácidos fenólicos da polpa do pequi, evidenciou-se proteção contra os danos oxidativos comparados ao padrão comercial butilidroxitolueno (BHT) Lima e Mancini-Filho (2005). Já Khouri e colaboradores (2007), demonstraram que o extrato aquoso da polpa de *C. brasiliense* pode prevenir aberrações cromossômicas induzidas por bleomicina na medula óssea de camundongos. Segundo Miranda-Vilela et al., (2010) que avaliou o efeito quimioprotetor do óleo de pequi em maratonistas que apresentavam anemia por deficiência de ferro, constatou-se que o óleo de pequi exerceu efeito protetor sobre as células

vermelhas do sangue, fazendo os índices de ferro voltarem aos valores normais de referência (Barbosa, et al; 2015).

Em relação ao modelo experimental, a escolha da dose de 400 mg/kg foi baseado nos estudos de Miranda-Vilela et al., (2009; 2011) e Palmeira et al., (2015) que utilizaram essa dose de óleo de *C.brasiliense* em seus estudos. Um estudo recente também mostrou a dose de 400mg/kg como sendo uma referência para o tratamento dos animais (Palmeira et al; 2015). Já o azoximetano (AMO), que foi o iniciador utilizado nos camundongos deste estudo, é um carcinogeno específico do cólon e do fígado e utilizado em numerosos estudos que visam identificar e avaliar o potencial de agentes quimiopreventivos do câncer (Chen e Huang, 2009; Chen et al., 1998). AMO é metabolicamente ativo no fígado e, em seguida entregue no cólon através da corrente sanguínea ou através da bile como conjugados glucoronidos. Depois é ativado pelo citocromo P450, especificamente CYP2E1, ele metila o DNA principalmente nas posições 6 e 7 de guanina (Sohn et al., 1991; Herron; et al., 1981). Destes processos de metilação do DNA, a metilação na posição O6 da guanina é mais propensa ao processo mutagênico e carcinogênico durante a replicação do DNA, geralmente através de uma mutação $G \rightarrow A$, a transição nos genes do crescimento celular ou de controle, leva à formação de um pequeno tumor benigno incluindo focos de criptas aberrantes o que pode resultar em câncer (Perse e Cesar, 2001, Nyskohus, et al., 2013, Psfaki, et al., 2010 e Ock, et al., 2011). Sobre a metilação do DNA que é um ponto bem importante para esse estudo, pois é este evento que leva a presença do tumor, é um assunto muito estudado. Em células normais, a metilação assegura a regulação da expressão gênica e silenciamento de genes estáveis. O DNA metilado é associado com

histonas modificadas e a interação destes codifica a arquitetura do genoma (Kulis e Esteller, 2010). O DNA metiltransferase é responsável pelo estabelecimento e manutenção da metilação que influencia na expressão de certos genes supressores de tumores, como uma consequência da hipermetilação dentro de regiões promotoras. Estudos têm demonstrado que vários genes supressores de tumor que são expressos em consequência da hipometilação, também podem ser silenciados pelo DNA metilado em diferentes tipos de câncer humano (Kulis e Esteller, 2010).

Neste presente estudo não estudou-se especificamente as criptas aberrantes que são as lesões causadas no cólon depois de alguns meses de tratamento com o iniciador, mas sim neste modelo o tempo de tratamento foi um pouco mais curto, de 8 semanas, e foi estudado as vias de mecanismos envolvidas no possível desenvolvimento futuro de lesões pré-neoplásicas, quais as vias que estão envolvidas e a importância de se saber isso antes da análise propriamente dita das lesões no tecido animal.

Devido a todos esses fatores importantes, ultimamente a quimioproteção do câncer tem recebido grande atenção (Clapper, 2001; Greenwald, 2002). A quimioproteção é uma abordagem em que agentes químicos alimentares ou sintéticos são usados para prevenir câncer em normal e / ou populações de alto risco (Spom, 1999).

Materiais e Métodos

4 Materiais e Métodos

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, protocolo de pesquisa 266/12.

4.1 Animais e ambiente de experimentação

Foram utilizados 48 camundongos BALB/c machos de 40 dias, provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas de policarbonato de tamanho (20x32), com no máximo 5 animais por caixa, trocadas 3 vezes por semana. Durante os experimentos, os animais permaneceram alojados em estante ventilada Smaflex, onde as caixas recebem troca individualizada do ar e, portanto os animais foram mantidos em microambientes isolados. Foi fornecido livre acesso a ração (NUVILAB CR1®) e água *ad-libitum*. A temperatura e umidade foram constantes, e foi mantido o ciclo de luz de 12 horas claro/escuro além de exaustão contínua do ar ambiente.

4.2 Administração do carcinógeno

A solução de azoximetano (Sigma-Aldridge, St Louis MO) foi preparada no momento do uso. Foi utilizada a dose de 10mg/Kg de peso corpóreo, administrada em uma única dose com aplicação de injeção subcutânea (Sohn, et al., 2011; MacFarlane, et al., 2013).

4.3 Preparo e administração do óleo do pequi (*Caryocar brasiliense*)

O óleo de *Caryocar brasiliense* foi cedido pelo Dr. César K. Grisolia da Universidade de Brasília – UnB. O óleo foi extraído a frio através de prensa mecânica da polpa do pequi fresco, em seguida foi filtrado a vácuo e acondicionado em frasco âmbar sob refrigeração.

No 40º dia de vida os camundongos receberam o óleo do pequi administrado por via oral com o auxílio de uma micropipeta uma vez por dia, durante 8 semanas. A quantidade do extrato do óleo de pequi administrada aos camundongos foi de 400mg/kg de peso do animal, conforme os resultados obtidos no experimento de avaliação da viabilidade das concentrações das doses do óleo de pequi e conforme estabelecido como dose eficaz no trabalho de (Palmeira, et al., 2015)

Tabela 1 - Composição relativa do óleo da polpa de Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). Adaptada de Miranda-Vilela et al. (2011).

Ácidos graxos		Vitaminas	Carotenóides
Saturados (%)	Insaturados (%)	Tipos (mg/100g)	
Palmítico (41,78)	Oleico (54,28)	Vitamina C (78,3)	Pró-vitamina A (6,26 - 11,5)
Esteárico (1,28)	Palmitoleico (0,67)	Vitamina E (0,607)	Licopeno (1,12 - 2,08)
Araquídico (0,12)	Linoleico (1,36)		
	Linolênico (0,51)		
Total (43,18)	Total (56,88)	Total (78,9)	Total (6,75 - 28,66)

Ramos et al., 2001; Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya, 2004; Oliveira et al., 2006; Lima et al., 2007; Miranda-Vilela et al., 2009; Almeida et al., 1988; Enes et al., 2011.

4.4 Delineamento Experimental

O delineamento está ilustrado na *Figura 3*. Foram formados quatro grupos experimentais com 12 animais cada grupo. O grupo C (grupo controle) recebeu ração (NUVILAB CR1 ®) desde a idade de 40 dias e foram eutanasiados após 110 dias para a retirada de órgãos. O grupo PQ400 (grupo controle óleo de pequi), recebeu óleo de pequi na concentração de 400mg/kg a partir da idade de 40 dias até a idade de 110 dias, quando foi feita a eutanásia e a retirada dos órgãos. O grupo AMO (grupo controle do iniciador azoximetano), recebeu uma injeção de AMO (10mg/kg) na idade de 40 dias, e na idade de 110 dias foi feita a eutanásia e retirada dos órgãos e o grupo AMO PQ400, na idade de 40 dias receberam uma injeção de AMO (10 mg/Kg), após duas semanas da injeção de AMO, os animais já com 54 dias de vida, começaram a receber óleo de pequi por via oral (400 mg/kg) por mais 56 dias até a idade de 110 dias, e depois foi feita também a eutanásia dos animais deste grupo.

Na eutanásia dos animais, foi feita uma incisão longitudinal mediana da cavidade abdominal. O cólon foi removido e lavado com solução salina 0,9% para retirar as fezes. A seguir, foi aberto longitudinalmente pela borda da inserção mesocólica. O cólon retirado foi fixado aberto com alfinetes em placas de parafina. Logo após foi fixado em solução fixadora metacarn (metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%) por 12 horas e depois mantido em álcool 70%.

Após este procedimento, o cólon foi incluído em paraplast para análise histológica convencional.

Figura 3 – Delineamento experimental de 110 dias. C (grupo controle de ração), PQ400 (grupo controle do óleo de pequi, dosagem de 400mg/kg/dia), AMO (grupo controle do azoximetano em apenas uma única dose), e AMOPQ400 (azoximetano 10mg/kg + 400mg/kg de óleo de pequi/dia).

4.5 Sacrifício

Os animais foram eutanasiados de acordo com o demonstrado na Figura 3. Para o sacrifício, utilizamos um sistema de anestesia por injeção subcutânea,

onde os anestésicos usados foram xilasina (12mg/kg) e ketamina (90mg/kg). Foi administrada uma injeção de anestésico em cada animal, depois de aguardar alguns minutos sobreveio à parada cardíaca e respiratória. A seguir foram feitos os demais procedimentos que serão explicados no protocolo do experimento.

