



Universidade de Brasília

Universidade de Brasília – UnB

Departamento de Nutrição

Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Título

Ação quimiopreventiva do tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) no desenvolvimento de criptas aberrantes no cólon de ratos tratados com azoximetano

Linha de pesquisa: Bioquímica Nutricional

Aluna: Natália Aboudib Campos

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Fernandes Arruda

Co-orientadora: Profa. Dra. Nathália Marcolini Pelúcio Pizato

Brasília – DF

Agosto / 2017



Universidade de Brasília

Universidade de Brasília – UnB

Departamento de Nutrição

Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Natália Aboudib Campos

Ação quimiopreventiva do tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) no desenvolvimento de criptas aberrantes no cólon de ratos tratados com azoximetano

Tese apresentada à Universidade de Brasília
como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutora em Nutrição Humana. Área de Concentração:
Bioquímica Nutricional.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Fernandes Arruda
Co-orientação: Profa. Dra. Nathália Marcolini Pelucio Pizato

Brasília, 29 de agosto de 2017

Universidade de Brasília
Departamento de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Comunicamos a aprovação da tese de doutorado da aluna **Natália Aboudib Campos**, intitulada “**Ação quimiopreventiva do tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) no desenvolvimento de criptas aberrantes no cólon de ratos tratados com azoximetano**”, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana do Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília.

Profa. Dra. Sandra Fernandes Arruda
Presidente – Universidade de Brasília (UnB)

Profa. Dra. Eliane Said Dutra
Membro interno ao PPGNH– Universidade de Brasília (UnB)

Profa. Dra. Andrea Barretto Motoyama
Membro interno à Universidade e externo ao PPGNH – Universidade de Brasília (UnB)

Profa. Dra. Andreza Fabro de Bem
Membro externo à universidade - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Profa. Dra. Kênia Mara Baiocchi de Carvalho
Suplente - Universidade de Brasília (UnB)

Brasília, 29 de agosto de 2017.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por estarem sempre ao meu lado me apoiando, consolando e acalmado em todos os momentos que precisei. Obrigada por tudo o que vocês fizeram e fazem por mim e pela Lud, temos muita sorte de ter vocês como pais! Obrigada pelos valores morais que vocês nos passaram e pela educação que nos deram, espero conseguir ser da mesma forma com meus filhos. Amo muito vocês!

To my husband, that I love so much! Thanks for spoiling me and making me happy! Thanks for being by my side every time I needed. Thanks for listening to me cry without complaining. Thanks for showing that you love me in your particular and not traditional way, LOL. I love you forever!

À “coisinha” mais gostosa da mamãe. Penny, obrigada por trazer tanta alegria e amor a nossas vidas, amo você!

À minha amada irmã, pela amizade, amor e companheirismo. Agradeço à Deus todos os dias pela família maravilhosa que temos.

À minha orientadora, Sandra, pelos ensinamentos, confiança, dedicação, paciência, conversas e desabafos. Te admiro muito pela profissional que você é! Você terá sempre um lugar especial no meu coração.

Aos meus familiares, pelo incentivo, torcida e amor.

Ao casal Raquel e Ricardo, por todos os agradáveis momentos que passamos juntos.

Aos meus queridos amigos e amigas, em especial à Marcela e Azadeh. Marcela, obrigada por ter tornado essa jornada menos difícil. Obrigada por toda a ajuda que você me deu e por ter sempre me puxado para cima, é muito bom trabalhar com gente assim! Azinha, muito obrigada por todas as conversas esclarecedoras e momentos descontraídos que você me proporcionou.

A todos os funcionários do Laboratório.

À Deus, pela minha vida, saúde e pela família maravilhosa que me deu.

RESUMO

Introdução: o câncer de cólon é o segundo e terceiro tipo de câncer mais comum em mulheres e homens, respectivamente. As respostas oxidativas e inflamatórias desempenham um papel importante no desenvolvimento e na prevenção do câncer, sendo essas respostas passíveis de modulação por compostos fitoquímicos presentes na alimentação. O tucum-do-cerrado, um fruto encontrado no cerrado brasileiro e rico em fitoquímicos, apresenta um alto potencial antioxidante *in vivo* em ratos, e *in vitro*. O presente estudo investigou o efeito quimiopreventivo do tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) no desenvolvimento de focos de criptas aberrantes (FCA), em ratos induzidos ao câncer de cólon com azoximetano (AOM). **Métodos:** Ratos Wistar (n = 28) foram tratados durante 12 semanas com uma das seguintes dietas: dieta controle (CT); dieta controle + injeção de AOM (CT/DR); dieta controle + 15% de tucum-do-cerrado (TU); dieta controle + 15% de tucum-do-cerrado + injeção de AOM (TU/DR). Após a eutanásia, foi realizada a contagem de focos de criptas aberrantes no cólon e os níveis de mRNA de interleucina 1-beta (Il1b), interleucina-6 (Il6), fator de necrose tumoral-alfa (Tnfa), ciclooxigenase-2 (Cox2), proteína X associada a bcl-2 (Bax), proteína linfoma de células B 2 (Bcl2) foram determinados no cólon; os níveis de proteína da COX-2, BAX, Bcl-2, razão Bcl2/BAX, IL-6, IL-1 β e TNF- α foram determinados no cólon; marcadores de estresse oxidativo (malonaldeído e carbonil) e a atividade de enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione_S-transferase, superóxido dismutase) foram determinados no fígado e cólon. **Resultados:** a associação do tucum-do-cerrado com a injeção de AOM (TU/DR) aumentou a atividade hepática de glutathione_S-transferase; diminuiu os níveis de MDA no cólon e no fígado; aumentou os níveis dos biomarcadores pró-inflamatórios COX2 e TNF α no cólon e sangue, respectivamente; e os níveis da proteína pró-apoptótica BAX e a razão Bcl2/Bax no cólon, em relação ao grupo CT/DR. **Conclusão:** o presente estudo mostrou que o consumo de tucum-do-cerrado diminuiu o dano oxidativo a lipídeos, induziu um efeito pró-inflamatório e promoveu um "ambiente" pró-apoptótico em ratos tratados com AOM, porém não foram observadas alterações na contagem de criptas aberrantes entre os grupos tratados com AOM.

Palavras-chave: fitoquímico, azoximetano, estresse oxidativo, inflamação, apoptose, câncer de cólon.

ABSTRACT:

Introduction: Colon cancer is the second and third most common type of cancer in women and men, respectively. Oxidative and inflammatory responses play an important role in the development and prevention of cancer, and these responses can be modulated by phytochemical compounds present in the diet. The tucum-do-cerrado, a fruit found in the Brazilian cerrado and rich in phytochemicals, presents a high antioxidant potential in vivo, in rats, and in vitro. The present study investigated the chemopreventive effect of tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) on the development of aberrant crypt foci (FCA) in rats induced colon cancer with azoxymethane (AOM). **Methods:** Wistar rats (n = 28) were treated for 12 weeks with one of the following diets: control diet (CT); control diet + AOM injection (CT / DR); control diet + 15% tucum-do-cerrado (TU); control diet + 15% tucum-do-cerrado + AOM injection (TU / DR). After euthanasia, aberrant crypt foci were counted in the colon and mRNA levels of interleukin 1-beta (Il1b), interleukin-6 (Il6), tumor necrosis factor-alpha (Tnfa), cyclooxygenase-2 (Cox2), bcl-2-associated protein X (Bax), B-cell lymphoma protein (Bcl2) were determined in the colon; the protein levels of COX-2, BAX, Bcl-2, Bcl-2 / BAX, IL-6, IL-1 β and TNF- α were determined in the colon. Oxidative stress markers (malonaldehyde and carbonyl) and the activity of antioxidant enzymes (catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase, superoxide dismutase) were determined in the liver and colon. **Results:** the association of tucum-do-cerrado with AOM injection (TU/DR) increased the hepatic activity of glutathione-S-transferase; decreased levels of MDA in the colon and liver; increased the levels of the pro-inflammatory biomarkers COX2 and TNF α in the colon and blood respectively and the levels of the pro-apoptotic protein BAX and the Bcl-2/Bax ratio in the colon, in relation to the CT/DR group. **Conclusion:** the present study showed that the consumption of tucum-do-cerrado decreased the oxidative damage to lipids, induced a pro-inflammatory effect and promoted a pro-apoptotic "environment" in rats treated with AOM, however no changes were observed in the count of aberrant crypts between the AOM-treated groups.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1		
Figura 1.1	Características adquiridas pelas células cancerígenas	20
Figura 1.2	Características emergentes e características habilitadas no câncer	21
Figura 1.3	Via intrínseca e extrínseca da apoptose	24
Figura 1.4	As três subfamílias da família Bcl-2: Bcl-2, Bax e BH3-apenas	25
Figura 1.5	Modelo de ativação direta e indireta da Bax e Bak por proteínas da subfamília BH3-apenas	26
Figura 1.6	Esquema de proteção da integridade mitocondrial pela Bcl-2	26
Figura 1.7	O papel da inflamação nos três estágios do desenvolvimento tumoral	32
Figura 1.8	Ação antitumoral do TNF α	35
Figura 1.9	Ação pró-tumoral do TNF α	35
Figura 1.10	Via de produção de prostaglandinas e tromboxanos	37
Figura 1.11	Degradação e secreção da PGE ₂	38
Figura 2.1	Fases do desenvolvimento do câncer de cólon	39
Figura 2.2	Focos de criptas aberrantes (FCA)	40
Figura 3.1	Via de ativação e indução do câncer por azoximetano	41
Figura 3.2	Modelo de indução de câncer de cólon por azoximetano	42
Figura 3.3	Proteínas com expressão alteradas após indução de câncer de cólon com AOM	43
Figura 4.1	Alguns mecanismos de atuação das ERs que podem facilitar o desenvolvimento do câncer	46
Figura 4.2	Como as células respondem a diferentes níveis de ERs	47
Figura 4.3	Diferentes ações das espécies reativas de oxigênio (EROs) na tumorigênese	48
Figura 5.1	Ação de enzimas antioxidantes na proteção das células contra Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	50
Figura 5.2	Reação catalisada pela catalase	50
Figura 5.3	Reação catalisada pela glutaciona peroxidase	51
Figura 5.4	Reação catalisada pela glutaciona redutase	51
Figura 5.5	Reação catalisada pela glutaciona S transferase	52
Figura 5.6	(A) Reação catalisada pela CuZnSOD; (B) reação catalisada pela MnSOD	52

Figura 5.7	Efeitos antioxidantes e pró-oxidantes dos polifenóis do chá verde no desenvolvimento do câncer	54
Figura 6.1	Classificação dos fitoquímicos	55
Figura 7.1	Imagem do tucum-do-cerrado (<i>Bactris setosa</i> Mart)	57
Figura 9.1	Esquema de tratamento dos animais	61
Capítulo 2		
Figure 1	Study design.	121
Figure 2	Effect of tucum-do-cerrado consumption in protein (MDA) and lipid oxidation (carbonyl) in liver and colon from rats treated with AOM and placebo.	123
Figure 3	Effect of tucum-do-cerrado consumption in antioxidant enzyme activity in the liver (A) and colon (B) of rats treated with AOM and placebo.	124
Figure 4	Effect of tucum-do-cerrado consumption in the mRNA (A) and protein (B, C) levels of apoptosis related proteins, BAX and Bcl-2, in colon of rats treated with AOM and placebo.	125
Figure 5	Effect of tucum-do-cerrado consumption in the colon levels of cytokines mRNA (A) and serum protein (B) of rats treated with AOM and placebo.	126
Figure 6	Effect of tucum-do-cerrado consumption in the mRNA (A) and protein (B, C) levels of cyclooxygenase 2 in colon of rats treated with AOM and placebo.	126

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1		
Tabela 9.1	Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na reação de qPCR	68
Capítulo 2		
Table 1	Sequences of the oligonucleotides used in the qPCR reaction.	121
Table 2	Effect of tucum-do-cerrado consumption in food intake, weight gain and hematological parameters in rats treated with AOM and placebo.	122
Table 3	Effect of tucum-do-cerrado consumption in the number of AC/cm, ACF/cm and HMAFC/cm in the colon of rats treated with AOM.	122

LISTA DE ABREVIATURAS

Actb: β -actina

A_{nm}: absorvância

AOM: azoximetano

Apaf-1: fator de ativação de apoptose 1

APS: persulfato de amônia

ATP: trifosfato de adenosina

Bax: Proteína X Associada a bcl-2

Bcl-2: Linfoma de células B 2

BCRJ: Banco de Células do Rio de Janeiro

Bim: BCL2-like 11 (facilitador da apoptose número 11)

Bid: Proteína Agonista de Morte Celular de Domínio Interatuante com BH3

CA: criptas aberrantes

CAT: catalase

células NK: células *natural killer*

cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar

CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média

c-myc: homólogo ao oncogene viral v-myc de mielocitomatose

COX-1: ciclo-oxigenase-1

COX-2: ciclo-oxigenase-2

CT: ciclo *threshold*

CT/DR: grupo controle + injeção AOM

CT: grupo controle + injeção placebo

dL: decilitro

DNA: ácido desoxirribonucléico

DNPH: dinitrofenil-hidrazina

DSS: sulfato de sódio dextrana

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ERNs: espécies reativas de nitrogênio

EROs: espécies reativas de oxigênio

ERs: espécies reativas

FAD: dinucleótido de flavina e adenina

FCA: focos de criptas aberrantes
FCAAM: focos de criptas aberrantes de alta multiplicidade
Fe²⁺: ferro férrico
Fe³⁺: ferro ferroso
fl: fentolítro
GPx: glutatona peroxidase
GPx-1: glutatona peroxidase citosólica
GPx-2: glutatona peroxidase intestinal
GPx-3: glutatona peroxidase plasmática
GPx-4: glutatona peroxidase fosfolípido hidroperóxido
GR: Glutaciona Redutase
GST: Glutaciona S-transferase
GSH: glutatona reduzida
GSSG: glutatona oxidada
G6PDH: Glicose-6-fosfato Desidrogenase
HCl: ácido clorídrico
HCM: hemoglobina corpuscular média
HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Performance
H₂O: molécula da água
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
H₂SO₄: ácido sulfúrico
IL-1: interleucina 1
IL-1 β : interleucina 1 β
IL-1 α : interleucina 1 α
IL-6: interleucina 6
IL-17A: interleucina 17A
IL-17F: interleucina 17F
IL-21: interleucina 21
IL-22: interleucina 22
INCA: Instituto Nacional de Câncer
Kg: quilograma
MAM: metilazoximetanol
mPGES-1: prostaglandina E sintase-1 microssomal

mRNA: ácido ribonucléico mensageiro
MRP4: proteína associada a multirresistência 4
MT: microambiente tumoral
MTT: brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
NF κ B: ativação do fator nuclear kappa B
NO•: óxido nítrico
Nrf2: fator nuclear (derivado de eritroide-2) tipo 2
OH•: hidroxil
OMS: Organização Mundial de Saúde
ONOO⁻: peroxinitrito
O₂: molécula de oxigênio
O₂^{•-}: superóxido
O₃: ozônio
¹O₂: Oxigênio singleto
pg: petagrama
PGD₂: prostaglandina D₂
PGE₂: prostaglandina E₂
PGES: prostaglandina E sintase-1
PGF_{2 α} : prostaglandin F_{2 α}
PGH₂: prostaglandina H₂
PGIS: prostaglandina I sintetase
PGI₂: prostaglandina I₂
PLA₂: fosfolipase A₂
PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil
pRB: a proteína do retinoblastoma
PVDF: difloride de polivinilideno
qRT-PCR: reação em cadeia de polimerase reversa em tempo real
receptor EP₂: receptor 2 de prostaglandina E₂
receptor EP₄: receptor 4 de prostaglandina E₂
RNA: ácido ribonucléico
RO₂•: radical peroxil

RO•: radical alcoxil

SOD: Superóxido Dismutase

SPSS: Statistical Packge for Social Sciences

TBA: ácido tiobarbiturico

TBA-MDA: complexo ácido tiobarbiturico e malondialdeído

TCA: ácido tricloroacético

TGF β : fator de transformação do crescimento beta

TH1: linfócitos T auxiliares 1

TH17: linfócitos T auxiliares 17

TMED: tetrametil etilenodiamino

TNF α : fator de necrose tumoral alfa

TU: grupo tucum-do-cerrado + injeção placebo

TU/DR: grupo tucum-do-cerrado + injeção AOM

TxA₂: tromboxano A2

TxS: tromboxano sintase

VCM: volume corpuscular médio

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular

8-oxo-dG: 8-oxo-deoxyguanosine

15d-PGJ₂: 15-Deoxi-Delta-12,14-prostaglandina J2

15-keto- PGE₂: 15-ceto-prostaglandina E₂

15-PGDH: 15-hidróxi-prostaglandina-desidrogenase

ESTRUTURA DA TESE

Esta tese está estruturada da seguinte forma: **Capítulo 1**, composto pela introdução, revisão bibliográfica, objetivos e materiais e métodos. Em seguida, **Capítulo 2**, com os resultados, discussão e conclusão da pesquisa realizada no doutorado estão apresentados em formato de um artigo original, intitulado **“Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) modulates oxidative stress, inflammation, and apoptosis-related proteins in rats treated with azoxymethane”**.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é uma das principais causas de morte no mundo, sendo responsável por 8,2 milhões de mortes em 2012. A incidência mundial desta doença é bastante alta e tende a crescer com o envelhecimento da população, com uma previsão de 21,4 milhões de casos novos em 2030 (Ferlay *et al.*, 2015).

O câncer de cólon é o segundo tipo mais comum em mulheres e terceiro mais comum em homens. Em 2012 foram diagnosticados 746 mil novos casos no mundo, correspondendo a 10% dos casos de câncer diagnosticados naquele ano (Ferlay *et al.*, 2015). No Brasil, este tipo de câncer é o 4º de maior incidência na população brasileira (Brasil, 2014).

O câncer é um conjunto de doenças onde células alteradas (malignas) crescem desordenadamente invadindo órgãos e tecidos (Brasil, 2014). Durante o desenvolvimento do câncer, as células cancerígenas adquirem uma série de importantes características (conhecidas como “hallmarks” do câncer) que vão permitir que a célula sobreviva, prolifere e dissemine (Hanahan e Weinberg, 2011). Essas características incluem: manter a sinalização que induz proliferação celular, inibir a ação de supressores de crescimento, resistir a mecanismos que induzem morte celular, adquirir um potencial replicativo ilimitado (imortalidade replicativa), induzir angiogênese e ativar a invasão do tecido e a metástase (Hanahan e Weinberg, 2000).

A resistência à morte celular (como a resistência a apoptose) é uma dessas características adquiridas pelas células cancerígenas (Hanahan e Weinberg, 2011). O organismo de mamíferos dispõe de diversos mecanismos que induzem a apoptose, um deles é mediado pelas proteínas Bax, pró-apoptótica, e Bcl-2, anti-apoptótica. As células tumorais podem bloquear a apoptose diminuindo a razão Bcl-2/BAX. Altos níveis da proteína Bcl-2 é encontrada em mais da metade dos tumores (Amundson *et al.*, 2000).

Um microambiente tumoral inflamatório é considerado outra característica chave para o estabelecimento do câncer ou sobrevivência da célula cancerígena (Hanahan e Weinberg, 2011). Estudos mostram que em lesões pré-neoplásicas

de câncer de cólon há um aumento dos níveis da ciclooxigenase-2, uma enzima que catalisa a produção de prostaglandinas associadas ao processo inflamatório, enquanto a redução dos níveis dessa enzima apresenta um efeito preventivo no desenvolvimento de câncer de cólon (Oshima *et al.*, 1996; Kawamori *et al.*, 1998). O fator de necrose tumoral alfa (TNF α) é uma das principais citocinas mediadoras da inflamação no microambiente tumoral (Balkwill, 2006), entretanto, pode induzir ações anti e pró tumorais dependendo, aparentemente, de seus níveis e tempo de exposição (Mocellin e Nitti, 2008). Níveis aumentados das interleucinas 1 β e 6 já foram observados em diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de cólon, e diversas ações pró-tumorais já foram associadas a essas citocinas (Elaraj *et al.*, 2006; Heikkila *et al.*, 2008). As espécies reativas também apresentam uma ação dúbia no desenvolvimento de câncer e, assim como o TNF α , o efeito pró ou anti tumoral dependerá da concentração (Gorrini *et al.*, 2013).

Estudos mostram que aproximadamente um terço de todas as plantas e vegetais apresentam ação antioxidante e anti-inflamatória (Wang *et al.*, 2014). Assim, a alimentação exerce um papel importante tanto no desenvolvimento quanto na prevenção do câncer (Tete *et al.*, 2012). Com o intuito de identificar compostos naturalmente encontrados em frutas (Yi *et al.*, 2005), raízes (Shureiqi e Baron, 2011) e hortaliças (Rijken *et al.*, 1999) que apresentem um efeito quimiopreventivo no desenvolvimento de câncer de cólon, alguns estudos *in vitro* e *in vivo* vem sendo realizados. Desta forma, uma vez comprovada a eficácia e segurança destes compostos, esses poderão ser utilizados na prevenção e/ou tratamento do câncer de cólon.

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que o tucum-do-cerrado, um fruto encontrado no cerrado brasileiro e rico em compostos bioativos, apresentou um alto potencial antioxidante *in vivo* em ratos (Fustinoni-Reis *et al.*, 2016), e *in vitro* (Siqueira *et al.*, 2013). A literatura mostra que alimentos ricos em diversos fitoquímicos são capazes de modular a inflamação reduzindo a expressão da COX-2 (Kim *et al.*, 2013) e das citocinas TNF α (Kauntz *et al.*, 2012), IL-1 β (Ahmed *et al.*, 2004) e IL-6 (Hosokawa *et al.*, 2010). Além disso, esses compostos podem induzir apoptose, por meio da modulação das proteínas Bax e Bcl-2 (Kauntz *et al.*, 2012). Os fitoquímicos

podem aumentar a atividade de enzimas antioxidantes (Pandurangan *et al.*, 2014), reduzindo assim o estresse oxidativo. Também já foi observado uma redução no aparecimento de focos de criptas aberrantes em animais tratados com fitoquímicos (Vanamala *et al.*, 2006). Todas essas ações resultam em efeitos anticancerígenos. Desta forma, o presente trabalho visa testar a hipótese de que o consumo de tucum-do-cerrado exerce uma ação quimiopreventiva no desenvolvimento de câncer de cólon induzido por azoximetano em ratos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 - Câncer

O câncer é uma condição clínica causada por células que sofreram alterações e adquiriram a capacidade de crescer de forma desordenada (crescimento neoplásico), o que permite a invasão e destruição de tecidos e órgãos adjacentes e/ou distantes (metástase) (Brasil, 2014). O desenvolvimento do câncer acontece em múltiplas etapas que ocorrem ao longo de muitos anos (Weinberg, 2014). Assim, com o envelhecimento da população mundial, a incidência de câncer vem aumentando em todo o mundo (Ferlay *et al.*, 2015). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2012 foram diagnosticados 14,1 milhões de casos novos de câncer no mundo e a previsão para 2030 é de 21,4 milhões de casos novos, já que a expectativa de vida da população mundial deve aumentar.

A transição de uma célula normal para uma neoplásica acontece por uma série de alterações genéticas e epigenéticas em genes supressores de tumor e proto-oncogenes (Femia *et al.*, 2008). Os genes supressores de tumor são genes que, ao serem inativados, aumentam a chance de crescimento tumoral, pois normalmente atuam reparando danos no DNA, desacelerando o ciclo celular ou controlando a apoptose. A inibição total ou parcial de algum desses genes (que acontece na grande maioria dos tumores) pode resultar em um tumor. Os proto-oncogenes são genes presentes nas células normais que costumam agir no ciclo celular. Assim, a expressão aumentada de algum desses genes, por uma mutação, por exemplo, resulta em um crescimento celular descontrolado podendo desencadear o aparecimento de um tumor. Quando um proto-oncogene deixa de funcionar normalmente e sua expressão é alterada, esse passa a ser chamado de oncogene (Cooper, 2000; Weinberg, 2014).

A carcinogênese, ou seja, a formação do câncer é dividida em três estágios: iniciação, promoção e progressão. O estágio de iniciação é causado por alterações irreversíveis no genoma, o que pode ser resultado de danos ao DNA, aos cromossomos ou ao epigenoma. Os iniciadores (agentes que causam danos ao genoma) podem ser substâncias químicas endógenas, como os radicais livres; exógenas, como os xenobióticos; ou radiação ionizante. Alterações que levem à ativação de proto-oncogenes ou à inativação de genes

supressores de tumor podem ser classificadas como eventos iniciadores de tumor (Yuspa e Poirier, 1988; Weitzman e Gordon, 1990; Jones e Baylin, 2002; Halliwell, 2007). A etapa seguinte é a de promoção do tumor, onde os danos genômicos resultam em alterações na expressão de genes que regulam a diferenciação e o crescimento celular. Assim, as células inicializadas sofrem expansão clonal seletiva, proliferação celular e/ou inibição da apoptose, podendo resultar na formação de um tumor benigno. Este estágio é normalmente reversível, pois a promoção do tumor é mediada por agentes promotores que, se deixarem de existir, permitem a regressão das lesões. Os xenobióticos e substâncias endógenas como radicais livres e proteínas inflamatórias podem atuar como agentes promotores (Cairns, 1975; Verma e Boutwell, 1980; Yuspa e Poirier, 1988; Weitzman e Gordon, 1990; Jones e Baylin, 2002; Pollock, 2006; Halliwell, 2007). O último estágio da carcinogênese é o de progressão. Nesta etapa ocorrem mudanças adicionais no genoma que induzem a transformação de lesões pré-malignas em lesões malignas que normalmente vêm acompanhadas de rápido crescimento, invasão, metástase e instabilidade genética (Weitzman e Gordon, 1990; Pollock, 2006; Halliwell, 2007).

