

PRISCILA LIMA SEQUETTO

**EFEITOS DOS FLAVONÓIDES NARINGINA, CRISINA E  
HESPERIDINA E DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Helianthus  
annuus* NA CARCINOGENESE EXPERIMENTAL DO CÓLON**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica Agrícola, para  
obtenção do título de *Doctor  
Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S479e  
2012

Sequetto, Priscila Lima, 1981-

Efeitos dos flavonóides naringina, crisina e hesperidina e do extrato hidroalcoólico do *Helianthus annuus* na carcinogênese experimental do cólon / Priscila Lima Sequetto. – Viçosa, MG, 2012.

xi, 172f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Tânia Toledo de Oliveira

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Flavonóides. 2. 1,2-dimetilhidrazina. 3. Intestinos - Câncer. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed.582.592

PRISCILA LIMA SEQUETTO

**EFEITOS DOS FLAVONÓIDES NARINGINA, CRISINA E  
HESPERIDINA E DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Helianthus  
annuus* NA CARCINOGENESE EXPERIMENTAL DO CÓLON**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica Agrícola, para  
obtenção do título de *Doctor  
Scientiae*.

APROVADA: 24 de julho de 2012.

---

Prof. Aloisio da Silva Pinto

---

Prof. Marcelo Eustáquio da Silva

---

Profª. Vanessa Jóia de Mello

---

Prof. José Humberto de Queiróz

---

Profª. Tânia Toledo de Oliveira  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela proteção e por iluminar meus passos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Agradeço com carinho especial, à minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tânia Toledo de Oliveira, pela orientação, amizade e incentivo.

Aos Professores participantes da banca por contribuir para a concretização de mais uma etapa da minha formação profissional.

Aos Professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola em especial ao Dudu, pela amizade e auxílio durante todo o período do curso.

Aos meus pais e ao meu irmão pelo amor incondicional e por acreditarem e confiarem sempre em mim.

Ao meu namorado Gustavo pelo amor, paciência, incentivo e compreensão.

Aos meus avós, tias, tios, primas e primos pelo incentivo, apoio e carinho, que me ajudam a seguir em frente.

Aos amigos do Laboratório Biofármacos, às estagiárias Virgínia, Flávia e Rayssa e a todos aqueles que me acompanharam durante os experimentos pela amizade e fundamental ajuda na condução do experimento.

Aos amigos Rômulo, Vanessa, Luís Eugênio, Lu, Carla, Patrícia, Raquel, Ana Paula, Larissa e aos demais que contribuíram com o apoio e cumplicidade de sempre.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10
<b>CAPÍTULO 1. NARINGINA REDUZ O NÚMERO DE LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS E O REMODELAMENTO MORFOLÓGICO COLORRETAL INDUZIDO POR CARCINÓGENO QUÍMICO EM RATOS.....</b>	
	15
<i>Introdução.....</i>	17
<i>Material e métodos.....</i>	19
<i>Resultados .....</i>	23
<i>Discussão .....</i>	40
<i>Referências bibliográficas.....</i>	45
Página	
<b>CAPÍTULO 2. EFEITO DO FLAVONÓIDE CRISINA NA REDUÇÃO DE LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS NO CÓLON DE RATOS EXPOSTOS À 1,2 DIMETILHIDRAZINA.....</b>	52
<i>Introdução.....</i>	54

<i>Material e métodos</i> .....	56
<i>Resultados</i> .....	61
<i>Discussão</i> .....	78
<i>Referências bibliográficas</i> .....	83

Página

<b>CAPÍTULO 3. EFEITO DO FLAVONÓIDE HESPERIDINA NA PROGRESSÃO DE LESÕES PRÉ-CANCEROSAS COLORRETAIS EM RATOS EXPOSTOS AO CARCINÓGENO 1,2 DIMETILHIDRAZINA...</b>	91
---	----

<i>Introdução</i> .....	93
<i>Material e métodos</i> .....	95
<i>Resultados</i> .....	100
<i>Discussão</i> .....	116
<i>Referências bibliográficas</i> .....	122

Página

<b>CAPÍTULO 4. ESTUDO DA AÇÃO ANTINEOPLÁSICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>Helianthus annuus</i> NA CARCINOGENESE INDUZIDA POR 1,2 DIMETILHIDRAZINA EM RATOS</b> .....	131
--	-----

<i>Introdução</i> .....	133
<i>Material e métodos</i> .....	136
<i>Resultados</i> .....	145
<i>Discussão</i> .....	159
<i>Referências bibliográficas</i> .....	162

CONCLUSÕES GERAIS.....	172
------------------------	-----

## LISTA DE TABELAS

<b>Capítulo 1</b>	<b>Página</b>
1. Análise dos focos de criptas aberrantes no intestino grosso de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonoide Naringina.....	26
2. Análise morfométrica de criptas do intestino grosso de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonoide Naringina.....	30
3. Análise morfométrica de criptas do intestino grosso de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonoide Naringina.....	33
4. Conteúdo de minerais no epitélio do intestino grosso de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonoide Naringina.....	37
5. Parâmetros bioquímicos séricos de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonoide Naringina.....	39
<b>Capítulo 2</b>	<b>Página</b>
1. Análise dos focos de criptas aberrantes de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonoide Crisina.....	63
2. Análise histomorfométrica das criptas do cólon de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonoide Crisina.....	68
3. Distribuição de células produtoras de mucinas ácidas e neutras nas criptas do cólon de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonoide Crisina.....	71
4. Parâmetros bioquímicos séricos de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonoide Crisina.....	75
5. Conteúdo de minerais no cólon de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonoide Crisina.....	78

<b>Capítulo 3</b>		Página
1.	Análise dos focos de criptas aberrantes de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Hesperidina.....	102
2.	Histomorfometria das criptas do cólon de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Hesperidina.....	106
3.	Densidade de número e volume de células produtoras de mucinas nas criptas do cólon de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Hesperidina.....	109
4.	Parâmetros bioquímicos de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Hesperidina.....	112
5.	Parâmetros hematológicos de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Hesperidina.....	113
 <b>Capítulo 4</b>		 Páginas
1.	Prospecção fitoquímica do extrato hidroalcoólico de <i>Helianthus annuus</i> .	141
2.	Análise dos focos de criptas aberrantes no intestino grosso de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o extrato hidroalcoólico de <i>Helianthus annuus</i> .....	144
3.	Análise morfométrica de criptas do intestino grosso de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o extrato hidroalcoólico de <i>Helianthus annuus</i> .....	148
4.	Parâmetros bioquímicos séricos de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o extrato hidroalcoólico de <i>Helianthus annuus</i> ....	154

## LISTA DE FIGURAS

<b>Introdução</b>	<b>Página</b>
1. A sequência adenoma-carcinoma colorretal.....	3
2. Biotransformação da 1,2-dimetilhidrazina.....	6
3. Esquema do desenvolvimento do câncer e interações potenciais dos compostos fenólicos de plantas.....	8
<b>Capítulo 1</b>	<b>Página</b>
1. Evolução do peso corporal de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina e tratados com o flavonóide Naringina.....	24
2. Fotomicrografias representativas de criptas do cólon distal de ratos sadios e expostos à 1,2 dimetilhidrazina obtidas por montagem total do intestino.....	25
3. Fotomicrografias representativas de secções longitudinais de criptas do cólon distal de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina e tratados com o flavonóide Naringina.....	27
4. Fotomicrografias representativas secções transversais de criptas do cólon distal de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina e tratados com o flavonóide Naringina.....	28
5. Distribuição de células produtoras de mucinas ácidas e neutras nas criptas do cólon distal de ratos sadios e expostos à 1,2 dimetilhidrazina..	32
6. Regiões organizadoras de nucléolo argirófilas em enterócitos de ratos expostos a 1,2 dimetilhidrazina e tratados com o flavonóide Naringina.....	35
7. Distribuição de minerais no epitélio do intestino grosso de ratos expostos a 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Naringina.....	36
<b>Capítulo 2</b>	<b>Página</b>
1. Evolução do peso corporal de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonoide Crisina.....	61
2. Fotomicrografias representativas de criptas do cólon médio de ratos do grupo 1 (A) e expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) no grupo 2 (B, C e D) obtidas por montagem total do intestino.....	62

3.	Fotomicrografias representativas de secções longitudinais de criptas do cólon médio de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Crisina.....	64
4.	Fotomicrografias representativas secções transversais de criptas do cólon médio de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Crisina.....	65
5.	Fotomicrografias representativas do tumor no cólon médio em ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina.....	66
6.	Distribuição de células caliciformes produtoras de mucinas ácidas e neutras nas criptas do cólon médio de ratos sadios e expostos à 1,2 dimetilhidrazina.....	70
7.	Regiões organizadoras de nucléolo por núcleo de enterócitos (AgNORs/núcleo) e células enteroendócrinas do intestino grosso de ratos expostos a 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Crisina.....	73
8.	Níveis de óxido nítrico no soro de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Crisina.....	76
9.	Análise representativa da distribuição de minerais no cólon médio de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Crisina.....	77

### Capítulo 3

### Página

1.	Fórmula estrutural da aglicona hesperetina.....	94
2.	Evolução do peso corporal de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Hesperidina.....	100
3.	Fotomicrografias representativas de criptas do cólon distal de ratos sadios e expostos à 1,2 dimetilhidrazina obtidas por montagem total do intestino.....	101
4.	Fotomicrografias representativas de secções longitudinais de criptas do cólon proximal de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Hesperidina.....	103
5.	Fotomicrografias representativas secções transversais de criptas do cólon proximal de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Hesperidina.....	104
6.	Distribuição de células produtoras de mucinas ácidas e neutras nas criptas do cólon proximal de ratos controle e expostos à 1,2 dimetilhidrazina.....	108

7.	Regiões organizadoras de nucléolo por núcleo de enterócitos e células enteroendócrinas do intestino grosso de ratos expostos a 1,2 dimetilhidrazina e tratados com o flavonóide Hesperidina.....	110
8.	Níveis de óxido nítrico no soro de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Hesperidina.....	114
9.	Análise representativa da distribuição de minerais no cólon médio de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina e tratados com o flavonóide Hesperidina.....	115

#### Capítulo 4

#### Página

1.	Evolução do peso corporal de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com extrato hidroalcoólico de <i>Helianthus annuus</i> .....	142
2.	Fotomicrografias representativas de criptas do cólon distal de ratos controle e expostos à 1,2 dimetilhidrazina obtidas por montagem total do intestino.....	143
3.	Fotomicrografias representativas de secções longitudinais de criptas do cólon distal de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina e tratados com o extrato hidroalcoólico de <i>Helianthus annuus</i> .....	145
4.	Fotomicrografias representativas secções transversais de criptas do cólon distal de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina e tratados com o extrato hidroalcoólico de <i>Helianthus annuus</i> .....	146
5.	Distribuição de células produtoras de mucinas ácidas e neutras nas criptas do cólon distal de ratos sadios e expostos à 1,2 dimetilhidrazina..	150
6.	Células enteroendócrinas do intestino grosso, regiões organizadoras de nucléolo por núcleo de enterócitos e células do epitélio das criptas em divisão de ratos expostos a 1,2 dimetilhidrazina e tratados com extrato hidroalcoólico de <i>Helianthus annuus</i> .....	152
7.	Análise representativa da distribuição de minerais no cólon médio de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o extrato hidroalcoólico de <i>Helianthus annuus</i> .....	156

## RESUMO

SEQUETTO, Priscila Lima, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Efeitos dos flavonóides naringina, crisina e hesperidina e do extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* na carcinogênese experimental do cólon.** Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Coorientadores: Márcia Rogéria de Almeida Lâmega e Tânus Jorge Nagem.