4.6 Processamento do material para avaliação histológica

Os cólons fixados em metacarn foram devidamente identificados conforme numeração dos animais e subseqüentemente incluídos em paraplast. Cada bloco foi feito com amostras de todos os cólons, sendo um bloco para cada animal. Cortes não seriados de 4,5 µm foram utilizados para confecção de lâminas. Os cortes corados foram fotografados e analisados em microscópio óptico Olympus Bx60.

4.7 Avaliações histológicas e imuno histoquímicas

4.7.1 Avaliação histológica da altura da mucosa em HE (hematoxilina e eosina)

As lâminas coradas com HE foram examinadas em microscopia de luz e fotografadas em câmera acoplada AxioCAM HR ZEISS no microscópio óptico Olympus BX60, para identificação da altura da mucosa intestinal. Foram feitas mensurações das fotos dos animais pelo programa Axiovision Zeiss. Três mensurações foram feitas, uma na mucosa completa e outras duas mensurações (altura e largura) nas criptas intestinais, que foram escolhidas

aleatoriamente. Logo em seguida foi feito uma média de todas as mensurações de altura e largura das criptas e esses números foram analisados através da fórmula $T = W \sqrt{1 - \frac{1}{Q^2}}$, sendo T= altura real da mucosa, W= altura da mucosa no corte, Q= (altura / largura de cada secção da cripta) da mucosa (Hans E et al., 1983), para chegarmos ao comprimento real da altura da mucosa intestinal. A figura 4 representa como essas medições foram feitas.

Figura 4. A marcação em vermelho mostra a medida da altura total da mucosa intestinal (W) e as marcações em azul mostram as medidas de altura e largura das criptas intestinais. Os números das mensurações foram então aplicados na fórmula descrita acima. Figura adaptada de Hans et al., 1983.

4.7.2 Índice de Proliferação Celular (PCNA)

Este índice é obtido através da quantificação de núcleos imunomarcados positivamente para PCNA, em um total de 1000 núcleos contados por animal, sendo o resultado expresso em porcentagem. Os cortes de tecidos fixados em metacarn foram utilizados e o protocolo de imuno-histoquímica foi realizado conforme descrito abaixo.

Cortes de 4,5µm foram imersos em tampão citrato (ph 7,2) e aquecidos por micro-ondas durante 15 minutos. Para o bloqueio de peroxidase endógena foi utilizado o bloqueador de peroxidase endógena da DAKO (DAKO® Califórnia, USA) em câmara úmida por 20 minutos, após lavagens em PBS. Em seguida as lâminas foram incubadas com tampão bloqueador Protein Block (DAKO® Califórnia, USA) em câmara úmida por 20 minutos. Utilizou-se o anticorpo primário monoclonal de camundongo Anti-PCNA [PC10] AB29, Abcam® (Cambridge – Inglaterra), diluição 1:200 em PBS durante a noite a 4°C. A reação imuno-histoquímica foi revelada com o kit LSAB Sistema HRP (Dako Cytomation Carpinteria, CA), de acordo com as instruções do fabricante. Os núcleos positivos tornaram-se evidentes após a aplicação do DAB (303-diaminobenzidina) e hematoxilina contrastante. As lâminas foram fotografadas em câmera acoplada AxioCAM ao microscópio óptico Olympus BX60.

A contagem de núcleos foi realizada através do seguinte protocolo: as únicas criptas visualizadas inteiras foram contadas no sentido do comprimento, estas foram divididas em três segmentos iguais a partir da base ao vértice da cripta e apenas os núcleos dos dois segmentos basais foram contados.

4.7.3 Imuno-histoquímica para evidenciação de 5-mc e quantificação do índice de metilação do DNA.

Este índice é obtido através da densidade óptica de coloração dos núcleos marcados. Cortes de 4,5µm foram imersos em tampão citrato (pH 7,2) e aquecidos por micro-ondas durante 15 minutos. Para o bloqueio de peroxidase endógena foi utilizado o bloqueador de peroxidase endógena da DAKO (DAKO® Califórnia, USA) em câmara úmida por 20 minutos, após lavagens em PBS. Em seguida as lâminas foram incubadas com tampão bloqueador Protein Block (DAKO® Califórnia, USA) em câmara úmida por 20 minutos. Utilizou-se o anticorpo primário 5-Anti-metilcitosina (5-mC) (Abcam® Cambridge, USA), diluído em BSA (0,28 g de azida e 2,8g de albumina bovina para 200ml de PBS) a 4°C, é um anticorpo de camundongo monoclonal (33D3) e este teve diluição de 1:100. A reação imuno-histoquímica foi revelada com o kit LSAB Sistema HRP (Dako Cytomation Carpinteria, CA), de acordo com as instruções do fabricante. As células positivas tornou-se evidente após a aplicação do DAB (303-diaminobenzidina) e hematoxilina contrastante.

As lâminas foram fotografadas em câmera acoplada AxioCAM ao microscópio óptico Olympus BX60. Foi utilizado o programa AxioVision 4.8, um programa de mensuração morfométrica automática para a verificação da densidade óptica de coloração dos núcleos, os mais intensamente corados apresentam maior densidade óptica e os menos intensamente corados apresentam menor densidade óptica. Como o programa mede a intensidade de luz que atravessa as células e os tecidos marcados, todas as lâminas foram analisadas no mesmo dia para que não tivesse nenhuma influência de

oscilação de intensidade da luz sobre o material analisado. Foi feita a medida da densidade média observada a partir da coloração da imagem. Na densitometria média é avaliada a média de todos os valores dos níveis de cinza marcados na foto de todas as regiões. Se este parâmetro é medido para as regiões de imagem RGB (red, green e blue), a imagem de cor RGB é primeiro convertida para uma imagem de nível cinza de acordo com a fórmula $(R+G+B)/3$ e a média correspondente é então exibida em unidades graus de cinza. A faixa de valores varia de 0 (preto) a 65.535 (branco), dependendo da profundidade de cor do pixel da imagem.

Assim, os valores obtidos pelo programa são diretamente proporcionais aos níveis de branco dos pixels e inversamente proporcionais aos níveis de negro, quanto mais baixo o valor obtido mais escuro é o objeto. Com estes respectivos números foi feito uma tabela com os devidos grupos do experimento, e estes foram analisados estatisticamente, utilizado o Software InStat, (Califórnia, EUA).

4.7.4 Reação imuno-histoquímica para evidenciação de c-Myc.

Este índice é obtido através da quantificação da cor nos núcleos marcados. Os cortes de tecidos fixados em metacarn foram utilizados e o protocolo de imuno-histoquímica foi realizado conforme descrito abaixo.

Cortes de 4,5 µm foram imersos em tampão citrato (pH 6,0) e aquecidos na panela de pressão durante 15 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena

foi feito pela imersão das lâminas em solução de H_2O_2 3% por 30 minutos. Após lavagens em PBS, os corte foram incubados com o anticorpo primário. O anticorpo primário utilizado foi o Anti-c-Myc [Y69] monoclonal de coelho, RabMAb®, indústria Abcam® (Cambridge – Inglaterra), diluído em BSA (0,28 g de azida e 2,8g de albumina bovina para 200ml de PBS) a 4°C, e este teve diluição de 1:100. Em seguida os cortes foram incubados com o anticorpo secundário HRP de cabra anti-coelho RabMAb®, indústria Abcam® (Cambridge – Inglaterra), com diluição de 1:500 por 30 minutos na estufa a 60°, em seguida foram feitas lavagens em PBS. As células positivas foram evidenciadas por meio da revelação do DAB (diaminobenzidina - DAKO®). Logo após, diafanização e montagem das lâminas. As lâminas foram fotografadas em câmera acoplada AxioCAM ao microscópio óptico Olympus BX60.

A intensidade da cor dos núcleos foi classificada em escores proporcionais à quantidade de coloração através dos números 1, 2 e 3 (o número 1 para uma marcação fraca, 2 para uma marcação média e 3 para uma marcação forte nas fotos observadas). Foi feita uma tabela com a média dos escores de 1 a 3 das fotos de cada animal em seus respectivos grupos e em seguida os números foram analisados estatisticamente utilizando o Software InStat, (Califórnia, EUA).

4.7.5 Coloração de PAS (ácido periódico-reativo de Schiff)

As lâminas foram colocadas dentro de um suporte de lâminas e mergulhadas no ácido periódico (0,5 g de ácido para 100 ml de água destilada) por 10 minuto em temperatura ambiente, depois as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos e em seguida mergulhadas no reativo de Schiff por 30 minutos em temperatura ambiente e logo em seguida foi feito uma lavagem em água corrente por 1 minuto. Na sequência foram realizados 3 banhos de água sulfurosa de 30 segundos cada, intercalando-se com banhos de água corrente de 1 min. Para finalizar as lâminas foram montadas com lamínula e permont.