Durante o desenvolvimento do câncer, a célula tumoral adquire importantes características, que vão permitir que a célula sobreviva, prolifere e dissemine (Hanahan e Weinberg, 2000). Em 2000, Hanahan e Weinberg (2000) propuseram seis características do câncer para explicar o desenvolvimento e a manutenção dessas doenças: manter a sinalização que induz proliferação celular, inibir a ação de supressores de crescimento, resistir a mecanismos que induzem morte celular, adquirir um potencial replicativo ilimitado (imortalidade replicativa), induzir angiogênese e ativar a invasão do tecido e a metástase (Figura 1.1) (Hanahan e Weinberg, 2000).

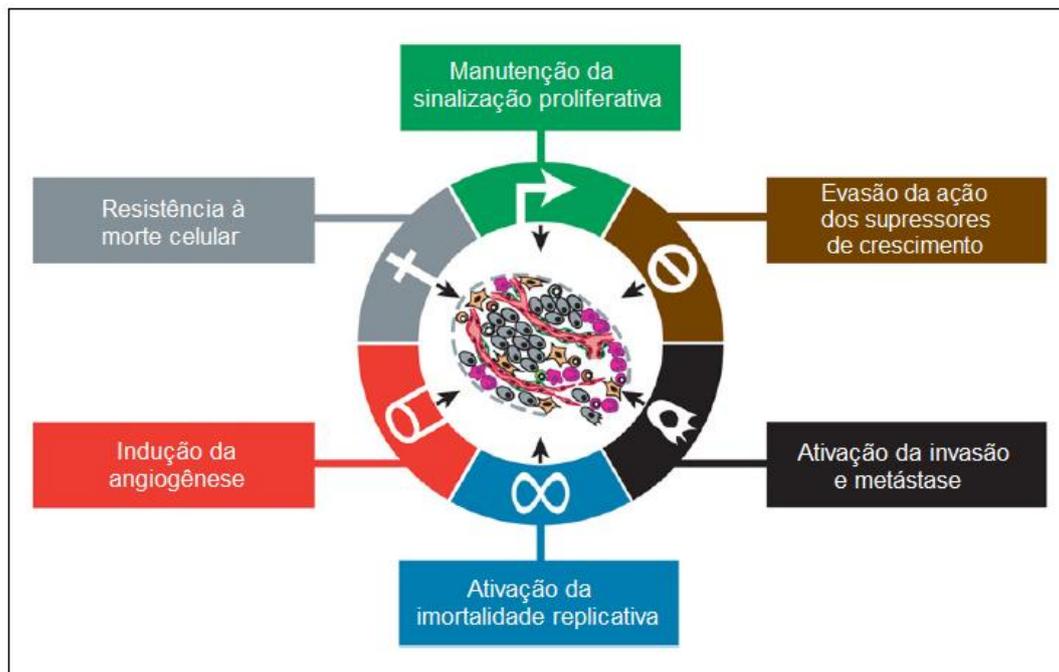


Figura 1.1: Características adquiridas pelas células cancerígenas.

Fonte: adaptado de Hanahan e Weinberg (2000).

Com o avanço dos estudos, novas características foram sugeridas. Em 2011, Hanahan e Weinberg (2000) publicaram um novo estudo sugerindo mais duas características adquiridas pelas células tumorais: reprogramação do metabolismo energético e escape do sistema imunológico (Figura 1.2) (Hanahan e Weinberg, 2011). Neste mesmo trabalho, os autores sugeriram que a obtenção dessas características pelas células tumorais acontece em grande parte como consequência a duas características que são habilitadas nestas células ou no microambiente onde elas estão, são elas a instabilidade genômica e a inflamação (Hanahan e Weinberg, 2011).

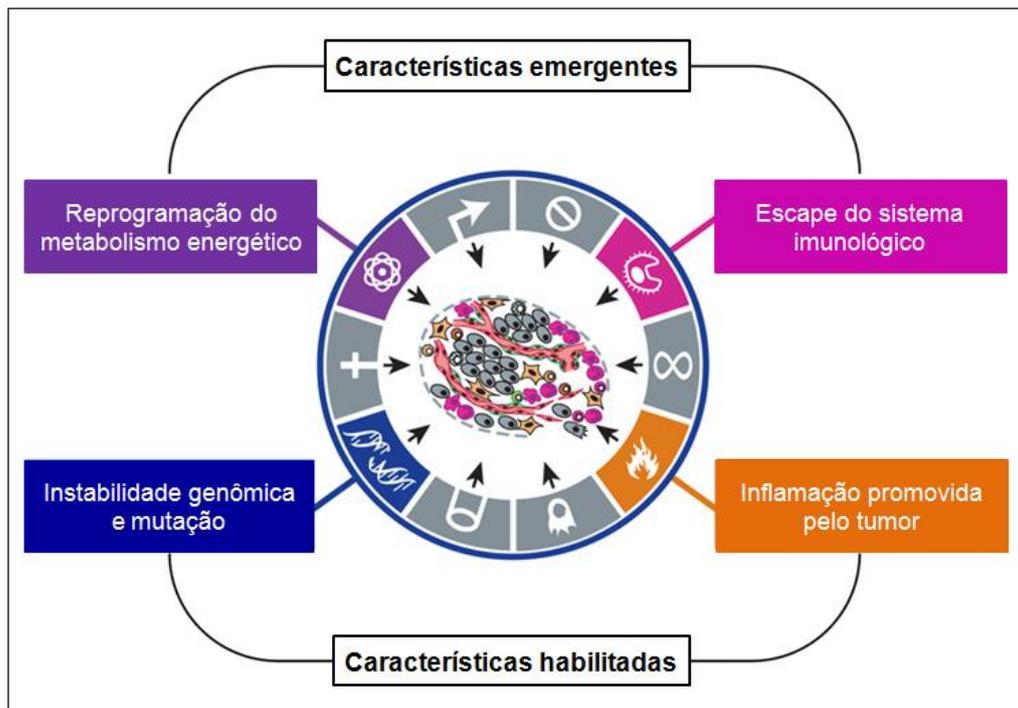


Figura 1.2: Características emergentes e características habilitadas no câncer.

Fonte: adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

Manutenção da sinalização proliferativa

O ciclo celular é um conjunto de complexos eventos que controlam o crescimento e a divisão da célula, resultando na formação de células filhas geneticamente idênticas à célula mãe. Em uma célula normal, o ciclo celular é iniciado por sinais mitogênicos liberados pelo ambiente que circunda a célula. Esses sinais são mediados por diversos fatores de crescimento que se ligam aos seus receptores e induzem cascatas de transdução de sinais. Essas cascatas ativam diversos fatores de transcrição que regulam genes envolvidos no ciclo celular (Harvey Lodish, 2007; Weinberg, 2014).

Alterações que resultem em proliferação celular descontrolada são fundamentais para as células cancerígenas (Hanahan e Weinberg, 2011). Essas alterações acontecem em componentes dos sinais mitogênicos e/ou em proteínas reguladoras do ciclo celular (Evan e Vousden, 2001). Em um segundo momento, a célula cancerígena também passa a controlar as vias de sinalização que regulam sua progressão, ou seja, o seu tamanho. Muitas vezes esses sinais influenciam na sobrevivência e no metabolismo energético dessas células (Hanahan e Weinberg, 2011).

Evasão da ação dos supressores de crescimento

A proliferação celular é controlada por sinais pro e anti-proliferativos. Nos tecidos normais, existe um equilíbrio entre aqueles que induzem o crescimento celular e aqueles que bloqueiam esse crescimento (Weinberg, 2014). Nas células cancerígenas, tanto os sinais pro quanto os anti-proliferativos estão desregulados (Hanahan e Weinberg, 2011).

Resistência à morte celular

Outro mecanismo de controle de expansão celular é a apoptose, a morte celular programada (Hanahan e Weinberg, 2000). A apoptose acontece quando a célula sofre algum dano que não pode ser reparado, como, por exemplo, um dano severo no DNA (Weinberg, 2014). Assim, a apoptose é considerada uma barreira natural para o desenvolvimento do câncer, já que as células com potencial para se tornarem cancerígenas são eliminadas (Evan e Littlewood, 1998; Lowe *et al.*, 2004; Adams e Cory, 2007).

A maquinaria apoptótica é composta por reguladores, que reconhecem os primeiros sinais de indução de morte celular, e efetores, os quais vão participar da fase de execução da apoptose (Hanahan e Weinberg, 2011). Os reguladores se dividem em dois grupos, um grupo que reconhece sinais extra celulares (via extrínseca da apoptose) e um que reconhece sinais intracelulares (via intrínseca da apoptose) (Riedl e Shi, 2004). A ativação da apoptose por ambas as vias vai resultar no acionamento de uma via em comum, a cascata das caspases, as quais vão mediar a fase de execução da apoptose (Riedl e Shi, 2004; Hassan *et al.*, 2014).

A via intrínseca da apoptose (Figura 1.3) é iniciada por estímulos estressantes intracelulares, como danos a biomoléculas (Riedl e Shi, 2004). A mitocôndria exerce um papel fundamental nessa via, pois estímulos pro apoptose induzem a liberação para o citosol de diversas proteínas residentes do interior dessa organela (Wang, 2001). Dentre essas proteínas está o citocromo c, que vai se ligar a proteína citoplasmática Apaf-1 formando um complexo chamado apoptossomo. Este complexo converte a pro-caspase 9 em caspase 9, a forma ativa dessa protease (Li *et al.*, 1997; Green e Kroemer, 2004). A

caspase 9 cliva a pro-caspase 3 em caspase 3 que continua a clivagem e a ativação de outras pro-caspases. A cascata das caspases continua até o momento em que essas proteases clivam um "substrato morto", ou seja, proteínas que ao serem degradadas causam mudanças que dão um fenótipo apoptótico à célula (Figura 1.3) (Weinberg, 2014). Assim, os componentes do interior da célula marcada para morrer são degradados e a célula começa a encolher até que seja consumida por células vizinhas ou fagocitárias (Hanahan e Weinberg, 2011; Hassan *et al.*, 2014).

A via extrínseca da apoptose (Figura 1.3) inicia-se por meio da ativação de algum dos receptores de morte (Nagata, 1999), uma família de receptores transmembrana compartilham um domínio citoplasmático em comum, o denominado domínio de morte. Os ligantes dos receptores de morte são membros da família do fator de necrose tumoral (TNF), uma família que inclui o TNF- α (discutido mais na frente). Assim, quando um receptor de morte é estimulado por seu ligante, esse cliva as pro-caspases 8 e 10 tornando-as ativas. Essas caspases acionam caspases executoras que convergem para a mesma via descrita acima (Riedl e Shi, 2004; Hanahan e Weinberg, 2011; Hassan *et al.*, 2014).

A apoptose também pode ser induzida por uma via extrínseca alternativa, onde células NK e linfócitos T citotóxicos lançam proteases indutoras de apoptose (granzima B) na célula alvo (Figura 1.3) (Motyka *et al.*, 2000). A granzima B ativa a cascata das caspases por meio da clivagem e ativação das pro-caspases 3 e 8 tornando-as ativas (Weinberg, 2014).

As células tumorais podem bloquear a apoptose por diversos mecanismos. Dentre esses mecanismos, o aumento da expressão de proteínas anti apoptóticas, como a Bcl-2, ou a diminuição dos níveis de proteínas pró apoptóticas, como a Bax (Miyashita *et al.*, 1994). A super expressão da Bcl-2 é encontrada em mais da metade dos tumores (Amundson *et al.*, 2000). Esse mecanismo será de grande importância para este trabalho, portanto maiores detalhes dessa via será descrita abaixo.

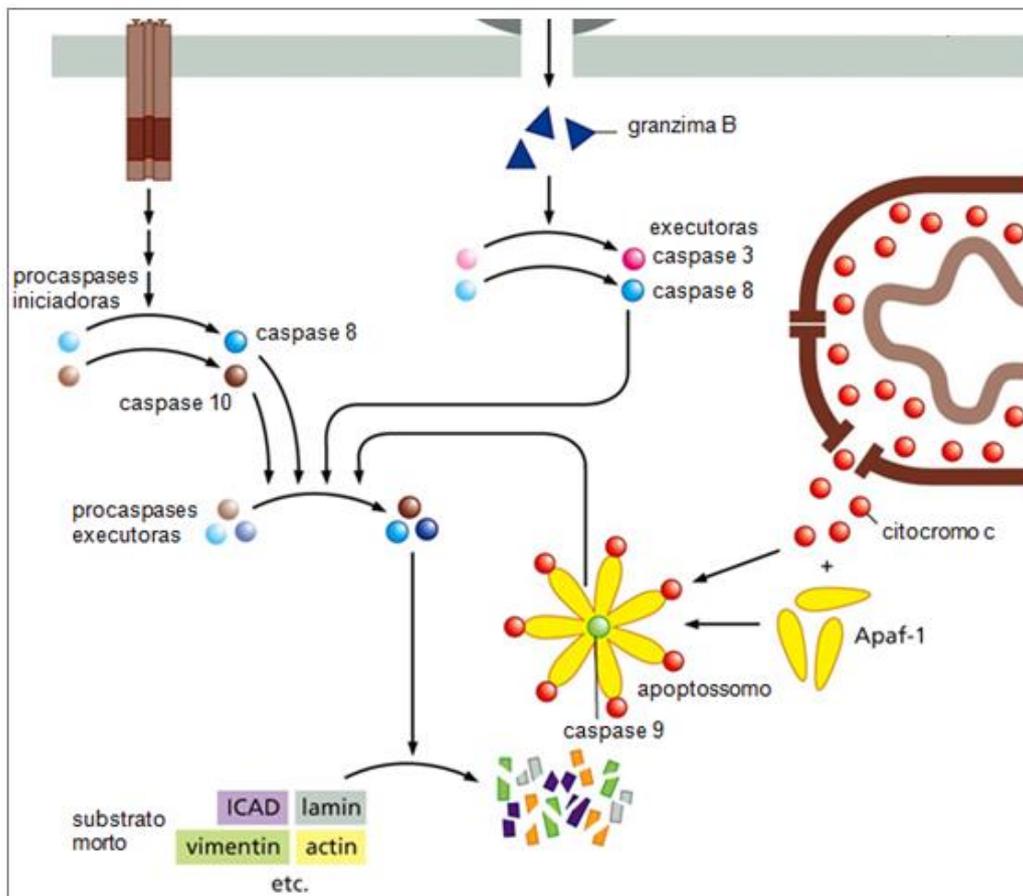


Figura 1.3: Via intrínseca e extrínseca da apoptose.

Fonte: adaptado de Weinberg (2014).

Bcl-2 e Bax

A via intrínseca da apoptose é regulada principalmente pela família da Bcl-2, uma família formada por proteínas de três subfamílias: subfamília da Bcl-2 (com ação anti-apoptose), subfamília da Bax e subfamília BH3- apenas (ambas com ação pró-apoptótica; Figura 1.4) (Cory e Adams, 2002; Adams e Cory, 2007).

As proteínas pro-apoptose trabalham em conjunto sendo necessária a participação das duas subfamílias, Bax e BH3- apenas, para a indução da apoptose. As proteínas da subfamília BH3- apenas funcionam como sensores de danos e como antagonistas diretas das proteínas anti-apoptóticas, enquanto as proteínas da família Bax atuam mais à frente na via, induzindo o rompimento da mitocôndria (Cory e Adams, 2002; Adams e Cory, 2007). Existem dois mecanismos descritos na literatura que explicam como as proteínas da subfamília BH3- apenas iniciam a ativação da apoptose, o modelo de ativação

direta e o modelo de ativação indireta (ambos modelos são mediados por Bad, Bim e tBid; Figura 1.5) (Kvansakul e Hinds, 2013).

No modelo de ativação direta, existem proteínas ativadoras (Bim e tBid - Bid na sua forma ativa) que se ligam diretamente à Bax e Bak ativando-as, e uma proteína sensibilizadora (Bad) que se liga às proteínas Bcl-2 inibindo-as (Figura 1.5a) (Letai *et al.*, 2002). O modelo de ativação indireta sugere que proteínas da subfamília BH3-apeenas (Bad, Bim e tBid) se ligam exclusivamente a proteínas indutoras de sobrevivência, impedindo que as mesmas neutralizem a ativação da Bax e Bak (Figura 1.5b) (Willis *et al.*, 2007).

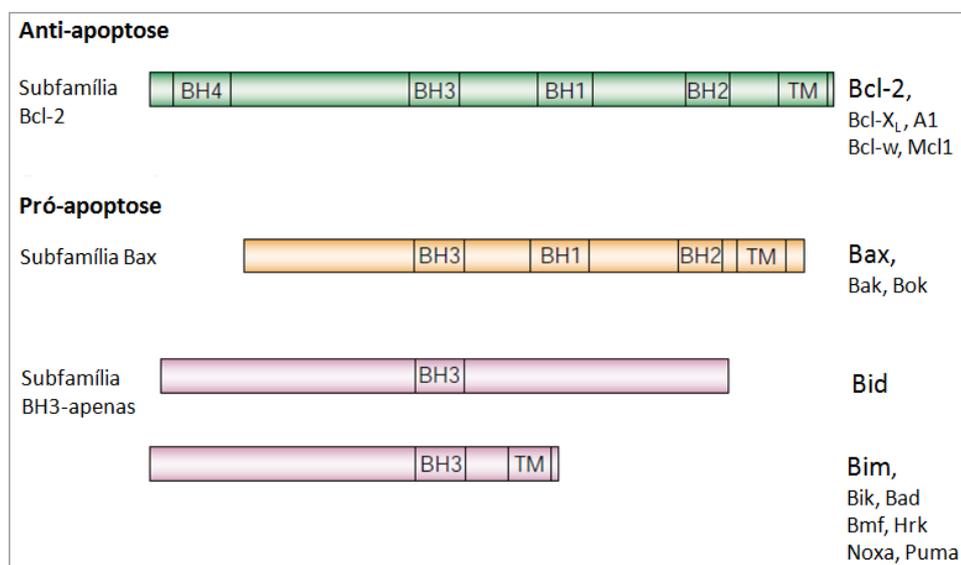


Figura 1.4: As três subfamílias da família Bcl-2: Bcl-2, Bax e BH3-apeenas.

Fonte: adaptado de Cory e Adams (2002).

A Bcl-2 atua como um guardião da membrana mitocondrial, mantendo a integridade da membrana externa da mitocôndria e impedindo assim a liberação do citocromo c para o citosol (Weinberg, 2014). Quando a Bcl-2 é neutralizada por ação das proteínas BH3, as proteínas Bax e Bak formam um homo-oligômero com a membrana mitocondrial. Esses homo-oligômeros criam poros nos lipossomas, permitindo a liberação do citocromo c para o citosol e, conseqüente, ativação do apoptossomo (Figura 1.6) (Cory e Adams, 2002). A homeostase da apoptose é mantida por meio de um balanço dos níveis de proteínas anti-apoptose e proteínas pró-apoptose (Cory e Adams, 2002).

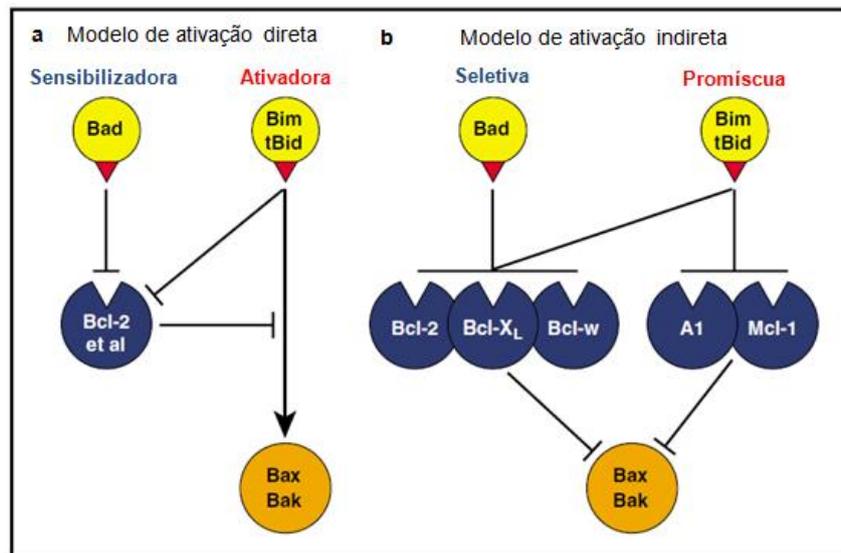


Figura 1.5: Modelo de ativação direta e indireta da Bax e Bak por proteínas da subfamília BH3-apenas. (a) Modelo direto; (b) Modelo indireto. Fonte: adaptado de Adams e Cory (2007).

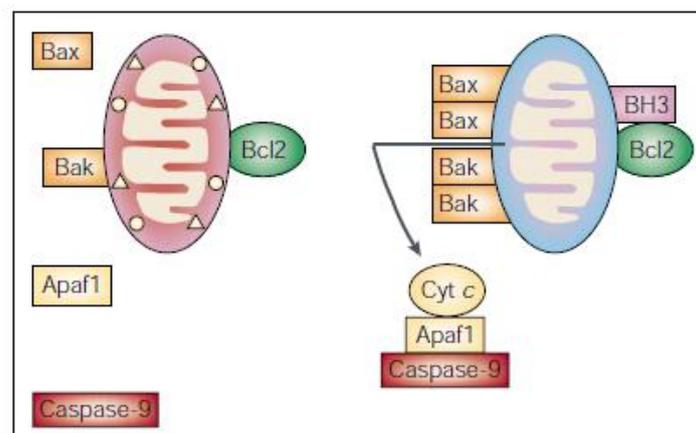


Figura 1.6: Esquema de proteção da integridade mitocondrial pela Bcl-2.

Fonte: adaptado de Cory e Adams (2002).

A regulação da expressão das proteínas da família Bcl2 acontece por diversos mecanismos. As proteínas anti-apoptóticas são reguladas por mecanismos em nível transcricional e por modificações na proteína (Adams e Cory, 2007). As proteínas pró-apoptóticas são igualmente reguladas por diversos fatores de transcrição e por regulação pós-traducional. Entretanto, as proteínas Bax e Bak são expressas constitutivamente, mantendo seus níveis relativamente constantes. Assim, a principal regulação dessas proteínas acontece em nível

pós-traducional e é regulada por membros da família Bcl-2 (Cimmino *et al.*, 2005; Youle e Strasser, 2008).

Ativação de imortalidade replicativa

As células somáticas normais apresentam um número limitado de divisões celulares, entrando, posteriormente, em senescência (Shay *et al.*, 1991). As células senescentes perdem a capacidade de se replicar, mas continuam metabolicamente ativas, podendo viver por semanas ou meses (Campisi e D'adda Di Fagagna, 2007). A senescência celular é considerada um mecanismo de proteção contra o desenvolvimento de câncer, já que a proliferação celular é essencial para o crescimento tumoral (Hanahan e Weinberg, 2000; Coppe *et al.*, 2010). Entretanto, as células em senescência podem favorecer o microambiente do câncer, pois passam a apresentar um fenômeno chamado fenótipo secretor associado à senescência (*senescence-associated secretory phenotype* - SASP), que resulta na liberação de várias citocinas pró-inflamatórias (Coppe *et al.*, 2010). O papel da inflamação no desenvolvimento do câncer será discutido mais a frente.

Indução da angiogênese

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes (Nyberg *et al.*, 2008). A angiogênese tumoral é essencial para garantir às novas células que estão sendo formadas o suprimento de nutrientes e oxigênio, bem como a eliminação de metabólitos e dióxido de carbono (Hanahan e Weinberg, 2011). A formação desses novos vasos acontece desde no início do desenvolvimento tumoral, sendo essencial para a progressão neoplásica ainda na fase de lesões pré-malignas microscópicas (Raica *et al.*, 2009).

Existem diversos mecanismos que induzem a angiogênese e os mecanismos adotados por cada tumor vão variar bastante (Ribatti, 2006). O microambiente tumoral vai contribuir diretamente para a manutenção e indução dos estímulos angiogênicos (Nyberg *et al.*, 2008) e maiores detalhes serão discutidos abaixo .

Invasão dos tecidos e metástase

A metástase é a propagação de células cancerígenas do tumor primário para órgãos distantes onde irão iniciar um tumor secundário (Nguyen *et al.*, 2009). A cascata metastática é iniciada ainda no tumor primário com o crescimento de células tumorais. Posteriormente, essas células diminuem a adesão celular, invadem a membrana basal do tecido onde o tumor foi originado, continuam se proliferando e induzem angiogênese. Em seguida, as células cancerígenas invadem o estroma e atravessam o endotélio dos vasos sanguíneos e linfáticos (intravasão) alcançando a circulação. Então, essas células são transportadas através da corrente sanguínea até um lugar onde elas se ligam às paredes dos vasos e saem da circulação para o tecido (extravasão), invadindo este outro órgão. As células invasoras começam a se proliferar, induzem angiogênese e iniciam um novo tumor metastático (Fidler, 2003; Nguyen *et al.*, 2009; Pavese *et al.*, 2010).

Características emergentes

A literatura sugere que existem dois outros recursos obtidos pelas células cancerígenas que vão favorecer o desenvolvimento do câncer e por isso deveriam ser adicionadas à lista de características do câncer. O primeiro é a reprogramação do metabolismo energético e o segundo é a evasão da ação destruidora das células imunológicas (Hanahan e Weinberg, 2011).