Neste estudo, objetivou-se avaliar os efeitos dos flavonóides naringina, hesperidina e crisina e do extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* na carcinogênese experimental do cólon de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina. Em cada experimento, foram utilizados ratos Wistar fêmeas pesando  $130,8 \pm 27,1$ g que receberam injeção subcutânea semanal de 1,2-dimetilhidrazina (DMH, 20 mg/kg) durante 10 semanas. A partir da 11<sup>a</sup> semana, foi iniciado o tratamento com os flavonóides naringina, crisina, hesperidina e com o extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus*, administrado por gavagem 3 vezes por semana a cada 48 horas, durante 14 semanas. Os animais foram divididos em 5 grupos com 7 animais em cada grupo. Grupo 1: NaCl 0,9%; Grupo 2: DMH + NaCl 0,9%; Grupo 3: DMH + tratamento (10 mg/Kg); Grupo 4: DMH + tratamento (100 mg/Kg); Grupo 5: DMH + tratamento (200 mg/Kg). A avaliação dos resultados foi realizada a partir de análises de quantificação do número de focos de criptas aberrantes (FCA), histopatologia, histoquímica e histomorfometria, avaliação de regiões organizadora de nucléolo por núcleo de enterócitos AgNORs e de células enteroendócrinas, análise bioquímica sérica e microanálise de minerais. De forma geral, nos grupos controle da indução e tratado com a menor dose houve aumento significativo do número de FCA com criptas displásicas dilatadas, das AgNORs/núcleo e redução dos minerais antioxidantes como cobre, magnésio, selênio e zinco comparado ao grupo sadio. Nas outras dosagens utilizadas foi observada redução da desorganização morfológica colorretal, com a diminuição do número de lesões pré-neoplásicas em ratos expostos ao carcinógeno químico DMH. Os segmentos inicial e médio do cólon foram mais sensíveis ao efeito inibitório destes tratamentos sobre a displasia do epitélio intestinal, os quais aparentemente apresentam influência limitada sobre lesões tumorais previamente estabelecidas. Acredita-se que parte dos resultados encontrados pode ser decorrente dos efeitos destes tratamentos na redução da proliferação celular e recuperação dos níveis de minerais antioxidantes na mucosa intestinal.

## ABSTRACT

SEQUETTO, Priscila Lima, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2012. **Effects of the flavonoid naringin, chrysin and hesperidin and extract of *Helianthus annuus* in experimental colon carcinogenesis.** Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Coadvisers: Márcia Rogéria de Almeida Lâmega and Tânus Jorge Nagem.

This study aimed to evaluate the effects of the flavonoid naringin, hesperidin and chrysin and extract of *Helianthus annuus* in experimental colon carcinogenesis in rats exposed to 1,2-dimethylhydrazine. In each experiment we used Wistar female weighing  $27.1 \text{ g} \pm 130.8$  received weekly subcutaneous injection of 1,2-dimethylhydrazine (DMH, 20 mg/kg) for 10 weeks. From week 11, treatment was started with the flavonoid naringin, chrysin, hesperidin and the hydroalcoholic extract of *Helianthus annuus*, administered orally three times a week every 48 hours for 14 weeks. The animals were divided into 7 groups with five animals in each group. Group 1: NaCl 0,9%, Group 2: DMH + NaCl 0,9%, Group 3: DMH + treatment (10 mg/Kg), Group 4: DMH + treatment (100 mg/Kg), Group 5: DMH + treatment (200 mg/Kg). The evaluation of the results was realized from analyzes to quantify the number of aberrant crypt foci (ACF), histopathology, immunohistochemistry and histomorphometry, evaluation of nucleolar organizer regions per nucleus of enterocytes and enteroendocrine cells AgNORs, serum biochemical analysis and microanalysis minerals. Overall, the induction and control groups treated with the lower dose significantly increased the number of dysplastic crypts with dilated FCA, of AgNORs/nucleus and reduction of antioxidant minerals such as copper, magnesium, selenium and zinc compared to the healthy group. In other dosages used were a decrease in colorectal morphological disorganization and a decrease in the number of precancerous lesions in rats exposed to the chemical carcinogen DMH. The early and middle segments of the colon were more sensitive to the inhibitory effect of these treatments on the intestinal epithelial dysplasia, which apparently have limited influence on pre-established tumors. It is believed that some of the results may be due to the effects of these treatments in reducing the proliferation and recovery levels of minerals antioxidants in colonic mucosa.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O câncer colorretal é um dos maiores problemas de saúde no mundo ocidental (Tonon et al., 2007). A maioria dos cânceres colorretais ocorre de forma esporádica e os principais fatores de risco se encontram na dieta e no estilo de vida, desta forma, a modificação destes fatores oferece oportunidades para a prevenção desta patologia (Schottenfeldm & Fraumeni, 2006). A alta incidência e mortalidade da doença devem-se ao diagnóstico numa fase tardia, afirmando a necessidade de melhores ferramentas para o diagnóstico e prognóstico precoces (Berg & Soreide, 2011).

Normalmente o câncer colorretal surge esporadicamente, embora um menor subgrupo surja como resultado de mutações herdadas, ou como resultado de doenças inflamatórias do intestino como doença de Crohn e colite ulcerosa (Markowitz & Bertagnolli, 2009). Existe uma evidência crescente de que o grau de desenvolvimento do tumor e a resposta ao tratamento são dependentes da constituição genética normal do indivíduo (Ullman & Itzkowitz, 2011). A resposta dos pacientes ao tratamento é variável, mesmo se a doença parece similar ao avaliar os parâmetros clinicopatológicos (Berg & Soreide, 2011).

A doença normalmente se desenvolve a partir de um pólipó benigno, podendo transformar-se em adenoma com displasia e evolução para carcinoma com potencial metastático (Davies et al., 2005). Estas alterações podem surgir como resultado do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em uma célula que podem levar a desregulação das vias de controle celular, e, assim, perturbar a proliferação normal e crescimento da célula (Markowitz & Bertagnolli, 2009).

O desenvolvimento dos tumores colorretais envolve várias alterações morfológicas associadas ao aparecimento e crescimento da lesão localizada, e uma

progressiva perturbação do genoma, incluindo a aquisição de mutações somáticas e o silenciamento de genes reguladores (Vogelstein et al., 1988).

No câncer colorretal, os adenomas são considerados como o precursor mais importante para os carcinomas, embora um subgrupo hiperplásico também tenha sido demonstrado como potencial maligno (Torlakovic & Snover 1996). A sequência adenoma-carcinoma sugere que mutações específicas ocorrem em determinadas fases do desenvolvimento do tumor, a fim de transformar o carcinoma em uma célula com potencial metastático, estas mutações afetam os genes e vias importantes para a regulação do crescimento e diferenciação celular (Fearon & Vogelstein, 1990).

O surgimento do conhecimento em nível molecular contribuiu para o entendimento das causas para a iniciação e progressão do tumor e revelou a complexidade e heterogeneidade da doença (Park et al., 2008).

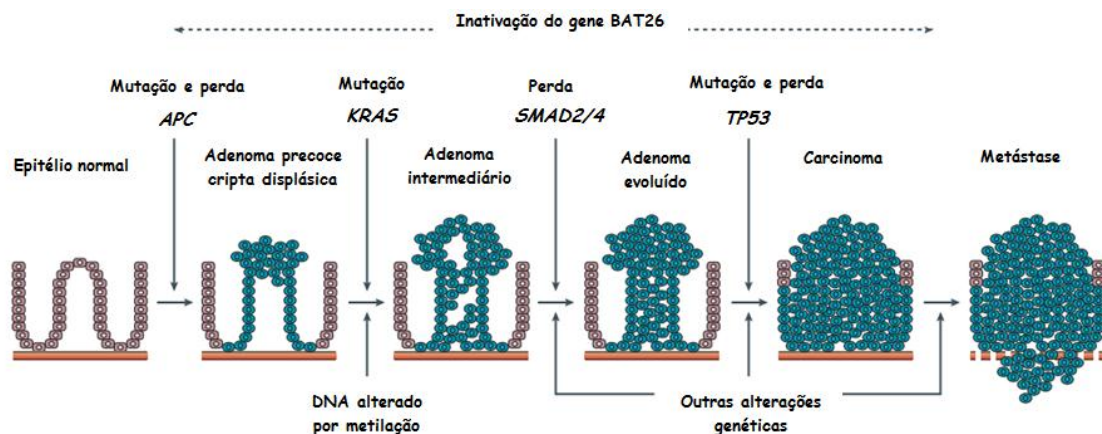
Duas classes de genes tem papel chave no desenvolvimento do câncer, os protooncogenes estimulam, enquanto genes supressores inibem os processos de divisão celular (Weinberg, 1996). Quando os protooncogenes sofrem alguma mutação a taxa de proliferação da célula é elevada, mesmo na ausência de fatores de crescimento, em contraste, os genes supressores tumorais mutantes são privados de sua função reguladora do ciclo celular, resultando em proliferação celular, mesmo se danos graves são introduzidos na célula (Berg & Soreide, 2011).