As lâminas foram fotografadas em câmera acoplada AxioCAM ao microscópio óptico Olympus BX60. Foi utilizado o programa AxioVision 4.8, um programa de mensuração morfométrica automática para a verificação da densidade óptica (intensidade de coloração) da secreção das células mucosas. Como o programa usa a intensidade de luz para medir a intensidade de coloração, todas as lâminas foram analisadas no mesmo dia para que não tivesse nenhuma influência de oscilação de intensidade da luz. Na densitometria média é avaliada a média de todos os valores de cinza de todas as regiões. Os graus de cinza de todas as regiões de interesse são medidos, sendo que é apresentada a média de todos os valores de grau de cinza na área escolhida. Se este parâmetro é medido para as regiões de imagem RGB (red, green e blue), a imagem de cor RGB é primeiro convertida para uma imagem de nível cinza de acordo com a fórmula $(R+G+B)/3$ e a média correspondente é então exibida em unidades de graus de cinza. A faixa de

valores varia de 0 (preto) a 65.535 (branco), dependendo da profundidade de cor do pixel da imagem.

Para se determinar a densidade óptica em números utilizaram-se os números das marcações e com estes respectivos números foi feita uma tabela com os devidos grupos do experimento, e estes foram analisados estatisticamente, utilizado o Software InStat, (Califórnia, EUA).

4.8 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas usando os números da marcação do tamanho da altura das criptas em HE, da marcação de densidade óptica da coloração de PAS e metilação, e da reação de imuno-histoquímica de PCNA, de todos os grupos experimentais que foram analisados pela análise de variância ANOVA com pós-teste de Kruskal-Wallis, que comparou todos os grupos entre si. Para estas análises foi utilizado o Software InStat, (Califórnia, EUA). Diferenças entre grupos foram consideradas significantes quando $p \leq 0,05$.

Resultados

5 Resultados

5.1 Análise histológica em HE (hematoxilina e eosina).

Nas análises das lâminas coradas em HE, não houve diferença significativa do tamanho da mucosa em nenhum grupo tratado quando comparado com o grupo controle (C). Foi feito uma análise histopatológica especializada por um patologista veterinário, porém neste parâmetro e com essa análise não foi encontrada nenhuma alteração patologia.

5.2 Coloração ácido periódico de Schiff (PAS)

Para a quantificação da intensidade de secreção de muco neutro de células mucosas com a coloração de PAS através de medida da densidade óptica, foi obtida a densidade média (valores médios em tons de cinza medidos em cada foto de cada animal). As medições obtidas para este parâmetro mostraram diferenças significativas entre os grupos: PQ400 (controle de óleo), AMO (grupo controle AMO) e AMOPQ400. A intensidade da secreção de muco no grupo AMO foi maior do que em outros grupos ($7.019,7 \pm 407,5$). Após o tratamento com óleo de pequi, a intensidade da produção de muco diminuiu mesmo no grupo que também recebeu AMO, (AMOPQ400 $8.013,6 \pm 646,7$). A tabela 2 mostra a média e o desvio padrão da densitometria média e as diferenças significativamente diferentes em todos os grupos.

Tabela 2 – Tabela de média e desvio padrão da intensidade de reação ao PAS pelo muco celular medida pela densitometria média das regiões do corte.

Grupos	C	PQ400	AMO	AMOPQ400
Número de animais	12	12	12	12
Média	7157,5 ^a	7816,3 ^b	7019,7 ^{abc}	8013,6 ^c
Desvio padrão	462,4	453,9	407,5	646,7

C (grupo controle), PQ400 (grupo controle óleo), AMO (grupo controle AMO) e AMOPQ400 (grupo tratado com AMO+400mg de pequi). As letras semelhantes representam os grupos que obtiveram valores significativamente diferentes. Menores valores indicam medidas de áreas mais escuras. Os parâmetros foram analisados por análise de variância (ANOVA com pós-teste de Kruskal-Wallis). Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

As fotomicrografias representadas na figura 5, mostram as células mucosas (células caliciformes) das criptas intestinais do cólon por grupos coradas pelo PAS.

Figura 5 – Fotomicrografias de cólon de camundongo com células mucosas cuja secreção foi corada pelo PAS. (A) C, (B) PQ400, (C) AMO e (D) AMOPQ400.

5.3 Análise de reação imuno-histoquímica para a evidenciação da expressão do gene 5-mc e quantificação da intensidade de metilação do DNA.

Nas análises do grau de metilação do DNA feitas também através do programa de mensuração de densidade óptica, foi mensurado o mesmo parâmetro que na coloração de PAS, a densitometria média dos tons de cinza dos núcleos imunomarcados para evidenciar o antígeno (5-mc) e assim quantificar a intensidade de metilação do DNA. Para este parâmetro foram encontradas diferenças significativas nos grupos: grupo controle óleo de pequi PQ400 ($9.831,68 \pm 887,8$), grupo controle AMO ($10.023,08 \pm 322,1$) e grupo iniciado e tratado com pequi AMOPQ400 ($8.454,17 \pm 1043,8$). Os grupos PQ400 e AMO obtiveram maiores valores quando comparado com o grupo controle C ($5.621,43 \pm 2692,7$), ou seja, nestes

grupos houve uma desmetilação do DNA. Já no grupo AMOPQ400 também houve desmetilação do DNA, mas não com a mesma intensidade que nos dois grupos anteriores. A tabela 3 mostra a média e o desvio padrão da densitometria óptica média (intensidade de imunomarcacão) dos núcleos pela (5-mc) estimada pela medida da densidade óptica e as diferenças significativamente diferentes entre os grupos.

Tabela 3 – Tabela de média e desvio padrão da densitometria média de metilação do DNA.

Grupos	C	PQ400	AMO	AMOPQ400
número de animais	12	12	12	12
Média	5.621,43 ^a	9.831,68 ^b	10.023,08 ^{abc}	8.454,17 ^c
Desvio padrão	2692,7	887,8	322,1	1043,8

C (grupo controle), PQ400 (grupo controle óleo), AMO (grupo controle AMO) e AMOPQ400 (grupo tratado com AMO+400mg de pequi). As letras semelhantes representam os grupos que obtiveram valores significativamente diferentes. Menores valores indicam medidas de áreas mais escuras. Os parâmetros foram analisados por análise de variância (ANOVA com pós-teste de Kruskal-Wallis). Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

As fotomicrografias representadas na figura 6, mostram a intensidade da marcação dos núcleos por grupos pela reação imuno-histoquímica do 5-mc.

Figura 6- Marcação de núcleos nas criptas observadas. Imuno-histoquímica por Metilação. (A) C; (B) PQ400; (C) AMO; (D) AMOPQ400.

A tabela 4 sumariza a densidade óptica média obtida para a intensidade de muco (PAS) e dos graus de metilação do DNA nos grupos experimentais.

Tabela 4 – Diferenças entre intensidade de metilação dos núcleos e quantidade de muco dos grupos analisados.

Grupos	Média de quantidade de muco (PAS) [*] DO (DP)	Número de animais	Média de intensidade de Metilação [*] DO (DP)	Número de animais
C	7.657,5 (462,4) ^a	12	5.621,43 (2692,7) ^a	12
PQ400	7.013,6 (453,9) ^b	12	9.831,68 (887,8) ^b	12
AMO	8.019,7 (407,5) ^{abc}	12	10.023,08 (322,1) ^{abc}	12
AMOPQ400	7.745,4 (440,9) ^c	12	8.454,17 (1043,8) ^c	12

Os ^{*} representam os valores de densidade óptica média dos núcleos imunocorados para 5-mc e das células mucosas coradas pelo **DO**: densidade óptica e **DP**: desvio padrão. C (grupo controle), PQ400 (grupo controle óleo), AMO (grupo controle AMO) e AMOPQ400 (grupo tratado com AMO+400mg/kg de pequi). As letras semelhantes representam os grupos que obtiveram valores significativamente diferentes. Menores valores indicam medidas de áreas mais escuras. Os parâmetros foram analisados por análise de variância (ANOVA com pós-teste de Kruskal-Wallis). Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

5.4 Análise da reação imuno-histoquímica para a evidenciação do c-Myc

Nas análises de imuno-histoquímica de c-Myc, a intensidade da cor dos núcleos foi classificada em escores com os números 1, 2 e 3 (o número 1 para uma marcação fraca, 2 para uma marcação média e 3 para uma marcação forte nas fotos observadas). Neste parâmetro foram encontradas diferenças significativas nos grupos: grupo controle óleo de pequi PQ400 ($1,83 \pm 0,52$), grupo controle AMO ($2,58 \pm 0,71$) e grupo iniciado e tratado com pequi AMOPQ400 ($1,5 \pm 0,51$). No grupo AMO (controle do azoximetano) houve um aumento de núcleos marcados quando comparado com os grupos PQ400 e

OMAPQ400, sendo este o grupo que mais teve marcação de genes oncogênicos c-Myc. A tabela 5 demonstra a média e o desvio padrão, mostrando assim as diferenças significativas entre os grupos analisados.

Tabela 5 – Média e desvio padrão da intensidade de marcação do c-Myc nos grupos analisados classificada em escores proporcionais a esta intensidade.

Grupos	C	PQ400	AMO	AMOPQ400
Média	1 ^a	1,83 ^b	2,58 ^{bc}	1,5 ^{ac}
desvio padrão	0	0,52	0,71	0,51

C (grupo controle), PQ400 (grupo controle óleo), AMO (grupo controle AMO) e AMOPQ400 (grupo tratado com AMO+400mg de pequi). As letras semelhantes representam os grupos que obtiveram valores significativamente diferentes. Menores valores indicam medidas de áreas mais escuras. Os parâmetros foram analisados por análise de variância (ANOVA com pós-teste de Kruskal-Wallis). Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

As fotomicrografias representadas na figura 7, mostram a intensidade da coloração dos núcleos por grupos que foram marcados pela reação imuno-histoquímica c-Myc.

