

ROBERTA ALVES HIGA

**ESTUDO DA AÇÃO ANTINEOPLÁSICA DO IPÊ
ROXO NA
CARCINOGENESE INDUZIDA PELO
AZOXIMETANO EM CAMUNDONGOS**

CAMPO GRANDE – MS

2007

ROBERTA ALVES HIGA

**ESTUDO DA AÇÃO ANTINEOPLÁSICA DO IPÊ
ROXO NA
CARCINOGENESE INDUZIDA PELO
AZOXIMETANO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Multiinstitucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Rede Centro-Oeste, Convênio Universidade de Brasília, Universidade Federal de Goiás e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos

Coordenador: Prof. Dr. Carlos Alberto Bezerra de Tomaz

CAMPO GRANDE – MS

2007

Higa, Roberta Alves

**ESTUDO DA AÇÃO ANTINEOPLÁSICA DO IPÊ ROXO NA
CARCINOGENESE INDUZIDA PELO AZOXIMETANO EM CAMUNDONGOS. –
CAMPO GRANDE, 2007.**

Xiii, 37p

Dissertação (Mestrado) – Programa Multiinstitucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Rede Centro-Oeste, Convênio Universidade de Brasília, Universidade Federal de Goiás e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

STUDY OF ACTION ANTINEOPLASTIC OF PURPLE IPÊ IN
CARCINOGENESIS INDUCED FOR THE AZOXIMETHANE IN MICE.

1. Carcinogênese, 2. Câncer colorretal, 3. Azoximetano, 4. Ipê roxo, 5. β -lapachona

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr Ricardo Dutra Aydos

Prof. Dr Mário Augusto da Silva Freitas

Prof. Dr Ernesto Antônio Figueiró-Filho

Aos meus pais e irmãos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Brasília, Universidade Federal de Goiás e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo convênio Centro Oeste.

Ao meu orientador Prof. Doutor Ricardo Dutra Aydos pelos conhecimentos adquiridos e pela paciência.

Ao Prof. Doutor Vitor Francisco Ferreira por ter cedido o extrato de Ipê Roxo para a realização deste trabalho, além de informações e conhecimentos de grande importância adquiridos.

À Prof. Doutora Rosiney Lousada Brum pelo apoio e preparação do princípio ativo utilizado no trabalho.

À Mestre Luciana Odashiro Miji pelo conhecimento e apoio na avaliação histológica do trabalho.

Ao Prof. Gilberto Gonçalves Facco pela colaboração na avaliação histológica.

Ao Mestre Guido Marks por ceder o carcinógeno utilizado no trabalho.

À Roseane Silveira Leite pelo companheirismo e determinação no desenvolvimento do trabalho no biotério.

À minha família e amigos pela compreensão nas ausências e pelo apoio para a realização deste trabalho.

TSUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE DIAGRAMAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. CARCINOGENESE E AZOXIMETANO.....	3
2.2. CARCINOGENESE COLÔNICA E FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES.....	5
2.3. IPÊ ROXO E BETA-LAPACHONA.....	6
3. OBJETIVO.....	10
3.1. OBJETIVO GERAL.....	10
3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	10
4. MÉTODOS.....	11
5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	12
6. PROTOCOLOS.....	14
7. RESULTADOS.....	18
8. DISCUSSÃO.....	25
9. CONCLUSÕES.....	29
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
ANEXO.....	37

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Posicionamento do animal após eutanásia e preparo para retirada da peça para estudo.....15
- Figura 2:** Incisão mediana realizada para exploração e localização do cólon.....16
- Figura 3:** Retirada do cólon sem o reto e ainda com apêndice.....16
- Figura 4:** Cólon já preparado para fixação em papel cartão.....17
- Figura 5:** Fotomicrografia mostrando lesão classificada como foco de cripta aberrante hiperplásico em animal do grupo I (10X).....19
- Figura 6:** Fotomicrografia mostrando lesão classificada como foco de cripta aberrante displásico (na seta) de animal do grupo I (5X).....19
- Figura 7:** Fotomicrografia mostrando lesão classificada como foco de cripta aberrante hiperplásico de animal do grupo II (5X).....20
- Figura 8:** Fotomicrografia mostrando características normais do cólon de animal do grupo III (10X).....20
- Figura 9:** Fotomicrografia mostrando lesão classificada como foco de cripta aberrante displásico de animal do grupo IV (5X).....21
- Figura 10:** Fotomicrografia mostrando a mesma lesão da figura anterior, classificada como foco de cripta aberrante displásico, de animal do grupo IV, em aumento 10X.....21

- Figura 11:** Fotomicrografia mostrando lesão classificada como foco de cripta aberrante hiperplásico de animal do grupo IV (10X).....22
- Figura 12:** Fotomicrografia mostrando lesão classificada como foco de cripta aberrante hiperplásico de animal do grupo V (5X).....22
- Figura 13:** Fotomicrografia mostrando características normais do cólon do único animal do grupo V que não apresentou alterações (5X).....23
- Figura 14:** Fotomicrografia mostrando agregados linfocitários (na seta) em mucosa de cólon de um animal do grupo I (10X).....23
- Figura 15:** Fotomicrografia mostrando agregado linfocitário (na seta) em mucosa de cólon de um animal do grupo IV (5X).....24

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Protocolo de administração de substâncias a cada semana conforme cada grupo de animais. Campo Grande, 2007.....12
- Tabela 2.** Animais dos grupos I, II, III, IV e V conforme a presença ou não de alterações histológicas caracterizadas em lâminas coradas com HE. Campo Grande, 2007.....18

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Protocolo de divisão de grupos conforme substância utilizada. Campo Grande, 2007.....	13
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AOM: azoximetano

β -lapachona: beta-lapachona

DNA: ácido desoxirribonucleico

HE: Hematoxilina Eosina

Kg: kilograma

Mg: miligramma

NO: óxido nítrico

FCA: foco de criptas aberrantes

RESUMO

O Ipê Roxo (*Tabebuia avellanedae*), uma árvore da família Bignoniácea encontrada no Brasil, é conhecida pela medicina popular como agente antitumoral contra várias neoplasias, entre elas o câncer colorretal. O objetivo do presente trabalho é estudar a ação antitumoral da β -lapachona, que é um constituinte extraído do ipê roxo, na carcinogênese colônica induzida experimentalmente pelo azoximetano em camundongos. Foram utilizados 50 camundongos divididos em 5 grupos: grupo I administrado AOM; grupo II - β -lapachona; grupo III - veículo (diluente); grupo IV - veículo + AOM; e grupo V - β -lapachona + AOM. Observou-se presença de focos de criptas aberrantes em todos os animais dos grupos I e IV, 50% no grupo II e 90% no grupo V. Concluiu-se que o azoximetano induz lesões do tipo focos de criptas aberrantes hiperplásicas e displásicas em cólon de camundongos e que a β -lapachona extraída do ipê roxo não apresentou efeito protetor das lesões induzidas pelo azoximetano em cólon de camundongos.

Palavras-chaves: carcinogênese, câncer colorretal, azoximetano, ipê roxo, β -lapachona.

ABSTRACT

The Purple Ipe (*Tabebuia avellanedae*), a tree of the Bignoniaceae family found in Brazil, is known by the popular medicine as antitumoral agent against some neoplasias, between them the colorectal cancer. The objective of the present work is experimentally to study the antitumoral action of β -lapachone, that is an extracted constituent of purple ipe, in colonic carcinogenesis azoximethane-induced in mice. 50 mice divided in 5 groups had been used: group I: AOM; group II: β -lapachone; group III: vehicle (diluyente); group IV: vehicle + AOM; e group V: β -lapachone + AOM. Presence of aberrant crypt foci was observed in all the animals of groups I and IV, 50% in group II and 90% in group V. It concluded that the azoximetano induces injuries of the type aberrant crypt foci hyperplastic and dysplastic in colon of mice and that β -lapachone extracted of purple ipe did not present protective effect of the induced injuries for the azoximetano in colon of mice.