Em suas configurações normais, os protooncogenes e os genes supressores de tumor, coreografam o ciclo celular em uma intrincada seqüência de eventos pelos quais as células crescem e se dividem, desta forma, estas duas classes de genes são responsáveis pela proliferação descontrolada encontrada em vários tipos de cânceres humanos (Weinberg, 1996). Assim, a regulação normal e equilíbrio entre a apoptose e

a proliferação celular é desviada para um estado proliferativo descontrolado com perda da morte celular (Berg & Soreide, 2011).

O gene APC é considerado o evento inicial para transformar uma célula normal em um adenoma, e é encontrado em aproximadamente 80% de todos os carcinomas colorretais. A mutação nos oncogenes KRAS é outra aberração vista com frequência no início da transformação de células normais (Yang et al., 2006).

Mutações no BRAF oncogene são vistas no início de transformação maligna. Ambos KRAS e mutações BRAF irão aumentar a taxa de proliferação da célula, comparável a mutações em APC (Laurent-Puig et al., 1999). Mutações no gene supressor de tumor TP53 são observadas em mais de 50% dos tumores colorretais, esta frequência elevada é encontrada em carcinomas, mas não em adenomas, sugerindo ser o gene TP53 crucial para a transformação maligna da célula (Torlakovic & Snover 1996). Na figura 1 são mostradas as etapas e os genes envolvidos no desenvolvimento do câncer de colorretal.



**Figura 1.** A sequência adenoma-carcinoma colorretal. A progressão do epitélio normal através de adenoma colorretal a carcinoma é caracterizada por anormalidades acumuladas em genes específicos. Mutações em genes de reparação e a mutação sucessiva em genes alvo para o desenvolvimento do câncer colorretal pode ocorrer em qualquer ponto na sequência (como

mostrado pela linha pontilhada). BAT26 é uma região microssatélite que é alterada em quase todos os CRCs. Adaptado de Davies et al., 2005.

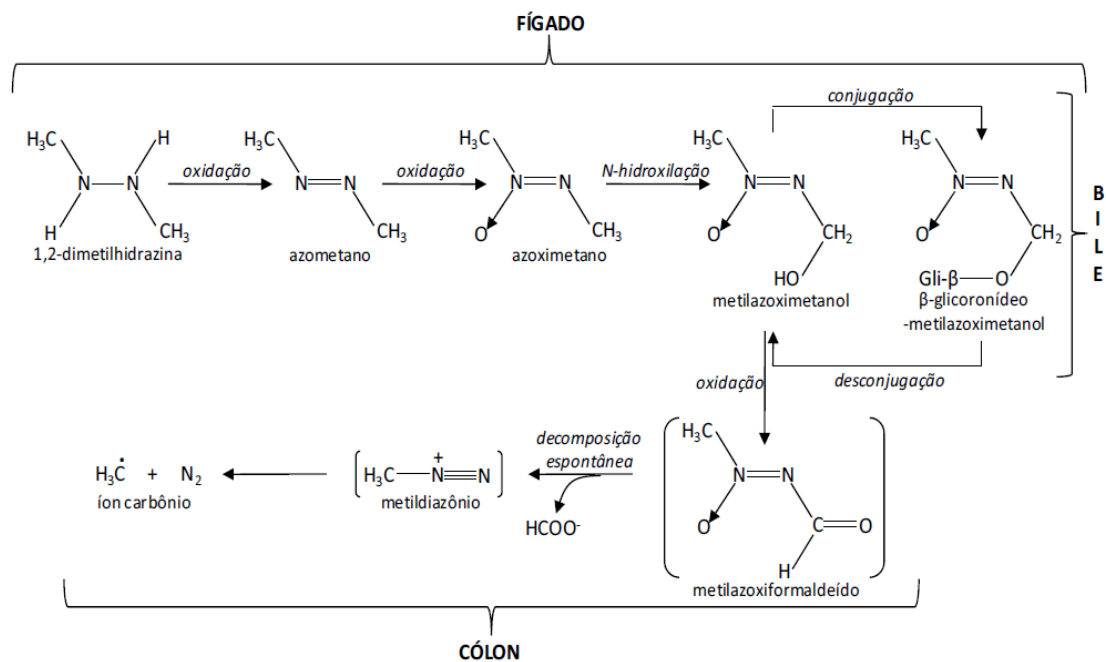
Em 1987, Bird e Good descreveram os focos de criptas aberrantes (FCA) como supostas lesões pré-neoplásicas no cólon de roedores tratados com carcinógeno. Os FCA se projetam no lumen intestinal (Bird & Good, 2000) sendo sua superfície facilmente visualizada ao exame microscópico de luz pela coloração com azul de metileno, e observados em pacientes com câncer colorretal e em pacientes com polipose adenomatosa familiar (Nucci et al., 1997).

Devido ao número total e tamanho destas pequenas lesões poderem ser marcadas de forma simples, FCA têm sido utilizados como um bioensaio de curto prazo para avaliar o papel de componentes nutritivos e agentes quimiopreventivos numa fase precoce da carcinogênese cólon (Wargovich, 2000). No entanto, os FCA não são diretamente relacionados com a formação precoce de tumores. O número de tumores desenvolvidos em roedores tratados com azoximetano (AOM) ou dimetilhidrazina (DMH) é pequeno em comparação com o elevado número de FCA, demonstrando que apenas uma fração muito pequena dos FCA tem o potencial para progredir para a fase de um tumor. Além disso, nestes modelos, uma correlação negativa entre a formação de ACF e de tumores tem sido encontrada, bem como uma discrepância entre a distribuição espacial da ACF e dos tumores (Kristinsson et al., 1999).

1,2 dimetilhidrazina (DMH) ou o seu metabólito azoximetano (AOM) são frequentemente utilizados para a indução da carcinogênese experimental do colorretal (Ma et al., 2002). DMH e outros carcinógenos podem levar a um aumento da proliferação celular, o qual é crítico para o processo de carcinogênese. Criptas aberrantes alongadas e aberrações nucleares acompanham o aumento da proliferação celular e podem representar lesões pré-neoplásicas precoces (Lamont & O' Gorman,

1978). DMH e compostos afins parecem causar metilação ativa do DNA das células epiteliais da mucosa colônica. Hipermetilação e hipometilação do DNA são duas características dos estágios iniciais da carcinogênese, estando os níveis de expressão do gene da metiltransferase aumentados na mucosa normal de pacientes com câncer de cólon (Pories, 1993).

A ativação metabólica da DMH pelo organismo envolve sua oxidação no fígado, originando o azometano, que sofre segunda oxidação e gera azoximetano. Este último, após hidroxilação por enzimas microssômicas hepáticas, resulta em metilazoximetanol, o qual é conjugado em ácido glicurônico e secretado pela bile. Ao atingir o intestino sofre hidrólise por  $\beta$ -glicuronidases produzidas pelas bactérias intestinais formando novamente metilazoximetanol, que sofre oxidação convertendo na forma instável metilazoxiformaldeído. Este sofre decomposição formando finalmente o íon carbônico, que é capaz de metilar DNA, RNA ou proteínas de células intestinais (Matsumoto & Higa, 1966; Weisburger, 1971; Sonh et al., 1991). Alguns autores sugerem que a DMH e seus metabólitos hepáticos podem ser transportados até as células epiteliais do cólon via corrente sanguínea, e serem secretados pela bile (Zedek et al., 1977). A figura 2 mostra o processo de ativação metabólica da DMH pelo organismo.



**Figura 2.** Biotransformação da 1,2-dimetilhidrazina. Adaptado de Weisburger (1971).

Os flavonóides são compostos polifenólicos presentes em alimentos e bebidas de origem vegetal que podem possivelmente proteger contra o câncer. Em linhagens celulares e estudos em animais, os flavonóides mostraram ter um efeito antioxidante, por interferir ou eliminar carcinógenos, inibir a proliferação celular, induzir apoptose e inibir a angiogênese. Especificamente para a carcinogênese de colorretal, tais achados são ainda inconclusivos (Xiao et al., 2008). A atividade protetora contra o câncer colorretal devido à ingestão de flavonóides em humanos não pode ser facilmente extrapolada para os testes em linhagens celulares e achados em animais, neste sentido, são necessários estudos epidemiológicos sobre a associação da ingestão de flavonóides e risco de câncer colorretal (Theodoratou et al., 2007).

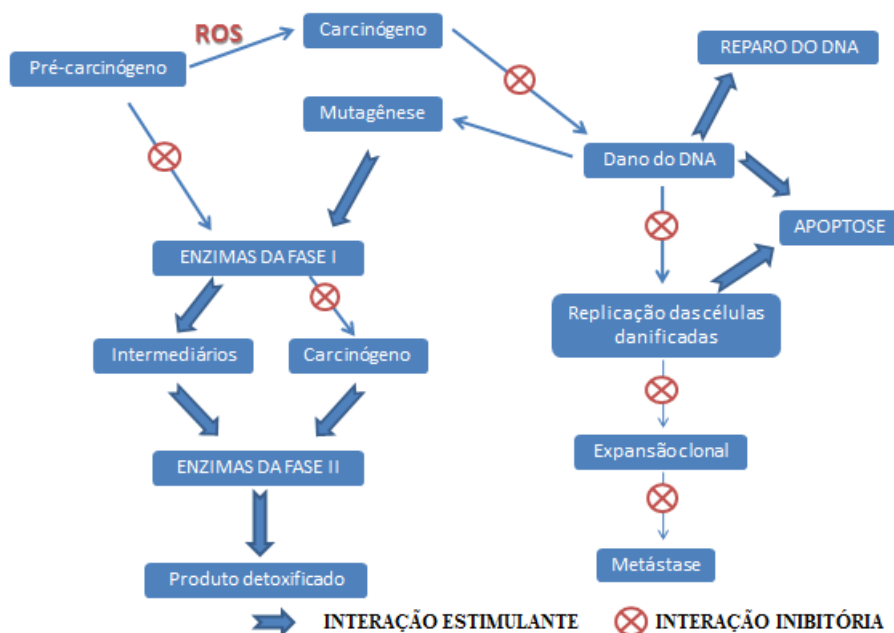
Os subgrupos de flavonóides mais estudados são os flavonóis, flavonas e catequinas. Os principais flavonóides ingeridos na alimentação são a quercetina, kaempferol e miricetina. Flavonas incluem luteolina e apigenina. As mais abundantes no subgrupo de catequinas são (1)-catequina, (-)-epicatequina, (1)-galocatequina (GC),

(-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epicatequinagalato (ECG) e (-)-epigallocatequina galato (EGCG). Flavonóides e catequinas podem ser encontrados em frutas, legumes, chá e vinho tinto, o chá contém todas as principais catequinas e flavonóis. Flavonas estão presentes apenas em alguns vegetais. A ingestão de frutas e vegetais, o consumo de chás, bem como a ingestão de flavonóides em si, tem sido proposto como protetor contra o câncer, mas não de forma a ser associada a uma redução no risco de câncer colorretal (Sun et al., 2006).