Figura 7- Marcação de núcleos das criptas observada pela reação muno histoquímica para o c-Myc. (A) C; (B) PQ400; (C) AMO; (D) AMOPQ400.

5.5 Índice de proliferação Celular pelo PCNA

Foi feita uma análise de proliferação celular com marcação de núcleos positivos para PCNA. Houve diferença estatística no grupo AMOPQ400 em relação aos demais grupos, pois este obteve menor porcentagem de marcação de núcleos positivos para PCNA, o grupo tratado com o óleo de pequi AMOPQ400 ($315,75 (62,9\%) \pm 54,2$) apresentou uma queda de proliferação celular de 18,7% quando comparado com o grupo tratado com o iniciador AMO ($415,45 (81,6\%) \pm 45,8$), isso significa que no grupo tratado com o óleo a proliferação celular foi menor e também foi diferente do grupo controle C

(413,91 (82,4%) $\pm$ 66,5) . A tabela 6 compara a média e o desvio padrão dos índices de proliferação celular pelo PCNA entre todos os grupos experimentais.

Tabela 6 - Comparação dos índices de proliferação celular pelo PCNA entre todos os grupos experimentais.

Grupos	C	PQ400	AMO	AMOPQ400
Média	413,91 (82,4%) ^a	396,8 (79,9%) ^b	415,45 (81,6%) ^c	315,75 (62,9%) ^{abc}
desvio padrão	66,5	39,1	45,8	54,2

C (grupo controle), PQ400 (grupo controle óleo), AMO (grupo controle AMO) e AMOPQ400 (grupo tratado com AMO+400mg de pequi). As letras semelhantes representam os grupos que obtiveram valores significativamente diferentes. Os parâmetros foram analisados por análise de variância (ANOVA com pós-teste de Kruskal-Wallis). Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

Estabeleceu-se o seguinte protocolo para contagem nuclear: foram contadas apenas criptas que foram cortadas longitudinalmente. Elas foram divididos em três segmentos iguais perpendiculares ao eixo da cripta da base para o ápice e apenas os núcleos dos dois segmentos basais foram contados. A Figura 8 mostra a reação imuno-histoquímica para o PCNA dos núcleos marcados no cólon de todos os grupos.

Figura 8- Fotomicrografia de cortes histológicos de cólon de camundongo mostrando a marcação pelo PCNA revelada pela reação da peroxidase - DAB nas criptas intestinais em todos os grupos experimentais. (A) C; (B) PQ400; (C) AMO e (D) AMOPQ400.

Discussão

6 Discussão

Neste estudo foi avaliada a ação quimioprotetora do óleo de Pequi *Caryocar brasiliense* contra mecanismos que antecedem uma lesão pré-neoplásica ou até mesmo a formação futura de criptas aberrantes para o desenvolvimento do câncer de cólon.

Em um estudo feito na Finlândia e nos Estados Unidos, o tratamento combinado com selênio, β -caroteno e as vitaminas E e A, resultou em menor incidência na mortalidade de câncer do esôfago e estômago em 10% e em 32% a mortalidade de câncer de cólon e retal. (Greenwald e Clifford, 2001). Da mesma forma o óleo de pequi é uma fruta que possui alto teor de vitaminas B1 e B2 (Oliveira et al., 2006), vitamina C na quantidade de 78,3 mg/100g (Almeida et al., 1998; Da Silva et al., 2009) e vitamina E na quantidade de 0,607 mg/100g (Enes et al., 2011). Na sua composição ainda são encontrados carotenóides como β -caroteno, licopeno (Oliveira et al., 2006), ζ -caroteno, criptoflavina, β -criptoxantina, anteraxantina, zeaxantina e 8 mutatoxantina (Ramos et al., 2001; Oliveira et al., 2006). A este grupo de compostos é atribuída a propriedade antioxidante que está relacionada com a intensificação do sistema imunológico e a redução do risco de doenças degenerativas como o câncer, entre outras (Britton, 1995; Rodriguez-Amaya, 1997; Ramos et al., 2001).

Os antioxidantes produzidos pelo organismo ou adquiridos através da dieta são importantes para erradicar os radicais livres e prevenir doenças (Ferreira et al., 2010). Por isso, estudos já mostraram que o óleo de pequi

possui propriedades nutricionais e é um bom candidato para uso como suplemento de antioxidantes. (Miranda-Vilela et al., 2009;2010).

Alguns estudos com fitoquímicos, inclusive os que estão presentes no óleo de Pequi, quando utilizados isoladamente obtiveram resultados nulos ou mesmo negativos na prevenção do câncer (Cerqueira et al., 2007; Tharappel et al., 2008). Porém neste estudo utilizamos o extrato oleoso total do produto bruto (fruto) o qual contém vários compostos bioativos que possivelmente atuaram em sinergismo e que pode explicar a diferença destes resultados com estudos onde a substância foi testada isoladamente. Estudos com fitoquímicos têm mostrado que a combinação entre eles pode ser mais efetiva contra neoplasias que o composto individual (Tharappel et al., 2008). Segundo Cerqueira et al. (2007) frutas e hortaliças têm apresentado resultados mais significativos na prevenção de doenças do que substâncias isoladas, pois os alimentos possuem vários compostos que agem de forma cooperativa. Este é o caso dos antioxidantes que agem em sinergismo, assim como a vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis) e vitamina C (ácido ascórbico), onde a vitamina C participa da regeneração do α -tocoferol (uma isoforma da vitamina E), conferindo-lhe novamente o potencial antioxidante (Zhang e Omaye, 2001).

Em relação ao óleo de pequi, a escolha da dose de 400 mg/kg foi baseado nos estudos de Miranda-Vilela et al., (2009; 2011) e Palmeira et al., (2015) que utilizaram essa dose de óleo de *C.brasiliense* em seus estudos. Um estudo recente também mostrou a dose de 400mg/kg como sendo uma referência para o tratamento dos animais (Palmeira et al; 2015). A sobrevivência de 100% dos animais mostrou que as respectivas doses

utilizadas no tratamento com o carcinógeno e com o óleo de pequi foram adequadas. As condições experimentais adequadas, possivelmente também contribuíram para a ausência de óbitos. A dose de 400 mg/kg de óleo de pequi não interferiu no peso final e ganho de peso total dos animais que ingerem óleo de pequi em relação aos que não ingerem. Estes dados indicam que a dose 400 mg/kg não interfere no aspecto nutricional referente à manutenção e ganho de peso (Palmeira et al., 2015).

Já o azoximetano (AMO), que foi o iniciador utilizado nos camundongos deste estudo, é um carcinógeno específico do cólon e do fígado e utilizado em numerosos estudos que visam identificar e avaliar o potencial de agentes quimiopreventivos do câncer (Chen e Huang, 2009; Chen et al., 1998). AMO é metabolicamente ativo no fígado e, em seguida entregue no cólon através da corrente sanguínea ou através da bile como conjugados glucoronidos. Depois é ativado pelo citocromo P450, especificamente CYP2E1, ele metila o DNA principalmente nas posições 6 e 7 de guanina (Sohn et al., 1991; Herron; et al., 1981). Destes processos de metilação do DNA, a metilação na posição O6 da guanina é mais propensa ao processo mutagênico e carcinogênico durante a replicação do DNA, geralmente através de uma mutação $G \rightarrow A$, a transição nos genes do crescimento celular ou de controle, leva à formação de um pequeno tumor benigno incluindo focos de criptas aberrantes o que pode resultar em câncer (Perse e Cesar, 2001, Nyskohus, et al., 2013, Psofaki, et al., 2010 e Ock, et al., 2011). Estudos anteriores sugerem que os agentes ou compostos alimentares naturais anti-câncer podem reduzir o número de O6-metilguanina (O6-MEG) ou modulam a expressão ou atividade de transformação, incluindo a enzima P450 ou β -glucuronidase com antecedência

para suprimir lesão pré-cancerosa ou a formação de tumores (Fiala, et al., 1991, Chen. et al., 1998).

O óleo de Pequi diminuiu em 18,7% a proliferação celular no grupo tratado com óleo de pequi (AMOPQ400) quando comparado com o grupo controle (C) e também o tratado com o iniciador (AMO). Essa inibição da proliferação celular pode ser devida aos compostos com atividade antioxidante que contribuem para a prevenção não apenas na fase de iniciação, mas também nas fases de promoção ou progressão de células iniciadas (Kelloff et al., 1994; Steward et al., 2013). As substâncias que atuam na fase de promoção, denominadas agentes supressores, agem em geral, inibindo a proliferação das células iniciadas e/ou induzindo apoptose (Surh, 2003; Steward et al., 2013). Assim, as substâncias carotenóides com atividade pró-vitamina A e licopeno presentes no óleo de pequi, podem estar envolvidas no efeito protetor contras as lesões pré-neoplásicas e possivelmente atuaram de forma mais efetiva na interferência destes processos durante a fase de promoção da carcinogênese do cólon. Um estudo mostrou que o glucocorticóide Sgk1 tem efeito anti-apoptótica, por isso, sua função sugere seu possível envolvimento na carcinogênese humana. O aumento da expressão de Sgk1 foi encontrada em tumores humanos de próstata e pulmão (Sherk, et al., 2008, Abbruzzese, et al., 2012). Em um segundo estudo também foi encontrado uma outra via de mecanismo para a proliferação celular. Esta via é chamada de AXL, ela é uma via receptora da tirosina quinase. Foi observado o aumento de expressão desta via no câncer de cólon, leucemia e vários outros e esta sinalização está associada ao aumento da proliferação celular (Martinelli

et al., 2015). Como foi observado nos resultados apresentados, acreditamos que o óleo de pequi teve seu papel quimioprotetor em um desses mecanismos, atuando como agente de ação antiproliferativa no grupo tratado OMAPQ400.