Keywords: carcinogenesis, colorectal cancer, azoximethane, purple ipe, β -lapachone.

1. INTRODUÇÃO

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde cerca de seis milhões de pessoas morrem anualmente por câncer em todo o mundo. Dado o impacto para a população, é muito natural que sejam enormes os esforços para encontrar formas mais eficazes de enfrentar a doença. As frentes mais importantes nesta batalha são o aprimoramento do diagnóstico (a detecção precoce permite maior chance de controle da doença), novas modalidades de tratamento (procedimentos menos agressivos e dirigidos essencialmente às células malignas) e medidas preventivas aplicáveis à população (para cuja adoção é essencial conhecer as causas e os mecanismos de aparecimento do câncer)¹.

Neoplasia pode ser entendida como proliferação celular anormal, descontrolada e autônoma (fora do controle dos mecanismos que regulam a multiplicação celular), na qual as células reduzem ou perdem a capacidade de se diferenciar, em consequência de alterações nos genes que regulam o crescimento e a diferenciação celulares.

A incidência e mortalidade por câncer de cólon apresenta no mundo todo uma tendência ao crescimento, em especial em países desenvolvidos e áreas urbanas de países menos desenvolvidos. No Brasil, com o aumento da expectativa de vida da população, as neoplasias de cólon vêm ganhando cada vez mais importância no perfil de morbidade e mortalidade ⁵, encontrando-se entre os dez primeiros tipos de câncer no Brasil, sendo a quinta causa de morte por câncer no país ⁶. Assim, é de se esperar o enorme interesse pelo estudo desta doença, com trabalhos que envolvem desde fatores ambientais, bem como dieta e hábitos de vida, até lesões consideradas pré-malignas, como os focos de criptas aberrantes ⁷.

Neste sentido, vários tratamentos experimentais vêm sendo testados, dentre eles, o estudo de plantas típicas de várias regiões. No Brasil, o cerrado é o segundo grande domínio ecológico com cerca de 220 espécies de plantas estudadas e usadas na medicina tradicional ²³.

O Ipê Roxo, uma árvore típica do cerrado brasileiro, já é há anos utilizado na medicina popular como tratamento para várias doenças ²². Nas décadas de 60 e 70, houve grande investimento em estudos das substâncias extraídas desta planta, principalmente o lapachol e a β -lapachona, que chegou a ser comercializado para uso em quimioterapia coadjuvante para tratamento de leucemia ^{22, 47}.

Este trabalho vem estudar a ação do ipê roxo em modelo animal de carcinogênese de cólon induzida por azoximetano.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CARCINOGENESE E AZOXIMETANO

A carcinogênese é um processo complexo, multifásico e dependente de fenômenos genéticos que culminam com o surgimento de clones de células que adquirem a capacidade de invadir os tecidos vizinhos e de dar metástases em órgãos distantes ².

O desenvolvimento neoplásico é um processo dinâmico caracterizado por etapas denominadas iniciação, promoção, progressão e manifestação ^{2, 3}. A iniciação constitui o primeiro passo e corresponde à interação do agente químico com o DNA da célula-alvo. É um processo irreversível porque leva a uma alteração permanente da estrutura do DNA. A eficiência da iniciação depende da replicação do DNA e divisão celular subsequentes à interação com o agente químico, “fixando” a alteração do genoma. Portanto, a célula iniciada apresenta genoma alterado, mas que não é expresso, tendo assim um fenótipo normal.

É a etapa seguinte, de promoção, que vai proporcionar a expressão da alteração do genoma. Em geral, os agentes promotores não reagem diretamente com o material genético da célula, mas afetam sua expressão por diferentes mecanismos, por exemplo, interagindo com receptores de membrana celular, com proteínas nucleares indutoras de mitose, ou com proteínas de membranas reguladoras de canais de íons. Desta forma, os agentes promotores estimulam a proliferação celular e modulam sua diferenciação, resultando em expansão clonal das células iniciadas e na expressão fenotípica da alteração do genoma. Experimentalmente, a etapa de promoção é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões tumorais benignas ou focos de células fenotipicamente alteradas ², por exemplo, os

focos de criptas aberrantes (FCA) estudados em carcinogênese induzida em cólon de ratos.

A etapa da progressão compreende a fase de evolução da neoplasia maligna que já está expressa fenotipicamente a nível histológico sendo caracterizada pela instabilidade cariotípica das células neoplásicas.

Substâncias químicas seguras ou presumivelmente cancerígenas encontram-se amplamente distribuídas na natureza e compreendem desde alimentos naturais até compostos altamente modificados pelo homem. Muitos carcinógenos químicos têm interesse apenas na carcinogênese experimental, outros são causa importante de cânceres humanos ¹.

Os carcinógenos químicos são divididos em duas grandes categorias: 1) carcinógenos diretos e 2) indiretos. Os primeiros são agentes alquilantes ou acilantes que já possuem atividade eletrofílica intrínseca; por isso mesmo podem provocar câncer diretamente. A maioria das substâncias cancerígenas, contudo, precisam primeiro sofrer modificações químicas no organismo antes de se tornarem eletrofílicas e ativas (as indiretas).

Os principais carcinógenos químicos conhecidos podem ser agrupados nas categorias: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (os alcatrões); aminas aromáticas; azocompostos; alquilantes; nitrosaminas; aflatoxinas; asbesto; cloreto de vinil; e carcinógenos inorgânicos (arsênio, cromo, níquel, ferro).

Os azocompostos são derivados do azobenzeno, que em si não é cancerígeno. Todos os azocompostos são carcinógenos indiretos. Muitos deles têm importância na carcinogênese experimental. Para a espécie humana, têm interesse porque muitos corantes usados na industrialização de produtos alimentares pertencem a essa categoria. Um exemplo conhecido é o do amarelo-manteiga, que era usado para dar à margarina a

mesma cor da manteiga. O azoximetano (AOM) é um azocomposto utilizado para induzir neoplasia de cólon em ratos similar ao tumor de cólon em humanos ².

O azoximetano é metabolizado no fígado e possivelmente em outros tecidos, e é logo N-hidroxilado a metilazoximetanol, substância quimicamente instável em temperatura corporal. Durante o decorrer deste processo forma-se um agente alquilante, o metildiazônio, o qual gera um íon carbônico capaz de metilar DNA, RNA e proteínas ⁴.

2.2. CARCINOGENESE COLÔNICA E FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES

Até o presente momento não se compreende completamente o processo básico do desenvolvimento do carcinoma do intestino grosso. No entanto, grandes progressos têm sido obtidos recentemente para uma maior compreensão, particularmente com o advento das técnicas da biologia molecular ^{7, 8}. Embora existam síndromes genéticas bem definidas, os fatores ambientais ainda parecem ser os mais importantes. Uma vez que vários estudos têm demonstrado de maneira consistente que certos constituintes dietéticos correlacionam-se bem com as variações geográficas da doença, uma ênfase considerável tem sido dada aos fatores que podem ser responsáveis por essas diferenças ^{7, 9,10, 11,12}.

A grande maioria dos autores concorda que o câncer é o resultado do acúmulo de alterações adquiridas e herdadas na seqüência de DNA de oncogenes e genes supressores tumorais. A ativação dos oncogenes, geralmente, resulta em proliferação celular descontrolada, devido à exacerbação da função dos seus produtos na célula ¹³. Assim, no carcinoma de cólon haveria multiplicidade de etapas de transformação, que poderiam

ser esquematizadas em: formação de áreas displásicas no epitélio colônico; formação de pólipos adenomatosos; progressão que adquire as características de adenocarcinoma; escape da vigilância imunológica, que permitiria ao tumor progredir e invadir, até metastaticamente outros tecidos orgânicos ¹.