As células cancerígenas despendem uma grande quantidade de energia para manter seu crescimento descontrolado, assim estas células reprogramam seu metabolismo de glicose de maneira que, mesmo havendo oxigênio, elas produzem energia apenas pela glicólise, estado chamado de "glicólise aeróbica" (efeito Warburg) (Warburg, 1956; Hanahan e Weinberg, 2011).

O segundo recurso funcional emergente é a evasão imunológica. Estudos mostram que tanto a imunidade inata quanto a adaptativa contribuem para a eliminação do tumor (Kim *et al.*, 2007; Teng *et al.*, 2008). Para que estes mecanismos de proteção sejam ativados e funcionem devidamente, o hospedeiro precisa ser imunocompetente e o tumor precisa ser altamente imunogênico. Células tumorais pouco imunogênicas conseguem escapar da vigilância imunológica e crescer mesmo em indivíduos imunocompetentes

(Hanahan e Weinberg, 2011; Weinberg, 2014) enquanto as células tumorais altamente imunogênicas são destruídas rotineiramente por células imunológicas. Entretanto, estas células podem fugir da ação destruidora do sistema imune inativando componentes deste sistema que foram destinados a destruir estas células (Shields *et al.*, 2010).

Instabilidade genômica

A instabilidade genômica é um conjunto de modificações genéticas que vão desde mutações pontuais até rearranjo cromossômico e que resultam em alterações na expressão de genes (Aguilera e Gomez-Gonzalez, 2008). As células cancerígenas costumam apresentar níveis de mutações aumentados (Negrini *et al.*, 2010). Além disso, problemas no sistema de vigilância que monitora a integridade do DNA podem acelerar o acúmulo dessas mutações (Jackson e Bartek, 2009). Alterações epigenéticas, como metilação do DNA e alterações de histonas, também podem modificar a expressão dos genes e essas alterações já foram encontradas em diversos cânceres (Esteller, 2007; Jones e Baylin, 2007).

Microambiente tumoral (MT)

Os tumores são formados basicamente por dois compartimentos, o parênquima e o estroma tumoral. As células neoplásicas formam o parênquima, enquanto que o tecido conjuntivo e os vasos sanguíneos formam o estroma tumoral (Hanahan e Weinberg, 2011).

O microambiente tumoral é composto por células não tumorais e seu estroma, sendo essencial no desenvolvimento do tumor. Dentre as células que compõem o MT estão células endoteliais, linfáticas, fibroblastos, pericitos e células do sistema imune (Balkwill *et al.*, 2012), sendo estas últimas de grande relevância para este trabalho.

Quando um tecido normal sofre algum dano, os fibroblastos são ativados e secretam altos níveis de fatores de crescimento, proteínas da matriz celular e fatores quimiotáticos, o que vai induzir crescimento e proliferação celular e ativação de células inflamatórias e vasculares. No tecido tumoral, os fibroblastos associados ao câncer ficam ativados de forma definitiva, induzindo proliferação,

angiogênese, invasão e metástase (Li *et al.*, 2007; Hanahan e Weinberg, 2011; Balkwill *et al.*, 2012).

A grande quantidade de células endoteliais no MT acontece em decorrência da ativação do "interruptor angiogênico", o que resulta na construção de novos vasos (neovascularização). Os vasos tumorais formados durante esse processo exibem formato anormal apresentando, muitas vezes, vazamentos. Esses vazamentos aumentam a pressão intersticial, o que piora a hipóxia, induzindo a produção de mais moléculas angiogênicas, e facilita a metástase (Dvorak, 2005). Dentre as moléculas angiogênicas encontradas no MT a mais comum delas é o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o qual é produzido por células cancerígenas e inflamatórias (Carmeliet, 2005; Li *et al.*, 2007; Hanahan e Weinberg, 2011; Balkwill *et al.*, 2012).

Pericitos são células que atuam na sustentação dos vasos sanguíneos e que são capazes de secretar moléculas que induzem vascularização. O papel dos pericitos na progressão do câncer é pouco conhecida e os estudos são contraditórios (Cooke *et al.*, 2012). Apesar de essas células serem importantes para a formação do endotélio tumoral, dados clínicos mostram que a presença de poucos pericitos no MT é associada a um pior prognóstico do paciente (Yonenaga *et al.*, 2005; Stefansson *et al.*, 2006; O'keeffe *et al.*, 2008).

Os tumores também induzem linfangiogênese, ou seja, a formação de vasos linfáticos os quais serão essenciais na disseminação de células cancerígenas. Além disso, as células linfáticas alteram a resposta imune antitumoral do hospedeiro, o que facilita a progressão do tumor (Alitalo, 2011).

Células do sistema imune

As células imunológicas desempenham tanto funções antitumoral quanto promotora de tumor. Os linfócitos T CD4+, por exemplo, podem desempenhar as duas funções. Já os linfócitos TH1 e as citocinas por eles produzidas (interleucina-2 e interferão-gama) ativam linfócitos T CD8+ capazes de matar células tumorais, e por isso a presença dessas células no microambiente tumoral (MT) é associado a um bom prognóstico. A presença de linfócitos TH17 e as citocinas IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 é associada a um prognóstico ruim, pois

esse linfócito e essas citocinas induzem inflamação no tecido, o que pode promover o crescimento tumoral (Fridman *et al.*, 2012).

A ativação do processo inflamatório acontece em resposta a alguma injúria e essa terá efeitos terapêuticos se for mantida por um período curto. Entretanto, quando a resposta inflamatória se torna crônica ela pode causar diversas doenças (Vendramini-Costa e Carvalho, 2012). Isso acontece porque a inflamação crônica induz uma série de alterações nos tecidos, como remodelamento e perda da arquitetura normal do tecido, danos a biomoléculas (via estresse oxidativo) (De Visser *et al.*, 2006). No caso do câncer, a inflamação também pode induzir proliferação, crescimento e angiogênese tumoral, invasão do tecido e metástase (Mantovani *et al.*, 2008; Murdoch *et al.*, 2008; Egeblad *et al.*, 2010; Qian e Pollard, 2010).

A importância da inflamação nos três estágios do desenvolvimento de câncer (iniciação, promoção e progressão) é amplamente descrita na literatura (Grivennikov *et al.*, 2010; Grivennikov e Karin, 2010). A inflamação presente no MT é caracterizada por infiltração de leucócitos e, dentre eles, macrófagos, mastócitos, neutrófilos, linfócitos T e B já foram identificados como promotores de tumor e metástase (fase de promoção e progressão do tumor). Em alguns casos, como no câncer de cólon associado à colite, a inflamação também pode atuar como um agente iniciador induzindo alterações epigenéticas e no DNA (Grivennikov e Karin, 2010). O papel e a importância de cada molécula inflamatória variam de acordo com o estágio do desenvolvimento tumoral (Terzic *et al.*, 2010). A ação pró-tumoral da inflamação crônica acontece por inúmeros mediadores como espécies reativas, citocinas, enzimas (como a COX-2), fatores de transcrição, oncogenes, entre outros (Figura 1.7) (De Palma *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2008; Murdoch *et al.*, 2008; Coffelt *et al.*, 2010; Denardo *et al.*, 2010; Egeblad *et al.*, 2010).

O papel da inflamação no câncer é altamente complexo. A ideia de que o sistema imunológico desempenharia um papel antitumoral teve sua popularidade aumentada e diminuída ao longo do século passado (Fisher *et al.*, 2014). Isso porque apesar dos efeitos pró-tumorais descritos anteriormente, a inflamação também pode ativar células do sistema imunológico, favorecendo o

reconhecimento e a eliminação de células cancerígenas em um processo denominado de vigilância imunológica contra tumores (Smyth *et al.*, 2006).

O conceito de que células do sistema imunológico podem reprimir o crescimento de tumores foi proposto por Ehrlich (1909). Muitos anos depois, Burnet e colaboradores (Burnet, 1970) demonstraram que camundongos apresentavam antígenos tumorais, criando assim o conceito de vigilância imunológica. Essa teoria propõe que é função do sistema imunológico reconhecer e destruir células transformadas. Com o passar dos anos e a melhora de recursos tecnológicos na pesquisa, essa ideia foi aprimorada e expandida, e atualmente já se sabe que tanto a imunidade inata quanto a adquirida participam da vigilância imunológica (Smyth *et al.*, 2000; Smyth *et al.*, 2006).

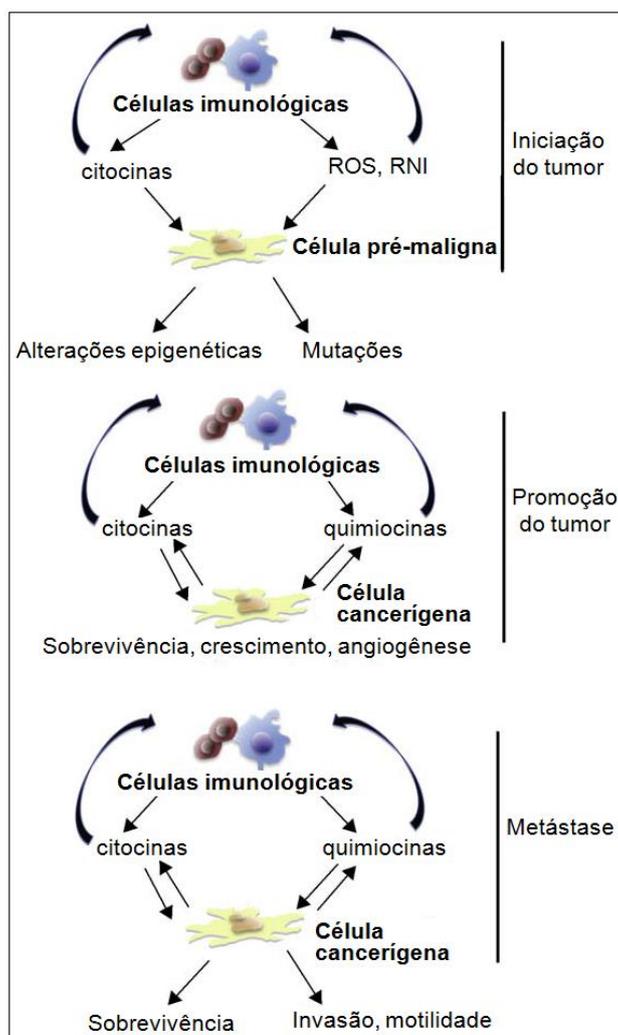


Figura 1.7: O papel da inflamação nos três estágios do desenvolvimento tumoral. Fonte: adaptado de Grivennikov e Karin (2010).

Citocinas

No MT, as citocinas encontradas são produzidas por células do estroma e leucócitos em resposta a estímulos desencadeados por células normais e células malignas (Vendramini-Costa e Carvalho, 2012). De uma forma geral, essas citocinas são divididas em pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, e dependendo do balanço entre esses dois tipos de citocinas essas promoverão um efeito antitumoral ou pró-tumoral. As citocinas são as principais responsáveis pela comunicação entre as células do sistema imune (Balkwill e Mantovani, 2001).

A família da interleucina 1 (IL-1) é composta por três proteínas: duas com ação agonista, as interleucinas 1α (IL-1 α) e 1β (IL-1 β), e uma com ação antagonista, denominada antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra). As interleucinas 1α e 1β se ligam ao mesmo receptor e apresentam funções similares, entretanto uma desempenha ação intracelular (IL-1 α) e a outra extracelular (IL-1 β) (Dinarello, 1996).

A IL-1 β está envolvida na resposta inflamatória e, apesar de exercer um efeito benéfico na imunidade ao ativar linfócitos, seus efeitos pró-tumorais são os mais descritos na literatura. Um aumento da expressão da IL-1 β já foi observada em diversos tipos de câncer. No câncer, níveis aumentados de IL-1 β costumam estar associados a um pior prognóstico, já que essa citocina apresenta uma habilidade em estimular a angiogênese, o crescimento tumoral e a metástase (Dinarello, 1996; Gemma *et al.*, 2001; Elaraj *et al.*, 2006; Lewis *et al.*, 2006).

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina secretada por células do sistema imune em resposta a antígenos e outras citocinas, especialmente TNF e IL-1. Essa citocina exerce diversos efeitos sobre o sistema imune, apresentando um importante papel tanto na imunidade inata como na adquirida (Vardam *et al.*, 2007). A ação pró-tumoral da IL-6 é amplamente descrita na literatura, por induzir proliferação, sobrevivência, metástase e, até mesmo, evasão imunológica da célula tumoral (Fisher *et al.*, 2014). Níveis elevados de IL-6 são associados a um prognóstico desfavorável em diversos tipos de câncer, como o colorretal, pancreático, gástrico, melanoma, mama e pulmão (Heikkila *et al.*, 2008; Lippitz,

2013). Entretanto, a IL-6 parece exercer um importante papel na ativação da resposta antitumoral de células T. Fisher *et al.* (2014) sugerem que o efeito antitumoral da IL-6 depende que a sinalização trans de IL-6 seja entregue para a célula correta, no local correto e no momento correto.

O fator de necrose tumoral alfa é uma das principais citocinas mediadoras da inflamação no MT, entretanto, quando o TNF α foi descoberto, esse era considerado uma potente citocina anti câncer (Balkwill, 2006). Diversos estudos mostrando a ação anti e pró tumoral do TNF α já foram desenvolvidos e, aparentemente, os níveis e o tempo de exposição ao TNF α são fundamentais para indução de cada uma dessas respostas (Mocellin e Nitti, 2008).

Estudos que fizeram injeção local (no tumor) de altas doses de TNF α mostraram que esta citocina foi capaz de induzir necrose do tumor (Brouckaert *et al.*, 1986; Talmadge *et al.*, 1988; Balkwill, 2009). Entretanto, a aplicação sistêmica de baixas doses de TNF α (dose máxima tolerada *in vivo*) não apresentou efeitos anti tumorais satisfatórios (Kuei *et al.*, 1989).

A ação antitumoral do TNF α pode acontecer por diversos mecanismos (Figura 1.8). O TNF α pode promover a ruptura dos vasos sanguíneos tumorais ao induzir necrose hemorrágica destes vasos (Vendramini-Costa e Carvalho, 2012). Outra ação vascular dessa citocina é o aumento da permeabilidade vascular, assim a terapia concomitante de baixas doses de TNF α junto com drogas quimioterápicas aumenta a concentração da droga no MT (Seynhaeve *et al.*, 2007). O TNF α pode ativar a imunidade antitumoral induzindo a produção de citocinas e fatores citotóxicos (como espécies reativas) e estimulando a maturação de células dendríticas (Vujanovic, 2001; Mocellin e Nitti, 2008). Além disso, ao estimular a produção de espécies reativas, essa citocina pode induzir a apoptose de células malignas (Kim *et al.*, 2010).



Figura 1.8: Ação antitumoral do TNF α .

Fonte: adaptado de Mocellin e Nitti (2008).

O TNF α exerce uma ação pró tumoral nos três estágios do desenvolvimento do câncer (Vendramini-Costa e Carvalho, 2012), inclusive tendo um papel importante como promotor de tumor em modelos de indução química de carcinogênese (Komori *et al.*, 1993). Muitas ações pró tumorais desta citocina acontecem via ativação do fator nuclear kappa B (NF κ B), um fator de transcrição ativado por estímulos pró-inflamatórios e estresse oxidativo que induz a expressão de mais de 500 genes, sendo eles relacionados a proliferação celular, angiogênese, invasão e metástase, anti-apoptóticos, fatores de crescimento, inflamação (inclusive IL-1, IL-6 e COX-2), entre outros (Genestier *et al.*, 1995; Binder *et al.*, 1999; Vlahos e Stewart, 1999; Vendramini-Costa e Carvalho, 2012; Weinberg, 2014). Além disso, o TNF α pode promover a imortalidade replicativa ao induzir a produção de espécies reativas que vão aumentar a atividade de telomerasas (Figura 1.9) (Mocellin e Nitti, 2008).

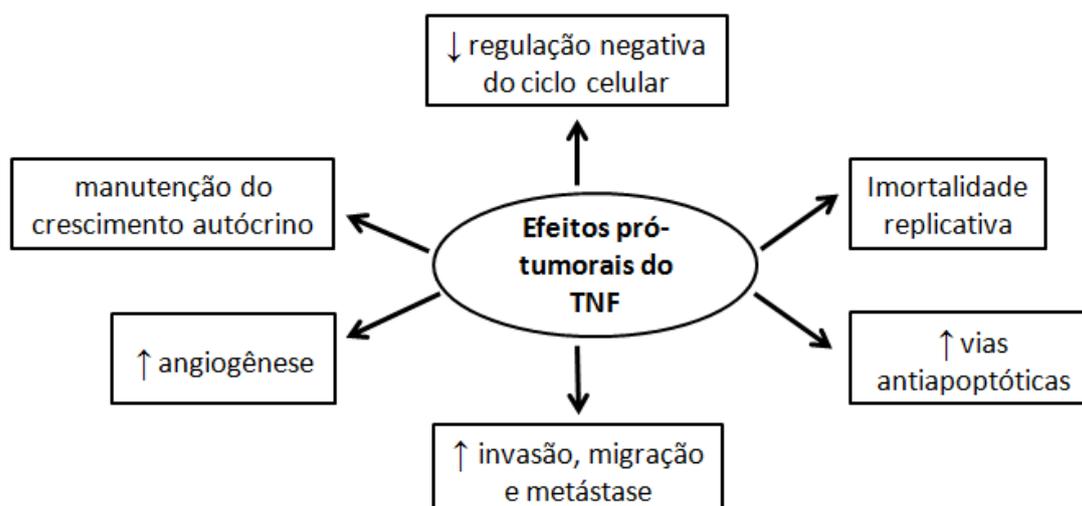


Figura 1.9: Ação pró-tumoral do TNF α .

Fonte: adaptado de Mocellin e Nitti (2008).

Ciclo-oxigenase-2

A ciclo-oxigenase-2 (COX -2) é uma enzima pouco expressa em tecidos normais, entretanto a expressão de seu gene é fortemente ativada por estímulos pró-inflamatórios (inclusive pelo TNF α) logo no início do processo inflamatório (Lasa *et al.*, 2000). Essa enzima catalisa a reação de conversão do ácido araquidônico em prostaglandina H₂ (PGH₂), que por sua vez serve de substrato para a formação de diversas prostaglandinas e tromboxanos (Figura 1.10) (Linkous e Yazlovitskaya, 2010).

A regulação da expressão da COX-2 acontece em nível transcricional e pós-transcricional (Lasa *et al.*, 2000). As prostaglandinas são capazes de modular a expressão desta enzima alterando a estabilidade de seu mRNA e ativando a região promotora do seu gene (Sales *et al.*, 2008). Além disso, sua expressão é aumentada por ação de fatores de crescimento, citocinas, hipóxia, oncoproteínas e promotores de tumor (Greenhough *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2011).

Diversos estudos vêm apontando um aumento da expressão da COX-2 em células cancerígenas (Sinicrope e Gill, 2004; Greenhough *et al.*, 2009; Warren *et al.*, 2009), principalmente em câncer de cólon, onde a sua expressão aparece aumentada em 85% dos carcinomas colorretais em humanos (Eberhart *et al.*, 1994). Esse aumento exerce um papel fundamental no desenvolvimento do tumor e está associado a um pior prognóstico e uma menor sobrevida destes pacientes (De Groot *et al.*, 2007). Concomitantemente, a literatura mostra que a inibição da COX-2 em ratos submetidos à aplicação de azoximetano (droga que induz câncer de cólon - discutida no item 3) resulta em prevenção do desenvolvimento de câncer de cólon (Oshima *et al.*, 1996; Kawamori *et al.*, 1998). Além disso, estudos mostram uma menor incidência de câncer de cólon em indivíduos que fazem uso de anti-inflamatórios não esteróides, já que estas drogas inibem a COX-2 (Kelloff *et al.*, 1999).

O aumento dos níveis de PGE_2 leva a um estímulo autócrino da COX-2, aumentando ainda mais a expressão desta enzima (Murakami *et al.*, 1997). A PGE_2 se liga à dois de seus receptores (EP_2 e EP_4) e induz diversas vias que resultam na estabilidade do mRNA e/ou ativação da região promotora do gene da COX-2 (Figura 1.11) (Sakuma *et al.*, 2004). Além disso, essa prostaglandina parece ser a grande responsável pelo efeito pró-tumorigênico da COX-2, já que este metabólito apresenta ações pleiotrópicas sobre as células cancerígenas, promovendo a proliferação, sobrevivência, angiogênese, migração e invasão destas células (Greenhough *et al.*, 2009) e inibindo a apoptose por meio do aumento dos níveis de Bcl-2 (Tsuji e Dubois, 1995; Gupta e Dubois, 2001).

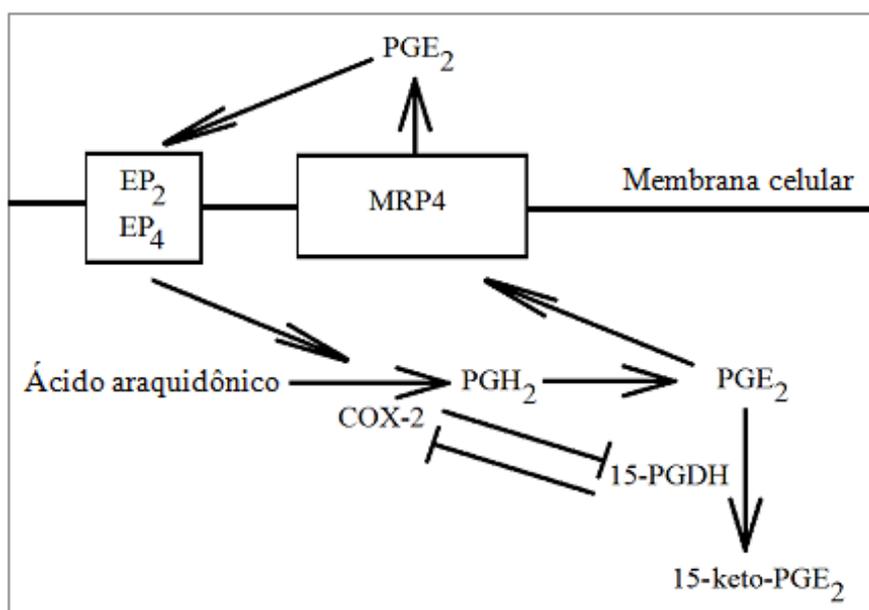


Figura 1.11: Degradação e secreção da PGE_2 . A PGE_2 é secretada para fora das células por ação da proteína associada a multirresistência 4 (MRP4). A PGE_2 extracelular se liga aos receptores EP_2 (receptor 2 de prostaglandina E_2) e EP_4 (receptor 4 de prostaglandina E_2) induzindo a expressão da COX-2. A degradação da PGE_2 acontece pela enzima 15-hidróxi-prostaglandina-desidrogenase (15-PGDH) e resulta na formação de 15-ceto-prostaglandina E_2 (15-keto- PGE_2). A 15-PGDH inibe a expressão da COX-2 e vice-versa. Assim, o aumento da expressão de uma dessas enzimas resulta em redução da expressão da outra enzima. Fonte: adaptado de Korbecki *et al.* (2014).

2 - Câncer de cólon

O desenvolvimento do câncer de cólon engloba diferentes fatores de riscos: pré-disposição genética, inflamação intestinal crônica, mutagênicos ambientais, patógenos intestinais (Terzic *et al.*, 2010) e alimentação (Tete *et al.*, 2012). Os cânceres de cólon causados por bases familiares genéticas representam apenas 20% dos casos da doença (Rustgi, 2007), sendo a maior parte dos casos ligados a fatores ambientais (Terzic *et al.*, 2010).

A primeira alteração observada no cólon que pode resultar em um câncer é a formação de focos de criptas aberrantes (FCA). FCA são aglomerados de glândulas anormais que aparecem antes mesmo do pólipó (ou adenomas), sendo resultado da transformação da célula intestinal saudável em célula pré-neoplásica. Uma vez acontecendo as alterações necessárias para a progressão do tumor, os FCA tornam-se adenomas. Adenomas são lesões pré-malignas e não invasivas de tecidos epiteliais. Caso novas alterações continuem acontecendo nessas células ou no microambiente em que elas se encontram, essas lesões podem evoluir para um carcinoma, que é um câncer de células epiteliais (Figura 2.1) (Terzic *et al.*, 2010; Weinberg, 2014).

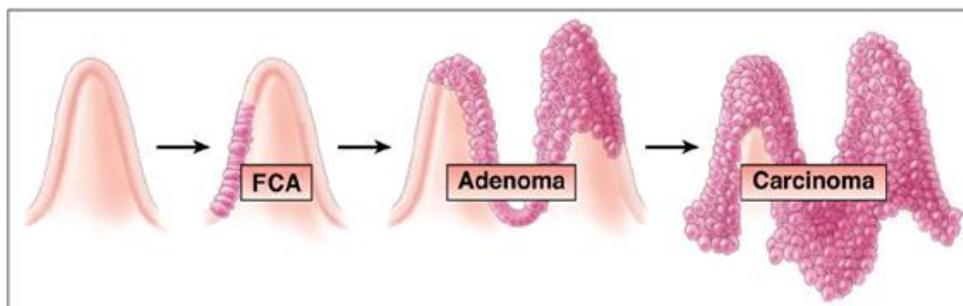


Figura 2.1: Fases do desenvolvimento do câncer de cólon.

Fonte: adaptado de Terzic *et al.* (2010).