Outro parâmetro analisado foi a intensidade de secreção presente nas células mucosas das criptas intestinais. A camada de muco é essencial para a proteção, o transporte molecular e lubrificação dos tecidos dos órgãos essenciais (Gibbins et al., 2015). Normalmente nas vias aéreas e no trato gastro intestinais, a película superficial do muco é formada principalmente por mucinas e proteínas globulares, sendo algumas destas proteínas IgA, que desempenha papel importante na imunidade dessa película de proteção e absorção (Gibbins et al., 2015).

Houve um aumento significativo da produção de muco neutro nas células mucosas das criptas intestinais do cólon principalmente no grupo AMO (grupo controle do iniciador AMO), o aumento da produção destas células pode indicar uma reação protetora do próprio organismo ao estímulo. Já no grupo tratado com óleo de pequi (AMOPQ400), houve redução da quantidade de muco produzido por estas células, isso pode ser devido à ação quimioprotetora do tratamento com o óleo de pequi, por isso, podemos supor que a agressão ao epitélio do cólon nestes grupos foi menor ou foi contrabalançada pela ação antioxidante dos componentes do óleo. Os valores da intensidade de secreção de muco medidos pela densidade óptica média ficaram próximos aos valores obtidos no grupo controle (C). Então supomos para este trabalho, que o óleo de pequi pode ter atuado como um quimioprotetor em alguma dessas vias de estímulo de secreção de células mucosas no grupo tratado com óleo de pequi (AMOPQ400).

Em relação à metilação do DNA nos grupos analisados no presente estudo, as médias dos grupos PQ400, AMO e AMOPQ400 foram significativamente diferentes quando comparado com o grupo controle (C). Nos grupos PQ400, AMO e AMOPQ400 respectivamente houve uma desmetilação do DNA (hipometilação) como foi observado nos resultados. Como nos grupos PQ400 (tratado com óleo) e AMO (tratado com o iniciador AMO) foram observados níveis semelhantes de desmetilação do DNA com duas substâncias diferentes, poderia se esperar que ao se administrar simultaneamente o óleo de pequi e o AMO (grupo AMOPQ400), houvesse um efeito somatório em relação à intensidade de desmetilação. porém não foi isso que foi observado. Ao contrário, a intensidade média de efeito de desmetilação do grupo AMOPQ400 ao invés de aumentar neste grupo, permaneceu semelhante aos resultados dos grupos PQ400 e AMO tomados individualmente. A intensidade de desmetilação do DNA no grupo que recebeu as duas substâncias foi semelhante ao obtido com cada substância isoladamente. Estes dados sugerem duas hipóteses, a) as vias pela qual ocorre a desmetilação do DNA utilizadas pelas duas substâncias (AMO e óleo de pequi) são iguais, assim não importa administrar uma ou outra que o efeito será o mesmo por atuarem nos mesmos genes, ou b) os locais de atuação no DNA são diferentes, sendo que neste caso uma substância interfere na ação da outra ou a anula, impedindo a desmetilação de alguma região do DNA pela primeira (o AMO), mas promovendo a desmetilação de outra região do DNA, pela segunda (o óleo de pequi). Tendo em vista que o AMO é uma substância carcinogênica (Chen e Huang, 2009; Chen et al., 1998) e que o óleo de pequi tem comprovados efeitos quimiopreventivos em outros modelos (Britton, 1995;

Rodriguez-Amaya, 1997; Ramos et al., 2001), acreditamos ser mais plausível a segunda hipótese, embora seja importante testá-la com outro modelo experimental especialmente desenhado para este fim. Segundo esta hipótese, o óleo de pequi pode ter inibido a ação desmetilante do AMO nas regiões do DNA sensíveis a este iniciador, contudo provocando a desmetilação da região do DNA que contém genes supressores de tumores, ativando a expressão destes genes. Esta hipótese poderia explicar porque o efeito das duas substâncias administradas em conjunto não se traduziu por um aumento da desmetilação em relação à administração isolada de cada e porque o óleo de pequi inibiu a expressão do oncogene c-Myc. Uma terceira hipótese é que o óleo de pequi não teria influído no grau de metilação do DNA provocado pelo AMO e os valores observados corresponderiam ao efeito do carcinógeno exclusivamente. Contudo, esta hipótese não é sustentada pelo fato de que o óleo de pequi, quando administrado isoladamente, também causou hipometilação e pelos efeitos observados em relação à expressão de c-Myc, que foi menor no grupo tratado com pequi e a intensidade de secreção de muco, que diminuiu também no mesmo grupo.

O estado de metilação do DNA é um assunto muito estudado. Em células normais, a metilação assegura a regulação da expressão gênica e silenciamento de genes estáveis. O DNA metilado é associado com histonas modificadas e a interação destes codifica a arquitetura do genoma (Kulis e Esteller, 2010). A alteração ocorre geralmente em um grupo metila na base nitrogenada citosina para guanina (CpG) e em aglomerados chamados ilhas C-p-G. O DNA metiltransferase é responsável pelo estabelecimento e manutenção da metilação que influencia na expressão de certos genes

supressores de tumores, como uma consequência da hipermetilação dentro de regiões promotoras. Estudos têm demonstrado que vários genes supressores de tumor que são expressos em consequência da hipometilação, também podem ser silenciados pelo DNA metilado em diferentes tipos de câncer humano (Kulis e Esteller, 2010).

Um estudo que avaliou hipermetilação dos genes promotores em adenocarcinoma de pulmão, mostrou que a metilação do DNA tem emergido como um biomarcador potencial específico do câncer. Hipermetilação de ilhas CpG localizadas nas regiões promotoras dos genes supressores de tumor está agora firmemente estabelecida como um mecanismo importante para a inativação destes genes (Gomes et al., 2014). Este estudo retrospectivo incluiu 40 carcinomas de células escamosas e 40 adenocarcinomas em vários estágios cirúrgicos para definir o perfil de metilação e possível silenciamento dos genes no reparo do DNA (Gomes et al., 2014).

Outros estudos mostram que a perda de grupos metilados no DNA, ou seja a desmetilação é frequentemente observada na carcinogenesis especialmente no câncer de cólon (Gama, 1989; Hernandez-Blazquez et al., 2000). Uma taxa média global de hipometilação de 8-10% foi observada em adenomas do cólon ou adenocarcinomas e uma forte correlação entre o fenótipo maligno e metilação do DNA foi demonstrada em células de câncer colorretal. Por conseguinte, muitos cânceres são caracterizados pela hipometilação global de DNA em comparação com os tecidos normais (Gama, 1989; Lengauer et al., 1997; Hernandez-Blazquez et al., 2000).

Nos resultados observados, os grupos com o óleo de pequi (PQ400), tratado com o iniciador (AMO) e tratado com o óleo de pequi (AMOPQ400) apresentaram menor intensidade da marcação de núcleos, mostrando uma possível hipometilação no DNA destes grupos. Por isso, podemos subentender que no grupo OMA a hipometilação pode ter atuado na via de ativação de oncogenes. Já no grupo PQ400 (o óleo de pequi) pode ter atuado ativando a expressão de genes supressores de tumores, mas pode ter também interferido com a ação do AMO impedindo que alguns oncogenes fossem ativados.

Em estudo realizado para avaliação da influência de frações solúveis e insolúveis de algas sobre a metilação no DNA, observou-se também a diminuição da metilação do DNA (hipometilação) com mais destaque na posição O6 da guanina, indicando que no extrato das algas havia presença de compostos funcionais potentes e atividade anti-câncer pela ativação de genes supressores de tumores por desmetilação do DNA (Suaeyun et al., 1997, Fiala et al., 1991, Chen et al., 1998). O estudo conclui que através da hipometilação do DNA por substâncias bioativas e medicamentos provenientes de fontes naturais de alimentos podem ajudar a reduzir o risco de câncer (Suaeyun et al., 1997, Fiala et al., 1991, Chen et al., 1998).

Assim sendo, neste presente trabalho, como também houve hipometilação do DNA no grupo tratado com óleo de pequi (OMAPQ400), uma hipótese seria que seu efeito desmetilante, devido a seus compostos pode ser importante para a redução de mecanismos de desenvolvimento do câncer. Outro trabalho que avaliou a porcentagem de hipermetilação e hipometilação do DNA em diversos tipos de cânceres mostrou que em vários estudos, existe

uma sobreposição significativa nos níveis de metilação do tecido normal e do tecido canceroso. Por conseguinte, enquanto uma perda de metilação é comumente associado com o desenvolvimento do câncer ou progressão da doença, um nível crítico de desmetilação pode não estar diretamente associado com uma fase particular da doença, havendo vários tipos de tumores que se caracterizam pela hipermetilação do DNA das células cancerosas (Ann e Wilson et al; 2007).