Segundo Pierini et al. (2008) a atividade anticarcinogênica dos flavonóides está relacionada a modulação do metabolismo de carcinógenos, modulação da resposta inflamatória devido a regulação da atividade das enzimas ciclooxigenase, lipoxigenase, óxido nítrico sintetase e aromatase, da proliferação celular e da apoptose. A modulação das fases I e II do metabolismo de compostos da dieta pode diminuir a produção de metabólitos tóxicos, relacionados ao processo de carcinogênese (Prochaska & Talalay, 1988). A observação de que a utilização crônica de drogas com atividade antiinflamatória reduz o risco de câncer de cólon, chamou a atenção para o estudo de alguns flavonóides como a crisina que possuem atividade antiinflamatória por promover a supressão da COX-2 (Chan et al., 2005). A sobrevivência da maioria das células cancerosas depende essencialmente da sua capacidade de se dividir continuamente e evitar a apoptose, muitos flavonóides mostraram inibir a proliferação celular e aumentar a apoptose *in vitro*, porém a confirmação deste efeito em animais ou humanos tem sido mais difícil (Kim et al., 2005).

O estresse oxidativo vem sendo relacionado ao processo patológico da carcinogênese. O câncer é o ponto final de um processo de múltiplos estágios, envolvendo uma sequência de eventos que ocorrem durante alguns anos ou até décadas (Giada & Filho, 2006). A ativação metabólica do carcinógeno é uma reação dependente

de radical livre e o dano oxidativo ao DNA tem um papel chave no processo mutagênico. Em sistemas biológicos, o DNA danificado pode ser reparado enzimaticamente e as células recuperam as suas funções normais. Todavia, se a célula contendo o DNA danificado se divide antes do seu DNA ser recuperado, o resultado é uma alteração genética permanente, primeiro passo na carcinogênese, pois o mau reparo do DNA pode resultar em mutações tais como substituições de bases e deleção, levando a carcinogênese (Tiwari, 2004). A Figura 3 mostra os estágios do desenvolvimento do câncer e as interações potenciais previstas dos compostos fenólicos.



**Figura 3.** Esquema do desenvolvimento do câncer e interações potenciais dos compostos fenólicos de plantas. Adaptado de Giada & Filho (2006).

O processo da carcinogênese pode ser inibido pelos compostos fenólicos afetando os eventos moleculares em todos os estágios do processo, resultando em uma redução potencial do risco de câncer. Os compostos fenólicos, devido a sua propriedade antioxidante, poderiam inativar as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que têm

papel importante na carcinogênese, impedindo o desencadeamento do processo comumente catalizado pelas enzimas citocromo P-450 (Giada & Filho, 2006).

Segundo Yang et al. (2001) outra forma de prevenção do processo carcinogênico seria estimulando a excreção de substâncias xenobióticas, estranhas ao organismo e por isso potencialmente carcinogênicas, e seus intermediários pela ativação das fases I e II dos sistemas de enzimas envolvidos na eliminação de compostos do organismo. Estas substâncias poderiam também ter um papel nos estágios mais avançados do desenvolvimento do câncer. Se o dano foi causado e os mecanismos ativos de reparo do DNA falharem, a célula iniciada pode ser morta por apoptose.

A apoptose pode ser estimulada pelos compostos fenólicos, devido principalmente, às suas propriedades antioxidantes. Quando uma célula alterada escapa da apoptose, a proliferação de células tumorais pode ser prevenida pelo bloqueio da replicação destas células. Desta forma e de acordo com Shanafelt et al. (2006), existem evidências de que os processos oxidativos contribuem para o estágio de promoção da carcinogênese e que os antioxidantes podem causar a regressão das lesões pré-malignas ou inibir seu desenvolvimento.

Diante ao exposto, os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos dos flavonóides naringina, hesperidina e crisina e do extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* na carcinogênese experimental do cólon de ratos expostos à 1,2-dimetilhidrazina.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

\* UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. Manual de normalização de trabalhos acadêmicos. Viçosa, MG, 2011. 88 p.

BERG, M.; SOREIDE, K. Genetic and Epigenetic Traits as Biomarkers in Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences*, v.12, p.9426-9439, 2011.

BIRD, P.R.; GOOD C.K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicology letters*, v.112, p.295-402, 2000.

CHAN A.T.; GIOVANNUCCI E.L.; MEYERHARDT J.A.; SCHERNHAMMER E.S.; CURHAN G.C.; FUCHS C.S. Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer. *Journal of the American Medical Association* 2005; 294, 914–923.

DAVIES, R.J., MILLER, R.; COLEMAN, N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nature Reviews Cancer*, v.5, p.199-209, 2005.

FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, v.61, p.759-767, 1990.

GIADA, M.L.R.; FILHO, M.J. The importance of dietary phenolic compounds in the promotion of human health. *Biological sciences*, v.12, p.7-15, 2006.

KIM, M.J.; KIM, D.H.; NA, H.K.; OH, T.Y.; SHIN, C.Y.; SURH, D.P.Y.J. Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from *Artemisia* plants, induces apoptosis in human gastric cancer (AGS) cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2005; 24, 261–269.

KRISTINSSON, J.; ROSETH, A.G.; SUNDSET, A.; NYGAARD, K.; LOBERG, E.M.; PAULSEN, J.E.; AADLAND, E.; FAGERHOL, M.K. Granulocyte marker

protein is increased in stools from rats with azoxymethane-induced colon cancer. Scandinavian journal of gastroenterology, v.34, p.1216-1223, 1999.

LAMONT, J.T.; O'GORMAN, T.A. Experimental colon cancer. Gastroenterology, v.75, p.1157-1169, 1978.

LAURENT-PUIG, P.; BLONS, H.; CUGNENC, P.H. Sequence of molecular genetic events in colorectal tumorigenesis. European journal of cancer prevention, v. 8, p.39-47, 1999.

MA, Q.Y.; WILLIAMSON, K.E.; ROWLANDS, B.J. Variability of cell proliferation in the proximal and distal colon of normal rats and rats with dimethylhydrazine induced carcinogenesis. World journal of gastroenterology, v.8, p.847-852, 2002.

MARKOWITZ, S.D.; BERTAGNOLLI, M.M. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. The New England journal of medicine, v.361, p.2449-2460, 2009.

MATSUMOTO, H.; HIGA, H.H. Studies on methylazoxymethanol, the aglycone of cycasin: methylation of nucleic acids in vitro. Journal of biochemistry, v. 98, p. 20-22, 1966.

NUCCI, M.R.; ROBINSON, C.R.; LONGO, P.; CAMPELL, P.; HAMILTON, S.R. Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. Human pathology, v.28, p.1396-1407, 1997.

PARK, D.H.; KIM, H.S.; KIM, T.I.; KIM, Y.H.; PARK, D.I.; KIM, H.J.; YANG, S.K.; BYEON, J.S.; LEE, M.S.; CHUNG, I.K.; JUNG, S.A.; JEEN, Y.T.; CHOI, J.H.; CHOI, H.; HAN, D.S. Clinicopathologic characteristics and malignant potential of colorectal flat neoplasia compared with that of polypoid neoplasia. Diseases of the colon and rectum, v. 51, p. 43-49, 2008.

PORIES, S.E.; RAMCHURREN, N.; SUMMERHAYES, I.; STEELE, G.M.D. Animal Models for Colon Carcinogenesis. *Archives of surgery*, v.128, p.647-653, 1993.

PROCHASKA, H.J.; TALALAY, P. Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res* 1988; 48, 4776–4782.

SCHOTTENFELDM, D.; FRAUMENI, J..F. Cancer epidemiology and prevention, 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, p.809-829, 2006.

SHANAFELT, T.D.; LEE, Y.K.; CALL, T.G.; NOWAKOWSKI, G.S.; DINGLI, D.; ZENT, C.S. E KAY, N.E. Clinical effects of oral green tea extracts in four patients with low grade B-cell malignancies. *Leukemia Research*, v. 30, p.707-712, 2006.

SOHN, O.S.; ISHIZAKI, H.; YANG, C.S.; FIALA, E.S. Metabolismo of axoxymethane, methylazoxymethanol and N-nitrosodimethylamine by cytochrome P450 II E1. *Carcinogenesis*, v.12, p.127-131, 1991.

SUN, C.; YUAN, J.; KOH, W.; YU, M.C. Green tea, black tea and colorectal cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Carcinogenesis*, v. 27, p.1301-1309, 2006.

THEODORATOU, E.; KYLE, J.; CETNARSKYJ, R.; FARRINGTON, S.M.; TENESA, A.; BARNETSON, R.; PORTEOUS, M.; DUNLOP, M.; CAMPBELL, H. Dietary flavonoids and the risk of colorectal cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, v. 16, p. 684-693, 2007.

TIWARI, A.K. Antioxidants: New-generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders. *Current Science*, v. 86, p.1092-1102, 2004.

TONON, L.M.; SECOLI, S.R.; CAPONERO R. A review of bevacizumab and its use in colorectal câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.53, p. 173-182, 2007.

TORLAKOVIC, E.; SNOVER, D.C. Serrated adenomatous polyposis in humans. *Gastroenterology*, v.110, p.748-755, 1996.

ULLMAN, T.A.; S.H. ITZKOWITZ. Intestinal Inflammation and Cancer. *Gastroenterology*, v.140, p. 807-1816, 2011.