Os FCAs apresentam características topográficas e histológicas diferentes das criptas normais, podendo ser identificados por microscopia (Figura 2.2) (Bird, 1987). Assim como no câncer de cólon, os FCAs são mais encontrados na porção distal do cólon (Alrawi *et al.*, 2006). Estas lesões apresentam algum grau de instabilidade genômica e já foram observadas

mutações de proto-oncogenes e genes supressores de tumor (Gupta *et al.*, 2007), bem como alterações epigenéticas de metilação de ilhas CpG (Sakurazawa *et al.*, 2000; Alrawi *et al.*, 2006). Também já foram observados defeitos na via de reparo de bases mal pareadas (*mismatch repair*); (Jacob e Praz, 2002). Diversas alterações proteicas, como a expressão da iNOS e da COX-2, já foram detectadas em FCAs (Hu *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2013).

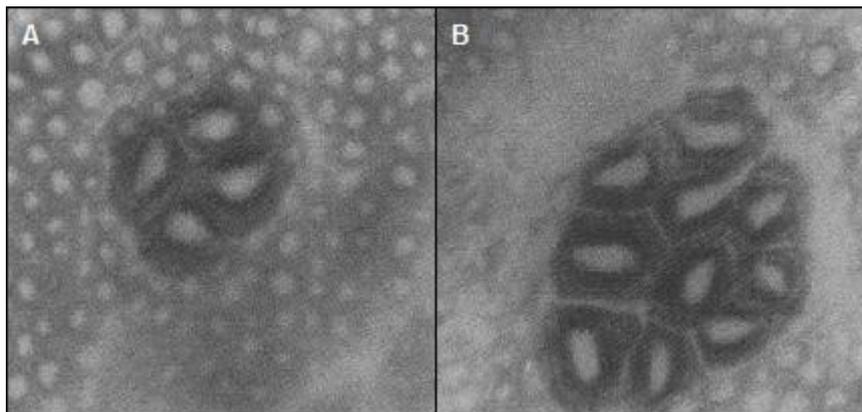


Figura 2.2: Focos de criptas aberrantes (FCA). (A) FCA com quatro criptas; (B) FCA com dez criptas. Fonte: adaptado de Bird e Good (2000).

3 – Indução de câncer de cólon por administração de azoximetano

O azoximetano (AOM) é uma droga altamente carcinogênica utilizada para induzir câncer de cólon em ratos e camundongos. A administração dessa droga em animais é um dos principais modelos usados em estudos que avaliam a biologia molecular, prevenção e tratamento desse tipo de câncer (Chen e Huang, 2009).

Ao ser administrado por via intraperitoneal ou subcutânea, o AOM é metabolizado pelo citocromo P450, principalmente pela isoforma CYP2E1, no fígado. Na primeira etapa, o AOM é metabolizado em metilazoximetanol (MAM) por meio da hidroxilação do grupamento metil do azoximetano. O MAM é jogado no intestino através dos ductos biliares e então é quebrado em formaldeído e metildiazônio, um alquilante altamente reativo que causa a alcalinização, por meio de metilação, da guanina e da tiamina do DNA (Figura 3.1) (Sohn *et al.*, 2001). A metilação da base nitrogenada vai resultar em mutações pontuais de mudança de G:C → A:T (Swann, 1990; Takahashi e Wakabayashi, 2004), o que

pode iniciar o processo de tumorigênese pela mutação de vários genes como K-ras, β -catenina e TGF β (Figura 3.2) (Chen e Huang, 2009).

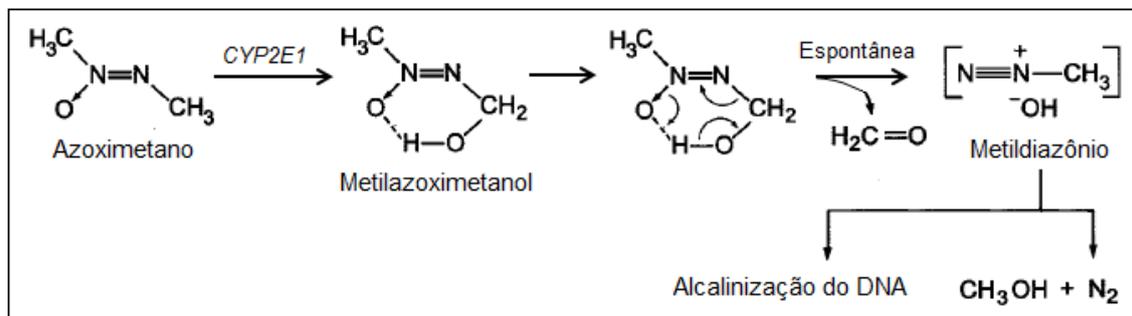


Figura 3.1: Via de ativação e indução do câncer por azoximetano. A isoforma CYP2E1 do citocromo P450 faz a hidroxilação do grupamento metil do azoximetano, resultando na produção do metilazoximetanol (MAM). O MAM é quebrado em formaldeído e metildiazônio, o qual promove a alquilação do DNA. Fonte: adaptado de Sohn *et al.* (2001).

A mutação do oncogene KRAS, causada pelo AOM, resulta na super expressão da proteína K-ras. A K-ras é uma GTPase envolvida na regulação da proliferação e do crescimento celular (Takahashi e Wakabayashi, 2004; Weinberg, 2014). Quando ativada, essa proteína aumenta os níveis de ciclina D1 e myc, que induzem proliferação celular, bem como os níveis das enzimas iNOS e Cox-2 (Figura 3.3). O óxido nítrico (NO•) produzido pela iNOS pode causar danos ao DNA e aumentar a neovascularização. A Cox-2 pode aumentar os níveis de prostaglandina E₂ (PGE₂), a qual pode induzir proliferação celular e bloqueio da apoptose (Takahashi e Wakabayashi, 2004).

A β -catenina é uma proteína envolvida na expressão de diversos genes, entre esses, os genes que controlam a proliferação celular. Quando essa proteína é mutada, a mesma se mantém estável no citoplasma, ou seja, deixa de ser degradada como deveria, e então passa a ser super expressa (Takahashi e Wakabayashi, 2004; Weinberg, 2014). Ao translocar para o núcleo, a β -catenina induz a expressão dos genes da ciclina D1 e myc, induzindo assim a proliferação celular. Mutação no gene da β -catenina também parece mexer de forma direta ou indireta nos níveis da oxido nítrico sintase induzível (iNOS), uma

enzima envolvida na produção da espécie reativa óxido nítrico (Figura 3.3) (Takahashi e Wakabayashi, 2004).

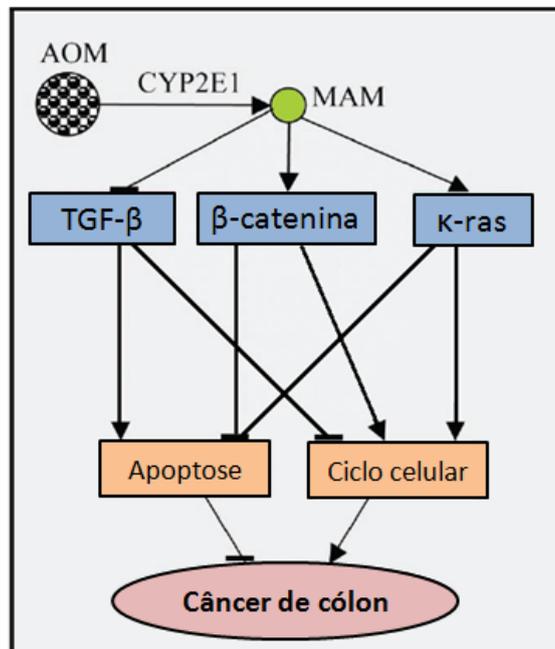


Figura 3.2: Modelo de indução de câncer de cólon por azoximetano. Após a aplicação intraperitoneal ou subcutânea do azoximetano (AOM), a droga é metabolizada em metilazoximetanol (MAM) pela isoforma CYP2E1 do citocromo P450. O MAM é altamente carcinogênico e pode causar a mutação de genes. Dentre os genes mais comumente mutados estão os genes que codificam as proteínas K-ras, β -catenina and TGF β , os quais vão induzir o câncer de cólon por meio do bloqueio da apoptose e ativação do ciclo celular. Fonte: adaptado de Chen e Huang (2009).

A TGF β é uma citocina que atua em todos os tipos de células controlando a proliferação e diferenciação celular. Essa citocina inibe a progressão de células pré-tumorais por diversos mecanismos como inibição da proliferação, diferenciação, sobrevivência e adesão celular, bem como pela inibição da inflamação no microambiente inflamatório. A inibição da TGF β na célula tumoral permite que o tumor cresça, se tornando invasivo e metastático (Massague, 2008).

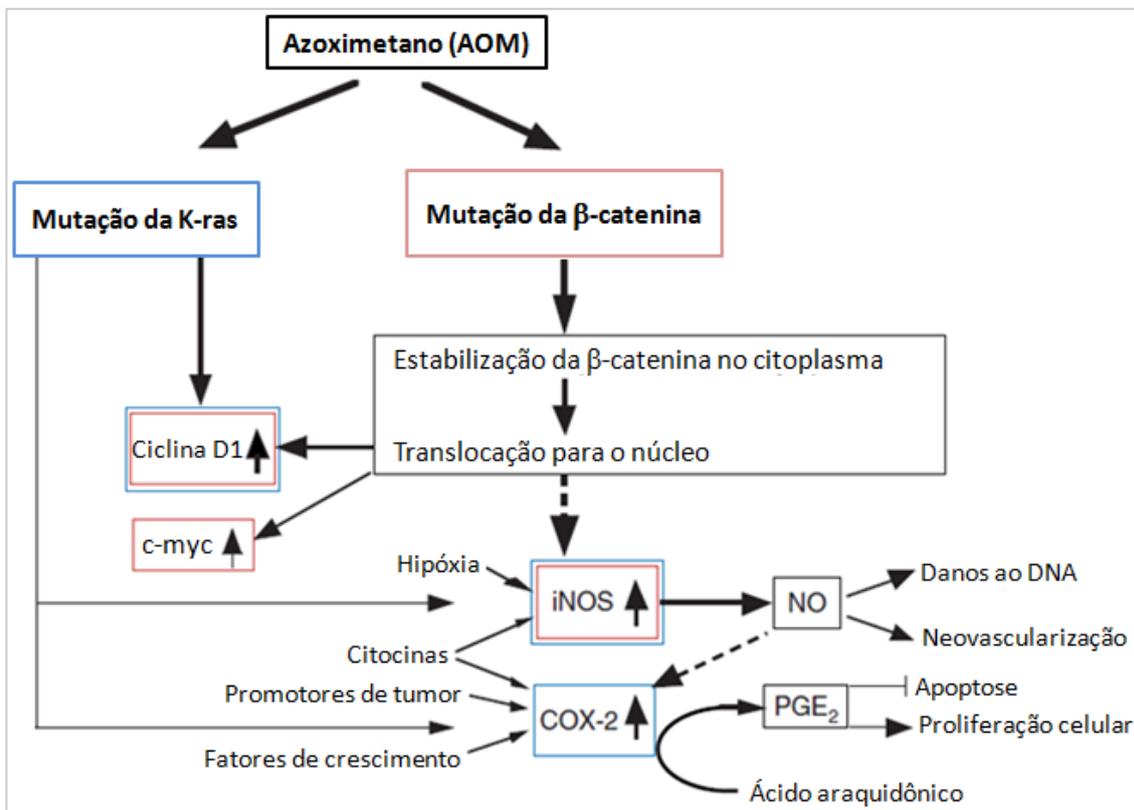


Figura 3.3: Proteínas com expressão alteradas após indução de câncer de cólon com AOM. Fonte: adaptado de Takahashi e Wakabayashi (2004).

4 - Câncer, espécies reativas e estresse

Espécies reativas (ERs) são compostos instáveis capazes de reagirem com outras moléculas. No organismo humano existem diversos tipos de espécies reativas, entretanto o papel das espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e, principalmente, as espécies reativas de oxigênio (EROs) no câncer são as mais conhecidas (Halliwell, 2007).

EROs é um termo usado para se referir a radicais de oxigênio, como superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxil (OH^{\bullet}), peróxil (RO_2^{\bullet}) e alcóxil (RO^{\bullet}), e moléculas não radicalares que atuam como agentes oxidantes e/ou que podem ser facilmente transformadas em radicais, como ozônio (O_3), peroxinitrito ($ONOO^-$), singlete (1O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Wiseman e Halliwell, 1996). As EROs são naturalmente produzidas pelo metabolismo de organismos aeróbios durante a produção de ATP na cadeia transportadora de elétrons (Hermes-Lima, 2004). A produção de EROs também acontece como parte da imunidade inata, para o

combate de microrganismos (Valko *et al.*, 2006), e como parte da sinalização celular (Finkel e Holbrook, 2000). ERNs é um termo usado para radicais de nitrogênio, como óxido nítrico (NO^\bullet), peroxinitrito (ONOO^-), radical dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet) e outros óxidos de nitrogênio, e produtos da reação do NO^\bullet com o $\text{O}_2^{\bullet-}$, RO_2^\bullet e RO^\bullet (Wiseman e Halliwell, 1996). O NO^\bullet é a principal fonte de ERNs sendo sintetizado por enzimas chamadas oxido nítrico sintase (NOS) (Moncada *et al.*, 1991; Patel *et al.*, 1999).

Estresse oxidativo é um desequilíbrio entre agressores oxidantes (como as espécies reativas) e defesas antioxidantes (como enzimas antioxidantes e antioxidantes dietéticos) (Polla, 1999). Os agressores oxidantes são capazes de reagir com outras moléculas como DNA, proteínas, lipídeos, etc, causando danos oxidativos a essas biomoléculas. A função dos antioxidantes é remover ou prevenir danos oxidativos em moléculas alvos (Halliwell, 2007). Assim, os organismos aeróbicos desenvolveram um complexo mecanismo de defesa antioxidante, com uma parte enzimática (enzimas antioxidantes) e uma parte não-enzimática, normalmente vinda da dieta (Valko *et al.*, 2006). Em organismos saudáveis, a produção de espécies reativas está balanceada com os sistemas de defesas antioxidantes (Polla, 1999).

A relação entre as espécies reativas e a carcinogênese é altamente complexa, mas a participação das ERs nos três estágios do desenvolvimento tumoral (iniciação, promoção e progressão) já é bastante aceita na literatura (Halliwell, 2013). A primeira conexão entre ERs e transformação celular foi descrita na literatura em 1981 (Oberley, 1988) e até hoje o papel das ERs no desenvolvimento do câncer permanece controverso (Gorrini *et al.*, 2013). Isso porque dependendo do tecido (Geiszt e Leto, 2004); do tipo, da quantidade e do tempo de exposição de ERs agindo naquele tecido; do estágio tumoral; entre outros fatores, as espécies reativas podem apresentar uma ação oncogênica ou supressora de tumor (Halliwell, 2007; Trachootham *et al.*, 2009; Halliwell, 2013). As ERs participam da sinalização de diversos processos envolvidos na carcinogênese como proliferação celular, apoptose, senescência, necrose, danos a biomoléculas, ativação de carcinógenos, recrutamento de fagócitos (Halliwell, 2007; Trachootham *et al.*, 2009; Halliwell, 2013).

Danos oxidativos ao DNA podem atuar como agentes iniciadores, promotores e causar instabilidade genética, danos a proteínas podem resultar em problemas no sistema de reparo do DNA (no caso de lesões a enzimas que participam deste processo) e danos a lipídeos podem resultar em regulação redox de fatores de transcrição (Figura 4.1) (Halliwell, 2007). As EROs podem ativar carcinógenos que vão funcionar como agente iniciadores e, algumas vezes, gerar mais espécies reativas (Halliwell, 2007). Baixos níveis de EROs podem estimular a proliferação celular, pela indução de fatores de transcrição que estimulam o crescimento celular (Irani *et al.*, 1997) e por diminuição da comunicação via junção-gap (Klaunig e Kamendulis, 2004), e podem inibir a apoptose, por meio de danos oxidativos às caspases e aumento do pH citosólico (que inibe a atividade das caspases) (Akram *et al.*, 2006). Entretanto, altos níveis de EROs induzem apoptose, senescência ou interrompem o ciclo celular (Figura 4.2) (Halliwell, 2007; Trachootham *et al.*, 2009).

Estudos mostram que as células malignas apresentam um estado pró-oxidante e utilizam as EROs em benefício próprio para induzir proliferação, metástase, angiogênese e instabilidade genética (Mori *et al.*, 2004; Radisky *et al.*, 2005; Okada *et al.*, 2006; Halliwell, 2007). Entretanto os níveis de ERs não podem exceder um certo limite, pois se isso acontecer, as células podem sofrer danos oxidativos que vão comprometer seu funcionamento (Halliwell, 2007).

Tendo em vista que as células cancerígenas usam o estresse oxidativo em seu próprio benefício, diversos estudos defendem o uso de antioxidantes para diminuir o estado pró-oxidativo dessas células e obter um efeito anticâncer (Zhou *et al.*, 2003; Pelicano *et al.*, 2004; Halliwell, 2007; Gorrini *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2014). Entretanto, o raciocínio contrário também é válido, e aumentar os níveis de ERs nas células cancerígenas até um ponto onde os danos oxidativos comprometam o seu funcionamento também pode ter um efeito anticâncer (Figura 4.3) (Blot *et al.*, 1993; Halliwell, 2007; Qiao *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012; Gorrini *et al.*, 2013).

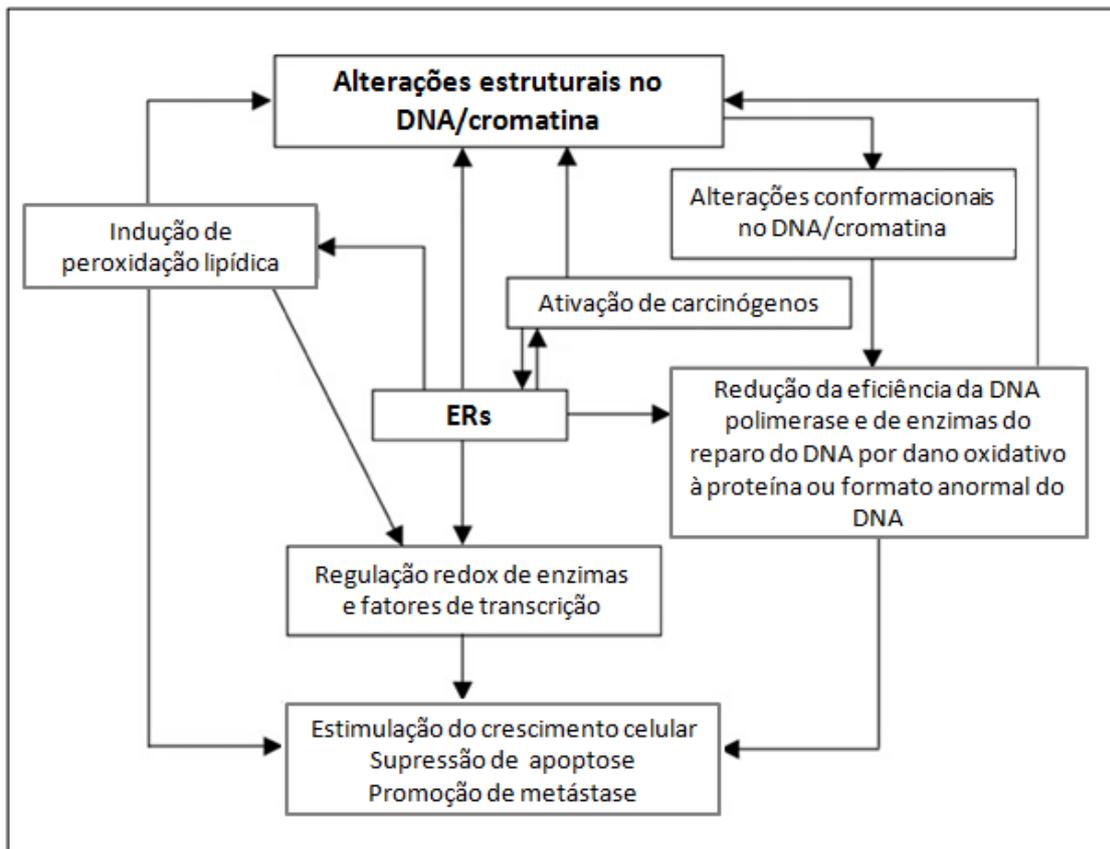


Figura 4.1: Alguns mecanismos de atuação das ERs que podem facilitar o desenvolvimento do câncer. Fonte: adaptado de Halliwell (2007).

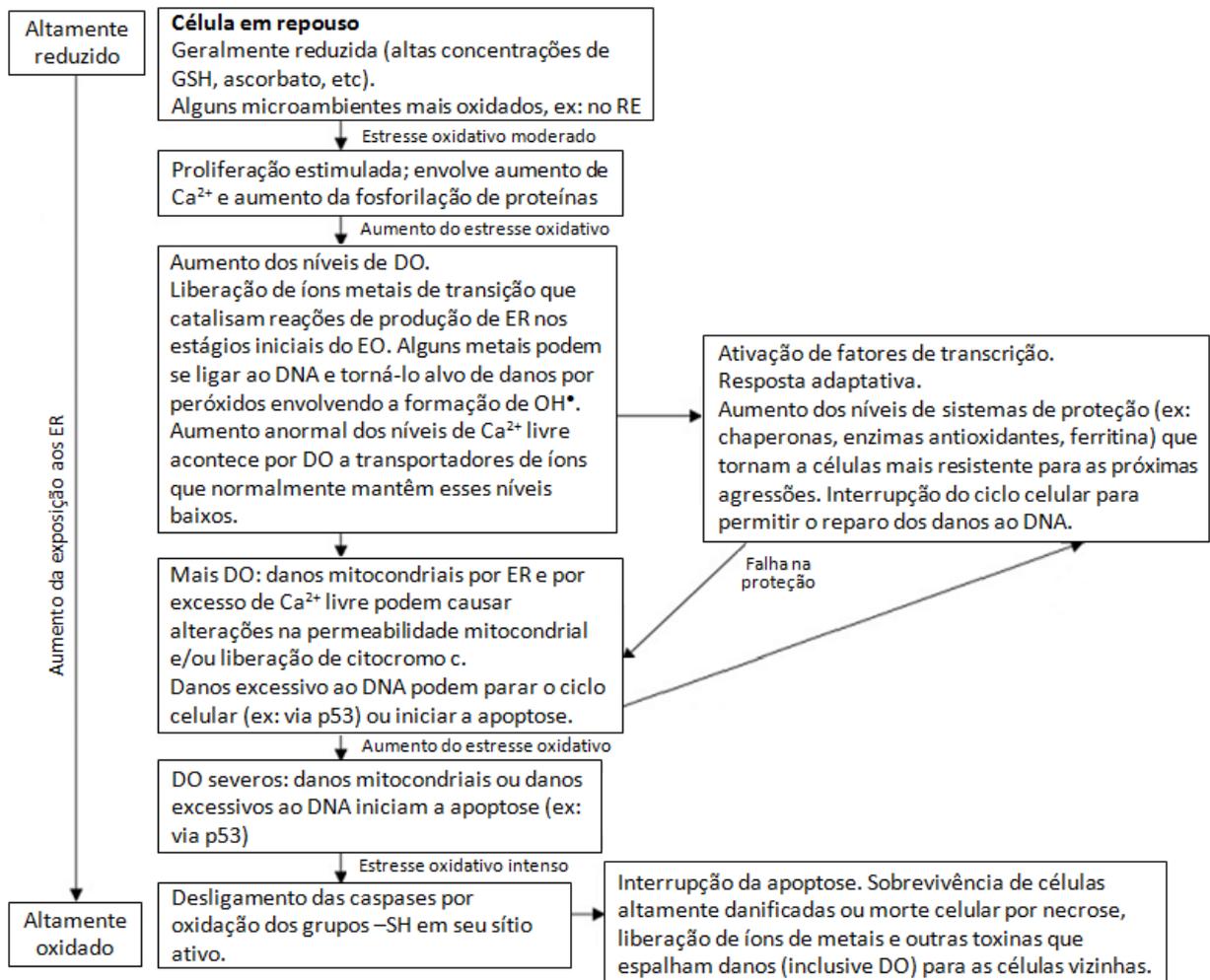


Figura 4.2: Como as células respondem a diferentes níveis de ERs. O estímulo da proliferação por baixos níveis de espécies reativas (ER) está associado com o aumento da fosforilação de diversas proteínas. As células são, normalmente, ambientes redutores, especialmente a mitocôndria ($\text{GSH}/\text{GSSG} > 100$) e o citosol ($\text{GSH}/\text{GSSG} > 100$). Entretanto, isso não acontece no retículo endoplasmático (RE) ($\text{GSH}/\text{GSSG} \approx 3$), já que um ambiente mais oxidante é necessário para o dobramento das proteínas e formação de pontes dissulfeto. DO: danos oxidativos; EO: estresse oxidativo. Fonte: adaptado de Halliwell (2007).