Outro parâmetro analisado foi a intensidade de expressão nuclear do oncogene c-Myc. O papel do gene c-Myc no câncer foi inicialmente apontado por Varmus e Bishop, ganhadores do prêmio nobel em 1989 (Sheiness e Bishop, 1979). A superexpressão de c-Myc tem sido verificada em uma grande variedade de cânceres humanos.

A localização do gene c-Myc foi identificada na região cromossômica 8q24.1, compreendendo três exons, cujos produtos (p64 e p67) consistem em fosfoproteínas nucleares altamente conservadas (Taub et al., 1982). Um dos ligantes reconhecido como essencial para a maioria das atividades biológicas exercidas pela c-Myc é a proteína MAX. Esta, quando associada com a proteína c-Myc, funciona como ativadora transcricional do gene (Kretzner, et al., 1992 e Amati et al., 1993).

A expressão do gene c-Myc é indispensável durante o desenvolvimento embrionário normal, porém a ativação inadequada desse gene contribui para o desenvolvimento de processos neoplásicos, que podem ocorrer por diferentes mecanismos: translocações cromossômicas, como verificado no linfoma de Burkitt, através da justaposição da região promotora do gene de cadeia pesada

de imunoglobulina, altamente expressa em linfócitos B, ao lado do sítio gênico do c-Myc, amplificação gênica pelo aumento do número de cópias do c-Myc e, consequentemente, de sua expressão como observado nos carcinomas do cólon (Ryan e Birnie, 1996).

A relação entre a expressão do gene c-Myc e o câncer já está muito bem estabelecida tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Foi demonstrado que os mecanismos moleculares que promovem a transformação maligna mediada pelo c-Myc não são completamente conhecidos, porém especula-se que o c-Myc também poderia atuar em outras vias, desde a inibição da transcrição de genes supressores tumorais (como o p21, o p57, o p15 e o p16) até a cooperação com a oncoproteína transdutora de sinal Ras, atuando de modo complementar e sinérgico na ativação das CDKs por estímulos mitogênicos (Lutz, Eilers 2002).

Outros estudos analisaram outra via de mecanismo de atuação do c-Myc e evidenciou-se que, em certas circunstâncias, o c-Myc poderia atuar induzindo a apoptose. Muitos genes envolvidos na morte celular programada, como o p53, p21 e BAX contêm regiões responsivas a c-Myc em seus promotores (Evan et al; 1992).

Pesquisas recentes sugerem que a super expressão de c-Myc resultaria no aumento de expressão de genes codificadores de proteínas ribossomais que, por sua vez, contribuem para o crescimento celular (Gardner et al., 2002).

Nessa perspectiva, cogita-se que o c-Myc possa atuar adicionalmente na supressão de fatores anti-angiogênicos, ativando a angiogênese na tentativa de promover o suprimento metabólico exigido pela neoplasia.

Os resultados observados no presente trabalho indicaram um alto fator de expressão do gene c-Myc no grupo AMO (grupo controle do iniciador azoximetano) quando comparado como grupo C (controle), indicando o possível início do desenvolvimento de uma lesão pré-neoplásica. As vias metabólicas estimuladas ou protegidas pelos componentes do óleo de pequi atuaram na redução da expressão gênica do c-Myc porque o grupo PQ400 (grupo tratado com óleo de pequi) teve uma alteração também, mas não significativa quando comparada com o grupo controle, já o grupo AMOPQ400 (AMO + tratado com óleo de pequi) teve valores significativamente menores, ou seja a expressão da marcação diminuiu quando comparado com o grupo AMO. Assim sendo, como também houve diminuição da expressão do gene c-Myc no grupo tratado com óleo de pequi quando comparado ao grupo OMA, acredita-se que o extrato do óleo de pequi, se mostrou eficaz contra a expressão de genes que se expressos de forma inadequada podem atuar em vias de mecanismos no desenvolvimento de neoplasias.

Conclusão

7 Conclusão

O óleo de *C. brasiliense* possui atividade protetora contra possíveis vias e mecanismos para progressão de lesões pré-neoplásicas no cólon em camundongos induzidos pelo iniciador azoximetano. Suas propriedades quimiopreventivas neste estudo estão associadas à atividade antiproliferativa, na redução de células mucosas, ao controle de expressão de oncogenes como o c-Myc e até mesmo possivelmente no controle de via de expressão de metilação no DNA. Os dados sugerem uma ação quimiopreventiva do óleo de pequi no desenvolvimento de processos de vias de mecanismos no cólon de camundongo.

Referências

8 Referências

- Abbruzzese C, Mattarocci S, Pizzuti L, Mileo AM, Visca P, Antoniani B, Alessandrini G, Facciolo F, Amato R, D'Antona L, Rinaldi M, Felsani A, Perrotti N, Paggi MG: Determination of SGK1 mRNA in non-small cell lung cancer samples underlines high expression in squamous cell carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res* 2012; 31:4.
- Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research* 2000.463: 111-172.
- Almeida SP, Silva JA. Pequi e Buriti – Importância Alimentar para a População dos Cerrados. Planaltina: EMBRAPA CPAC; 1994. p 38.
- Almeida SP. Frutas nativas do cerrado: caracterização físico química e fonte potencial de nutrientes. In: Sano, S. M.; Almeida, S. P. Cerrado: Ambiente e flora. Planaltina: Embrapa-CAAC. 1998. p. 247-285.
- Ann S. Wilson, Barbara E. Power, Peter L. Molloy. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1775 (2007) 138–162.
- Barbisan LF, Scolastici C, Miyamoto M, Salvadori DMF, Ribeiro LR, Eira AF, Camargo JLV. Effects of crude extracts of *Agaricus blazei* on DNA damage and rat liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine. *Genetics and Molecular Research*. 2003. v. 2(3) p. 295-308.
- Barbosa MA, Fonseca JC, Castro AHF, Lima LA. 2015. Efeito alelopático do extrato etanólico e das frações obtidas das folhas de smilax SP. Sobre *Lactuca sativa* (alface). 2015, Blucher Biochemistry Proceedings, v.1, n.1 p. 47-48.
- Baylin S B, Makos M, Wu J J, Yen R W, de Bustros A, Vertino P, Nelkin B D. *Cancer Cells*.1991; 3:383–390.
- Bianca Silva Ferreira, Camila Guimarães de Almeida, Lara Pereira Faza, Angelina de Almeida, Cláudio Galuppo Diniz , Vânia Lúcia da Silva, Richard Michael Grazul, Mireille Le Hyaric. Comparative Properties of Amazonian Oils Obtained by Different Extraction Methods. *Molecules* 2011, v.16, 5875-5885.
- Bird RP. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon treated. *Cancer Lett*. 1995. v. 93, p. 55-71.
- Borek C. Antioxidants and cancer. *Sci Med (Phila)*. 1997; v. 4; p.51-62.
- Britton G. Structure and proprieties of carotenoids in relation to function. *The FASEB journal*. 1995. v.9.

Britton G. Structure and proprieties of carotenoids in relation to function. The FASEB journal. 1995. v.9.

Camargo A. M. M; Batistuzzo, O. A. J. Fundamentos de Toxicologia. 2008. v. 3. p. 9-615.

Castro A.J.S , Grisolia C.K , Araújo B.C, Dias C.D , Dutra E.S. Nepomuceno J.C. Recombinogenic effects of the aqueous extract of pulp from pequi fruit (Caryocar brasiliense) on somatic cells of *Drosophila melanogaster*. 2008. Genet. Mol. Res. 7 (4): 1375-1383

Cerqueira FM, Medeiros MHG, Augusto O. Antioxidantes dietéticos: controvérsia e perspectivas. Química Nova. 2007. v. 30 n. 2, p. 441-449.

Chen J, Huang XF. The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. Cancer Biol Ther. 2009;8:1313–7.

Chen P, Kartha S, Bissonnette M, Hart J, Toback FG. AMP-18 facilitates assembly and stabilization of tight junctions to protect the colonic mucosal barrier. Inflamm Bowel Dis. 2012; 18: 1749–1759.

Chen P, Li YC, Toback FG. AMP-18 Targets p21 to Maintain Epithelial Homeostasis. 2015. PLoS ONE 10(4).

Chen P, Wu X, Sonis S, Lingen M, Berger A, Toback F. A novel peptide to treat oral mucositis blocks endothelial and epithelial cell apoptosis. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2012; 83:409–415.

Chen W, Sohn OS, Fiala ES, Weisburger JH. Effect of tea on the formation of DNA adducts by azoxymethane. Xenobiotica. 1998;28:213–7.

Chen, F. F, Jiang, G, Xu. K, Zheng J. N. Function and mechanism by which interferon regulatory factor-1 inhibits oncogenesis. 2012. v. 5(2); p. 417-423.

Choudhury SR, et al. Selective increase in subtelomeric DNA methylation: an epigenetic biomarker for malignant glioma. Clinical Epigenetics (2015) 7:107.