A maioria dos carcinógenos experimentais, como o azoximetano (AOM), utilizados para a indução de carcinoma colorretal em animais de laboratório, primeiramente produzem microadenomas que evoluem para adenoma e subseqüentemente como um adenocarcinoma invasivo ⁷.

A injeção múltipla e repetida de carcinógeno em ratos resulta em aumento na incidência de tumor colorretal ¹⁴. O azoximetano (AOM) é reconhecido como carcinógeno indutor de foco de cripta aberrante (FCA) em tumor colorretal ¹⁵ e é usado amplamente como modelo de carcinogênese experimental ^{16, 17, 18}.

Os FCA foram primeiramente descritos por Bird em 1987 ¹⁷ definidos como criptas que apresentam: a) alteração da abertura do lúmen; b) epitélio espessado; e c) maior que criptas normais adjacentes ¹⁴. Durante a última década, numerosos estudos que incluem análise molecular enfocaram o significado do FCA em eventos precoces na carcinogênese de cólon, e é considerado como lesão pré-maligna e com potencial para câncer de cólon ^{14, 19, 20, 21}.

2.3. IPÊ ROXO E BETA-LAPACHONA

O Ipê Roxo (*Tabebuia avellanedae*), também chamado de Pau'Darco, *taheboo* e lapacho, uma árvore da família Bignoniácea, encontrada no Brasil, é conhecida pela medicina popular como agente

antitumoral, principalmente contra neoplasias de mama, próstata, ovários, cólon e leucemias²².

O lapachol é uma importante naftoquinona obtida da casca do Ipê Roxo, e seu derivado, a quinona β -lapachona, existe principalmente neste tipo de ipê. Várias atividades farmacológicas foram atribuídas ao lapachol e seus derivados semi-sintéticos, como ação antimicrobiana, antifúngica, cercaricida, moluscicida, leishmanicida, tripanossomicida, antimalárica, anti-inflamatória, antineoplásica, anti-ulcerante, anticonceptiva e contra enterovirose^{22, 23, 24, 25}.

Não mais do que um século foi necessário para que estudiosos ficassem fascinados pela variedade de propriedades do lapachol e de seus derivados. É muito significativa a sua propriedade de indução de apoptose, por agirem sobre as enzimas topoisomerasas I e II. Até o momento, a bioquímica da indução não está de todo esclarecida, entretanto, com as informações disponíveis na literatura pode-se apontar para uma ação de indução de apoptose através da inibição do complexo topoisomerase-DNA. Uma série de processos de importância crucial para as células, como a indução da apoptose e os danos provocados pelo estresse oxidativo estão entre os principais efeitos que as quinonas provocam em sistemas biológicos²².

As topoisomerasas I e II são enzimas nucleares críticas para o funcionamento normal de qualquer célula. São elas que mantêm a integridade do DNA, reparando-o quando danificado. Qualquer alteração no balanço entre estas enzimas é suficiente para induzir apoptose – que é a morte celular programada²².

Em sua ação natural, estas topoisomerasas assentam-se na estrutura do DNA por uma supertorção (dobras) topológica, quando fazem cortes, permitindo que as funções de transcrição, reparação, replicação e

estruturação do cromossomo ocorram normalmente. Após esta abertura, as células dividem-se seguindo uma série de etapas bem definidas (G1, G2 e M). Na primeira, chamada de G1, a célula copia o DNA para os seus cromossomos num estágio conhecido como síntese (ou S). A célula divide-se, e um segundo conjunto idêntico de cromossomos vai para a célula-filha (metáfase M), sendo este estágio chamado de mitose. Durante cada estágio da divisão, a célula possui um compasso de espera, ponto de checagem, quando então faz uma auto-avaliação do novo conjunto de cromossomos, conferindo se é realmente idêntico ao antigo. Se por acaso a avaliação não for favorável, o processo de divisão é colocado em modo inercial à espera do reparo. Se o dano no cromossomo for muito grande, sem possibilidades de reparo a contento, a célula, na tentativa de se preservar, interrompe o seu ciclo vital cometendo suicídio. Acredita-se que esta seja uma estratégia de proteção dos organismos, que assim evitam passar o dano para uma nova geração de células²².

Nas células cancerosas não existem os pontos de checagem G1, G2 e M e isto evita sua apoptose mesmo tendo ocorrido um acúmulo de danos genéticos. Uma estratégia de combate às células cancerosas seria o uso de substâncias que induzissem a formação de pontos artificiais de checagem no processo da divisão celular. Se assim ocorrer, haverá a indução da morte das células malignas. Nestas condições, qualquer agente (ou inibidor) que afete nas neoplasias o complexo topoisomerase-DNA poderia induzir este processo letal. Como as células cancerígenas crescem e se multiplicam com rapidez, estarão mais sensíveis aos inibidores da topoisomerase I que as células normais. Portanto, estas enzimas são alvos especiais na nova quimioterapia antitumoral²².

Entretanto, a ação inibitória sobre sistemas reparadores parece não ser o único modo de atuação da β -lapachona, uma vez que fungos, que não expressam as topoisomerases, também são inibidos por esta quinona²². Ao que parece, a β -lapachona é um xenobiótico de atuação crítica sobre mais

de um alvo intracelular, que não só a topoisomerase I. Uma outra hipótese alternativa seria o ataque pela β -lapachona a pontos específicos do ciclo catalítico que expressa a ação da topoisomerase I como, por exemplo, a pontos de checagem G1 e S, por ação outra que não a de uma simples intercalação. Recentemente, foi relatado que a β -lapachona induz a apoptose de células malignas epiteliais, de glioma humano, e de pigmentos retiniais humanos²².

Outras atividades importantes também estão relatadas na literatura para a β -lapachona. Recentemente, vários pesquisadores relataram que a β -lapachona também atua fortemente na indução da apoptose por interferência no complexo topoisomerase II-DNA. Em concentrações menores que 8 μ M, esta substância induziu a morte celular com características de apoptose de células malignas da próstata, o que sugere que esta seja uma substância promissora para a quimioterapia desta doença. Em um estudo sobre a indução da topoisomerase II, com tipos de células sensíveis e resistentes a quimoterápicos, observou-se que esta substância é também citotóxica frente a diferentes células tumorais apresentando, inclusive, atividade sobre células resistentes à camptotecina. Este estudo revelou que o envenenamento da topoisomerase II pela β -lapachona é independente do ATP e envolve a formação de complexos que podem ser clivados reversivelmente²².

Existem poucos trabalhos científicos que utilizaram o lapachol e seus derivados como agentes antineoplásicos, principalmente no estudo do câncer de cólon²⁸.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a ação antitumoral do ipê roxo na carcinogênese colônica induzida experimentalmente pelo azoximetano em camundongos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudo da β -lapachona (constituente do ipê roxo) na inibição da carcinogênese colônica induzida em camundongos.

4. MÉTODOS

Amostra

Foram utilizados 50 camundongos, machos, com 8 semanas de idade, peso médio de 20 gramas, originários do Biotério Central da UFMS.

Ambiente

- Local da experimentação: Laboratório de Carcinogênese do Departamento de Clínica Cirúrgica da UFMS;
- Condições de alojamento: caixas de polipropileno com tampa de galvanizado, tamanho padrão para 6 animais;
- Período de adaptação de 7 dias.