VOGELSTEIN, B.; FEARON, E.R.; HAMILTON, S.R.; KERN, S.E.; PREISINGER, A.C.; LEPPERT, M.; NAKAMURA, Y.; WHITE, R.; SMITS, A.M.; BOS, J.L. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England journal of medicine*, v.319, p.525-532, 1988.

WARGOVICH, M.J.; JIMENEZ, A.; MCKEE, K.; STEELE, V.E.; VELASCO, M.; WOODS, J.; PRICE, R.; GRAY, K.; KELLOFF, G.J. Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression. *Carcinogenesis*, v.21, p.1149-1155, 2000.

WEINBERG R.A. How cancer arises. *Scientific American*, v.9, p.62-70, 1996.

WEISBURGUER, J.H. Colon carcinogens: their metabolism and mode of action. *Cancer*, v. 28, p.60-70, 1971.

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, p.113-119, 2008.

YANG, C.S.; LANDAU, J.M.; HUANG, M.T.; NEWMARK, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual review of nutrition*, v. 21, p.381-406, 2001.

YANG, J.; ZHANG, W.; EVANS, P.M.; CHEN, X.; HE, X.; LIU, C. Adenomatous Polyposis Coli (APC) differentially regulates  $\beta$ -catenin phosphorylation

and ubiquitination in colon. The Journal of biological chemistry, v. 281, p.17751-17757, 2006.

ZEDEK, M.S.; GRAB, D.J.; STERNBERG, S.S. Differences in the acute response of the various segments of rat intestine to treatment with the intestinal carcinogen methylazoxymethanol acetate. Cancer research, v.37, p.32-36, 1977.

## CAPÍTULO 1

### **Naringina reduz o número de lesões pré-neoplásicas e o remodelamento morfológico colorretal induzido por carcinógeno químico em ratos**

#### **RESUMO**

Fitoquímicos biologicamente ativos, especialmente flavonóides, têm apresentado potencial anticarcinogênico. A Naringina é a principal flavonona glicosilada conhecida pela medicina chinesa por sua marcada atividade anti-inflamatória e antioxidante. O objetivo do estudo foi investigar o efeito da Naringina na formação de lesões pré-neoplásicas (focos de criptas aberrantes – FCA) colorretais induzidas por carcinógeno químico em ratos. Ratos Wistar fêmeas pesando  $130,8 \pm 27,1$  g receberam injeção subcutânea semanal de 1,2-dimetilhidrazina (DMH, 20 mg/kg) durante 10 semanas. Os animais foram divididos em 5 grupos com 7 animais em cada grupo. Grupo 1: NaCl 0,9%; Grupo 2: DMH + NaCl 0,9%; Grupo 3: DMH + Naringina (10 mg/kg); Grupo 4: DMH + Naringina (100 mg/kg); Grupo 5: DMH + Naringina (200 mg/kg). Em G2 e G3 houve aumento significativo do número de FCA e regiões organizadora de nucléolo por núcleo de enterócitos (AgNORs/núcleo) comparado à G1. Em G4 e G5 houve redução significativa do número de FCA e AgNORs/núcleo comparado à G2. O nível de minerais antioxidantes como cobre, magnésio, selênio e zinco foi significativamente reduzido no epitélio dos FCA em G2 e G3, mas similar nos grupos G4 e G5, comparados à G1. A Naringina, especialmente na dose de 200mg/kg, foi eficaz em minimizar o remodelamento morfológico colorretal, reduzindo o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas em ratos expostos à 1,2-dimetilhidrazina. Sugere-se que parte desse efeito pode ser decorrente da redução da proliferação celular e dos níveis de ferro teciduais, e recuperação dos níveis de minerais antioxidantes induzidos por esse flavonóide.

**Palavras-chave:** câncer, intestino, patologia, flavonóide, 1,2-dimetilhidrazina.

## **Introdução**

Cânceres do trato digestivo apresentam elevada incidência entre as populações e estão entre as causas mais comuns de morte por câncer em todo o mundo (Pierini et al., 2008). Devido à variabilidade na incidência, tem sido descrito que os diferentes tipos de cânceres do trato digestivo podem ser influenciados por hábitos de vida como prática de exercícios físicos, tabagismo e alimentação (Perez-Holanda et al., 2007; Rossi et al., 2006).

Em 1987, Bird descreveu focos de criptas aberrantes (FCA) como lesões pré-neoplásicas no cólon de roedores expostos ao carcinógeno químico 1,2-dimetilhidrazina (DMH). A DMH é capaz de estimular a divisão celular e induzir a formação de FCA e tumores no cólon e reto por interferir no processo de metilação do DNA, semelhante ao observado em humanos (Pories, 1993). Os FCA manifestam-se em fases precoces da carcinogênese colorretal como expansões das criptas intestinais decorrentes de displasia, hipertrofia e hiperplasia epitelial (Nucci et al., 1997; Bird 1995). Devido o número total e tamanho dos FCA poderem ser determinados de forma simples, rápida e barata, a DMH tem sido amplamente utilizada em modelos experimentais de câncer colorretal (Wargovich, 2000; Larangeira et al., 1998). Além disso, a avaliação dos FCA constitui um bioensaio de curto prazo para avaliar o papel de agentes quimiopreventivos na carcinogênese colorretal (Wargovich, 2000; Newell & Heddle, 2004).

Diversos fitoquímicos biologicamente ativos, especialmente os flavonóides, têm sido investigados em relação à um possível efeito anticarcinogênico (Moon et al. 2006; Pierini et al., 2008; Theodoratou et al., 2007). Estudos epidemiológicos sugeriram uma associação entre o consumo de flavonóides e a redução da incidência de doenças cardiovasculares, inflamatórias e câncer (Jain & Parmar, 2011; Rossi et al., 2006). Foi previamente demonstrado que flavonóides como flavonas, flavonóis, catequinas,

procianidinas, flavanonas, isoflavonas, miricetina, naringenina, e hesperidina apresentam potencial anticarcinogênico *in vitro* (Pierini et al., 2008, Theodoratou et al., 2007, Moon et al., 2006). Além disso, ensaios pré-clínicos indicaram que a atividade anticarcinogênica dos flavonóides está relacionada à modulação do metabolismo de carcinógenos, resposta inflamatória, regulação da proliferação celular e apoptose, mecanismos diretamente implicados no desenvolvimento e progressão dos cânceres colorretais (Pierini et al., 2008; Talalay et al., 1988).

Atualmente, a relevância do consumo de flavonóides na dieta para a prevenção e/ou controle de diferentes tipos de câncer é extremamente controversa, principalmente em seres humanos, uma vez que o consumo desses fitoquímicos é geralmente baixo e seu metabolismo extremamente complexo e ainda pouco conhecido (Pierini et al., 2008; Spilsbury et al., 2012). A Naringina é a principal flavonona glicosilada conhecida pela medicina tradicional chinesa por suas atividades, anti-inflamatória, antioxidante e anti-hipercolesterolêmica. É comumente encontrada em frutos cítricos como laranja, limão, acerola, e uva (Jain & Parmar, 2011; Liu et al., 2012). Após a administração oral, a Naringina e os seus metabólitos secundários aglicona, naringenina, glicuronídeo e sulfato de naringenina, foram encontrados no sangue e na urina em ratos (Liu et al., 2012). Além disso, a fração não absorvida desse flavonóide é transformada pela microflora intestinal em ácidos fenólicos (Liu et al., 2012) que enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (Naczek & Shahidi, 2004). Reconhecidamente, estas substâncias são antioxidantes de ocorrência natural, com marcada atividade inibitória sobre a oxidação lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos *in vitro* (Chen et al., 2010) e *in vivo* (Vanamala et al., 2006).

Existem evidências suficientes de que a carcinogênese pode ser inibida por diferentes compostos fenólicos (Master et al., 2012, Araújo et al., 2011). Embora tenha sido atribuído um possível efeito anticarcinogênico ao flavonóide Naringina em diferentes modelos murinos de câncer (Magnuson et al., 1993; Kanno et al., 2005), o papel desse flavonóide na prevenção e/ou tratamento do câncer colorretal ainda é pouco conhecido. Dessa forma, para esclarecer sua relevância e eficácia, o objetivo do estudo foi investigar o efeito da Naringina na formação de lesões pré-neoplásicas colorretais induzidas por carcinógeno químico em ratos.

## **Material e Métodos**

### ***Animais e modelo experimental***

Foram utilizados 35 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas, com 8 semanas de idade e peso inicial de  $130,8 \pm 27,1$  gramas fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Durante todo o experimento os animais foram alojados individualmente em caixas com sistema de ventilação automatizado (Ventilife Alesco<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil), mantidas em ambiente com temperatura ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade (60% - 70%) e luminosidade (12/12 h claro/escuro) controladas, recebendo água e ração *ad libitum*. Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais com 7 animais em cada grupo. Grupo 1 (controle): NaCl 0,9%; Grupo 2 (controle da indução): DMH + NaCl 0,9%; Grupo 3: DMH + Naringina (10 mg/kg); Grupo 4: DMH + Naringina (100 mg/kg); Grupo 5: DMH + Naringina (10 mg/kg). O estudo foi conduzido de acordo com as normas internacionalmente aceitas para o uso e cuidados com animais de laboratório, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da

Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde - UNIVIÇOSA (protocolo de aprovação 00002/2012-I).

A carcinogênese colorretal foi induzida por meio de uma injeção subcutânea de 1,2 dimetilhidrazina (Aldrich Chemical Co, Milwaukee, USA) na dose de 20 mg/kg a cada semana, durante 10 semanas (Larangeira et al., 1998). A partir da 11<sup>a</sup> semana, o flavonóide Naringina diluído em 700 µl de NaCl 0,9% (veículo) foi administrado por gavagem 3 vezes por semana, durante 14 semanas. Os animais dos grupos 1 e 2 receberam gavagem apenas com NaCl 0,9% (700 µl). O peso dos animais foi registrado semanalmente. Ao final das 25 semanas os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical sob anestesia (ketamina, 10 mg/kg; and xilazina 2 mg/kg i.p.) após jejum de 12 horas.