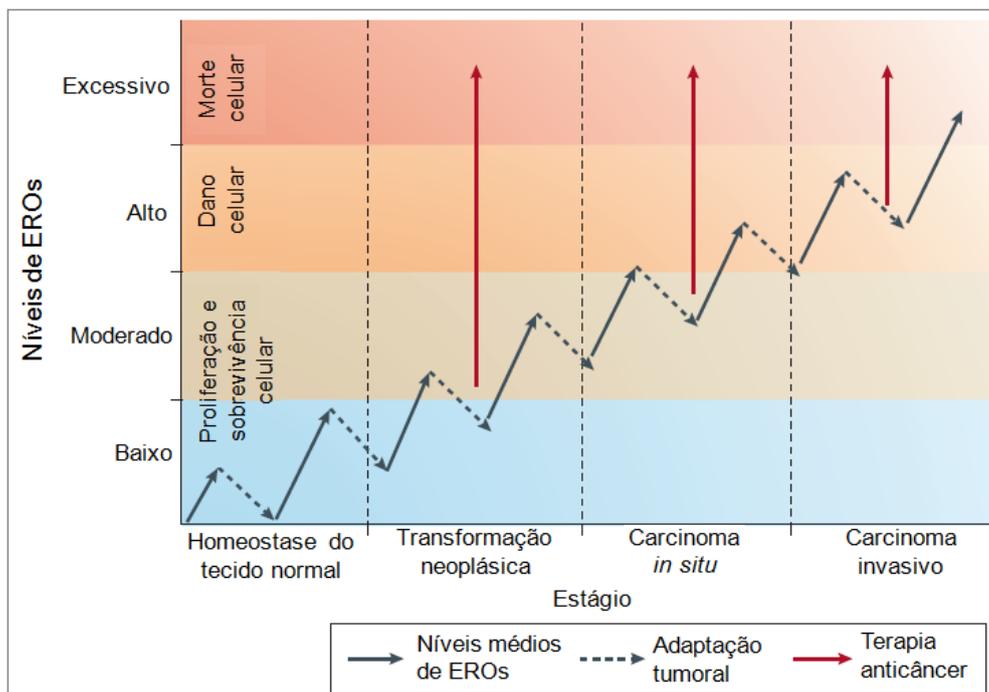


Figura 4.3: Diferentes ações das espécies reativas de oxigênio (EROs) na tumorigênese. Durante a transição do tecido normal para o carcinoma invasivo, as células passam por um aumento progressivo dos níveis de EROs (setas sólidas) causado por alterações metabólicas adquiridas pelas células transformadas. As células cancerígenas escapam da morte celular aumentando os níveis das defesas antioxidantes, as quais vão diminuir os níveis de EROs (setas pontilhadas). Assim, Gorrini e colaboradores (2013) defendem a adoção de terapias anticâncer que inibam mecanismos antioxidantes, o que resultará em um acúmulo excessivo de EROs e indução de morte celular. Fonte: adaptado de Gorrini *et al.* (2013).

5 - Antioxidantes

Em resposta aos efeitos deletérios causados pelas espécies reativas, os organismos aeróbios desenvolveram um complexo sistema de defesas antioxidantes e, em circunstâncias normais, esses efeitos deletérios são controlados por este sistema (Hermes-Lima, 2004; Halliwell, 2007). Antioxidantes são substâncias que previnem, atrasam ou removem um dano oxidativo de uma molécula alvo (Halliwell, 2007). Nos organismos vivos existem

diversos tipos de antioxidantes e a importância de cada um deles depende de diversos fatores (Halliwell, 2007).

Os antioxidantes podem atuar como sequestradores de radicais livres, doadores de hidrogênio, doadores de elétron, quelantes de metais que são fonte de elétrons livres, detoxificantes de espécies reativas, moduladores da expressão de genes associados aos sistemas antioxidantes (Krinsky, 1992). Assim, não existe “o melhor” antioxidante, o antioxidante ideal vai depender do tipo de espécie reativa e de seu alvo (Halliwell, 2007).

Os antioxidantes podem ser sintetizados *in vivo* ou adquiridos pela dieta (Halliwell, 2007). Entre os antioxidantes produzidos endogenamente estão as enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase, glutaciona peroxidase, glutaciona redutase e glutaciona S-transferase (discutidas mais a frente). Os antioxidantes dietéticos incluem os carotenoides, vitamina C, vitamina E e os polifenóis (também discutidos posteriormente).

Enzimas antioxidantes

As enzimas antioxidantes são produzidas endogenamente e trabalham em sinergismo dentro de um sistema balanceado e coordenado (Figura 5.1) (Halliwell, 2007). Assim, o aumento dos níveis de uma enzima antioxidante sem um aumento concomitante dos níveis da enzima que dará continuação à cascata antioxidante implica em menor resistência aos danos oxidativos (De Haan, 1996). O organismo aeróbio apresenta diversas enzimas antioxidantes.

A catalase é uma enzima antioxidante formada por quatro subunidades proteicas contendo, cada subunidade, um grupo heme férrico ligado ao seu sítio ativo e uma molécula de NADPH, os quais atuam como cofatores (Halliwell, 2007). Essa enzima é encontrada nos peroxissomos de quase todas as células do organismo humano e catalisa a reação de decomposição de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (Figura 5.2) (Goyal, 2010).

peróxidos, como o peróxido de hidrogênio. Nesta reação, ocorre a transferência de elétron da glutathiona reduzida (GSH) para o peróxido de hidrogênio, formando duas moléculas de água e uma molécula de glutathiona oxidada (GSSG; Figura 5.3) (Halliwell, 2007; Steinbrenner e Sies, 2009).

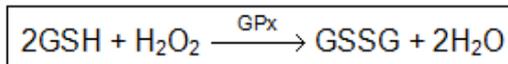


Figura 5.3: Reação catalisada pela glutathiona peroxidase.

Fonte: Halliwell (2007).

A glutathiona redutase (GR) é uma enzima que catalisa a redução da GSSG em GSH (Figura 5.4). Esta enzima é formada por duas subunidades e o sítio ativo de cada subunidade contém uma molécula de dinucleótido de flavina e adenina (FAD). Os elétrons necessários para reduzir a GSSG em GSH são doados pelo NADPH. Nesta reação, o FAD recebe elétrons do NADPH e os elétrons são entregues para a ponte dissulfídica presente em cada sítio ativo da GR. Os grupamentos –SH formados interagem com a GSSG e a reduzem em 2 GSH (Halliwell 2007).

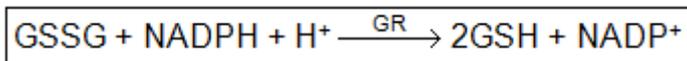


Figura 5.4: Reação catalisada pela glutathiona redutase.

Fonte: Halliwell (2007).

A GST é uma enzima essencial no metabolismo de xenobióticos, onde participa da primeira fase da detoxificação. É responsável pela conjugação de diversos xenobióticos com a GSH (Figura 5.5), permitindo assim a excreção destes conjugados principalmente pela bile. Existem diversas isoenzimas da GST, as quais diferem quanto à especificidade pelo substrato. Em humanos, existem polimorfismos que diminuem a atividade de GSTs, resultando em aumento de risco para alguns tipos de câncer (Hayes, 2005; Halliwell, 2007).

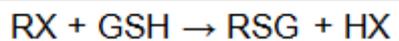


Figura 5.5: Reação catalisada pela glutathione S transferase.

Fonte: Halliwell (2007).

As superóxidos dismutases (SODs) são enzimas que catalisam a reação de dismutação do superóxido. As CuZnSODs são encontradas principalmente no citosol e estão presentes em quase todas células eucarióticas (Fridovich, 1995). O íon cobre da CuZnSOD catalisa a reação de dismutação alternando seu estado oxidado e reduzido (Figura 5.6A) (Halliwell 2007). As MnSODs são encontradas na mitocôndria de quase todos os tecidos de animais (Fridovich, 1995). Nesta enzima, o manganês faz a função do cobre, catalisando dismutação por meio da alternância de seu estado redox (Figura 5.6B) (Halliwell 2007).

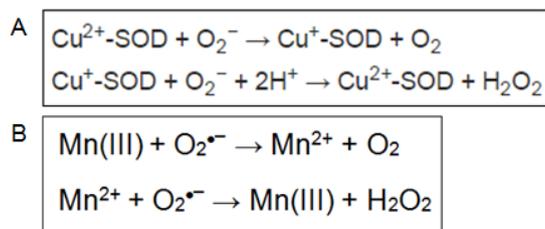


Figura 5.6: (A) Reação catalisada pela CuZnSOD; (B) reação catalisada pela MnSOD. Fonte: Halliwell (2007).

Antioxidantes dietéticos

Estudos mostram que o consumo dietético de antioxidantes naturais está associado a prevenção de diversas doenças crônicas, inclusive o câncer (Brighenti *et al.*, 2005; Valtuena *et al.*, 2008; Shehzad *et al.*, 2010). Segundo a Organização Mundial de Saúde, um terço das mortes causadas por câncer pode ser prevenido e o fator dietético está bastante associado com esta prevenção (Bode e Dong, 2009).

Os antioxidantes dietéticos são grupos de compostos químicos que apresentam diversos mecanismos de ação antioxidante. Dentre esses, os polifenóis são os mais consumidos na dieta, correspondendo a cerca de 90% dos antioxidantes dietéticos ingeridos (Saura-Calixto, 2006; Perez-Jimenez *et al.*, 2013).

Os polifenóis são compostos que apresentam dois ou mais anéis aromáticos ligados a uma hidroxila. O número de hidroxilas e sua localização na molécula são determinantes para a atividade antioxidante exercida pelo polifenol. Os polifenóis podem atuar como antioxidantes *in vitro* por meio do sequestro de diversas espécies reativas (atuando como agente redutor) e quelando metais como o ferro e o cobre (prevenindo assim a produção de oxidantes) (Halliwell 2007). Além disso, os polifenóis podem modular, de forma direta ou indireta, a expressão de genes envolvidos na síntese de enzimas dos sistemas antioxidantes (Joven *et al.*, 2014).

A literatura mostra que os polifenóis também podem apresentar ações pró-oxidantes e essas ações podem resultar em danos oxidativos (Ohashi, 2002; Perron e Brumaghim, 2009) ou em proteção antioxidante (Erlank *et al.*, 2011). Por exemplo, alguns polifenóis podem reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} , sendo este último essencial para produção de radicais hidroxil oxidativos (Ohashi, 2002; Perron e Brumaghim, 2009). Por outro lado, o aumento da produção de espécies reativas mediado por alguns polifenóis pode ativar o fator nuclear (derivado de eritroide-2) tipo 2 (Nrf2) (Na e Surh, 2008; Erlank *et al.*, 2011), um fator de transcrição que induz a expressão gênica de inúmeras enzimas antioxidantes, mediando assim uma proteção contra danos oxidativos (Ma, 2013). Desta forma, a ativação do Nrf2 pode resultar em aumento da atividade de enzimas antioxidantes (Pandurangan *et al.*, 2014).

Os efeitos dos polifenóis no câncer podem ser ainda mais complexos, pois esses podem exercer efeitos quimiopreventivos por mecanismos antioxidantes e pró-oxidantes. Estudos com polifenóis encontrados no chá verde mostram bem esses mecanismos (Figura 5.7). Esses polifenóis podem bloquear a formação do tumor ao diminuir os níveis de espécies reativas de oxigênio. Essa ação protegerá as células de danos oxidativos, inibirá a proliferação, metástase, inflamação e fatores de transcrição que podem auxiliar na formação do tumor. Por outro lado, o aumento da produção de EROs, também por ação dos polifenóis do chá verde, pode inibir o crescimento do tumor por meio do aumento dos danos ao DNA, que levaria a apoptose da célula, ativação de enzimas antioxidantes, inibição da proliferação, metástase, inflamação e alguns fatores de transcrição (Forester e Lambert, 2011).

Estudos mostram que os efeitos pró-oxidantes dos polifenóis são dose dependente (Hattori *et al.*, 2002). Altas doses de epigallocatequina-galato (750-1.500 mg/Kg) produziram efeitos tóxicos no fígado de ratos por meio do aumento do estresse oxidativo (Lambert *et al.*, 2010). Na literatura, ainda não existe recomendações de ingestão diária dos polifenóis, dessa forma a ingestão dietética destes compostos deve ser cuidadosamente avaliada.

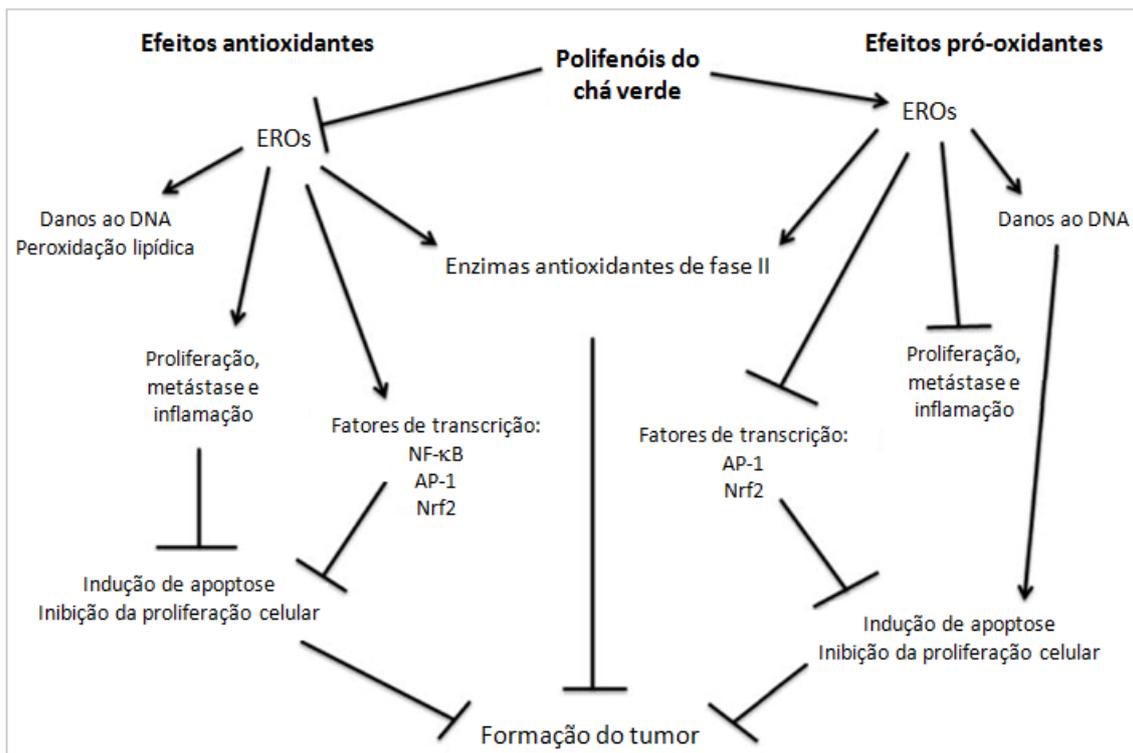


Figura 5.7: Efeitos antioxidantes e pró-oxidantes dos polifenóis do chá verde no desenvolvimento do câncer. Fonte: adaptado de Forester e Lambert (2011).

6 - Fitoquímicos e câncer

Fitoquímicos são um grupo de compostos produzidos por plantas, sendo, assim, encontrados em alimentos de origem vegetal como frutas, legumes, hortaliças e grãos. Diversos fitoquímicos apresentam efeitos positivos para a saúde humana, estando associados a prevenção de diversas doenças (Shehzad *et al.*, 2010). Fazem parte do grupo dos fitoquímicos os terpenos e terpenóides, os alcalóides e os compostos fenólicos, sendo este último grupo de especial

relevância para este trabalho, pois o tucum-do-cerrado é bastante rico em alguns fenólicos (Figura 6.1) (Rosa, 2013).

Os fitoquímicos podem auxiliar na prevenção do câncer (Surh, 2003). Os agentes quimiopreventivos são divididos em duas categorias: agentes bloqueadores e agentes supressores do câncer (Wattenberg, 1985). Os agentes bloqueadores atuam no estágio de iniciação do câncer, impedindo que carcinógenos alcancem seu alvo, inibindo a ativação do carcinógeno ou impedindo sua interação com biomoléculas. Os agentes supressores atuam nos estágios de promoção e progressão, inibindo a transformação maligna da célula iniciada. Os fitoquímicos podem atuar como agentes bloqueadores e supressores (Surh, 2003).

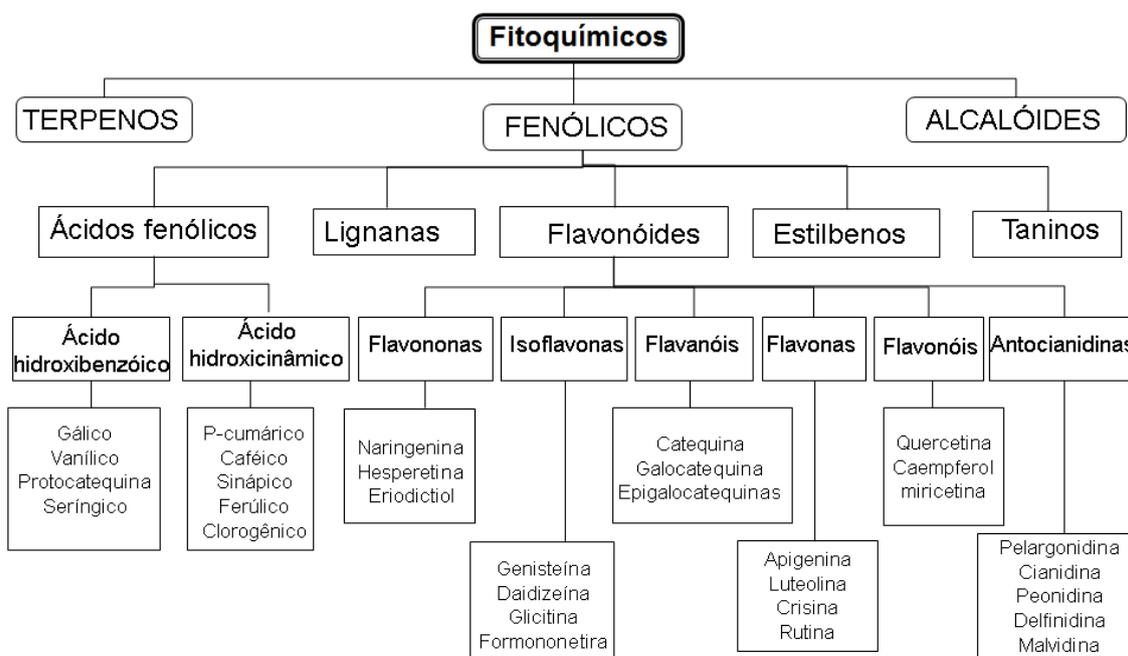


Figura 6.1: Classificação dos fitoquímicos. Fonte: adaptado de Rosa (2013).

Parte da ação quimiopreventiva dos fitoquímicos parece estar associada as suas propriedades antiinflamatórias e antioxidantes (como discutido anteriormente) (Wang *et al.*, 2014). Porém, esses compostos também são capazes de modular diversas vias de transdução de sinais (Lee *et al.*, 2009). Dessa forma, as ações quimiopreventivas dos fitoquímicos são bastante diversas (Surh, 2003).

A literatura também mostra que os fitoquímicos são capazes de modular marcadores envolvidos no desenvolvimento do câncer de cólon, como as enzimas COX-2 e antioxidantes; proteínas envolvidas na apoptose, BAX e Bcl-2; citocinas, como a TNF α , IL-1 β e IL-6, e focos de criptas aberrantes. O consumo dietético de alimentos ricos em fitoquímicos é capaz de reduzir a expressão da enzima COX-2 no intestino de ratos saudáveis e de ratos que receberam a droga azoximetano (AOM) (Rodriguez-Ramiro *et al.*, 2013; Pandurangan *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2014). Alimentos ricos em fitoquímicos também podem induzir a apoptose por meio da modulação dos níveis das proteínas Bax e Bcl-2. Kauntz *et al.* (2012) mostraram que a administração oral do flavonoide silibina foi capaz de induzir apoptose no intestino de ratos tratados com AOM por meio da diminuição dos níveis de mRNA da Bcl-2 (anti-apoptótica) e aumento dos níveis de mRNA da Bax (pró-apoptótica). Este mesmo estudo mostrou que os níveis de transcritos da citocina TNF α foram menores no grupo que recebeu a silibina + AOM comparado com o grupo que recebeu apenas AOM. A ação antiinflamatória dos fitoquímicos foi observada em um estudo com aurapteno, onde ratos tratados com AOM/sulfato de sódio dextrana (DSS) + aurapteno apresentaram menores níveis de IL-1 β e IL-6 no cólon comparados aos animais controle (Tanaka, 2010).

A ação dos fitoquímicos na prevenção do desenvolvimento de focos de criptas aberrantes (FCA) já foi descrito em diversos estudos. Animais tratados com azoximetano e que receberam ácido rosimárico (Furtado *et al.*, 2015), romã (Banerjee *et al.*, 2013), extrato de vinho tinto (Mazue *et al.*, 2014), chocolate preto (Hong *et al.*, 2013), chá verde (Xiao, 2008), suco de maçã (Barth *et al.*, 2005), apresentaram menor formação de criptas aberrantes quando comparados ao controle, que recebeu apenas a droga.

7 - Tucum-do-cerrado

A *Bacteris setosa* Mart. é uma palmeira arbustiva pertencente à família *Palmae* (Sato Duarte A.Y.S.; De Queiroz R.S.; Sanches, 2012). Essa palmeira é nativa do Brasil, podendo ser encontrada no cerrado brasileiro. O fruto produzido por essa planta é popularmente conhecido como tucum-do-cerrado, coco-de-

natal, marajá, tucum-bravo, tucum-pitanga, tucunzeiro, uva-do-mato (Figura 7.1) (Sato Duarte A.Y.S.; De Queiroz R.S.; Sanches, 2012). Esse fruto é comestível, possuindo uma polpa branca e suculenta e uma casca de coloração negro-arroxeadado ou marrom-escuro (Rosa, 2013).



Figura 7.1: Imagem do tucum-do-cerrado (*Bacteris setosa* Mart).

Fonte: arquivo pessoal.

Estudos de caracterização do tucum-do-cerrado mostraram que este fruto apresenta alto teor de flavanóis totais, sendo 15 a 19 vezes superior ao da maçã, e de antocianinas totais, sendo bem próximo ao do açaí (fruto considerado rico neste composto bioativo) (Rosa, 2013). Entre os flavonóides identificados nos extratos da casca do tucum-do-cerrado estão: flavanol (catequina); flavonóis (quercetina e rutina); ácidos fenólicos (gálico, ferúlico e caféico), e antocianinas (cianidina) (Rosa, 2013). O alto teor de compostos fenólicos está associado a sua alta atividade antioxidante *in vitro* comparada com a maçã (Siqueira *et al.*, 2013).

Em um estudo *in vivo*, onde ratos receberam tucum-do-cerrado na dieta na concentração de 15%, foi observada uma redução nos níveis de danos oxidativos a proteínas e lipídeos no baço e aumento da capacidade redutora de ferro no plasma. Além disso, o tucum-do-cerrado modulou a expressão de genes

como o gene da enzima catalase, que teve sua expressão diminuída no baço, e o gene do fator de transcrição Nrf2, que sofreu um aumento no fígado (Fustinoni-Reis *et al.*, 2016).

A alta concentração de compostos fenólicos, o alto poder antioxidante *in vitro* e as ações antioxidantes *in vivo* do tucum-do-cerrado, tornam este fruto um forte candidato para apresentar ações quimiopreventivas. Além disso, o intestino é um órgão que está em contato direto com os fitoquímicos dos alimentos, recebendo assim a proteção dos fitoquímicos absorvidos e dos não absorvidos pelo organismo (Halliwell, 2007). Dessa forma, o presente estudo visa avaliar a ação quimiopreventiva do consumo dietético do tucum-do-cerrado no desenvolvimento do câncer de cólon em ratos tratados com azoximetano.

OBJETIVOS

8.1 - Objetivo geral

Avaliar o efeito quimiopreventivo do consumo de tucum-do-cerrado no desenvolvimento de criptas aberrantes no cólon de ratos induzidos ao câncer de cólon por azoximetano.

8.2 - Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do consumo de tucum-do-cerrado na prevenção do desenvolvimento de criptas aberrantes, focos de criptas aberrantes e focos de criptas aberrante de alta multiplicidade.
- Avaliar o efeito do consumo de tucum-do-cerrado sobre os níveis de transcritos da Bax, Bcl2, IL-6, IL-1 beta, TNF-alfa e Cox2 .
- Avaliar o efeito do consumo de tucum-do-cerrado sobre os níveis das proteínas Cox-2, BAX e Bcl-2.
- Avaliar o efeito do consumo do tucum-do-cerrado no nível de inflamação das citocinas $TNF\alpha$, IL-6, IL-1 β .
- Avaliar o efeito do consumo de tucum-do-cerrado nos níveis de danos oxidativos a proteínas e lipídeos.
- Avaliar o efeito do consumo de tucum-do-cerrado sobre a atividade das enzimas antioxidantes catalase, glutaciona peroxidase, glutaciona redutase, glutaciona-S-transferase e superóxido dismutase.

METODOLOGIA

9.1 - Aclimação

28 ratos Wistar machos recém-desmamados (21 dias) foram adquiridos da empresa Granja RG em Santo Amaro, São Paulo, Brasil. Os animais foram alocados no biotério da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília, mantidos em ciclos de 12/12h de claridade/escuridão com livre acesso a água e ração apenas no ciclo de escuridão. Os animais ficaram 27 dias em aclimação para que atingissem o peso de 220 g, peso mínimo necessário para aplicação da droga. Durante esse período, todos os animais foram alimentados com dieta AIN-93G padrão para roedores (Reeves *et al.*, 1993). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil (CEUA, UnBDOC n 160500/2013, em anexo).

9.2 - Tratamento

Após o período de aclimação os animais foram divididos em 4 grupos, conforme descrito abaixo. Inicialmente, por um período de 12 dias cada grupo recebeu apenas a dieta tratamento (dieta controle ou dieta adicionada de tucum-do-cerrado), ou seja, os animais não receberam a injeção de droga ou salina. Esse protocolo foi utilizado pois o objetivo desse estudo é avaliar a capacidade do tucum-do-cerrado em prevenir o desenvolvimento do câncer de cólon (quimioprevenção). Após duas semanas, os grupos receberam a primeira dose da droga (azoximetano, Sigma Aldrich, St. Louis, USA; indutor do câncer de cólon) ou do placebo, e a segunda aplicação da droga ou salina foi dada uma semana após a primeira aplicação (Ghirardi *et al.*, 1999). O grupos **controle + droga** e **tucum-do-cerrado + droga** receberam injeção intraperitoneal de azoximetano na concentração de 15 mg / kg de peso corporal, enquanto os grupos **controle + placebo** e **tucum-do-cerrado + placebo** receberam igual volume de solução salina 0,9% (Figura 9.1).