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os 50 animais foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos, conforme protocolo:

Grupo I: 10 (n) animais submetidos à administração de 2 doses de azoximetano, sendo uma na primeira semana e outra na segunda;

Grupo II: 10 (n) animais submetidos à administração de β -lapachona em doses diárias durante 6 semanas;

Grupo III: 10 (n) animais submetidos à administração de veículo (diluyente) da β -lapachona em doses diárias durante 6 semanas;

Grupo IV: 10 (n) animais submetidos à administração de veículo (diluyente) da β -lapachona em doses diárias durante 6 semanas, e de 2 doses de azoximetano, sendo uma na primeira semana e outra na segunda;

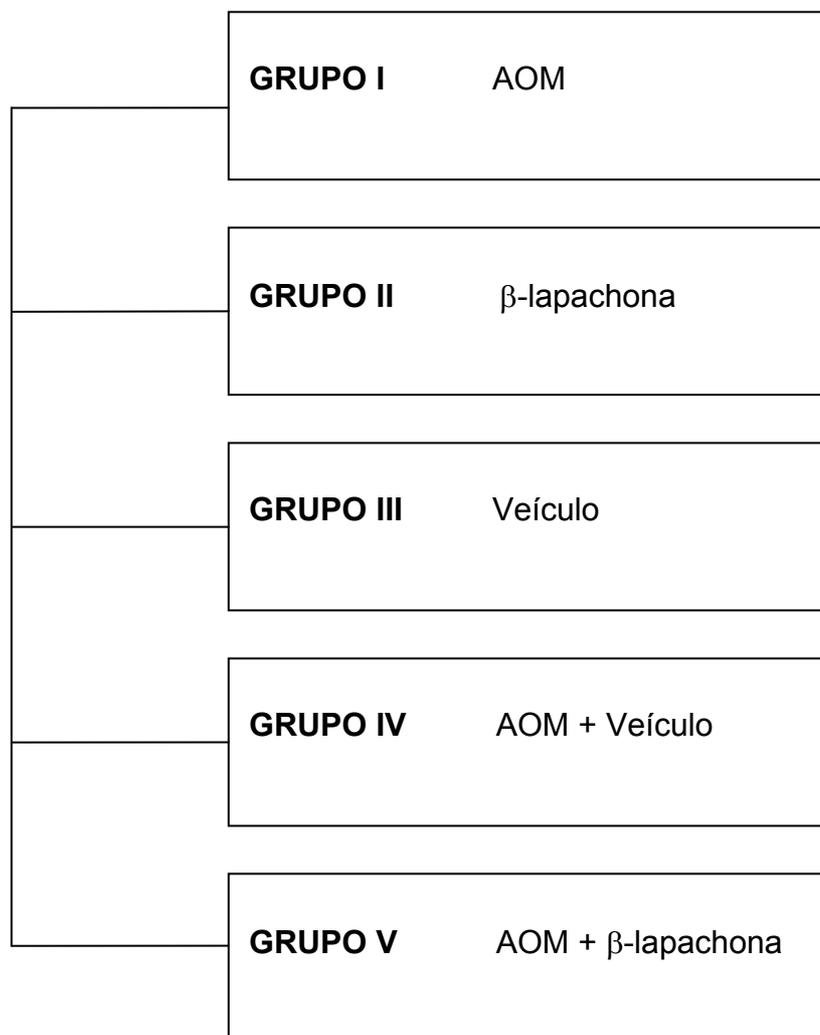
Grupo V: 10 (n) animais submetidos à administração de β -lapachona em doses diárias durante 6 semanas e de 2 doses de azoximetano, sendo uma na primeira semana e outra na segunda.

Tabela 1. Protocolo de administração de substâncias a cada semana conforme cada grupo de animais. Campo Grande, 2007.

Semana	1	2	3	4	5	6
Grupo I	*	*				
Grupo II						
Grupo III						
Grupo IV	*	*				
Grupo V	*	*				

* Dose de azoximetano Uso de β -lapachona Uso do veículo

Diagrama 1. Protocolo de divisão de grupos conforme substância utilizada.
Campo Grande, 2007.



6. PROTOCOLOS

PREPARO E DILUIÇÃO DA BETA-LAPACHONA

Preparada no laboratório de química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) pela Dr^a Rosiney Lousada Brum e diluída com solução (veículo) de etanol a 20%. Realizada administração da substância diariamente por via oral através de gavagem na dose de 25mg/Kg ou de seu veículo, também diariamente.

INDUÇÃO DO CÂNCER

Azoximetano em dose de 15mg/Kg peso/dose diluído em soro fisiológico 0,9%, via subcutânea, em duas doses durante experimento – 1^a e 2^a semanas.

AMBIENTAL

Temperatura: 23-24^oC

Luminosidade: luz artificial, ciclo claro/escuro 12/12hs (=130 a 325 lux)

Ruído: menor 30 decibéis

Limpeza da gaiola a cada 3 dias. Desinfecção com solução de hipoclorito 2%.

Colocação de maravalha esterilizada em autoclave.

CONTROLE SANITÁRIO

Peso no início e no fim do experimento.

Avaliação física diária.

Óbitos e causa.

Exclusão animal por causa - não óbito.

EUTANÁSIA

Os camundongos foram identificados, pesados e realizou-se a eutanásia com administração de tiopental na dose de 150mg/kg, via intraperitoneal. Método aceito pelo Report of the AVMA Panel on Euthanasia. Verificação do óbito.

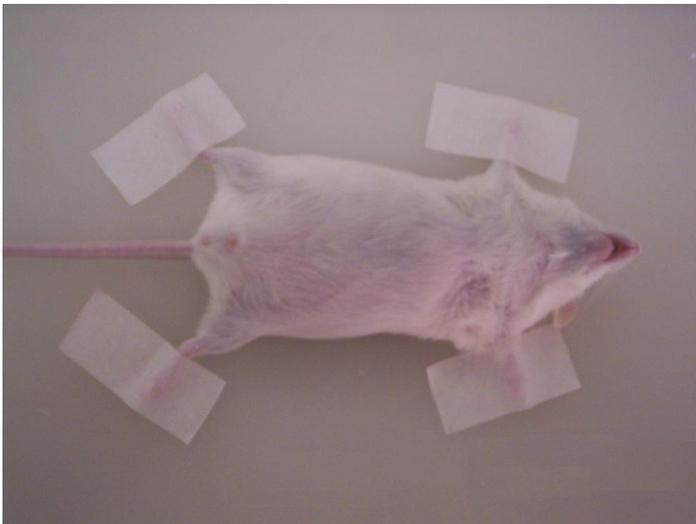


Figura 1: Posicionamento do animal após eutanásia e preparo para retirada da peça para estudo.

RETIRADA DA PEÇA PARA ESTUDO

O camundongo era posicionado em decúbito dorsal, procedendo-se incisão longitudinal mediana da pele, estendendo-se do processo xifóide até o púbis; diérese dos planos da parede abdominal; identificação da região ileo-cecal e reparo com pinça; colectomia total após secção de toda extensão do mesocólon, excluindo-se o reto e o apêndice, que não foram utilizados no experimento; retirada da peça operatória.



Figura 2: Incisão mediana realizada para exploração e localização do cólon.



Figura 3: Retirada do cólon sem o reto e ainda com apêndice.

PREPARO DA PEÇA OPERATÓRIA PARA ESTUDOS

Abertura do cólon na borda anti-mesentérica; lavagem da mucosa com solução de ringer; fixação do cólon em papel cartão e colocado em formol tamponado a 10%, permanecendo durante 24 horas; a seguir, inclusão em parafina; diérese com micrótomo de borda proximal, a nível de 3 cm utilizando-se toda extensão em largura do reto em corte longitudinal; e colocação em lâmina de vidro para processamento histopatológico com coloração de hematoxilina e eosina (HE).



Figura 4: Cólon já preparado para fixação em papel cartão.

HISTOPATOLOGIA

Realizou-se análise histológica e estudo morfológico, classificando-se em:

Foco de cripta aberrante hiperplásico: apresenta moderada hiperplasia, com discreto alargamento da luz e forma anormal;

Foco de cripta aberrante displásico: além do alargamento da luz, há bastante tortuosidade da cripta que é marcadamente hiperplásica e com pseudoestratificação;

Microadenoma: severamente hiperplásico, presença de diferenciação celular, hiperplasia e perda da polaridade celular²⁹.