#### ***Determinação dos focos de criptas aberrantes***

Após a eutanásia o intestino grosso foi removido *in totum*, lavado em NaCl 0,9%, aberto longitudinalmente, e fixado durante 24 horas em placas de parafina contendo formol tamponado a 10%, pH= 7,2 (Bird 1987). Os intestinos foram medidos e divididos em três fragmentos iguais (cólon proximal, médio e distal + reto) em relação ao ceco. O reto foi avaliado juntamente com o cólon distal em todas as análises. Em seguida, foram corados com azul de metileno 0,1% por um minuto e lavados em tampão fosfato, pH=7,2, para análise microscópica. Para identificação e quantificação dos focos de criptas aberrantes (FCA), a superfície mucosa do intestino grosso foi observada a partir dos fragmentos intactos do intestino com auxílio de microscópio de luz (Olympus BX-60<sup>®</sup>, Tóquio, Japan), com lente objetiva de 10 vezes (Bird 1987, 1995). Toda a área intestinal foi avaliada e a categorização dos FCA foi realizada mediante a determinação da frequência observada de criptas aberrantes em cada foco. Dessa forma, as categorias

estabelecidas incluíram focos com 1, 2, 3, 4 a 10, acima de 10 criptas aberrantes, e tumor.

### ***Análise histopatológica histoquímica e histomorfométrica***

Após a análise dos FCA, os fragmentos intestinais foram descorados com lavagens sucessivas em etanol 50%, desidratados em etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Foram obtidos cortes de 4 $\mu$ m de espessura em micrótomo rotativo (Leica Multicut 2045<sup>®</sup>, Reichert-Jung Products, Alemanha) que foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para caracterização morfológica geral do tecido, Alcian blue (AB) e Ácido Periódico de Schiff (PAS) para marcação de células mucossecretoras (Yoshimi et al., 2004; Meira et al., 2008). Para evitar a análise da mesma área histológica, foram utilizados 1 a cada 20 cortes do tecido. Os cortes foram visualizados e as imagens capturadas por meio de um microscópio de luz (Olympus BX-60<sup>®</sup>, Tóquio, Japan) conectado a uma câmera digital (Olympus QColor-3<sup>®</sup>, Tokyo, Japan). Para cada coloração e grupo investigado, foram obtidos aleatoriamente sessenta campos microscópicos com objetiva de 40 vezes de aumento, de modo que uma área total de 8,27x10<sup>5</sup> $\mu$ m<sup>2</sup> foi analisada para cada segmento intestinal.

Os parâmetros histopatológicos analisados foram a presença de displasia tecidual, dilatação de criptas e morfologia dos enterócitos (Meira et al., 2008). A partir de secções longitudinais corada com H&E, foram determinados os parâmetros morfométricos de comprimento e largura das criptas. Em secções transversais foi determinada a área das criptas e do seu lúmen. O volume das criptas e do lúmen foi estimado multiplicando o comprimento das criptas pela área das criptas e área do lúmen, respectivamente. Em secções transversais coradas com AB e PAS foi determinado o número de células mucossecretoras por unidade de área histológica. Nessas mesmas

secções, a densidade de volume (Vv) ocupada por mucinas ácidas (AB+) e neutras (PAS+) na área histológica foi estimada por contagem de pontos usando a seguinte fórmula:  $Vv [AB+, PAS+] = P_P [AB+, PAS+] / P_T$ ; onde  $P_P$  é o número de pontos que incidem sobre cada tipo de mucina e  $P_T$  é o número total de pontos de teste. Para essa análise foi utilizado um sistema de teste com 72 pontos aplicados sobre uma área histológica padronizada de  $20,0 \times 10^3 \mu\text{m}^2$  (Mandarim-de-Lacerda, 2003).

A marcação das regiões organizadoras de nucléolo (AgNORs) foi realizada por meio do método descrito por Howell and Black, (1980). Brevemente, cortes de  $4 \mu\text{m}$  dos três segmentos intestinais foram incubados com solução de prata coloidal na ausência de luz durante 60 minutos a temperatura ambiente. AgNORs foram visualizados em microscópio de luz (Olympus BX-60<sup>®</sup>, Tóquio, Japan) com aumento de 1000 vezes e contadas em núcleos de 90 enterócitos amostrados aleatoriamente em 30 criptas intestinais de cada segmento intestinal para cada animal. Os resultados foram expressos para todo o intestino como o número de AgNORs por núcleo. Toda a análise histomorfométrica foi realizada por meio do software Image Pro-plus 4.5<sup>®</sup> (Media Cybernetcs, Silver Spring, MD, USA).

#### ***Microanálise de elementos químicos***

Fragmentos dos três segmentos intestinais (proximal, médio e distal + reto) foram dissecados, desidratados em etanol e submetidos à secagem ao ponto crítico (CPD 030, Bal-tec, Witten, North Rhine-Westphalia, Alemanha). O conteúdo e a distribuição dos elementos químicos foram investigados por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EED) usando um microscópio eletrônico de varredura (Leo 1430VP, Zeiss, Jena, Alemanha) acoplado a um detector de Raios-X (Tracor TN5502, Middleton, WI, EUA). Foi utilizado um aumento de 300 vezes, voltagem de aceleração de 20 kV e

distância de trabalho de 19 mm. Para cada grupo foi investigada uma área total de  $36.18 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  em cada segmento do cólon. A proporção dos elementos carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O), flúor (F), sódio (Na), magnésio (Mg), fósforo (P), enxofre (S), cloro (Cl), potássio (K), cálcio (Ca), manganês (Mn), ferro (Fe), cobre (Cu) selênio (Se) e Zinco (Zn) foi mensurada e expressa como o valor médio para todo o intestino.

### **Análise bioquímica**

Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca no momento da eutanásia. O sangue foi centrifugado e o soro utilizado para dosagem bioquímica de albumina, proteínas totais, glicose, colesterol e triacilgliceróis (Alizè<sup>®</sup>, França).

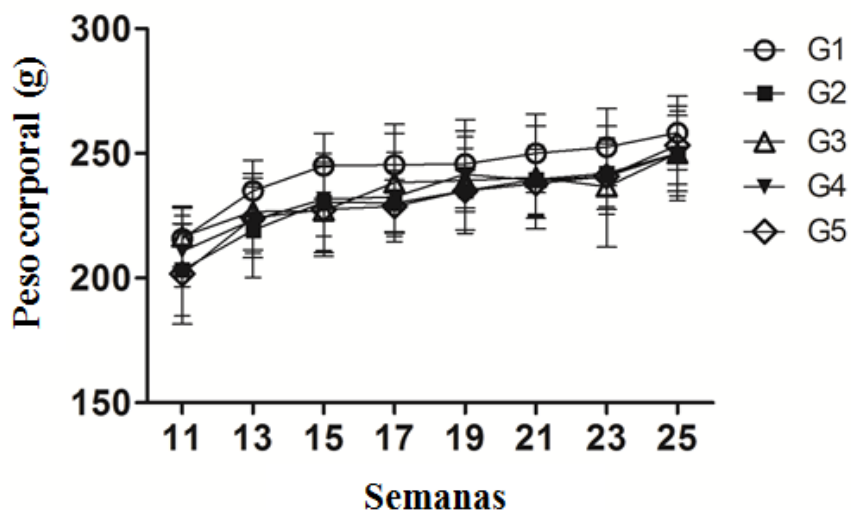
### **Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (média  $\pm$  DP). Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks) seguidos pelo teste de Dunnett. Resultados com valor  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## **Resultados**

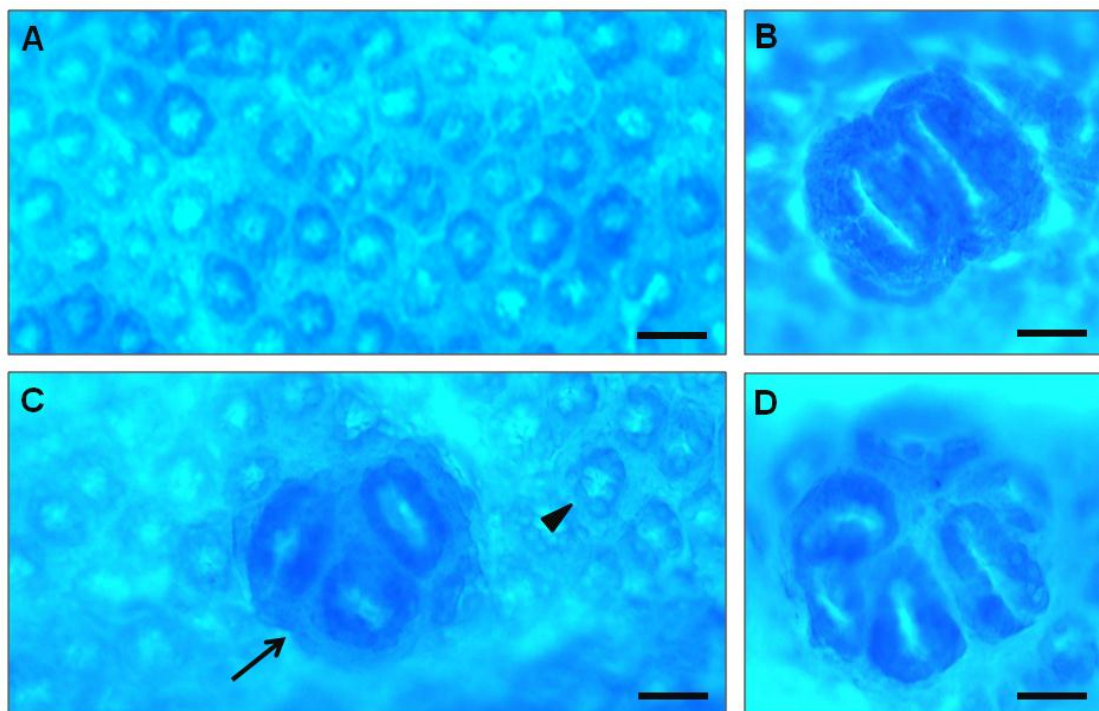
### ***Análise biométrica e dos focos de criptas aberrantes***

Não houve diferença significativa no peso corporal (Figura 1) e comprimento intestinal (dados não mostrados) entre os grupos após as 25 semanas de experimento.