Cidre D.C.M. Análise Computacional de Imagens de Focos de Ciertas Aberrantes [Dissertação]. Universidade do Porto, 2011.

Clapper ML, Chang WC, Meropol NJ. Chemoprevention of colorectal cancer. Curr Opin Oncol. 2000. v. 13, p. 13-307.

Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006. 127:469–8010.

Clifford CK, Greenwald P, Milner JA. Diet and cancer prevention. Eur J Cancer. 2001. v. 8, p. 65-948.

Cole BF, Baron JA, Sandler RS, Haile RW, Ahnen DJ, Bresalier RS, et al. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2007. n. 297, p. 9-235.

Cotrim, H.. “Impacto do Cancro Colorectal no Doente e Cuidadores/Família: Implicações para o Cuidar.”. Dissertação de Doutorado. Universidade do Porto. 2007.

Damiani C. Qualidade e perfil volátil de pequi (*Caryocarbrasiliense* Camb.) minimamente processado, armazenado sob diferentes temperaturas [Dissertação]. Lavras: Universidade Federal de Lavras. 2006.

Dougherty ER, Esfahani MS, Yoon BJ, Probabilistic reconstruction of the tumor progression process in gene regulatory networks in the presence of uncertainty. *BMC Bioinformatics*. 2011. v. 18, n 12, p.1186-1471.

Duthie SJ, Ma A, Ross MA, Collins AR. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer research*. 1996. v. 56. p. 1291-1295.

E.C. Aguilar, T.L. Jascolka, L.G. Teixeira, P.C. Lages, A.C.C. Ribeiro, E.L.M. Vieira, M.C.G. Peluzio, J.I. Alvarez-Leite. Paradoxical effect of a pequi oil-rich diet on the development of atherosclerosis: balance between antioxidant and hyperlipidemic properties. *Braz J Med Biol Res*, 2012, v.45, n 7, p. 601-609.

Facioli NL, Golçalves LAG. Modificação por via enzimática da composição triglicerídica do óleo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). *Química nova*. 1998.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990. 61:759–67

Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger A. Aberrant crypt foci: a review. *Toxicol Pathol*. 1999. v. 27, p. 42-632.

Ferreira, R. M, A; et al. Antioxidantes e sua importância na alimentação. *Revista Verde* (Mossoró – RN – Brasil). 2009. v.5, n.5, p. 26 – 30.

Fiala ES, Joseph C, Sohn OS, el-Bayoumy K, Reddy BS. Mechanism of benzylselenocyanate inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Res* 1991;51:2826-30.

Fukumaso H, Latorre A O, Zaidan Dagli M L. *Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*, Guarana, Increases Survival of Ehrlich Ascites Carcinoma (EAC) Bearing Mice by Decreasing Cyclin-D1 Expression and Inducing a G0/G1 Cell Cycle Arrest in EAC Cells. *PHYTOTHERAPY RESEARCH* *Phytother.* (2011). Res. 25: 11–16.

Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, *et al.* The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res* 1983;11:6883–94.

Gibbins HL, Proctor GB, Yakubov GE, Wilson S, Carpenter GH. SIgA Binding to Mucosal Surfaces Is Mediated by Mucin-Mucin Interactions. 2015. PLoS ONE 10 (3).

Giovannucci E, Bacon CG, Testa M, Glass TA, Kawachi I. The association of treatment-related symptoms with quality-of-life outcomes for localized prostate carcinoma patients. *Cancer*. 2002, v. 94 n.3, p. 71-862.

Giovannucci E. Modifiable risk factors for colon câncer. 2002. v. 31 (4), p. 43-925.

Giovannucci EL Chan AT, , Schernhammer ES, Colditz GA, Hunter D J, Willett WC, *et al.* A prospective study of aspirin use and the risk for colorectal adenoma. *Ann Intern Med*. 2004. v. 140, p.157–166.

Gomes A, *et al.* Promoter hypermethylation of DNA repair genes MLH1 and MSH2 in adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the lung. *Rev Port Pneumol*. 2014 Jan-Feb; 20(1):20-30.

Gomes-Carneiro MR, Ribeiro-Pinto LF, Paumgartten FJR. Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão do toxicologista. *Cad. Saúde Públ.* 1997; v. 13; p. 27- 38.

Greenwald P, Clifford CK, Milner JA. Diet and cancer prevention. *Eur J Cancer*. 2001; v. 37; p. 948-965.

Greenwald P. Cancer chemoprevention. *BMJ*. 2002, p. 8-324.

Guillem JG, Grewal H, Klimstra DS, Cohen AM. p53 nuclear overexpression may not be an independent prognostic marker in early colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1995, v. 11; p. 81-1176.

Gustafson-Svard C, Lilja I, Hallbook O, Sjodahl R. Cyclo-oxygenase and colon cancer: clues to the aspirin effect *Ann Med*. 1997, v. 29; p.52-247.

Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. 1994. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J. Cell Sci*. 107(Pt. 12):3569–77

Hans E, Dallas M, Scheafeer R. O guia da prática da Histologia. National Library of Medicine. 1983.

Heath JP. Epithelial cell migration in the intestine. *Cell Biol. Int*. 1996. 20:139–46

Herron DC, Shank RC. In vivo kinetics of O6-methylguanine and 7-methylguanine formation and persistence in DNA of rats treated with symmetrical dimethylhydrazine. *Cancer Res* 1981;41: 3967-72.

Hinneburg, I; Damien,H.J; Raimo H. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, London, 2006. v. 97, n. 1, p. 122-129.

Ito N, Tamano S, Shirai T. A medium-term rat liver bioassay for rapid *in vivo* detection of carcinogenic potential of chemical. *Cancer Sci*. 2003. v. 94, n. 1, p. 3–8.

Jones P A. *Cancer Res*. 1996; 56:2463–2467.

Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Fay JR, Lubet RA, Crowell JA, Sigman CC. Mechanistic consideration in chemopreventive drug development. *J. Cell. Biochem. Suppl*. 1994. v. 20, p. 1 - 24.

Kern SE, Kinzler KW, Redston MS, Papadopoulos N, Caldas C. Common occurrence of APC and K-ras gene mutations in the spectrum of colitis-associated neoplasias. 1995. v. 2, p. 3-8.

Kerr WE, Silva FR, Tchucarrame E. Pequi (*Caryocar brasiliense* camb.). Informações preliminares sobre um pequi sem espinhos no caroço. *Rev. Bras. Frutic*. 2007. v. 29, n. 1, p. 169-171.

Khoury J, Resck IS, Poças-Fonseca M, Souza TMM, Pereira LO, Oliveira ABB, Grisolia CK. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of the aqueous extract of pulp from “pequi” (*Caryocar brasiliense* Camb). *Gen Mol Biol*. 2007; 30:442-448.

Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet*. 2010; 70: 27-56.

Laurens G. van der Flier and Hans Clevers. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Rev. Physiol*. 2009. 71:241–60

Lei Cheng, Mao-De Lai. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal câncer. *World J Gastroenterol* 2003; v. 9(12); p. 2642-2649.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2545–50.

Lima A, Mancini-Filho J. Compostos com atividade antioxidante no fruto Pequi (*Caryocar brasiliense*, L). *Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*. 2005. v. 30, p. 310.

Lima A, Silva AMO, Trindade RA, Torres RP, Mancini-Filho J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). *Rev. Bras. Frutic*. 2007. v. 29, n. 3, p. 695-698.

Lima, A.; Mancini-Filho, J. Compostos com atividade antioxidante no fruto Pequi (*Caryocar brasiliense*, L), Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição (NUTRIRE), 2005, v. 30, p. 310.

Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Biol.* 2004. *Dev.*20:781–810.

MacFarlane AJ, Behan NA, Matias FMG, Green J, Caldwell D and Brooks SPJ. Dietary folate does not significantly affect the intestinal microbiome, inflammation or tumorigenesis in azoxymethane–dextran sodium sulphate-treated mice. *British Journal of Nutrition.* 2013. v. 109, p. 630–638.

Mainenti P, Rosa LEB. Carcinogênese química experimental em glândulas salivares – Revisão da literatura. Revista Brasileira de Cancerologia. 2008. v. 54(2): 167-174.

Mariano RGB, Couri S, Freitas SP. Enzymatic technology to improve oil extraction from *Caryocar brasiliense* Camb. (Pequi) pulp. Rev. Bras. Frutic. 2009. v. 31, n. 3, p. 637-643.

Mariano-Da-Silva S, Brait JDA, Faria FP, Silva FP, Silva SM, Oliveira SL, Braga PF, Mariano-Da-Silva S. Chemical characteristics of pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) native of three municipalities in the State of Goiás – Brazil. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2009. v. 29, p. 771-777.

Martin TE, Powell CT, Wang Z, Bhattacharyya S, Walsh-Reitz MM, Agarwal K, et al. A novel mitogenic protein that is highly expressed in cells of the gastric antrum mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003; 285: G332–343.

Martinelli E, et al. AXL is an oncotarget in human colorectal cancer. *Oncotarget*, Advance Publications 2015.

Martins RN, Turner BA, Carroll RT, Sweeney D, Kim KS, Wisniewski HM, Blass JP, Gibson GE, Gandy S. High levels of amyloid-beta protein from S182 (Glu246) familial Alzheimer's cells. *Neuroreport.* 1995. v.7, p. 20-217.