1- **Grupo controle (CT; n = 6)**: dieta AIN-93G (Reeves *et al.*, 1993) e injeção intraperitoneal de solução salina 0,9%.

2- **Grupo controle + AOM (CT/DR; n = 8)**: dieta AIN-93G e injeção intraperitoneal de azoximetano (15 mg/ kg peso corporal, AOM).

3- **Grupo tucum-do-cerrado (TU; n = 6)**: dieta AIN-93G adicionada de tucum-do-cerrado na proporção de 150 g de tucum-do-cerrado (casca de polpa) / Kg dieta e injeção intraperitoneal de solução salina 0,9%.

4- **Grupo dieta tucum-do-cerrado + AOM (TU/DR; n = 8)**: dieta AIN-93G adicionada de tucum-do-cerrado na proporção de 150 g de tucum-do-cerrado (casca de polpa) / Kg dieta e injeção intraperitoneal de azoximetano (15 mg/ kg peso corporal, AOM).

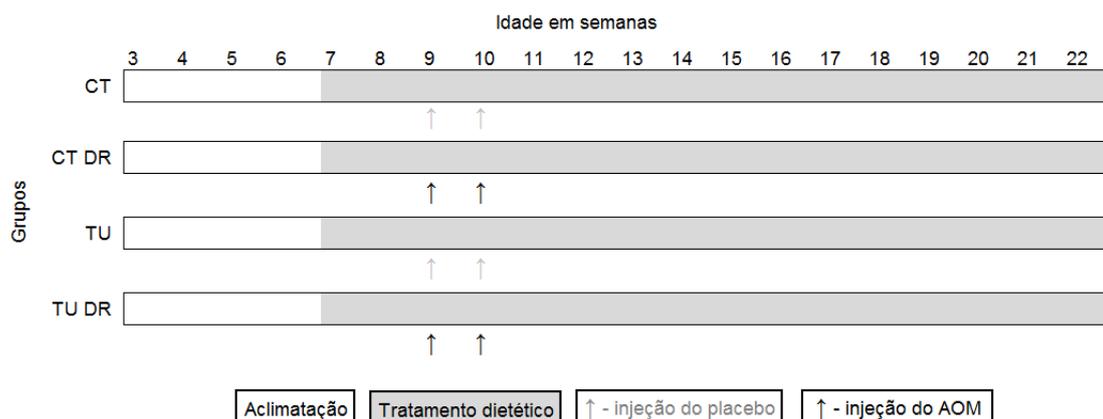


Figura 9.1: Esquema de tratamento dos animais.

Os animais foram pesados semanalmente para avaliação do ganho ponderal e o consumo da ração foi estimado diariamente por meio da diferença do peso da ração ofertada e da sobra. Após as 12 semanas de tratamento os animais foram eutanasiados usando isoflurano 3% por inalação e o sangue retirado por punção cardíaca. Logo após a eutanásia, foram retirados o fígado, o intestino delgado, o intestino grosso e uma parte do conteúdo cecal. Os órgãos foram lavados com PBS a 4°C. O intestino grosso foi cortado longitudinalmente com uma tesoura e colocado em uma bandeja (resfriada com gelo) com a luz intestinal voltada para cima. Com o auxílio de um bisturi, o intestino sofreu outro corte longitudinal que o dividiu ao meio. Metade do cólon foi congelado em nitrogênio líquido e a outra metade sofreu cortes horizontais que dividiram o intestino em três partes iguais, que foram classificadas como cólon distal (região próxima ao reto), transversal (região entre o cólon distal e proximal) e proximal (região ligada ao cecum). Essas três partes foram colocadas esticadas em papel filtro e submergidas em formalina tamponada 10%.

Variáveis analisadas

9.3 - Avaliação de parâmetros sanguíneos

A coleta do sangue foi realizada em tubos contendo EDTA 7%. Após a coleta, o material foi encaminhado para o Hospital Veterinário da Universidade de Brasília onde as análises foram feitas em contador de células ABX Micros ESV 60 (Horiba, Kyoto, Japão). Os parâmetros analisados foram: eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), plaquetas e células brancas.

9.4 – Identificação e quantificação de focos de criptas aberrantes (FCA)

A primeira alteração observada no cólon que pode resultar em câncer é a formação de uma única célula pré-neoplásica (criptas aberrantes, CA) que pode progredir para um conjunto de lesões pré-neoplásicas conhecidas como focos de criptas aberrantes (FCA). Os focos contendo quatro ou mais criptas aberrantes (FCA de alta multiplicidade, FCAAM) são preditivos de uma eventual formação de tumor (Terzic *et al.*, 2010). A identificação e quantificação de FCA no cólon foi feita de acordo com o método descrito por Bird (1987). O cólon mantido em formalina 10% foi corado com solução de azul de metileno 0,2% por aproximadamente 1 minuto e colocado no microscópio com a superfície da mucosa para cima. O número de CA e de FCA foram contados e classificados pela sua multiplicidade usando um microscópio de luz com aumento de x40. A multiplicidade foi avaliada contando o número de criptas aberrantes apresentadas em cada foco.

9.5 - Marcadores de danos oxidativos

9.5.1 - Marcador de peroxidação lipídica

Os níveis de malondialdeído (MDA) foram determinados no fígado e no cólon por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) segundo Candan e Tuzmen (2008) com modificações (Arruda *et al.*, 2013). Brevemente, o tecido foi homogeneizado em ácido sulfúrico 1% com uma diluição final de 1:10 (peso / volume) e centrifugado a 12.000 g durante 15 minutos a 4° C. Uma alíquota do

sobrenadante (250 μ L) foi adicionada a 375 μ L de ácido fosfórico 440 mmol / L e 125 μ L de ácido tiobarbitúrico 42 mmol / L (TBA, Sigma, St. Louis, MO, EUA). A mistura foi aquecida durante 1 hora a 100° C e, após resfriado, foram adicionados 500 μ L desta mistura a 500 μ L da solução metanol : NaOH 1 mol / L (volume / volume 91: 9). As amostras foram centrifugadas a 12 000 \times g durante 5 minutos a 4° C, o sobrenadante foi filtrado em membrana PVDF 0,45 μ m e 50 μ L de cada amostra foram injetados em sistema HPLC utilizando coluna Shim-park CLC-ODS C18 de 15 cm (Shimadzu, Kyoto, Japão). A fase móvel utilizada no sistema foi metanol: tampão fosfato 50 mmol / L (60:40) e a leitura foi realizada em detector de fluorescência com comprimentos de onda fixados em 553 nm (emissão) e 532 nm (excitação). A curva padrão foi feita pela hidrólise ácida de 1,1,3,3-tetraethoxy-propano 97% (TEP, Sigma, St. Louis, MO, EUA) em ácido sulfúrico a 1% usando quatro pontos padrão (0.81–16.16 nmol/mL; $y = 1^{-6} X + 0.0719$; $r^2 = 0.9911$). Os resultados foram expressos como nmol MDA / mg de proteína total, e a concentração de proteína foi determinada como o método descrito anteriormente (Hartree, 1972).

9.5.2 - Marcador de oxidação proteica

O ensaio baseia-se na reação da 2,4-dinitrofenilhidrazina com o grupo carbonil de proteínas oxidadas, e consequente formação de um complexo que absorve a 376 nm, como descrito por Richert *et al.* (2002). Brevemente, cerca de 0,1 g de amostras de fígado e cólon foram homogeneizadas em tampão Tris HCl 25 mmol/L contendo ureia 6 mol/L (pH 9,0) obedecendo uma proporção de 1:20 (p/v). Alíquotas de 200 μ L de homogeneizado foram transferidas para três diferentes tubos onde foram adicionados 200 μ L de ácido tricloroacético 20% (TCA) responsável pela precipitação das proteínas. Os tubos foram centrifugados a 10.000 \times g / 5 min, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspendido em 200 μ L do tampão de homogeneização. Em dois dos tubos foram adicionados 700 μ L de 2,4-dinitrofenil-hidrazina 0,2% (DNPH) em HCl 2 mol/L (amostras), enquanto no terceiro tubo pipetou-se 700 μ L de HCl 2 mol/L, utilizado como branco. Os tubos foram centrifugados por 15 min a 4°C, ao pellet foram adicionados 700 μ L de TCA 20% e os tubos passaram por nova centrifugação (10.000 \times g / 5 min). Novamente descartou-se o sobrenadante, o

precipitado de proteína foi lavado por três vezes utilizando 1 mL de solução de acetato de etila : etanol (1:1) e posteriormente centrifugado. Após 15 minutos, o precipitado foi dissolvido em 500 µL de tampão fosfato de potássio 500 mmol/L (pH 2,5) contendo guanidina 6 mol/L e, após centrifugação por dois minutos a 10.000 x g, incubou-se a 4°C por 30 min sob agitação (Thermomixer Confort Eppendorf). A absorbância foi lida a 376 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol de carbonil por mg de proteína total, utilizando um coeficiente de extinção molar do complexo carbonil - dinitrofenil-hidrazina de 22.000 mM⁻¹cm⁻¹ a 376 nm. A determinação de proteína total foi realizada por método descrito anteriormente (Hartree, 1972).

9.6 - Determinação da Atividade Específica de Enzimas Antioxidantes

9.6.1 - Preparação do homogeneizado para análise das enzimas

A atividade das enzimas catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e glutathione-S-transferase foram determinadas no mesmo homogeneizado segundo descrito por (Joanisse e Storey, 1996). Resumidamente, o fígado (diluição final de 1:40 peso / volume) e o cólon (diluição final de 1:20 peso / volume) foram homogeneizados em tampão de fosfato de potássio 50 mmol / L, pH 7,2, contendo EDTA 50 mmol/L e fluoreto de fenilmetilsulfonil 1 mmol/L (PMSF; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), utilizando homogeneizador elétrico TissueRuptor (QIAGEN, Austin, Texas, EUA). As amostras foram centrifugadas a 13 000 x g durante 20 min a 4° C e o sobrenadante utilizado para determinação de atividade enzimática e dosagem de proteínas totais. Utilizou-se um homogeneizado diferente para a quantificação da atividade da superóxido dismutase: homogeneização do fígado e do cólon em 50 mmol / L de tampão fosfato de potássio pH 7,8, contendo 0,5 mmol / L de EDTA e 1 mmol / L de PMSF, com uma diluição final de 1 : 20 (peso / volume).

9.6.2 - Ensaio da Catalase (CAT)

Foi avaliado o consumo de H₂O₂ pela catalase por meio do monitoramento da absorbância a 240 nm durante 20 segundos utilizando espectrofotômetro

Shimadzu – TCC 240A (Joanisse e Storey 1996). Para tanto, foi utilizado um sistema contendo homogeneizado (5 μL para fígado e 60 μL para intestino), tampão fosfato de potássio 50 mmol/L, pH 7,2 com EDTA 0,5 mmol/L e H_2O_2 10 mmol/L, concentrações finais. O ensaio continha dois brancos: branco total, constituído pelo sistema reacional sem homogeneizado e o branco específico, constituído pelo sistema reacional sem H_2O_2 , necessário para determinar qualquer reação com substratos do próprio tecido. A atividade enzimática foi calculada por meio do coeficiente de extinção molar do H_2O_2 a 240nm que é de $0,0394 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Uma unidade de catalase foi definida como a quantidade de enzima necessária para decompor 1 μmol de H_2O_2 / min.

9.6.3 - Ensaio da Glutathiona Peroxidase (GPx)

A atividade de glutathiona peroxidase foi determinada de forma indireta, por meio do monitoramento da oxidação do NADPH que foi medido em espectrofotômetro (Shimadzu – TCC 240A) na absorvância de 340 nm, em uma reação catalisada pela glutathiona redutase (GR) cujo substrato é a glutathiona oxidada (GSSG) (Joanisse e Storey 1996). O sistema de reação foi constituído por tampão fosfato de potássio 50 mmol/L, pH 7,2 com EDTA 0,5 mmol/L, azida sódica 2 mmol/L, GR 1,5 IU/mL, NADPH 0,15 mmol/L, GSH 5 mmol/L, H_2O_2 0,2 mmol/L e homogeneizado (20 μL para fígado e 75 μL para intestino), concentrações finais. O ensaio também continha dois brancos (total e específico) iguais ao ensaio da catalase. O tempo de leitura da reação foi de 20 segundos. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do NADPH a 340nm que é de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Uma unidade (U) de glutathiona peroxidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 nmol NADPH / min.

9.6.4 - Ensaio da Glutathiona Redutase (GR)

O ensaio foi executado segundo Joanisse e Storey (1996) por espectrofotometria (espectrofotômetro Shimadzu – TCC 240A) usando um comprimento de onda de $A_{340\text{nm}}$, no qual foi monitorada a oxidação do NADPH (doador de elétrons para redução da GSSG) por 30 segundos. Os reagentes deste ensaio incluem, em concentrações finais, tampão fosfato de potássio 50

mmol/L, pH 7,2 com EDTA 0,5 mmol/L, NADPH 0,2 mmol/L, GSSG 1 mmol/L e homogeneizado de fígado (40 μ L para fígado e intestino). O branco total era formado por tudo exceto o homogeneizado e o branco específico não continha GSSG. Para os cálculos da atividade enzimática, é considerado o coeficiente de extinção molar do NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 340nm. Uma unidade (U) de glutatona redutase foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 nmol NADPH / min.

9.6.5 - Ensaio da Glutathione-S-transferase

A atividade de GST foi avaliada segundo Joanisse e Storey (1996), por espectrofotometria (espectrofotômetro Shimadzu – TCC 240A) ($A_{340\text{nm}}$), por meio do monitoramento da absorbância do conjugado de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e GSH (S-2,4-dinitrofenil-glutathione) a 340 nm, durante 20 segundos. O sistema reacional foi formado por tampão fosfato de potássio 50 mmol/L em pH 7,2 com EDTA 0,5 mmol/L, CDNB 1 mmol/L, GSH 1 mmol/L (valores de concentrações finais) e homogeneizado de tecido (50 μ L para fígado e intestino). Dois brancos foram utilizados no sistema: branco total (sem homogeneizado) e branco específico (sem GSH, para avaliar a conjugação entre a GSH do tecido e o CDNB). A atividade enzimática é determinada utilizando o coeficiente de extinção molar do S-2,4-dinitrofenil-glutathione de $9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 340nm. Uma unidade (U) de glutathione-S-transferase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 nmol de conjugado / min.

9.6.6 - Ensaio da Superóxido Dismutase (SOD)

No ensaio descrito por Mccord e Fridovic (1969), a xantina oxidase produz superóxido a partir da hipoxantina, o superóxido por sua vez reduz o citocromo c. A cinética da reação de redução do citocromo c é monitorada por meio da leitura da absorbância a 550 nm por 60 segundos. Dessa forma, quando o homogeneizado (fonte de SOD) é adicionado ao sistema, ocorre a inibição da redução do citocromo c, já que a SOD faz a dismutação do superóxido em H_2O_2 e O_2 . O sistema reacional, em concentrações finais, era formado por tampão fosfato de potássio 50 mmol/L, pH 7,8 com EDTA 0,5 mmol/L, citocromo c predominantemente oxidado 0,01 mmol/L, hipoxantina 0,05 mmol/L,

homogeneizado (diferentes volumes) e xantina oxidase suficiente para gerar uma taxa de redução do citocromo c de 0,02 a 0,025 abs/min. Para os cálculos da atividade enzimática, uma unidade (U) de SOD correspondeu à quantidade de enzima necessária para diminuir em 50% a redução do citocromo c. Para obtenção desse dado, foi necessário realizar o ensaio utilizando diferentes volumes de um mesmo homogeneizado: 5 μ L, 10 μ L, 25 μ L e, 50 μ L para fígado e 10 μ L, 25 μ L, 50 μ L, 80 μ L para intestino. Neste ensaio, o branco total não continha o homogeneizado e ele era utilizado para determinar o volume de xantina oxidase que seria utilizada no ensaio. Foi realizado um branco específico (sem a xantina oxidase) para cada volume de homogeneizado. Um gráfico contendo o volume de homogeneizado utilizado no ensaio e o delta da absorbância do citocromo c reduzido a 550 nm foi plotado e uma função logarítmica foi gerada. A partir desta função foi possível encontrar o valor correspondente a uma unidade (U) de SOD, a qual correspondeu ao volume de homogeneizado necessário para gerar um delta da absorbância do citocromo c reduzido igual a 0,0125 abs/min.

9.7 - Determinação dos níveis de mRNA de Bax, Bcl2, Il6, Il1b, Tnfa, Cox2

Essas análises foram realizadas no cólon previamente congelado em nitrogênio líquido. O tecido foi macerado e, utilizando homogeneizador elétrico TissueRuptor (QIAGEN, Austin, Texas, EUA), o RNA extraído com Trizol (1g de tecido para 10mL de Trizol) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Em seguida, o material foi centrifugado a 10000 x g a 4°C por 10 min, o sobrenadante transferido para outro tubo e incubado com 200 μ L de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 3 minutos a temperatura ambiente. O material foi submetido a uma nova centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foram adicionados 500 μ L de álcool isopropílico (J. T. Baker, Xalostoc, Edo de Méx, México) para a precipitação do RNA. Novamente a amostra sofreu centrifugação e o pellet de RNA foi lavado com 1 mL etanol 75% (J. T. Baker, Xalostoc, Edo de Méx, México). O material foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em água deionizada.

As amostras de RNA foram precipitadas com acetato de sódio anidro 3 mol/L pH 5,2 (10% do volume da amostra) e etanol (2,5 x volume da amostra), incubadas a uma temperatura de 4° C por 30 min e então centrifugadas a 10000 x g por 30 min a 4°C. Ao material precipitado, adicionou-se 1 mL de etanol 75% e o material foi centrifugado a 10000 x g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado, a amostra foi seca em temperatura ambiente e depois ressuspensa em água deionizada.

A pureza das amostras de RNA total foi verificada por determinação da absorbância a 230, 260 e 280nm em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 UV-visível, Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra) e das proporções A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} . A concentração do RNA total foi feita por meio da fórmula:

Concentração de RNA ($\mu\text{g/ml}$) = $A_{260\text{nm}}$ x 40 x fator de diluição.

Na qual, A_{260} é valor de leitura da amostra a 260 nm, 40 é o coeficiente médio de extinção do RNA (Azevedo et al., 2010).

A integridade do RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose e software 1D LabImage (Kapelan Bio-Imaging Solutions, Leipzig, Alemanha). Para isso, 300 ng da amostra de RNA total foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil), tampão de corrida TAE 1x (Tris: Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil / Ácido Bórico: Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil / Ácido Etilenodiaminotetracético: Sigma, Saint Louis, MO, EUA) e corado com 5 μL de GelGreen™ (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA). O gel foi então analisado por foto documentação para confirmar a integridade do material genético.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Um mix foi preparado, contendo 10X RT Buffer, 10X Random primers, dNTPmix, RNase inhibitor e MultiScribe™ Reverse Transcriptase, com volume final de 10 μL , e posteriormente adicionado a um tubo contendo 10 μL de amostra de RNA (na concentração 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). As amostras preparadas foram colocadas em termociclador (Esco, Swift Maxi, Hatboro, PA, EUA) e submetidas às seguintes condições: 25°C por 10 min; 37°C por 120 min; 85°C por 5 min. Ao término da

transcrição reversa, as amostras de cDNA foram estocadas a uma temperatura de -20°C.

Os níveis dos transcritos de Bax, Bcl2, Il6, Il1b, Tnfa e Cox2 foram determinados por meio da amplificação do cDNA em sistema de reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR; 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para isso, foram pipetados na placa 2 µL de cDNA (ou 0,02 µg de RNA total), 5 µL de Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster 18 City, CA, EUA) e 0,2 µmol/L (concentração final) de cada primer (Tabela 9.1), com volume final de 10 µL. A amplificação do gene de interesse foi realizada utilizando-se 50 ciclos nas seguintes condições: a 95°C por 20 segundos, 95°C por 3 segundos e 60°C 30 segundos. Para a curva de dissociação, foi utilizado: 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos, 95°C por 15 segundos e 60°C por 15 segundos.

Para nos certificarmos da ausência de contaminação por DNA genômico, foi feito um controle negativo para cada amostra. Para isso, as amostras foram expostas à reação de síntese de cDNA sem a enzima transcriptase reversa e, posteriormente, submetidas à reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR).

A especificidade de amplificação foi verificada a partir da curva de dissociação (*melting curve*). A eficiência da reação de amplificação da PCR foi avaliada por meio de uma curva padrão construída a partir de diferentes diluições de cDNA para cada gene analisado. A curva foi montada correlacionando o ΔCT (ciclo *threshold*) versus o log da quantidade de cDNA utilizado para cada ponto na curva. A eficiência de amplificação foi determinada a partir da inclinação obtida pela curva padrão, sendo necessário um valor de inclinação menor que 0,1.

A expressão de todos os genes foi normalizada com base no gene constitutivo β -actina (Actb). Assim, a quantificação dos níveis de mRNA dos genes alvos foi calculada a partir do CT do gene alvo em relação ao gene constitutivo (β -actina), por meio da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O método descrito acima segue o tutorial da Applied Biosystems (2008).

Tabela 9.1: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na reação de qPCR.

Nome do gene	Gene	Oligonucleotídeos (5'– 3')	Referência
Ciclo-oxigenase-2	Cox2	F GCAAAGGCCTCCATTGACCAGAG R CGGGATACAGTTCCATGGCATCG	(Delage <i>et al.</i> , 2005)
Linfoma de células B 2	Bcl2	F GATTGTGGCCTTCTTTGAGT R ATAGTTCCACAAAGGCATCC	(Mohseni <i>et al.</i> , 2012)
Proteína X Associada a bcl-2	Bax	F TGCTACAGGGTTTCATCCAG R ATCCTCTGCAGCTCCATGTT	(Mohseni <i>et al.</i> , 2012)
Interleucina 6	Il6	F GCCAGAGTCATTCAGAGCAATA R GTTGGATGGTCTTGGTCCTTAG	(Di Liddo <i>et al.</i> , 2015)
Interleucina 1 beta	Il1b	F CACCTCTCAAGCAGAGCACAG R GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC	(Peinnequin <i>et al.</i> , 2004)
Fator de necrose tumoral alfa	Tnfa	F AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC R GTCGTAGCAAACCACCAAGCAGA	(Peinnequin <i>et al.</i> , 2004)
β actina	Actb	F GTCGTACCACTGGCATTGTG R CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	(Wang <i>et al.</i> , 2008)

9.8 - Determinação dos níveis de proteína BAX, BCL-2 e COX-2

Uma alíquota do cólon foi homogeneizada em tampão (0,1g : 2 μ L) contendo sacarose 0,25 mol/L; Tris HCl 15 mmol/L pH 7,9; NaCl 15 mmol/L; KCl 60 mmol/L; EDTA 5 mmol/L; spermine 0,15 mmol/L; spermidine 0,5 mmol/L; dithiotheritol 1 mmol/L; coquetel inibidor de protease 1% (volume / volume tampão) (Sigma Aldrich, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e coquetel inibidor de fosfatase 1% (volume / volume tampão) (Sigma Aldrich, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) utilizando-se homogeneizador vidro-vidro submerso em gelo. A amostra foi então sonicada por 1 minuto, centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado. Uma alíquota desse material foi usada para a determinação da concentração de proteína total, pelo método descrito por Hartree (1972), e o restante foi estocado a -80°C.

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Para o preparo das amostras, foi feita uma diluição do homogeneizado em água e depois parte desse material foi resuspenso (1:1) em tampão (tris 1200 mmol/L pH 6,8; SDS 4% p/v; glicerol 20% (v/v); azul de bromofenol 0,1%)

contendo β -mercaptoetanol (60:1). As amostras foram aquecidas a 100 °C por 1 minuto e depois foram aplicadas no gel. A quantidade de proteína variou de acordo com a proteína de interesse: 20 μ g de proteína para cada amostra de BCL-2 e BAX e 45 μ g de proteína para as amostras de COX-2.

O gel de poliacrilamida utilizado na eletroforese era formado por um gel concentrador de 5% (3,4 mL de água; 830 μ L de acrilamida/bisacrilamida 30%; 630 μ L de tris HCl 1,0 mol/L pH 6,8; 50 μ L SDS 10%; 15 μ L TEMED; 50 μ L de APS 10%) que representava 1/3 do gel e um gel separador de 12% (3,3 mL de água; 4,0 mL de acrilamida/bisacrilamida 30%; 2,5 mL de tris HCl 1,5 mol/L pH 8,8; 100 μ L SDS 10%; 15 μ L TEMED; 100 μ L de APS 10%) que representava 2/3 do gel. Para a eletroforese, foi utilizado tampão (tris 25 mmol/L; glicina 0,192 mol/L; SDS 0,1% p/v) e a corrida foi feita a 80 V por cerca de 3 horas (Bio-Rad, California, USA).

Após a separação, as proteínas foram transferidas para membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF – Merck Millipore, Massachusetts, USA) em sistema Trans Blot Semi-Dry (Bio-Rad, California, USA) usando papel filtro extra grosso umedecido com tampão (tris 48 mmol/L; glicina 39 mmol/L, metanol 20%). As condições da transferência variaram de acordo com a proteína de interesse: 30 minutos, 15 V para BCL-2 e BAX, e 40 minutos, 15V para COX-2.