**Figura 1.** Evolução do peso corporal de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Naringina. G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Naringina (10 mg/kg); G4, DMH + Naringina (100 mg/kg); G5, DMH + Naringina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \* vs. G1, † vs G2.

A análise da superfície da mucosa intestinal demonstrou a presença de FCA em todos os segmentos investigados nos grupos expostos à DMH. Os FCA apresentaram-se distribuídos ao longo de toda a superfície intestinal. Diferentes níveis de desenvolvimento dos FCA foram observados, com predomínio de focos contendo entre 1 e 3 criptas aberrantes circundadas por criptas normais, distribuídos principalmente no cólon médio e distal (Figura 2).



**Figura 2.** Fotomicrografias representativas de criptas do cólon distal de ratos saudáveis (A) e expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) (B, C e D) obtidas por montagem total do intestino. No painel (A) são observadas criptas normais homogeneamente distribuídas. Nos animais expostos à DMH são identificados focos com 2 (B), 3 (C) e 6 (D) criptas aberrantes, caracterizadas por dilatação do epitélio de revestimento intestinal e protrusão em direção à luz intestinal. No painel (C) são observadas criptas normais (cabeça de seta) ao redor do foco de cripta aberrante (seta) (Coloração Azul de Metileno, barras = 40  $\mu$ m).

A quantificação das lesões da mucosa mostrou aumento do número de FCA nos três segmentos intestinais em todos os grupos expostos à DMH, especialmente em G2. De modo geral, foi observado que todas as doses administradas de Naringina promoveram redução significativa do número total de criptas aberrantes por foco em relação à G2. Para todos os segmentos intestinais os melhores resultados foram observados em G5. Em todos os grupos tratados com o flavonoide, a redução dos FCA foi mais acentuada nos cólons médio e proximal. Foi observada baixa frequência de

tumores nos animais expostos à DMH. Os tratamentos com o flavonóide nem sempre foram eficientes na redução do número destes tumores (Tabela 1).

**Tabela 1.** Análise dos focos de criptas aberrantes no intestino grosso de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonoide Naringina.

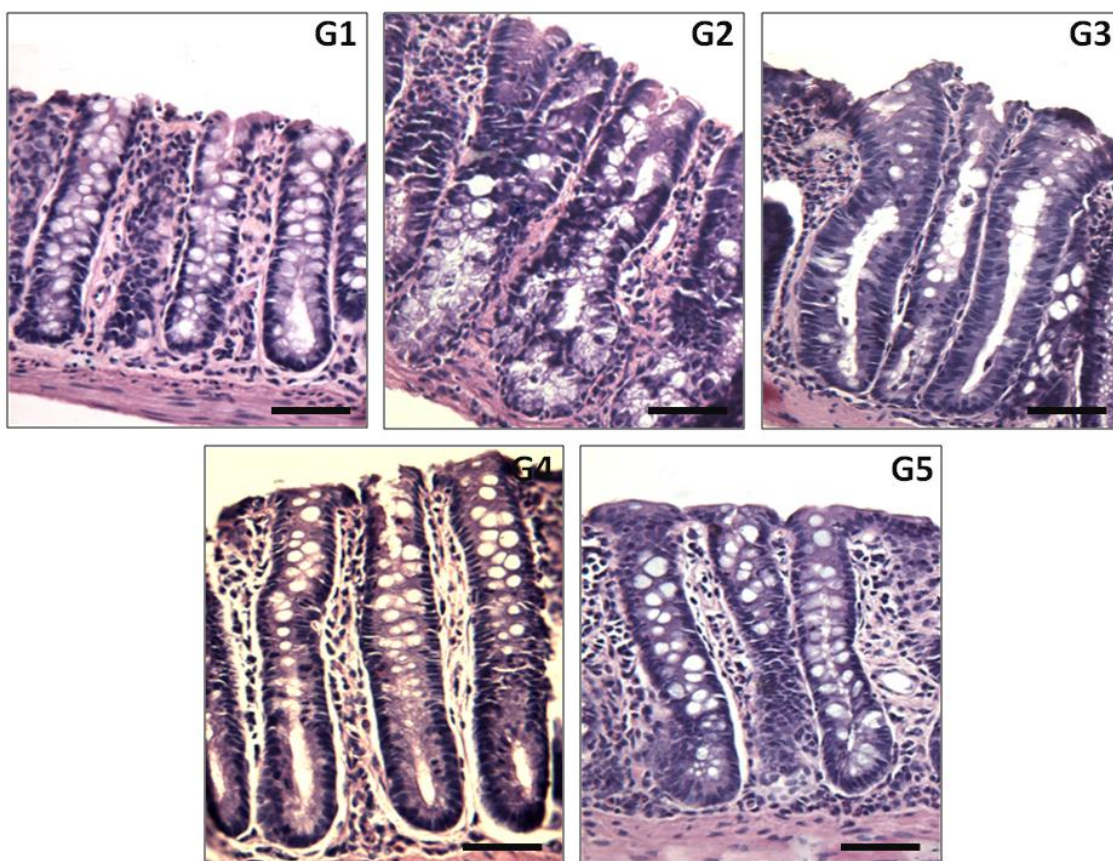
Segmento intestinal / Número de cripta aberrante por foco	G1	G2	G3	G4	G5
<b>Proximal</b>					
1	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.1*	18.7 ± 5.5* <sup>†</sup>	20.2 ± 7.8* <sup>†</sup>	7.7 ± 4.6* <sup>†</sup>
2	0.0 ± 0.0	12.3 ± 4.7*	3.3 ± 2.3* <sup>†</sup>	3.0 ± 1.3* <sup>†</sup>	1.7 ± 1.3* <sup>†</sup>
3	0.0 ± 0.0	5.3 ± 1.4*	2.4 ± 1.1* <sup>†</sup>	1.3 ± 0.5* <sup>†</sup>	0.3 ± 0.1* <sup>†</sup>
4 to 10	0.0 ± 0.0	3.0 ± 1.0*	1.6 ± 1.1*	0.5 ± 0.1* <sup>†</sup>	0.2 ± 0.1* <sup>†</sup>
> 10	0.0 ± 0.0	1.3 ± 0.4*	0.0 ± 0.0 <sup>†</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>†</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>†</sup>
Tumor	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.1*	0.0 ± 0.0 <sup>†</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>†</sup>	0.2 ± 0.1* <sup>†</sup>
<b>Médio</b>					
1	0.3 ± 0.1	55.3 ± 9.3*	59.5 ± 10.5*	61.2 ± 16.5*	38.0 ± 6.3* <sup>†</sup>
2	0.2 ± 0.1	10.7 ± 3.5*	4.5 ± 2.4* <sup>†</sup>	14.4 ± 7.0*	6.3 ± 2.7*
3	0.0 ± 0.0	6.7 ± 1.0*	10.8 ± 4.1*	5.5 ± 1.4*	2.0 ± 0.9* <sup>†</sup>
4 to 10	0.0 ± 0.0	9.7 ± 3.4*	5.7 ± 1.3* <sup>†</sup>	12.6 ± 3.0*	3.7 ± 1.2* <sup>†</sup>
> 10	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.1* <sup>†</sup>	0.2 ± 0.1* <sup>†</sup>	0.2 ± 0.1* <sup>†</sup>
Tumor	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.2	0.0 ± 0.0 <sup>†</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>†</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>†</sup>
<b>Distal</b>					
1	0.5 ± 1.2	28.3 ± 20.5*	86.8 ± 40.2*	66.0 ± 22.0*	58.2 ± 16.0*
2	0.0 ± 0.0	9.8 ± 4.1*	8.8 ± 2.9*	6.0 ± 4.2*	8.2 ± 6.1*
3	0.2 ± 0.4	4.5 ± 2.2*	5.8 ± 2.0*	4.4 ± 1.3*	3.0 ± 1.4*
4 to 10	0.0 ± 0.0	4.7 ± 2.4*	3.7 ± 1.8*	5.0 ± 2.7*	2.0 ± 1.0*
> 10	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.1* <sup>†</sup>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Tumor	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.1*	0.2 ± 0.1* <sup>†</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>†</sup>	0.2 ± 0.1* <sup>†</sup>

Valores expressos como média e desvio-padrão (média ± DP). G1(sadio), NaCl 0,9%;

G2, (controle da indução) DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Naringina (10 mg/kg); G4, DMH + Naringina (100 mg/kg); G5, DMH + Naringina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \* vs. G1, <sup>†</sup> vs G2.

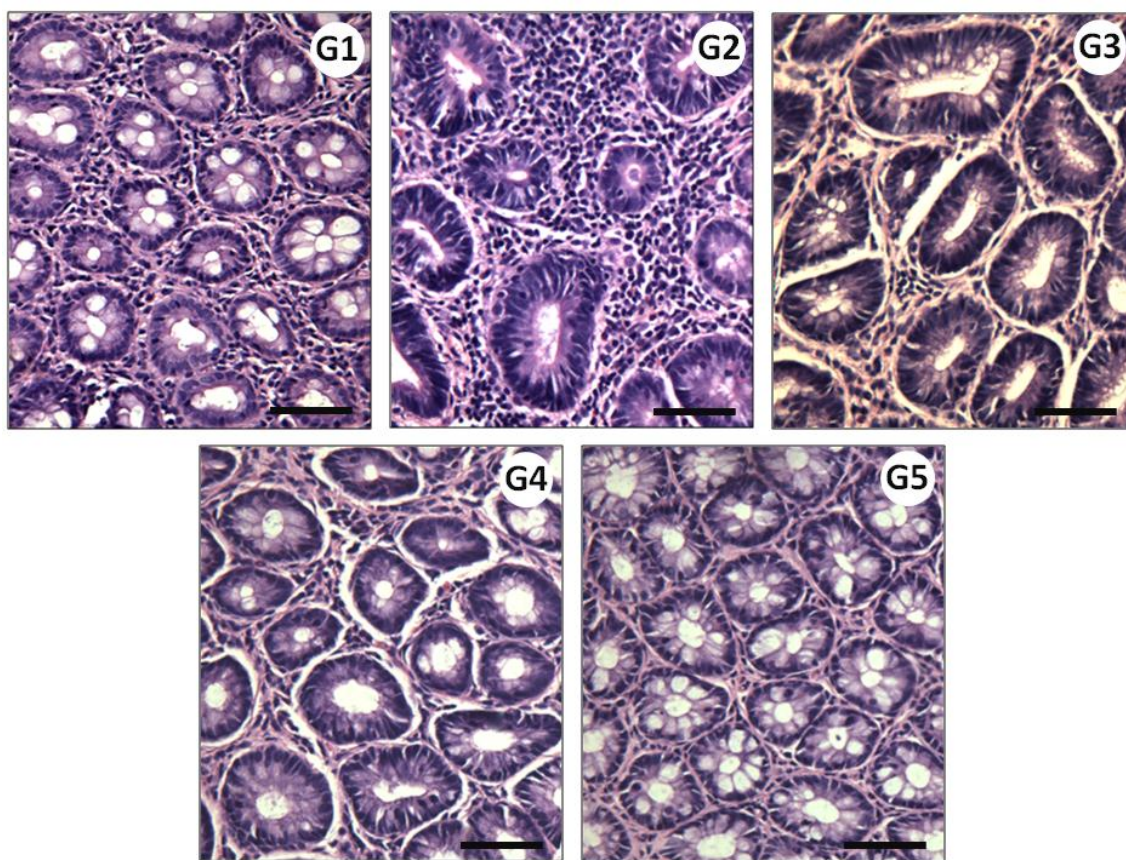
### *Análise histopatológica, histoquímica e histomorfométrica*