Melo Júnior, A.F.; Carvalho, D.; Póvoa, J.S.R.; Bearzoti, E. Estrutura genética de populações naturais de pequi (Caryocar brasiliense Camb.). Scientia Forestalis, Piracicaba, 2004, n. 66, p.56-65.

Michels, K.B.; Fuchs, C.S.; Giovannucci, E.; Coldit, A.; Hunter, D. J.; Stampfer, M.J.; Willetti, W.C.; Fiber intake and incidence of colorectal cancer among 76,947 women and 47,279 men. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, Philadelphia, 2005, v.14, p.842-849.

Miranda-Vilela AL, Akimoto AK, Penha CZ, Pereira LCS, Klautau-Guimarães MN, Grisolia CK. Dietary carotenoid-rich oil supplementation improves exercise-

induced anisocytosis in runners: influences of heptoglobin, MnSOD (Val9Ala), CAT (21/AT) and GPX1 (Pro 198Leu) gene polymorphisms in dilutional pseudoanemia ("sports anemia"). *Genetics and Molecular Biology*. 2010. v. 33(2) 359-367.

Miranda-Vilela AL, Pereira Luiz CS, Grisolia CK. Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners male and female runners. *Nutrition Research*. 2009. v. 29,p. 850-858.

Newmark GM, Gore RM, Thakrar KH, Mehta UK, Berlin JW. 4. Pathways of abdominal tumour spread: the role of the subperitoneal space. *Cancer Imaging*. 2009. v. 24, n 9, p. 20-112.

Nyskohus LS, Watson AJ, Margison GP, Le Leu RK, Kim SW, Lockett TJ, et al. Repair and removal of azoxymethane-induced O6-methylguanine in rat colon by O6-methylguanine DNA methyltransferase and apoptosis. *Mutat Res* 2013;758:80-6.

Oliveira MNS, Gusmão E, Lopes PSN, Simões MOM, Ribeiro LM, Dias BAS. Estádio de maturação dos frutos e fatores relacionados aos aspectos nutritivos e de textura da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). *Rev. Bras. Frutic*. 2006. v. 28, n. 3, p. 380-386.

Oliveira PA, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz L, Lopes C. Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc*. 2007. p. 79.

Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci* 2007. v. 96, p. 2181–96.

Palmeira SM¹, Silva PR, Ferrão JS, Ladd AA, Dagli ML, Grisolia CK, Hernandez-Blazquez FJ. Chemopreventive effects of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) on preneoplastic lesions in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *Eur J Cancer Prev*. Aug 18, 2015.

Park BS, Kwang-Geun L, TKyuki S, Sung-Eun L, Gary RT. Antioxidant activity and characterization of volatile constituents of Taheebo (*Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003 v.51, n.1, p.295-300.

Perse M, Cerar A. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J Biomed Biotechnol* 2011; 473-964.

Phillips, RL. Role of Life-style and Dietary Habits in Risk of Cancer among Seventh-Day Adventists. 1975.

Pitot HC, Dragan YP, Teeguarden J, Hsia S, Campbell H. Quantitation of multistage carcinogenesis in rat liver. *Toxicologic Pathology*. 1996. v. 24. n. 1. p. 119-128.

Psofaki V, Kalogera C, Tzambouras N, Stephanou D, Tsianos E, Seferiadis K, et al. Promoter methylation status of hMLH1, MGMT, and CDKN2A/p16 in colorectal adenomas. *World J Gastroenterol* 2010;16:3553-60.

Ramos MIS, Umaki MCS, Hiane PI, Filho MMR. Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides pró-vitamínicos "A" da polpa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) B.CEPPA. 2001. v. 19, n. 1, p. 23-32.

Ribeiro R.F. Pequi: o rei do cerrado. Belo Horizonte: Rede Cerrado, 2000. p. 62.

Roderick PJ, Wilkes HC, Meade TW. The gastrointestinal toxicity of aspirin: an overview of randomised controlled trials. *Br J Clin Pharmacol* 1993, v. 35. p. 26-219.

Rodrigues MA, Silva LAG, Salvadori DMF, Camargo JLV, Montenegro MR. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Braz J Biol Res*. 2002. n.35, p. 5-351.

Rodriguez-Amaya DB. Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed, and stored foods. Arlington: OMNI Project. 1997. p 88.

Rodriguez-Amaya, D.B. Passion Fruits. In *Encyclopedia of food sciences and nutrition*, 2nd ed.; Caballero, B., Trugo, L.C., Finglas, P.M., Eds.; Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2003; v. 10, p. 4368-4373.

Rodriguez-Amaya, D.B.; Kimura, M.; Godoy, H.T.; Amaya-Farfan, J. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *J. Food Comp. Anal.* 2008, v. 21, p. 445-463.

Schmutte C, Yang AS, TuDung T, et al. Mechanisms for the involvement of DNA methylation in colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1996;56:2375–81.

Serpeloni JM, Vilegas W, Varanda EA, Cólus IM. Avaliação in vivo da anticlastogenicidade de extratos de plantas medicinais do gênero *Miconia* através do teste do micronúcleo. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*. 2008. v. 29, n. 1, p. 47- 56.

Sheiness D, Bishop JM. DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. *J Virol*. 1979;31:514-21.

Sherk AB, Frigo DE, Schnackenberg CG, Bray JD, Laping NJ, Trizna W, Hammond M, Patterson JR, Thompson SK, Kazmin D, Norris JD, McDonnell DP: Development of a small-molecule serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 antagonist and its evaluation as a prostate cancer therapeutic. *Cancer Res* 2008;68:7475-7483.

Sohn OS, Fiala ES, Silvia PR, Weisburger JH and Gonzalez FJ. Differential Effects of CYP2E1 Status on the Metabolic Activation of the Colon Carcinogens Azoxymethane and Methylazoxymethanol. *Cancer Research* 2001, 8435–8440.

Sohn OS, Ishizaki H, Yang CS, Fiala ES. Metabolism of azoxymethane, methylazoxymethanol and N-nitrosodimethylamine by cytochrome P450IIE1. *Carcinogenesis* 1991;12:127-31.

Souza-Moreira TM, Salgado HRN, Pietro RCLR. O Brasil no contexto de qualidade de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2010. v. 20, p. 435 – 440.

Sporn MB. Prevention of cancer in the next millennium. *Cancer Res* 1999, p.58-59.

Steward WP, Brown K. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. *British Journal of Cancer*. 2013. v. 109, p. 1–7.

Suaeyun R, Kinouchi T, Arimochi H, Vinitketkumnue U, Ohnishi Y. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) on formation of azoxymethane-induced DNA adducts and aberrant crypt foci in the rat colon. *Carcinogenesis* 1997;18: 949-55.

Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature reviews cancer*. 2003. v. 3 p. 768-780.

Tharappel JC, Lehmler HJ, Srinivasan C, Robertson LW, Spear BT, Glauert HP. Effect of antioxidant phytochemicals on the hepatic tumor promoting activity of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB-77). *Food Chem Toxicol*. 2008; 46: 3467-3474.

Toback FG, Walsh-Reitz MM, Musch MW, Chang EB, Del Valle J, Ren H, et al. Peptide fragments of AMP-18, a novel secreted gastric antrum mucosal protein, are mitogenic and motogenic. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003; 285:344–353.

Trosko JE. The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2003. v. 36, n. 1, 2. p. 43-48.

Turolla M, Nascimento E; Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 42, n. 2, abr./jun; 2006.

Tuzcu M, Aslan A, Tuzcu Z, Yabas M, Bahcecioglu IH, IH Ozercan, Kucuk O, Sahin K. Tomato powder impedes the development of azoxymethane-induced colorectal cancer in rats through suppression of COX-2 expression via NF- κ B and regulating Nrf2/HO-1 pathway. Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências da Universidade Firat, Elazig, Turquia. Molecular Nutrition & Food Research. 2012. v. 56, n 9, p. 1477 – 1481.

Varanda EA. Atividade de plantas medicinais. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl. 2006. v. 27, n.1, p.1-7.

Varanda EM, Pais MP. Insect folivory in *Didymopanax vinosum* (Apiaceae) in a vegetation mosaic of Brazilian cerrado. Braz J Biol. 2006, p. 80-67.

Vilela M. L. A; et al. The protective effects of nutritional antioxidant therapy on Ehrlich solid tumorbearing mice depend on the type of antioxidant therapy chosen: histology, genotoxicity and hematology evaluations. 2010, p. 1091–1098.

Walsh-Reitz MM, Huang EF, Musch MW, Chang EB, Martin TE, Kartha S, et al. AMP-18 protects barrier function of colonic epithelial cells: role of tight junction proteins. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2005; 289: G163–171.

Young-Joon, et al. A case of aplastic anemia in a patient with systemic lupus erythematosus. Mod Rheumatol. .2003; v.13, n 2, p. 80-177.

Zhang P, Omaye ST. β -Carotene: interactions with α -tocopherol and ascorbic acid in microsomal lipid peroxidation. Journal of Nutritional Biochemistry.2001; 12:38-45.

Ziliotto L. Modulação da carcinogênese do cólon pelo cogumelo *Agaricus blazei* no rato [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2008.