7. RESULTADOS

Após as análises histopatológicas realizadas conforme NAMBIAR E COLS (2004), onde os critérios usados para classificação histológica foram: foco de cripta aberrante hiperplásico, foco de criptas aberrantes displásicos e microadenomas, observou-se o resultado apresentado na tabela 2. Considerou-se como positivo a presença de foco de criptas aberrantes hiperplásicos ou displásicos. Não houve presença de microadenomas.

Tabela 2. Animais dos grupos I, II, III, IV e V conforme a presença ou não de alterações histológicas caracterizadas em lâminas coradas com HE. Campo Grande, 2007.

Alteração histológica	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
Animal 1	+	+	-	+	+
Animal 2	+	+	-	+	+
Animal 3	+	+	-	+	+
Animal 4	+	-	-	+	+
Animal 5	+	-	-	+	+
Animal 6	+	-	-	+	+
Animal 7	+	-	-	+	+
Animal 8	+	-	-	+	+
Animal 9	+	+	-	+	+
Animal 10	+	+	-	+	-
Total (%)	100	50	0	100	90

(+) presente; (-) ausente.

A tabela 2 mostra a presença de alterações histológicas em todos os animais dos grupos I e IV, em metade do grupo II e em 90% do grupo V.

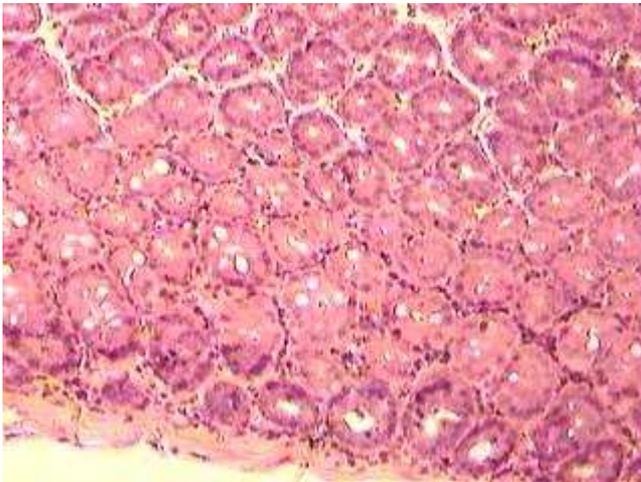


Figura 5: Fotomicrografia mostrando lesão classificada como foco de cripta aberrante hiperplásico em animal do grupo I (10X).



Figura 6: Fotomicrografia mostrando lesão classificada como foco de cripta aberrante displásico (na seta) de animal do grupo I (5X).



Figura 7: Fotomicrografia mostrando lesão classificada como foco de cripta aberrante hiperplásico de animal do grupo II (5X).

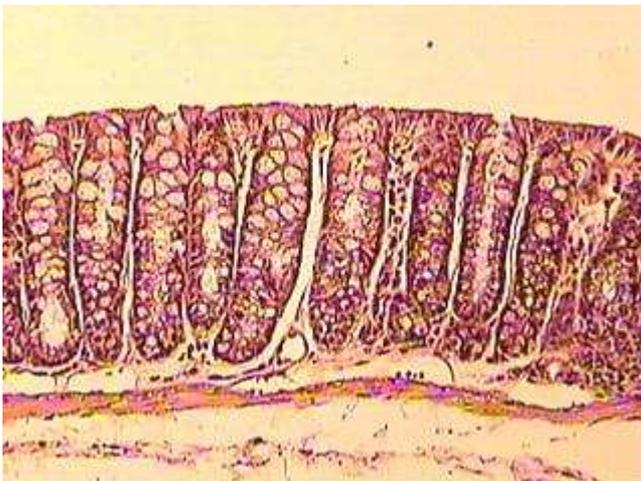


Figura 8: Fotomicrografia mostrando características normais do cólon de animal do grupo III (10X).

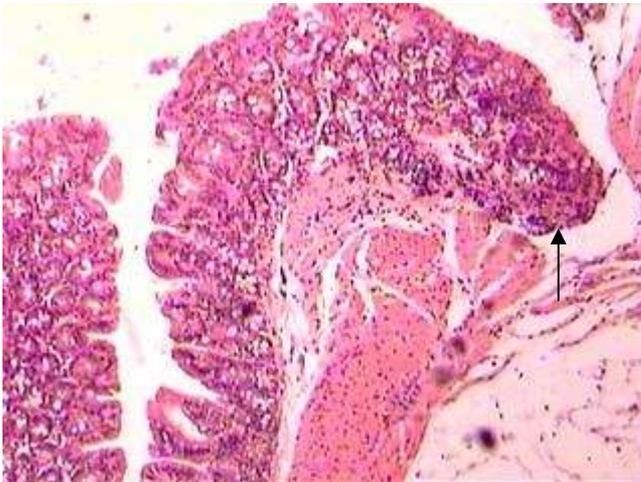


Figura 9: Fotomicrografia mostrando lesão classificada como foco de cripta aberrante displásico de animal do grupo IV (5X).

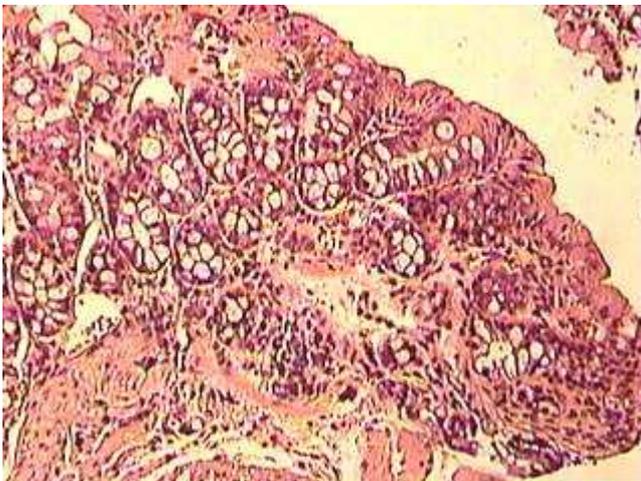


Figura 10: Fotomicrografia mostrando a mesma lesão da figura anterior, classificada como foco de cripta aberrante displásico, de animal do grupo IV, em aumento 10X.

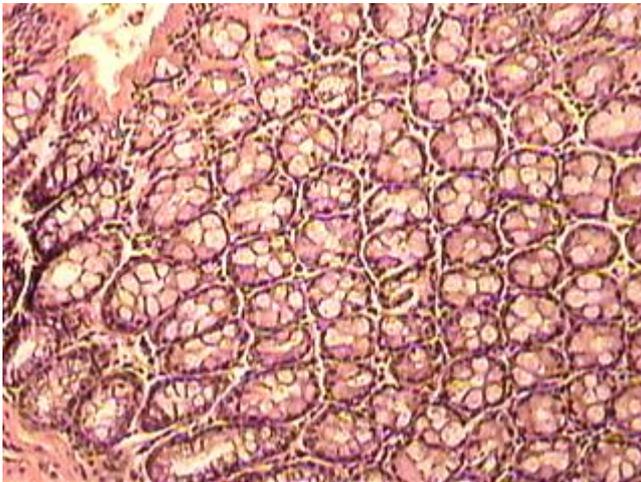


Figura 11: Fotomicrografia mostrando lesão classificada como foco de cripta aberrante hiperplásico de animal do grupo IV (10X).