A membrana foi então bloqueada com leite em pó desnatado 5% em TBST (tris 20 mmol/L; 0,137 mol/L; 0,1% tween 20) por 2 horas em agitador basculante e temperatura ambiente. Depois a membrana foi lavada com TBST e incubada com anticorpo primário diluído em solução de bloqueio (1:2000 para β -actina; 1:1000 para BAX e BCL-2; 1:500 para COX-2) por 16 horas no agitador à 5°C. Posteriormente, a membrana foi lavada com TBST e incubada com anticorpo secundário (1:1000) em agitador basculante em temperatura ambiente por 1 hora. A membrana sofreu nova lavagem com TBST e foi revelada com reagente NBT/BCIP (Sigma Aldrich, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) por 30 minutos (para BAX e BCL-2) ou 6 horas (para COX-2). As bandas foram quantificadas em sistema de análise de imagem Image Studio (Li-cor-Bioscience, Lincoln, NE, USA).

9.9 - Avaliação dos níveis de IL-6, TNF α , IL-1 β

Os níveis das citocinas foram determinados no soro utilizando kit comercial de ensaio imunoenzimático (ELISA) para IL-6 (Sigma Aldrich; St. Louis, USA), IL-1 β e TNF α (eBioscience, Viena, Austria) seguindo as recomendações do fabricante.

9.10 - Análise estatística

A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada pelo método de Kolmogorov-Smirnov. Para as variáveis com distribuição normal, foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA) com correção de Bonferroni, e para as variáveis com distribuição não normais, foi realizado o teste Kruskal-Wallis. Todas as análises foram feitas utilizando o software SPSS (versão 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). O valor de significância estabelecido para o teste foi de $P < 0,05$.

ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, n. 9, p. 1324-37, Feb 26 2007. ISSN 0950-9232 (Print)

0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17322918> >.

AGUILERA, A.; GOMEZ-GONZALEZ, B. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 3, p. 204-17, Mar 2008. ISSN 1471-0064 (Electronic)

1471-0064 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18227811> >.

AHMED, S. et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) differentially inhibits interleukin-1 beta-induced expression of matrix metalloproteinase-1 and -13 in human chondrocytes. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 308, n. 2, p. 767-73, Feb 2004. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14600251> >.

AKRAM, S. et al. Reactive oxygen species-mediated regulation of the Na⁺-H⁺ exchanger 1 gene expression connects intracellular redox status with cells' sensitivity to death triggers. **Cell Death Differ**, v. 13, n. 4, p. 628-41, Apr 2006. ISSN 1350-9047 (Print)

1350-9047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16179939> >.

ALITALO, K. The lymphatic vasculature in disease. **Nat Med**, v. 17, n. 11, p. 1371-80, Nov 07 2011. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22064427> >.

ALRAWI, S. J. et al. Genomic instability of human aberrant crypt foci measured by inter-(simple sequence repeat) PCR and array-CGH. **Mutat Res**, v. 601, n. 1-2, p. 30-8, Oct 10 2006. ISSN 0027-5107 (Print)

0027-5107 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16806294> >.

AMUNDSON, S. A. et al. An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. **Cancer Res**, v. 60, n. 21, p. 6101-10, Nov 01 2000. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11085534> >.

ARRUDA, L. F. et al. Dietary iron concentration may influence aging process by altering oxidative stress in tissues of adult rats. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61058, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23593390> >.

BADAWI, A. F.; BADR, M. Z. Expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and levels of prostaglandin E2 and 15-deoxy-delta12,14-

prostaglandin J2 in human breast cancer and metastasis. **Int J Cancer**, v. 103, n. 1, p. 84-90, Jan 01 2003. ISSN 0020-7136 (Print)

0020-7136 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12455057> >.

BALKWILL, F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 25, n. 3, p. 409-16, Sep 2006. ISSN 0167-7659 (Print)

0167-7659 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951987> >.

_____. Tumour necrosis factor and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 5, p. 361-71, May 2009. ISSN 1474-1768 (Electronic)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19343034> >.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539-45, Feb 17 2001. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11229684> >.

BALKWILL, F. R.; CAPASSO, M.; HAGEMANN, T. The tumor microenvironment at a glance. **J Cell Sci**, v. 125, n. Pt 23, p. 5591-6, Dec 01 2012. ISSN 1477-9137 (Electronic)

0021-9533 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23420197> >.

BANERJEE, N. et al. Pomegranate polyphenolics suppressed azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci and inflammation: possible role of miR-126/VCAM-1 and miR-126/PI3K/AKT/mTOR. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 12, p. 2814-22, Dec 2013. ISSN 1460-2180 (Electronic)

0143-3334 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23996930> >.

BARTH, S. W. et al. Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 8, p. 1414-21, Aug 2005. ISSN 0143-3334 (Print)

0143-3334 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15802299> >.

BINDER, C. et al. Induction of inducible nitric oxide synthase is an essential part of tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in MCF-7 and other epithelial tumor cells. **Lab Invest**, v. 79, n. 12, p. 1703-12, Dec 1999. ISSN 0023-6837 (Print)

0023-6837.

BIRD, R. P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Lett**, v. 37, n. 2, p. 147-51, Oct 30 1987. ISSN 0304-3835 (Print)

0304-3835 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3677050> >.

BIRD, R. P.; GOOD, C. K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Toxicol Lett**, v. 112-113, p. 395-402, Mar 15 2000. ISSN 0378-4274 (Print)

0378-4274 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10720758> >.

BLOT, W. J. et al. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. **J Natl Cancer Inst**, v. 85, n. 18, p. 1483-92, Sep 15 1993. ISSN 0027-8874 (Print)

0027-8874.

BOATENG, J. et al. Selected fruits reduce azoxymethane (AOM)-induced aberrant crypt foci (ACF) in Fisher 344 male rats. **Food Chem Toxicol**, v. 45, n. 5, p. 725-32, May 2007. ISSN 0278-6915 (Print)

0278-6915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17321025> >.

BODE, A. M.; DONG, Z. Cancer prevention research - then and now. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 7, p. 508-16, Jul 2009. ISSN 1474-175x.

BRASIL. Instituto Nacional Do Câncer – INCA. Estimativa 2014., 2014. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf> >. Acesso em: 12 dezembro.

BRIGHENTI, F. et al. Total antioxidant capacity of the diet is inversely and independently related to plasma concentration of high-sensitivity C-reactive protein in adult Italian subjects. **Br J Nutr**, v. 93, n. 5, p. 619-25, May 2005. ISSN 0007-1145 (Print)

0007-1145 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15975160> >.

BROUCKAERT, P. G. et al. In vivo anti-tumour activity of recombinant human and murine TNF, alone and in combination with murine IFN-gamma, on a syngeneic murine melanoma. **Int J Cancer**, v. 38, n. 5, p. 763-9, Nov 15 1986. ISSN 0020-7136 (Print)

0020-7136.

BURNET, F. M. The concept of immunological surveillance. **Prog Exp Tumor Res**, v. 13, p. 1-27, 1970. ISSN 0079-6263 (Print)

0079-6263 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4921480> >.

CAIRNS, J. Mutation selection and the natural history of cancer. **Nature**, v. 255, n. 5505, p. 197-200, May 15 1975. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1143315> >.

CAMPISI, J.; D'ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 9, p. 729-40, Sep 2007. ISSN 1471-0072.

CANDAN, N.; TUZMEN, N. Very rapid quantification of malondialdehyde (MDA) in rat brain exposed to lead, aluminium and phenolic antioxidants by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. **Neurotoxicology**, v. 29, n. 4, p. 708-13, Jul 2008. ISSN 0161-813X (Print)

0161-813x.

CARMELIET, P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. **Oncology**, v. 69 Suppl 3, p. 4-10, 2005. ISSN 0030-2414 (Print)

0030-2414.

CHEN, J.; HUANG, X. F. The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. **Cancer Biol Ther**, v. 8, n. 14, p. 1313-7, Jul 2009. ISSN 1555-8576 (Electronic)

1538-4047 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19502780> >.

CHOI, Y. J. et al. Acai Berries Inhibit Colon Tumorigenesis in Azoxymethane/Dextran Sulfate Sodium-Treated Mice. **Gut Liver**, v. 11, n. 2, p. 243-252, Mar 15 2017. ISSN 2005-1212 (Electronic)

1976-2283 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27965474> >.

CIMMINO, A. et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 39, p. 13944-9, Sep 27 2005. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16166262> >.

COFFELT, S. B. et al. Elusive identities and overlapping phenotypes of proangiogenic myeloid cells in tumors. **Am J Pathol**, v. 176, n. 4, p. 1564-76, Apr 2010. ISSN 1525-2191 (Electronic)

0002-9440 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20167863> >.

COOKE, V. G. et al. Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway. **Cancer Cell**, v. 21, n. 1, p. 66-81, Jan 17 2012. ISSN 1878-3686 (Electronic)

1535-6108 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22264789> >.

COOPER, G. M. **The Cell: A Molecular Approach**. 2. Sunderland: Sinauer Associates, 2000.

COPPE, J. P. et al. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. **Annu Rev Pathol**, v. 5, p. 99-118, 2010. ISSN 1553-4014 (Electronic)

1553-4006 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20078217> >.

CORY, S.; ADAMS, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 9, p. 647-56, Sep 2002. ISSN 1474-175X (Print)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209154> >.

DE GROOT, D. J. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 61, n. 1, p. 52-69, Jan 2007. ISSN 1040-8428 (Print)

1040-8428 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16945549> >.

DE HAAN, J. B. C., F.; IANNELLO, R.; BLADIER, C.; KELNER, M.J.; KOLA, I. Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. **Hum Mol Genet**, v. 5, n. 2, p. 283-92, 1996.

DE PALMA, M. et al. Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications. **Trends Immunol**, v. 28, n. 12, p. 519-24, Dec 2007. ISSN 1471-4906 (Print)

1471-4906 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981504> >.

DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 1, p. 24-37, Jan 2006. ISSN 1474-175X (Print)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16397525> >.

DELAGE, B. et al. A high-fat diet generates alterations in nuclear receptor expression: prevention by vitamin A and links with cyclooxygenase-2 and beta-catenin. **Int J Cancer**, v. 116, n. 6, p. 839-46, Oct 10 2005. ISSN 0020-7136 (Print)

0020-7136 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15856452> >.

DENARDO, D. G.; ANDREU, P.; COUSSENS, L. M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. **Cancer Metastasis Rev**, v. 29, n. 2, p. 309-16, Jun 2010. ISSN 0167-7659.

DI LIDDO, R. et al. Anti-inflammatory activity of Wnt signaling in enteric nervous system: in vitro preliminary evidences in rat primary cultures. **J Neuroinflammation**, v. 12, p. 23, Feb 03 2015. ISSN 1742-2094 (Electronic)

1742-2094 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25644719> >.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 2095-147, Mar 15 1996. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8630372> >.

DVORAK, H. F. Angiogenesis: update 2005. **J Thromb Haemost**, v. 3, n. 8, p. 1835-42, Aug 2005. ISSN 1538-7933 (Print)

1538-7836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102050> >.

EBERHART, C. E. et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. **Gastroenterology**, v. 107, n. 4, p. 1183-8, Oct 1994. ISSN 0016-5085 (Print)

0016-5085 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7926468> >.

EGEBLAD, M.; NAKASONE, E. S.; WERB, Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. **Dev Cell**, v. 18, n. 6, p. 884-901, Jun 15 2010. ISSN 1534-5807.

EHRlich, P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. **Ned. Tijdschr. Geneeskd.**, v. 5, p. 273-290, 1909.

ELARAJ, D. M. et al. The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 4, p. 1088-96, Feb 15 2006. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16489061> >.

ERLANK, H. et al. Polyphenols activate Nrf2 in astrocytes via H₂O₂, semiquinones, and quinones. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 12, p. 2319-27, Dec 15 2011. ISSN 1873-4596 (Electronic)

0891-5849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22037513> >.

ESTELLER, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nat Rev Genet**, v. 8, n. 4, p. 286-98, Apr 2007. ISSN 1471-0056 (Print)

1471-0056 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17339880> >.

EVAN, G.; LITTLEWOOD, T. A matter of life and cell death. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1317-22, Aug 28 1998. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721090> >.

EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 342-8, May 17 2001. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836.

FALCHETTI, R. et al. Effects of resveratrol on human immune cell function. **Life Sci**, v. 70, n. 1, p. 81-96, Nov 21 2001. ISSN 0024-3205 (Print)

0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11764009> >.

FEMIA, A. P. et al. K-ras mutations and mucin profile in preneoplastic lesions and colon tumors induced in rats by 1,2-dimethylhydrazine. **Int J Cancer**, v. 122, n. 1, p. 117-23, Jan 01 2008. ISSN 1097-0215 (Electronic)

0020-7136 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17847023> >.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, Mar 01 2015. ISSN 1097-0215 (Electronic)

0020-7136 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220842> >.

FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 6, p. 453-8, Jun 2003. ISSN 1474-175X (Print)

1474-175x.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-47, Nov 09 2000. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11089981> >.

FISHER, D. T.; APPENHEIMER, M. M.; EVANS, S. S. The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. **Semin Immunol**, v. 26, n. 1, p. 38-47, Feb 2014. ISSN 1096-3618 (Electronic)

1044-5323 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24602448> >.

FORESTER, S. C.; LAMBERT, J. D. The role of antioxidant versus pro-oxidant effects of green tea polyphenols in cancer prevention. **Mol Nutr Food Res**, v. 55, n. 6, p. 844-54, Jun 2011. ISSN 1613-4133 (Electronic)

1613-4125 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21538850> >.

FRIDMAN, W. H. et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 4, p. 298-306, Mar 15 2012. ISSN 1474-1768 (Electronic)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22419253> >.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annu Rev Biochem**, v. 64, p. 97-112, 1995. ISSN 0066-4154 (Print)

0066-4154 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7574505> >.

FURTADO, R. A. et al. Chemopreventive effects of rosmarinic acid on rat colon carcinogenesis. **Eur J Cancer Prev**, v. 24, n. 2, p. 106-12, Mar 2015. ISSN 1473-5709 (Electronic)

0959-8278 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24977626> >.

FUSTINONI-REIS, A. M. et al. Tucum-Do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.) Consumption Modulates Iron Homeostasis and Prevents Iron-Induced Oxidative Stress in the Rat Liver. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 38, Feb 17 2016. ISSN 2072-6643 (Electronic)

2072-6643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26901220> >.

GEISZT, M.; LETO, T. L. The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. **J Biol Chem**, v. 279, n. 50, p. 51715-8, Dec 10 2004. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15364933> >.

GEMMA, A. et al. Altered expression of several genes in highly metastatic subpopulations of a human pulmonary adenocarcinoma cell line. **Eur J Cancer**, v. 37, n. 12, p. 1554-61, Aug 2001. ISSN 0959-8049 (Print)

0959-8049 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11506965> >.

GENDRON, M. E. et al. Time-dependent beneficial effect of chronic polyphenol treatment with catechin on endothelial dysfunction in aging mice. **Dose Response**, v. 10, n. 1, p. 108-19, 2012. ISSN 1559-3258 (Electronic)

1559-3258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22423234> >.

GENESTIER, L. et al. Tumor necrosis factor-alpha up-regulates Bcl-2 expression and decreases calcium-dependent apoptosis in human B cell lines. **Int Immunol**, v. 7, n. 4, p. 533-40, Apr 1995. ISSN 0953-8178 (Print)

0953-8178 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7547679> >.

GHIRARDI, M. et al. Azoxymethane-induced aberrant crypt foci and colorectal tumors in F344 rats: sequential analysis of growth. **Eur Surg Res**, v. 31, n. 3, p. 272-80, 1999. ISSN 0014-312X (Print)

0014-312X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10352356> >.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, n. 12, p. 931-47, Dec 2013. ISSN 1474-1776.

GOYAL, M. M. B. A. Human catalase: looking for complete identity. **Protein Cell**, v. 1, n. 10, p. 888-97, 2010.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, n. 5684, p. 626-9, Jul 30 2004. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15286356> >.

GREENHOUGH, A. et al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 3, p. 377-86, Mar 2009. ISSN 1460-2180 (Electronic)

0143-3334 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136477> >.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-99, Mar 19 2010. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303878> >.

GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. **Curr Opin Genet Dev**, v. 20, n. 1, p. 65-71, Feb 2010. ISSN 1879-0380 (Electronic)

0959-437X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036794> >.

GUALDONI, G. A. et al. Resveratrol enhances TNF-alpha production in human monocytes upon bacterial stimulation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1840, n. 1, p. 95-105, Jan 2014. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24035785> >.

GUPTA, A. K.; PRETLOW, T. P.; SCHOEN, R. E. Aberrant crypt foci: what we know and what we need to know. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 5, n. 5, p. 526-33, May 2007. ISSN 1542-3565.

GUPTA, R. A.; DUBOIS, R. N. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. **Nat Rev Cancer**, v. 1, n. 1, p. 11-21, Oct 2001. ISSN 1474-175X (Print)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11900248> >.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases (rat and human). **Methods Enzymol**, v. 77, p. 218-31, 1981. ISSN 0076-6879 (Print)

0076-6879 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6173570> >.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? **Biochem J**, v. 401, n. 1, p. 1-11, Jan 01 2007. ISSN 0264-6021.

_____. The antioxidant paradox: less paradoxical now? **Br J Clin Pharmacol**, v. 75, n. 3, p. 637-44, Mar 2013. ISSN 1365-2125 (Electronic)

0306-5251 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22420826> >.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 07 2000. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931> >.

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 04 2011. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> >.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal Biochem**, v. 48, n. 2, p. 422-7, Aug 1972. ISSN 0003-2697 (Print)

0003-2697.

HARVEY LODISH, A. B., S LAWRENCE ZIPURSKY, PAUL MATSUDAIRA, DAVID BALTIMORE, AND JAMES DARNELL. **Molecular Cell Biology**. 5. Garland Science, 2007. 1392.

HASSAN, M. et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 150845, 2014. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25013758> >.

HATTORI, R. et al. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 282, n. 6, p. H1988-95, Jun 2002. ISSN 0363-6135 (Print)

0363-6135 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12003802> >.

HAYES, J. D. F., J.U.; JOWSEY, I.R. GLUTATHIONE TRANSFERASES. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 51-88, 2005.

HEIKKILA, K.; EBRAHIM, S.; LAWLOR, D. A. Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer. **Eur J Cancer**, v. 44, n. 7, p. 937-45, May 2008. ISSN 0959-8049 (Print)

0959-8049 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18387296> >.

HERMES-LIMA, M. OXYGEN IN BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY: ROLE OF FREE RADICALS. In: STOREY, K. B. (Ed.). **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. 1. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. p.319-368.

HONG, M. Y. et al. Effects of dark chocolate on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci. **Nutr Cancer**, v. 65, n. 5, p. 677-85, 2013. ISSN 1532-7914 (Electronic)

0163-5581 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23859035> >.

HOSOKAWA, Y. et al. Tea polyphenols inhibit IL-6 production in tumor necrosis factor superfamily 14-stimulated human gingival fibroblasts. **Mol Nutr Food Res**, v. 54 Suppl 2, p. S151-8, Jul 2010. ISSN 1613-4133 (Electronic)

1613-4125 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20461739> >.

HU, Y. et al. Combination of selenium and green tea improves the efficacy of chemoprevention in a rat colorectal cancer model by modulating genetic and epigenetic biomarkers. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64362, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23717604> >.

IRANI, K. et al. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. **Science**, v. 275, n. 5306, p. 1649-52, Mar 14 1997. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9054359> >.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071-8, Oct 22 2009. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19847258> >.

JACOB, S.; PRAZ, F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. **Biochimie**, v. 84, n. 1, p. 27-47, Jan 2002. ISSN 0300-9084 (Print)

0300-9084 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11900875> >.

JOANISSE, D. R.; STOREY, K. B. Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze-tolerant wood frog. **Am J Physiol**, v. 271, n. 3 Pt 2, p. R545-53, Sep 1996. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8853374> >.

JOHANSSON, M.; DENARDO, D. G.; COUSSENS, L. M. Polarized immune responses differentially regulate cancer development. **Immunol Rev**, v. 222, p. 145-54, Apr 2008. ISSN 1600-065X (Electronic)

0105-2896 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18363999> >.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet**, v. 3, n. 6, p. 415-28, Jun 2002. ISSN 1471-0056 (Print)

1471-0056 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12042769> >.

_____. The epigenomics of cancer. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 683-92, Feb 23 2007. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320506> >.

JOVEN, J. et al. Polyphenols and the modulation of gene expression pathways: can we eat our way out of the danger of chronic disease? **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 54, n. 8, p. 985-1001, 2014. ISSN 1040-8398.

KAUNTZ, H. et al. Silibinin, a natural flavonoid, modulates the early expression of chemoprevention biomarkers in a preclinical model of colon carcinogenesis. **Int J Oncol**, v. 41, n. 3, p. 849-54, Sep 2012. ISSN 1019-6439.

KAWAMORI, T. et al. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. **Cancer Res**, v. 58, n. 3, p. 409-12, Feb 01 1998. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9458081> >.

KELLOFF, G. J.; SIGMAN, C. C.; GREENWALD, P. Cancer chemoprevention: progress and promise. **Eur J Cancer**, v. 35, n. 14, p. 2031-8, Dec 1999. ISSN 0959-8049 (Print)

0959-8049 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10711244> >.

KHAN, R. et al. Glycyrrhizic acid suppresses the development of precancerous lesions via regulating the hyperproliferation, inflammation, angiogenesis and apoptosis in the colon of Wistar rats. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56020, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23457494> >.

KHAN, Z. et al. Biology of Cox-2: an application in cancer therapeutics. **Curr Drug Targets**, v. 12, n. 7, p. 1082-93, Jun 2011. ISSN 1873-5592 (Electronic)

1389-4501 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21443470> >.

KIM, H. J. et al. Regulation of lipopolysaccharide-induced inducible nitric-oxide synthase expression through the nuclear factor-kappaB pathway and interferon-beta/tyrosine kinase 2/Janus tyrosine kinase 2-signal transducer and activator of transcription-1 signaling cascades by 2-naphthylethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (THI 53), a new synthetic isoquinoline alkaloid. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 320, n. 2, p. 782-9, Feb 2007. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17108235> >.

KIM, J. et al. Chemopreventive effect of cactus (*Opuntia humifusa*) extracts: radical scavenging activity, pro-apoptosis, and anti-inflammatory effect in human colon (SW480) and breast cancer (MCF7) cells. **Food Funct**, v. 4, n. 5, p. 681-8, Apr 30 2013. ISSN 2042-650X (Electronic)

2042-6496 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435602> >.

KIM, J. J. et al. TNF-alpha-induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-X(L). **Cell Death Differ**, v. 17, n. 9, p. 1420-34, Sep 2010. ISSN 1350-9047.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 44, p. 239-67, 2004. ISSN 0362-1642 (Print)

0362-1642 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744246> >.

KOMORI, A. et al. Tumor necrosis factor acts as a tumor promoter in BALB/3T3 cell transformation. **Cancer Res**, v. 53, n. 9, p. 1982-5, May 01 1993. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472.

KORBECKI, J. et al. Cyclooxygenase pathways. **Acta Biochim Pol**, v. 61, n. 4, p. 639-49, 2014. ISSN 1734-154X (Electronic)

0001-527X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25343148> >.

KRINSKY, N. I. Mechanism of action of biological antioxidants. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 200, n. 2, p. 248-54, Jun 1992. ISSN 0037-9727 (Print)

0037-9727 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1579590> >.

KUEI, J. H.; TASHKIN, D. P.; FIGLIN, R. A. Pulmonary toxicity of recombinant human tumor necrosis factor. **Chest**, v. 96, n. 2, p. 334-8, Aug 1989. ISSN 0012-3692 (Print)

0012-3692 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2752816> >.

KVANSAKUL, M.; HINDS, M. G. Structural biology of the Bcl-2 family and its mimicry by viral proteins. **Cell Death Dis**, v. 4, p. e909, Nov 07 2013. ISSN 2041-4889 (Electronic). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24201808> >.

LAMBERT, J. D. et al. Hepatotoxicity of high oral dose (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice. **Food Chem Toxicol**, v. 48, n. 1, p. 409-16, Jan 2010. ISSN 1873-6351 (Electronic)

0278-6915 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19883714> >.

LASA, M. et al. Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 12, p. 4265-74, Jun 2000. ISSN 0270-7306 (Print)

0270-7306 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10825190> >.

LEE, H. J. et al. 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in colorectal mucosa as a potential biomarker for predicting colorectal neoplasms. **J Korean Med Sci**, v. 28, n. 8, p. 1154-60, Aug 2013. ISSN 1011-8934.

LEE, J. A. et al. Differential regulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by superoxide dismutase in lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 cells. **Exp Mol Med**, v. 41, n. 9, p. 629-37, Sep 30 2009. ISSN 2092-6413 (Electronic)

1226-3613 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19478557> >.

LETAI, A. et al. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. **Cancer Cell**, v. 2, n. 3, p. 183-92, Sep 2002. ISSN 1535-6108 (Print)

1535-6108.

LEWIS, A. M. et al. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. **J Transl Med**, v. 4, p. 48, Nov 10 2006. ISSN 1479-5876 (Electronic)

1479-5876 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17096856> >.

LI, H.; FAN, X.; HOUGHTON, J. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. **J Cell Biochem**, v. 101, n. 4, p. 805-15, Jul 01 2007. ISSN 0730-2312 (Print)

0730-2312 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17226777> >.