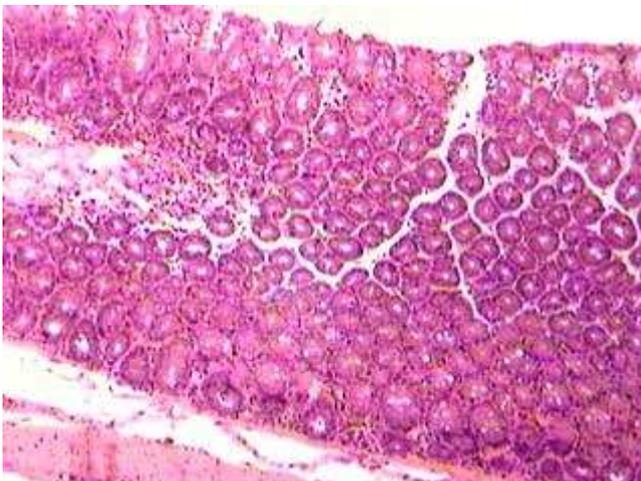


Figura 12: Fotomicrografia mostrando lesão classificada como foco de cripta aberrante hiperplásico de animal do grupo V (5X).



Figura 13: Fotomicrografia mostrando características normais do cólon do único animal do grupo V que não apresentou alterações (5X).

Também observou-se a presença de agregados linfocitários nas mucosas de cólon principalmente nos grupos I, IV e V, visto nas figuras 14 e 15.

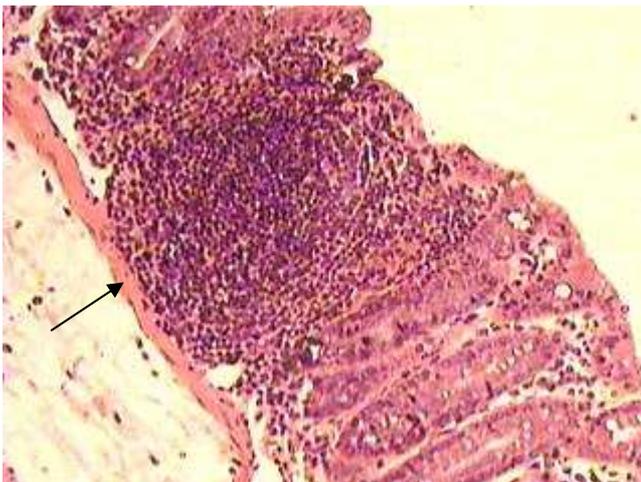


Figura 14: Fotomicrografia mostrando agregados linfocitários (na seta) em mucosa de cólon de um animal do grupo I (10X).

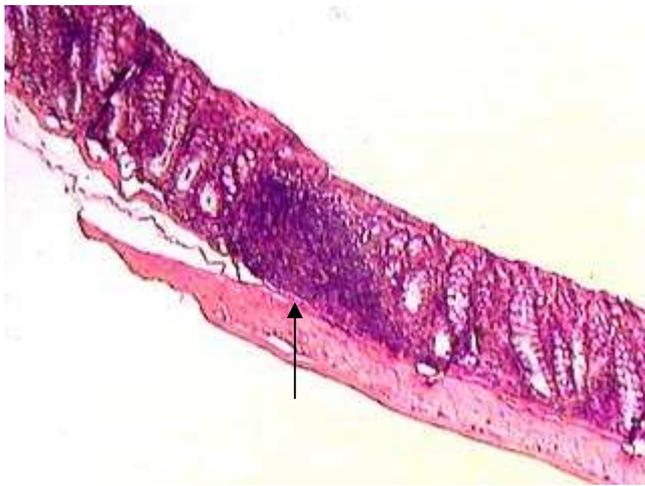


Figura 15: Fotomicrografia mostrando agregado linfocitário (na seta) em mucosa de cólon de um animal do grupo IV (5X).

8. DISCUSSÃO

A utilização de animais do mesmo sexo possibilitou a comparação dos resultados além de permitir sua uniformidade ¹⁸, pois há evidência que os estrogênios têm relação com a carcinogênese induzida experimentalmente. Um estudo sobre os efeitos secundários da indução de câncer de cólon pelo azoximetano em ratos, mostrou que em fêmeas houve aparecimento de tumor renal, o que não ocorreu em machos ³⁰. Sabe-se também que os camundongos machos toleram o uso oral do lapachol diferentemente das fêmeas ²⁷.

A idade de 8 semanas de vida foi escolhida pois sabe-se que camundongos jovens são muito mais susceptíveis ao azoximetano do que camundongos adultos ^{3, 31}.

Sabe-se que o azoximetano tem a propriedade de induzir neoplasia em camundongos ^{24, 32, 33}. Vários estudos têm demonstrado que ratos e camundongos são bons animais para a indução de tumores intestinais por AOM, já que essa doença raramente se desenvolve espontaneamente nos mesmos, além de que os tumores desenvolvidos são bastante semelhantes aos dos humanos ^{26, 32}.

A dose de azoximetano utilizada foi de 15 mg/Kg de peso em duas doses semanais, que é a dosagem habitualmente utilizada ^{26, 27, 30}, porém existe uma variância de 3,75 a 20 mg/Kg, podendo ser usada em dose única a até mesmo em 6 aplicações em doses semanais ^{29, 31, 36, 37, 38}, geralmente em trabalhos onde há acompanhamento por tempo superior a 20 semanas.

Encontrou-se presença de agregados linfocitários em praticamente todos os animais, em todos os grupos. Na literatura encontram-se comentários sobre o achado, mas não há um consenso estabelecido. Em um estudo sobre supressão de tumores colônicos induzidos com azoximetano

em camundongos ocorreram grupos com aumento e outros com diminuição de agregados linfocitários, sendo realizada apenas análise descritiva do achado ³⁸.

Optou-se por realizar avaliação de lesões pré-malignas induzidas pelo azoximetano, assim não haveria necessidade de acompanhamento por grandes períodos, já que essas lesões já aparecem com 6 semanas após a indução do câncer. Então, devido ao tempo de evolução das lesões, não foram encontrados microadenomas em nenhum animal, pois sabe-se que estas lesões aparecem após 16 semanas da indução do tumor por azoximetano ¹⁸ e raramente com 12 semanas ³⁷. Foi demonstrado que uma dose única de AOM associada à colite induzida por dextran em camundongos produziu o aparecimento de adenocarcinoma colônico em até 4 semanas de experimento, sugerindo relação de neoplasia com processo inflamatório induzido ³⁷.

O foco de cripta aberrante tem sido usado para detecção precoce de fatores que influenciam a carcinogênese colorretal ^{3, 40}, sendo encontrado tanto em roedores tratados com carcinógenos, como de forma espontânea em seres humanos ^{4, 41, 21}. Evidências experimentais suportam a hipótese que esse tipo de lesão é pré-neoplásica ^{21, 33, 41, 42, 43, 45, 46} e consistem em criptas que apresentam lúmen alargado e de forma anormal ^{4, 43, 46} provavelmente evoluindo cronologicamente com fenômenos proliferativos, hiperplásicos, displásicos e, enfim, pequenos adenomas ^{4, 40}.

Houve necessidade da realização de dois grupos de controle do veículo da β -lapachona, pois seu diluente é alcoólico (etanol 20%) ⁴⁷, dos quais o grupo III, tratado apenas com o veículo, não apresentou alterações histopatológica, como já visto na literatura ²⁷. E o grupo IV apresentou alterações semelhantes ao grupo I, devido ao uso do promotor de tumor (AOM).

O lapachol e seu derivado β -lapachona são naftoquinonas com potencial terapêutico contra alguns tipos de câncer ⁴⁷. A β -lapachona exibe *in vitro* variados tipos de atividade contra diferentes linhagens de células, principalmente malignas dos cânceres de pulmão, mama, colorretal, próstata, melanoma e leucemia. Apesar do amplo espectro de bioatividades, os mecanismos de atuação da β -lapachona em modelos experimentais ainda não estão bem delineados. E mesmo assim, há um forte interesse voltado ao uso comercial da substância, que pode ser demonstrado pelas diversas patentes concedidas ao longo dos últimos anos envolvendo esta quinona, provavelmente como garantia de uso comercial futuro ²².