LI, P. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 479-89, Nov 14 1997. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9390557> >.

LI, Y.; CAO, Z.; ZHU, H. Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. **Pharmacol Res**, v. 53, n. 1, p. 6-15, Jan 2006. ISSN 1043-6618 (Print)

1043-6618 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16169743> >.

LINKOUS, A.; YAZLOVITSKAYA, E. Cytosolic phospholipase A2 as a mediator of disease pathogenesis. **Cell Microbiol**, v. 12, n. 10, p. 1369-77, Oct 2010. ISSN 1462-5814.

LIPPITZ, B. E. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. **Lancet Oncol**, v. 14, n. 6, p. e218-28, May 2013. ISSN 1474-5488 (Electronic)

1470-2045 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23639322> >.

LOWE, S. W.; CEPERO, E.; EVAN, G. Intrinsic tumour suppression. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 307-15, Nov 18 2004. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15549092> >.

MA, Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 53, p. 401-26, 2013. ISSN 1545-4304 (Electronic)

0362-1642 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23294312> >.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-44, Jul 24 2008. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650914> >.

MASSAGUE, J. TGFbeta in Cancer. **Cell**, v. 134, n. 2, p. 215-30, Jul 25 2008. ISSN 0092-8674.

MAZUE, F. et al. Differential protective effects of red wine polyphenol extracts (RWEs) on colon carcinogenesis. **Food Funct**, v. 5, n. 4, p. 663-70, Apr 2014. ISSN 2042-650X (Electronic)

2042-6496 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24569685> >.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. **J Biol Chem**, v. 244, n. 22, p. 6049-55, Nov 25 1969. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5389100> >.

MEGARAJ, V. et al. Role of hepatic and intestinal p450 enzymes in the metabolic activation of the colon carcinogen azoxymethane in mice. **Chem Res Toxicol**, v. 27, n. 4, p. 656-62, Apr 21 2014. ISSN 1520-5010 (Electronic)

0893-228X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24552495> >.

MIYASHITA, T. et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. **Oncogene**, v. 9, n. 6, p. 1799-805, Jun 1994. ISSN 0950-9232 (Print)

0950-9232.

MOCELLIN, S.; NITTI, D. TNF and cancer: the two sides of the coin. **Front Biosci**, v. 13, p. 2774-83, Jan 01 2008. ISSN 1093-9946 (Print)

1093-4715 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981752> >.

MOHSENI, M. et al. Melatonin may play a role in modulation of bax and bcl-2 expression levels to protect rat peripheral blood lymphocytes from gamma irradiation-induced apoptosis. **Mutat Res**, v. 738-739, p. 19-27, Oct-Nov 2012. ISSN 0027-5107 (Print)

0027-5107.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, p. 109-42, Jun 1991. ISSN 0031-6997 (Print)

0031-6997 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1852778> >.

MORI, K.; SHIBANUMA, M.; NOSE, K. Invasive potential induced under long-term oxidative stress in mammary epithelial cells. **Cancer Res**, v. 64, n. 20, p. 7464-72, Oct 15 2004. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15492271> >.

MOSKAUG, J. O. et al. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. **Am J Clin Nutr**, v. 81, n. 1 Suppl, p. 277S-283S, Jan 2005. ISSN 0002-9165 (Print)

0002-9165 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15640491> >.

MOTYKA, B. et al. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 491-500, Oct 27 2000. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674.

MURAKAMI, M. et al. Prostaglandin E2 amplifies cytosolic phospholipase A2- and cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E2 generation in mouse osteoblastic cells. Enhancement by secretory phospholipase A2. **J Biol Chem**, v. 272, n. 32, p. 19891-7, Aug 08 1997. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9242654> >.

MURDOCH, C. et al. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 8, p. 618-31, Aug 2008. ISSN 1474-175x.

NA, H. K.; SURH, Y. J. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. **Food Chem Toxicol**, v. 46, n. 4, p. 1271-8, Apr 2008. ISSN 0278-6915 (Print)

0278-6915 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18082923> >.

NAGATA, S. Fas ligand-induced apoptosis. **Annu Rev Genet**, v. 33, p. 29-55, 1999. ISSN 0066-4197 (Print)

0066-4197 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10690403> >.

NEGRINI, S.; GORGOULIS, V. G.; HALAZONETIS, T. D. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 3, p. 220-8, Mar 2010. ISSN 1471-0080 (Electronic)

1471-0072 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20177397> >.

NGUYEN, D. X.; BOS, P. D.; MASSAGUE, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 4, p. 274-84, Apr 2009. ISSN 1474-1768 (Electronic)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19308067> >.

NYBERG, P.; SALO, T.; KALLURI, R. Tumor microenvironment and angiogenesis. **Front Biosci**, v. 13, p. 6537-53, May 01 2008. ISSN 1093-9946 (Print)

1093-4715 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18508679> >.

O'KEEFFE, M. B. et al. Investigation of pericytes, hypoxia, and vascularity in bladder tumors: association with clinical outcomes. **Oncol Res**, v. 17, n. 3, p. 93-101, 2008. ISSN 0965-0407 (Print)

0965-0407 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18669161> >.

OBERLEY, L. W. Free radicals and diabetes. **Free Radic Biol Med**, v. 5, n. 2, p. 113-24, 1988. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849.

OHASHI, Y. Y., K.; YOSHIOKA, H.; YOSHIOKA, H. Kinetic Analysis of the Effect of (-)-Epigallocatechin Gallate on the DNA Scission Induced by Fe(II). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 4, p. 770-776, 2002.

OKADA, F. et al. The role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-derived reactive oxygen species in the acquisition of metastatic ability of tumor cells. **Am J Pathol**, v. 169, n. 1, p. 294-302, Jul 2006. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16816381> >.

OSHIMA, M. et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). **Cell**, v. 87, n. 5, p. 803-9, Nov 29 1996. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674.

PALOMER, X. et al. Resveratrol induces nuclear factor-kappaB activity in human cardiac cells. **Int J Cardiol**, v. 167, n. 6, p. 2507-16, Sep 10 2013. ISSN 1874-1754 (Electronic)

0167-5273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22748497> >.

PANDURANGAN, A. K. et al. Luteolin, a bioflavonoid inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis: Involvement of iNOS and COX-2. **Pharmacogn Mag**, v. 10, n. Suppl 2, p. S306-10, Apr 2014. ISSN 0973-1296 (Print)

0973-1296 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24991108> >.

PATEL, R. P. et al. Biological aspects of reactive nitrogen species. **Biochim Biophys Acta**, v. 1411, n. 2-3, p. 385-400, May 05 1999. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10320671> >.

PAUR, I.; AUSTENAA, L. M.; BLOMHOFF, R. Extracts of dietary plants are efficient modulators of nuclear factor kappa B. **Food Chem Toxicol**, v. 46, n. 4, p. 1288-97, Apr 2008. ISSN 0278-6915 (Print)

0278-6915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17980947> >.

PAVESE, J. M.; FARMER, R. L.; BERGAN, R. C. Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein. **Cancer Metastasis Rev**, v. 29, n. 3, p. 465-82, Sep 2010. ISSN 1573-7233 (Electronic)

0167-7659 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20730632> >.

PEINNEQUIN, A. et al. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. **BMC Immunol**, v. 5, p. 3, Feb 05 2004. ISSN 1471-2172 (Electronic)

1471-2172 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15040812> >.

PELICANO, H.; CARNEY, D.; HUANG, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. **Drug Resist Updat**, v. 7, n. 2, p. 97-110, Apr 2004. ISSN 1368-7646 (Print)

1368-7646 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158766> >.

PEREZ-JIMENEZ, J.; DIAZ-RUBIO, M. E.; SAURA-CALIXTO, F. Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: occurrence, metabolic fate and health effects. **Nutr Res Rev**, v. 26, n. 2, p. 118-29, Dec 2013. ISSN 1475-2700 (Electronic)

0954-4224 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23930641> >.

PERRON, N. R.; BRUMAGHIM, J. L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. **Cell Biochem Biophys**, v. 53, n. 2, p. 75-100, 2009. ISSN 1559-0283 (Electronic)

1085-9195 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19184542> >.

POLLA, B. S. Therapy by taking away: the case of iron. **Biochem Pharmacol**, v. 57, n. 12, p. 1345-9, Jun 15 1999. ISSN 0006-2952 (Print)

0006-2952 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10353254> >.

POLLOCK, R. E. **Manual de Oncologia Clínica**. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 2006. 1316.

POOL-ZOBEL, B.; VEERIAH, S.; BOHMER, F. D. Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens -- focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. **Mutat Res**, v. 591, n. 1-2, p. 74-92, Dec 11 2005. ISSN 0027-5107 (Print)

0027-5107 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16083918> >.

QIAN, B. Z.; POLLARD, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 39-51, Apr 02 2010. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371344> >.

QIAO, Y. L. et al. Total and cancer mortality after supplementation with vitamins and minerals: follow-up of the Linxian General Population Nutrition Intervention Trial. **J Natl Cancer Inst**, v. 101, n. 7, p. 507-18, Apr 01 2009. ISSN 1460-2105 (Electronic)

0027-8874 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19318634> >.

RADISKY, D. C. et al. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. **Nature**, v. 436, n. 7047, p. 123-7, Jul 07 2005. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16001073> >.

RAICA, M.; CIMPEAN, A. M.; RIBATTI, D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. **Eur J Cancer**, v. 45, n. 11, p. 1924-34, Jul 2009. ISSN 1879-0852 (Electronic)

0959-8049 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19406633> >.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993. ISSN 0022-3166 (Print)

0022-3166.

RIBATTI, D. Genetic and epigenetic mechanisms in the early development of the vascular system. **J Anat**, v. 208, n. 2, p. 139-52, Feb 2006. ISSN 0021-8782 (Print)

0021-8782 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16441559> >.

RICHERT, S. et al. Assessment of skin carbonyl content as a noninvasive measure of biological age. **Arch Biochem Biophys**, v. 397, n. 2, p. 430-2, Jan 15 2002. ISSN 0003-9861 (Print)

0003-9861.

RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, n. 11, p. 897-907, Nov 2004. ISSN 1471-0072 (Print)

1471-0072 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15520809> >.

RIJKEN, P. J. et al. Effect of vegetable and carotenoid consumption on aberrant crypt multiplicity, a surrogate end-point marker for colorectal cancer in azoxymethane-induced rats. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 12, p. 2267-72, Dec 1999. ISSN 0143-3334 (Print)

0143-3334 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10590218> >.

RODRIGUEZ-RAMIRO, I. et al. Cocoa polyphenols prevent inflammation in the colon of azoxymethane-treated rats and in TNF-alpha-stimulated Caco-2 cells. **Br J Nutr**, v. 110, n. 2, p. 206-15, Jul 28 2013. ISSN 0007-1145.

ROMIER, B. et al. Modulation of signalling nuclear factor-kappaB activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2 cells. **Br J Nutr**, v. 100, n. 3, p. 542-51, Sep 2008. ISSN 1475-2662 (Electronic)

0007-1145 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18377686> >.

ROSA, F. R. **Atividade antioxidante de frutos do cerrado e identificação de compostos em *Bactris setosa* Mart., *Palmae* (tucum-do-cerrado)**. 2013. 146 Doutorado (Doutorado em Nutrição Humana). Nutrição Humana, Universidade de Brasília, Brasília.

ROSA, F. R. et al. Phytochemical Compounds and Antioxidant Capacity of Tucum-Do-Cerrado (Bactris setosa Mart), Brazil's Native Fruit. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 110, Feb 23 2016. ISSN 2072-6643 (Electronic)

2072-6643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26907338> >.

RUSTGI, A. K. The genetics of hereditary colon cancer. **Genes Dev**, v. 21, n. 20, p. 2525-38, Oct 15 2007. ISSN 0890-9369 (Print)

0890-9369 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17938238> >.

SAKUMA, Y. et al. Stimulation of cAMP production and cyclooxygenase-2 by prostaglandin E(2) and selective prostaglandin receptor agonists in murine osteoblastic cells. **Bone**, v. 34, n. 5, p. 827-34, May 2004. ISSN 8756-3282 (Print)

1873-2763 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15121014> >.

SAKURAZAWA, N. et al. Instability of X chromosome methylation in aberrant crypt foci of the human colon. **Cancer Res**, v. 60, n. 12, p. 3165-9, Jun 15 2000. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10866306> >.

SALES, K. J.; GRANT, V.; JABBOUR, H. N. Prostaglandin E2 and F2alpha activate the FP receptor and up-regulate cyclooxygenase-2 expression via the cyclic AMP response element. **Mol Cell Endocrinol**, v. 285, n. 1-2, p. 51-61, Mar 26 2008. ISSN 0303-7207 (Print)

0303-7207 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18316157> >.

SATO DUARTE A.Y.S.; DE QUEIROZ R.S.; SANCHES, R. A. G., C.R.; DEDINI, F.G. . Ethnobotany of Natural Fibres - Bactris setosa (tucum) in a Traditional Rural Community. **FIBRES & TEXTILES in Eastern Europe**, v. 20, n. 2, p. 18-20, 2012.

SAURA-CALIXTO, F. G., I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. **Food Chemistry**, v. 94, n. 3, p. 442-447, 2006.

SEYNHAEVE, A. L. et al. Tumor necrosis factor alpha mediates homogeneous distribution of liposomes in murine melanoma that contributes to a better tumor response. **Cancer Res**, v. 67, n. 19, p. 9455-62, Oct 01 2007. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472.

SHAY, J. W.; WRIGHT, W. E.; WERBIN, H. Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. **Biochim Biophys Acta**, v. 1072, n. 1, p. 1-7, Apr 16 1991. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1850299> >.

SHEHZAD, A.; WAHID, F.; LEE, Y. S. Curcumin in cancer chemoprevention: molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials. **Arch Pharm (Weinheim)**, v. 343, n. 9, p. 489-99, Sep 2010. ISSN 1521-4184 (Electronic)

0365-6233 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20726007> >.

SHIELDS, J. D. et al. Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. **Science**, v. 328, n. 5979, p. 749-52, May 07 2010. ISSN 0036-8075.

SHUREIQI, I.; BARON, J. A. Curcumin chemoprevention: the long road to clinical translation. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 4, n. 3, p. 296-8, Mar 2011. ISSN 1940-6215.

SINICROPE, F. A.; GILL, S. Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 23, n. 1-2, p. 63-75, Jan-Jun 2004. ISSN 0167-7659 (Print)

0167-7659 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15000150> >.

SIQUEIRA, E. M. et al. Brazilian savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72826, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23991156> >.

SMYTH, M. J.; DUNN, G. P.; SCHREIBER, R. D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. **Adv Immunol**, v. 90, p. 1-50, 2006. ISSN 0065-2776 (Print)

0065-2776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16730260> >.

SMYTH, M. J. et al. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. **J Exp Med**, v. 192, n. 5, p. 755-60, Sep 04 2000. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10974040> >.

SOHN, O. S. et al. Differential effects of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoxymethanol. **Cancer Res**, v. 61, n. 23, p. 8435-40, Dec 01 2001. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731424> >.

STEFANSSON, I. M.; SALVESEN, H. B.; AKSLEN, L. A. Vascular proliferation is important for clinical progress of endometrial cancer. **Cancer Res**, v. 66, n. 6, p. 3303-9, Mar 15 2006. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472.

STEINBRENNER, H.; SIES, H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, n. 11, p. 1478-85, Nov 2009. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19268692> >.

SUN, L.; LUO, C.; LIU, J. Hydroxytyrosol induces apoptosis in human colon cancer cells through ROS generation. **Food Funct**, v. 5, n. 8, p. 1909-14, Aug 2014. ISSN 2042-6496.

SURH, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 10, p. 768-80, Oct 2003. ISSN 1474-175X (Print)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14570043> >.

SWANN, P. F. Why do O6-alkylguanine and O4-alkylthymine miscode? The relationship between the structure of DNA containing O6-alkylguanine and O4-alkylthymine and the mutagenic properties of these bases. **Mutat Res**, v. 233, n. 1-2, p. 81-94, Nov-Dec 1990. ISSN 0027-5107 (Print)

0027-5107.

TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. **J Clin Invest**, v. 107, n. 1, p. 7-11, Jan 2001. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11134171> >.

TAKAHASHI, M.; WAKABAYASHI, K. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. **Cancer Sci**, v. 95, n. 6, p. 475-80, Jun 2004. ISSN 1347-9032 (Print)

1347-9032 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15182426> >.

TALMADGE, J. E. et al. Immunomodulatory properties of recombinant murine and human tumor necrosis factor. **Cancer Res**, v. 48, n. 3, p. 544-50, Feb 01 1988. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3257167> >.

TAN, B. L. et al. Brewers' rice induces apoptosis in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats via suppression of cell proliferation and the Wnt signaling pathway. **BMC Complement Altern Med**, v. 14, p. 304, Aug 16 2014. ISSN 1472-6882 (Electronic)

1472-6882 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25129221> >.

TANAKA, T., DE AZEVEDO, M.B., DURÁN, N., ALDERETE, J.B., EPIFANO, F., GENOVESE, S., TANAKA, M., TANAKA, T., CURINI, M. Colorectal cancer chemoprevention by 2 beta-cyclodextrin inclusion compounds of auraptene and 4'-geranyloxyferulic acid. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 4, p. 830-40, 2010.

TENG, M. W. et al. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. **J Leukoc Biol**, v. 84, n. 4, p. 988-93, Oct 2008. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18515327> >.

TERZIC, J. et al. Inflammation and colon cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2101-2114 e5, Jun 2010. ISSN 1528-0012 (Electronic)

0016-5085 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20420949> >.

TETE, S. et al. Nutrition and cancer prevention. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 25, n. 3, p. 573-81, Jul-Sep 2012. ISSN 0394-6320 (Print)

0394-6320 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23058007> >.

TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 7, p. 579-91, Jul 2009. ISSN 1474-1784 (Electronic)

1474-1776 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19478820> >.

TSUJII, M.; DUBOIS, R. N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. **Cell**, v. 83, n. 3, p. 493-501, Nov 03 1995. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8521479> >.

UMESALMA, S.; SUDHANDIRAN, G. Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF-kappaB, iNOS, COX-2, TNF-alpha, and IL-6 in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 107, n. 2, p. 650-5, Aug 2010. ISSN 1742-7843 (Electronic)

1742-7835 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20406206> >.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**, v. 160, n. 1, p. 1-40, Mar 10 2006. ISSN 0009-2797 (Print)

0009-2797 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16430879> >.

VALTUENA, S. et al. Food selection based on total antioxidant capacity can modify antioxidant intake, systemic inflammation, and liver function without altering markers of oxidative stress. **Am J Clin Nutr**, v. 87, n. 5, p. 1290-7, May 2008. ISSN 1938-3207 (Electronic)

0002-9165 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18469252> >.

VANAMALA, J. et al. Suppression of colon carcinogenesis by bioactive compounds in grapefruit. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 6, p. 1257-65, Jun 2006. ISSN 0143-3334 (Print)

0143-3334 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16387741> >.

VARDAM, T. D. et al. Regulation of a lymphocyte-endothelial-IL-6 trans-signaling axis by fever-range thermal stress: hot spot of immune surveillance. **Cytokine**, v. 39, n. 1, p. 84-96, Jul 2007. ISSN 1043-4666 (Print)

1043-4666 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17903700> >.

VASKIVUO, T. E.; STENBACK, F.; TAPANAINEN, J. S. Apoptosis and apoptosis-related factors Bcl-2, Bax, tumor necrosis factor-alpha, and NF-kappaB in human endometrial hyperplasia and carcinoma. **Cancer**, v. 95, n. 7, p. 1463-71, Oct 01 2002. ISSN 0008-543X (Print)

0008-543X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12237915> >.

VENDRAMINI-COSTA, D. B.; CARVALHO, J. E. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. **Curr Pharm Des**, v. 18, n. 26, p. 3831-52, 2012. ISSN 1381-6128.

VERMA, A. K.; BOUTWELL, R. K. Effects of dose and duration of treatment with the tumor-promoting agent, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on mouse skin carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 1, n. 3, p. 271-6, Mar 1980. ISSN 0143-3334 (Print)

0143-3334 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22283009> >.

VERMA, M. The Role of Epigenomics in the Study of Cancer Biomarkers and in the Development of Diagnostic Tools. **Adv Exp Med Biol**, v. 867, p. 59-80, 2015. ISSN 0065-2598 (Print)

0065-2598 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26530360> >.

VLAHOS, R.; STEWART, A. G. Interleukin-1alpha and tumour necrosis factor-alpha modulate airway smooth muscle DNA synthesis by induction of cyclo-oxygenase-2: inhibition by dexamethasone and fluticasone propionate. **Br J Pharmacol**, v. 126, n. 6, p. 1315-24, Mar 1999. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188.

VUJANOVIC, N. L. Role of TNF family ligands in antitumor activity of natural killer cells. **Int Rev Immunol**, v. 20, n. 3-4, p. 415-37, Jun 2001. ISSN 0883-0185 (Print)

0883-0185 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11878511> >.

WALY, M. I. et al. Amelioration of azoxymethane induced-carcinogenesis by reducing oxidative stress in rat colon by natural extracts. **BMC Complement Altern Med**, v. 14, p. 60, Feb 18 2014. ISSN 1472-6882 (Electronic)

1472-6882 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24533833> >.

WANG, D.; DUBOIS, R. N. Eicosanoids and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 3, p. 181-93, Mar 2010. ISSN 1474-1768 (Electronic)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20168319> >.

WANG, J.; MAZZA, G. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 15, p. 4183-9, Jul 17 2002. ISSN 0021-8561 (Print)

0021-8561 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12105943> >.

WANG, L. et al. Antioxidative dietary compounds modulate gene expression associated with apoptosis, DNA repair, inhibition of cell proliferation and migration. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 9, p. 16226-45, Sep 15 2014. ISSN 1422-0067 (Electronic)

1422-0067 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25226533> >.

WANG, Q. et al. Lipopolysaccharide induces a significant increase in expression of iron regulatory hormone hepcidin in the cortex and substantia nigra in rat brain. **Endocrinology**, v. 149, n. 8, p. 3920-5, Aug 2008. ISSN 0013-7227 (Print)

0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18450970> >.

WANG, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. **Genes Dev**, v. 15, n. 22, p. 2922-33, Nov 15 2001. ISSN 0890-9369 (Print)

0890-9369 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11711427> >.

WARBURG, O. On respiratory impairment in cancer cells. **Science**, v. 124, n. 3215, p. 269-70, Aug 10 1956. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13351639> >.

WARREN, C. A. et al. Quercetin may suppress rat aberrant crypt foci formation by suppressing inflammatory mediators that influence proliferation and apoptosis. **J Nutr**, v. 139, n. 1, p. 101-5, Jan 2009. ISSN 0022-3166.

WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of cancer. **Cancer Res**, v. 45, n. 1, p. 1-8, Jan 1985. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472.

WEINBERG, R. A. **The Biology of Cancer**. 2. Nova York e Londres: Garland Scienc, 2014.

WEITZMAN, S. A.; GORDON, L. I. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. **Blood**, v. 76, n. 4, p. 655-63, Aug 15 1990. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2200535> >.

WILLIAMS, D. et al. Flax seed oil and flax seed meal reduce the formation of aberrant crypt foci (ACF) in azoxymethane-induced colon cancer in Fisher 344 male rats. **Food Chem Toxicol**, v. 45, n. 1, p. 153-9, Jan 2007. ISSN 0278-6915 (Print)

0278-6915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17045379> >.

WILLIS, S. N. et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 856-9, Feb 09 2007. ISSN 0036-8075.

WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochem J**, v. 313 (Pt 1), p. 17-29, Jan 01 1996. ISSN 0264-6021 (Print)

0264-6021 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8546679> >.

XIAO, H., HAO, X., SIMI, B., JU, J., JIANG, H., REDDY, B.S., YANG, C.S. Green tea polyphenols inhibit colorectal aberrant crypt foci (ACF) formation and prevent oncogenic changes in dysplastic ACF in azoxymethane-treated F344 rats. **Carcinogenesis** v. 29, n. 1, p. 113-9, 2008.

YI, W. et al. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 18, p. 7320-9, Sep 07 2005. ISSN 0021-8561 (Print)

0021-8561.

YONENAGA, Y. et al. Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients. **Oncology**, v. 69, n. 2, p. 159-66, 2005. ISSN 0030-2414 (Print)

0030-2414 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16127287> >.

YOULE, R. J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 1, p. 47-59, Jan 2008. ISSN 1471-0072.

YUSPA, S. H.; POIRIER, M. C. Chemical carcinogenesis: from animal models to molecular models in one decade. **Adv Cancer Res**, v. 50, p. 25-70, 1988. ISSN 0065-230X (Print)

0065-230X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3287845> >.

ZHANG, W. et al. Vitamin intake and liver cancer risk: a report from two cohort studies in China. **J Natl Cancer Inst**, v. 104, n. 15, p. 1173-81, Aug 08 2012. ISSN 1460-2105 (Electronic)

0027-8874 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22811438> >.

ZHOU, Y. et al. Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 4098-104, May 15 2003. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12531810> >.



Universidade de Brasília
 Instituto de Ciências Biológicas
 Comitê de Ética no Uso Animal

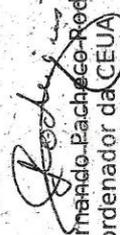
Brasília, 11 de abril de 2014.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "AÇÃO QUIMIOPREVENTIVA DO TUCUM (BACTRIS SETOSA) NO DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER DE CÔLON", UnBDOC n.º 160500/2013, sob responsabilidade da Professora Egle Machado de Almeida Siqueira foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.




 Prof. Dr. Fernando Pacheco-Rodrigues
 Coordenador da CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.