A β -lapachona foi utilizada por via oral, através de método de gavagem, diariamente na dose de 25 mg/Kg, mas não existem muitos trabalhos a respeito, sendo que a dose varia de 600mg a menos de 1 mg por dia, em uso intramuscular, endovenoso e oral, a maioria não especificando diluição e modo de aplicação ^{22, 27, 47,48}. Há também resultados demonstrando que camundongos toleram menos o uso oral de naftoquinonas que ratos ²⁷.

Em estudo *in vitro*, sabe-se que a β -lapachona possui atividade contra cerca de 60 linhagens de células tumorais humanas, dentre elas o câncer de cólon ⁴⁸. Também induz apoptose de células do câncer de mama; possui considerável atividade anticancerígena em células de mieloma múltiplo; inibição da enzima NO-sintase, o que pode abrir novos caminhos para o desenvolvimento de antiinflamatórios; em baixas concentrações pode induzir a morte celular de câncer de próstata; é citotóxica frente a diferentes células tumorais apresentando, inclusive, atividade sobre células resistentes a outros quimioterápicos ²².

Mas também observou-se toxicidade sobre embriões de ratas, provocando efeito abortivo ⁴⁷, e que quando associado ao carcinógeno

metilcolantreno aumenta o índice de tumores em ratas, comportando-se como potente promotor oncogênico, com alta toxicidade hepática e renal ²⁷.

Nos animais do grupo II encontraram-se focos de criptas aberrantes hiperplásicos em 50% dos cortes. Não se encontrou na literatura dados que expliquem este fato, exceto um estudo que relata a importância dos trabalhos já realizados que demonstram de fato sua ação marcadamente antitumoral em doses altas de lapachol e seus derivados, mas que ainda sabe-se muito pouco sobre seus efeitos colaterais e doses utilizadas ²⁷.

Neste estudo foram encontradas apenas focos de criptas aberrantes dos tipos hiperplásicos e displásicos, sendo que o primeiro tipo foi encontrado em todos os animais que apresentavam alterações histopatológicas, e o segundo foi pouco comum em todos os grupos. A maioria dos trabalhos realiza apenas avaliação descritiva da histopatologia de lâminas coradas por método de hematoxilina e eosina, e apresentam resultados com avaliação de imunohistoquímica, genética (DNA) ou bioquímicos ^{4, 21, 22, 33, 41, 45, 46, 48}.

Apenas um animal do grupo V não apresentou alterações histopatológicas, o que demonstrou que não houve alterações significativas na redução dos focos de criptas aberrantes em camundongos que tiveram indução de tumor de cólon com azoximetano e tratados com β -lapachona. Assim, não ficou comprovado que a β -lapachona extraída do ipê roxo inibe o aparecimento de lesões em cólon de camundongos quando é administrado em modelo AOM induzido.

9. CONCLUSÕES

O azoximetano induz lesões do tipo focos de criptas aberrantes hiperplásicas e displásicas em cólon de camundongos.

A β -lapachona extraída do ipê roxo não apresentou efeito protetor das lesões induzidas pelo azoximetano em cólon de camundongos.

Para que se possam obter maiores informações a respeito da ação antitumoral do ipê roxo seriam necessários mais estudos para se estabelecer um melhor modelo experimental, com diferentes doses e concentrações da β -lapachona, diferentes agentes oncogênicos e maior tempo de experimento.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasileiro Filho, G. Bogliolo Patologia geral. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
2. Douglas CR. Patofisiologia geral: mecanismo da doença. São Paulo: Robe Editorial, 2000.
3. Demarzo MM; Garcia SB. Exhaustive physical exercise increases the number of colonic preneoplastic lesions in untrained rats treated with a chemical carcinogen. *Cancer lett*; 2004; 216(1); 31-34.
4. Montenegro MA; Negrette MS; Lertora WJ; Catuogno MS. Focos de criptas displásicas inducidas com 1,2-dimetilhidrazina em intestino grueso de ratas tratadas com molibdeno y tungsteno. *Rev Vet* 2003, 14:1.
5. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Falando sobre câncer de intestino. INCA 2003, pág.11.
6. Instituto Nacional do Câncer. Prevenção e controle do câncer: normas e recomendações do INCA. *Ver Bras Cancerol* 2002;48(3):317-32.
7. Keighley MRB; Williams NS. Cirurgia do ânus, reto e colo. 1ª ed, 1998. Editora Manole.
8. Perez RO; Habr-Gama A; Jacob CE; Souza Júnior AHS; Picolo MM; Pécora RA. A genética do câncer colorretal: princípios para o cirurgião. *Rev. bras. colo-proctol*; jan -mar 1998; 18(1):5-10.
9. Wyatt J; Dorado I; Valencia M; Navarro E. El cáncer de colón en ratas y la dieta regional en Sonora, México / Colon cancer in rats and diet in the Sonoran desert region of México. *Arch. latinoam. nutr*; mar. 1996; 46(1):33-7.

10. Newell LE. The potent colon carcinogen, 1,2- dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. *Mutat Res*; 2004; 564(1);1-7.
11. Shih CK; Chiang W; Kuo ML. Effects of adlay on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Food Chem Toxicol*; 2004; 42(8); 1339-1347.
12. Wu B; Iwakiri R; Ootani A; Tsunada S; Fujise T; Sakata H; Toda S; Fujimoto K. dietary corn oil promotes colon câncer by inhibiting mitochondria-dependent apoptosis in azoxymethane-treated rats. *Exp Biol Med*; 2004; 229(10); 1017-1025.
13. Mattar, R. Carcinogênese colorretal e gástrica. *GED gastroenterol. endosc. dig; out.-dez.* 1994;13(4):175-80.
14. Marks, G. Estudo do fator de crescimento transformador beta com administração do hexafosfato de inositol na carcinogênese, em ratos. 2004.
15. Kawamori T; Tanaka T; Hirose Y; Satoh K; Hara A; Torihara M; Tamai Y; Yamahara J; Mori H. Suppression of azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci by dietary exposure to a novel synthesized retinoidal butenolide, 5-hydroxy-4-(2-phenyl-(E)ethenyl)-2(5H)-furanone, in rats. *Cancer Lett*; 1995 Jun 8, 92(2):159-65.
16. Tanaka T; Kojima T; Suzui M; Mori H. Chemoprevention of colon carcinogenesis by the natural product of a simple phenolic compound protocatechuic acid: suppressing effects on tumor development and biomarkers expression of colon tumorigenesis. *Cancer Res*; 1993 Sep 1; 53(17):3908-13.
17. Wali RK; Khare S; Tretiakova M; Cohen G; Nguyen L; Hart J; Wang J; Wen M; Ramaswamy A; Joseph L; Sitrin M; Brasitus T; Bissonnette M. Ursodeoxycholic acid and F(6)-D(3) inhibit aberrant crypt proliferation in the rat azoxymethane model of colon cancer: roles of cyclin D1 and E-cadherin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*;, 2002 Dec; 11(12):1653-62.

18. Laranjeira LLS; Taha MO; Ferme A; Lemos R; Plapler H. Localização de lesões tumorais induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no cólon de ratos. Acta Cir. Bras. July/Aug./Sep. 1998; vol.13 n.3 São Paulo .
19. Rodrigues MAM; Silva LAG; Salvadori DMF; De Camargo JLV; Montenegro MR. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. Braz. j. med. biol. res; Mar. 2002, 35(3):351-355.
20. Hata K; Yamada Y; Kuno T; Hirose Y; Hara A; Qiang SH; Mori H. Tumor formation is correlated with expression of beta-catenin-accumulated crypts in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. Cancer Sci; 2004 Apr, 95(4):316-20.
21. Shimpo K; Chihara T; Beppu H; Ida C; Kaneko T; Nagatsu T; Kuzuya H. Inhibition of azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in rat colorectum by whole leaf Aloe arborescens Miller var. Nataliensis Berger. Phytother Res; 2001; 15(8); 705-711.
22. Silva MN; Ferreira VF; Souza MCBV. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. Quím. Nova May/June 2003 vol.26 no.3 São Paulo.
23. Oliveira MF; Lemos TLG; Mattos TAS; Santiago, GMP; Braz-filho R. New enamine derivatives of lapachol and biological activity. An. Acad. Bras. Ciênc. June 2002, vol.74 no.2 Rio de Janeiro.
24. Goel RK; Pathak NK; Biswas M; Pandey VB; Sanyal AK. Effect of lapachol, a naphthaquinone isolated from Tectona grandis, on experimental peptic ulcer and gastric secretion. J Pharm Pharmacol; 1987 Feb 39(2):138-40.

25. Carmo Lagrota MH; Wigg MD; Aguiar AN; Pinto AV; Pinto Mdo C. Antiviral activity of naphthoquinones. I. Lapachol derivatives against enteroviruses. *Rev Latinoam Microbiol*; 1986 Jul-Sep, 28(3):221-5.
26. Morrison RK; Brown DE; Oleson JJ; Cooney DA. Oral toxicology studies with lapachol. *Toxicol Appl Pharmacol*; 1970 Jul 17(1):1-11.
27. Sandoval, N. A; Rodriguez C., Poch M; Martínez, N. R. de. Tumores provocados por metilcolantreno y lapachol. Seguimiento del desarrollo mediante citología / Tumors caused by methylcholanthrene and lapachol. Follow-up of development by cytology. *Acta physiol. pharmacol. ther. latinoam*; 1996, 46(4):257-64.
28. Choi BT; Cheong J; Choi YH. beta-Lapachone-induced apoptosis is associated with activation of caspase-3 and inactivation of NF-kappaB in human colon cancer HCT-116 cells. *Anticancer Drugs*; 2003 Nov, 14(10):845-50.
29. Nambiar PR; Nakanishi M; Gupta R; Cheung E; Firouzi A; Ma XJ; Flynn C; Dong M; Guda K; Levine J; Raja R; Achenie L; Rosenberg DW. Genetic signatures of high-and-low-risk aberrant crypt foci in a mouse model of sporadic colon cancer. *Cancer Res*; 2004; 64(18); 6394-6401.
30. Kobaec-Larsen M; Fenger C; Ritskes-Hoitinga J. Secondary effects induced by the colon carcinogen azoxymethane in BDIX rats. *APMIS*; 2004; 112(6); 319-329.
31. Paulsen JE; Fulland RC; Alexander J. Age-dependent induction of aberrant crypt foci in rat colon by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and azoxymethane. *Pharmacol Toxicol*; 2000; 87(2); 69-73.
32. Takahashi M; Wakabayashi K. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer sci*; 2004 95(6); 475-480.

33. Yoshimi N; Morioka T; Kinjo T; Inamine M; Kaneshiro T; Shimizu T; Suzui M; Yamada Y; Mori H. Histological and immunohistochemical observations of mucin-depleted foci (MDF) stained with Alcian blue, in rat colon carcinogenesis induced with 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride. *Cancer Sci*; 2004; 95(10); 792-797.
34. Wargovich MJ; Chen CD; Jimenez A; Steele VE; Velasco M; Stephens LC; Price R; Gray K; Kelloff GJ. Aberrant crypts as a biomarker for colon cancer: evaluation of potential chemopreventive agents in the rat. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 1996 May, 5(5):355-60.
35. Femia AP; Dolara P; Caderni G. Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoxymethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*; 2004 Feb, 25(2):277-81.
36. Mollersen L; Paulsen JE; Alexander J. Loss of heterozygosity and nonsense mutation in *Apc* in azoxymethane-induced colonic tumors in min mice. *Anticancer Res*; 2004; 24(5A); 2595-2599.
37. Suzuki R; Kohno H; Sugie S; Tanaka T. Sequential observations on the occurrence of preneoplastic and neoplastic lesions in mouse colon treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci*; 2004; 95(9); 721-727.
38. Poole AJ; Heap D; Carroll RE; Tyner AL. Tumor suppressor functions for the Cdk inhibitor p21 in the mouse colon. *Oncogene*; 2004; 23(49); 8128-8134.
39. Sequeira JL; Kobayasi S; Rodrigues MAM. Wound Healing and colon carcinogenesis. Enhancing effects of skin wounding on development of colon tumors induced by 1,2 dimethylhydrazine in the rat. *Acta Cir Bras*; 2000 Jul-Sept; 15(3).

40. Murillo G; Choi JK; Pan O; Contantinou AI; Mehta RG. Efficacy of garbanzo and soybean flour in suppression of aberrant crypt foci in the colons of CF-1 mice. *Anticancer Res*; 2004; 24(5A); 3049-3055.
41. Di Gregorio C; Losi L; Fante R; Modica S; Ghidoni M; Pedroni M; Tamassia MG; Gafa L; Ponz de Leon M; Roncucci L. histology of aberrant crypt foci in the human colon. *Histopathology*; 1997; 30(4); 328-334.
42. Nobuoka A; Takayama T; Miyanishi K; Sato T; Takanashi K; Hayashi T; Kukitsu T; Sato Y; Takahashi M; Okamoto T; Matsunaga T; Kato J; Oda M; Azuma T; Niitsu Y. Glutathione-S-transferase P1-1 protects aberrant crypt foci from apoptosis induced by deoxycholic acid. *Gastroenterology*; 2004; 127(2); 428-443.
43. Cotti GC; Santos FPS; Sebastianes FM; Habr-Gama A; Seid VE; Martino RB. Genética do câncer colorretal. *Rev Méd (São Paulo)* 2000 abr/dez; 79 (2/4): 45-64.
44. Suzuki R; Kohno H; Sugie S; Sasaki K; Yoshimura T; Wada K; Tanaka T. Preventive effects of extract of leaves of ginkgo (*Ginkgo biloba*) and its component bilobalide on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Cancer Lett*; 2004; 210(2); 159-169.
45. Fujita K; Matsuda E; Sekine K; Iigo M; Tsuda H. Lactoferrin modifies apoptosis-related gene expression in the colon of the azoxymethane-treated rat. *Cancer Lett*; 2004; 213(1); 21-29.
46. Takeda J; Kitajima K; Fujii S; Horiuchi H; Hori H; Chibana Y; Okuyama T; Tominaga K; Ichikawa K; Ono Y; Teramoto T; Ohkura Y; Imura J; Shinoda M; Chiba T; Sakamoto C; Kawamata H; Fujimori T. Inhibitory effects of etodolac, a selective COX-2 inhibitor, on the occurrence of tumors in colitis-induced tumorigenesis model in rats. *Oncol Rep*; 2004; 11 (5) 981-985.

47. Guerra MO; Mazoni ASB; Brandão MAF; Peters VM. Toxicology of lapachol in rats: embryolethality. *Rev. Bras. Biol.* 2001; 61 (1).

48. Renou SG; Asis SE; Abasolo MI; Bekerman DG; Bruno AM. Monoarylhydrazones of alpha-lapachone: synthesis, chemical properties and antineoplastic activity. *Pharmazie* 2003; 58 (10); 690-695.

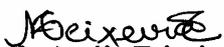
ANEXO



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº. 71/2005 da Mestranda **Roberta Alves Higa**, sob a Orientação do Prof. Ricardo Dutra Aydos, referente ao projeto de pesquisa "**Estudo da ação antineoplásica do Ipê Roxo na carcinogênese induzida por azoximetano em ratos**", está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS**, em reunião de 21 de fevereiro de 2005.

Campo Grande (MS), 25 de fevereiro de 2005.


Dr^a Maria Araújo Teixeira
Presidente da CEUA


Prof^a Joice Stein
Vice-Presidente da CEUA