A análise histopatológica indicou a presença de marcada reorganização morfológica das criptas intestinais. Em G2 e G3 foram observadas criptas hipertrofiadas com intensa displasia, principalmente no terço basal. Nesses grupos, houve hipertrofia e aumento da densidade de enterócitos com citoplasma e núcleo alongados, marcada redução da densidade de células caliciformes em toda a extensão das criptas, e dilatação do espaço luminal. Em G4 e G5 houve evidente redução da displasia das criptas, com a presença de enterócitos alongados, e espaço luminal variando de moderadamente (G4) à levemente (G5) dilatado (Figuras 3 e 4).



**Figura 3.** Fotomicrografias representativas de secções longitudinais de criptas do cólon distal de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Naringina. Animais saudáveis (G1) apresentaram criptas normais com lúmen estreito e elevada densidade de

células caliciformes. Em G2 e G3 são observadas criptas com intensa displasia com enterócitos alongados, principalmente na base das criptas, e reduzida densidade de células caliciformes. Em G4 são observadas criptas alongadas com as bases levemente dilatadas. Em G5 são mostradas criptas semelhantes à G1 (Coloração H&E, barra = 50  $\mu$ m). G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Naringina (10 mg/kg); G4, DMH + Naringina (100 mg/kg); G5, DMH + Naringina (200 mg/kg).



**Figura 4.** Fotomicrografias representativas secções transversais de criptas do cólon distal de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Naringina. Em G1 as criptas intestinais apresentam estrutura normal com formato circular ou oval e lúmen estreito. Em G2 e G3 são mostradas criptas displásicas com lúmen dilatado e enterócitos alongados. Em G4 e G5 são observadas criptas moderadamente dilatadas. Em G5 são mostradas criptas levemente dilatadas com lúmen estreito (Coloração H&E, barra = 60  $\mu$ m). G1(sadio), NaCl

0,9%; G2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Naringina (10 mg/kg); G4, DMH + Naringina (100 mg/kg); G5, DMH + Naringina (200 mg/kg).

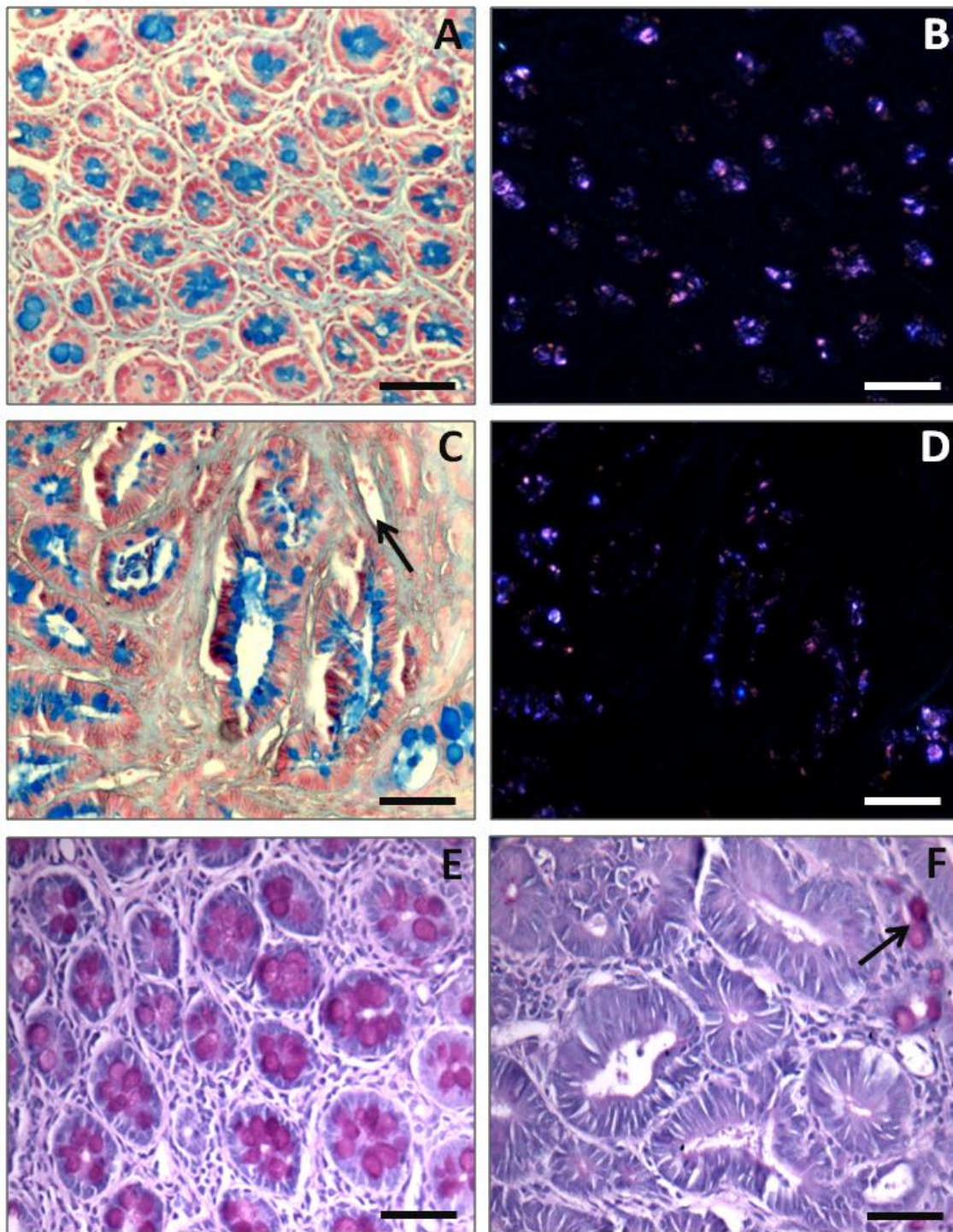
A análise histomorfométrica das criptas mostrou aumento significativo de todos os parâmetros avaliados em G2 em relação à G1 nos três segmentos do cólon. De forma geral, todos os grupos tratados apresentaram redução dos parâmetros avaliados em relação à G2, principalmente no cólon proximal. Independentemente do segmento intestinal analisado, G3 não apresentou diferença estatística em nenhum parâmetro morfométrico comparado à G2. Esses parâmetros foram significativamente inferiores em todos os segmentos intestinais em G5 comparados à G2 (tabela 2).

**Tabela 2.** Análise morfométrica de criptas do intestino grosso de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Naringina.

Segmento intestinal	Largura ( $\mu\text{m}$ )	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Área da cripta ( $\mu\text{m}^2$ )	Área do lúmen ( $\mu\text{m}^2$ )	Volume da cripta ( $\mu\text{m}^3$ )x10 <sup>3</sup>	Volume do lúmen ( $\mu\text{m}^3$ )x10 <sup>3</sup>
<i>Proximal</i>						
G1	208.6 ± 38.1	35.4 ± 6.7	1773.8 ± 581.5	179.2 ± 51.6	423.15 ± 87.0	40.7 ± 8.3
G2	333.9 ± 36.7*	69.9 ± 16.3*	3730.2 ± 662.6*	454.1 ± 65.8*	700.3 ± 99.2*	104.5 ± 20.4*
G3	262.0 ± 45.3	44.0 ± 10.7	2618.4 ± 697.7	332.8 ± 67.7*	567.7 ± 70.1	83.3 ± 11.3*
G4	258.3 ± 17.8 <sup>†</sup>	38.4 ± 7.0 <sup>†</sup>	1982.0 ± 629.1 <sup>†</sup>	145.1 ± 51.6 <sup>†</sup>	453.2 ± 85.3 <sup>†</sup>	33.1 ± 9.4 <sup>†</sup>
G5	221.6 ± 40.5 <sup>†</sup>	39.6 ± 7.6 <sup>†</sup>	2110.7 ± 546.3 <sup>†</sup>	131.5 ± 50.2 <sup>†</sup>	422.9 ± 76.1 <sup>†</sup>	29.9 ± 8.6 <sup>†</sup>
<i>Médio</i>						
G1	250.8 ± 35.0	34.2 ± 8.4	1678.3 ± 401.8	167.0 ± 70.0	360.9 ± 62.4	40.9 ± 10.7
G2	385.9 ± 58.5*	66.7 ± 10.3*	3116.8 ± 705.7*	525.3 ± 125.7*	902.5 ± 115.9*	116.1 ± 27.8*
G3	300.2 ± 50.9	55.4 ± 6.1*	2813.9 ± 518.4*	348.3 ± 100.1*	722.7 ± 103.0*	87.9 ± 16.4*
G4	270.7 ± 35.9 <sup>†</sup>	52.1 ± 7.2*	1940.9 ± 443.2 <sup>†</sup>	323.0 ± 67.2	598.2 ± 85.8* <sup>†</sup>	64.4 ± 9.3* <sup>†</sup>
G5	250.4 ± 33.1 <sup>†</sup>	45.2 ± 7.0 <sup>†</sup>	1817.5 ± 494.7 <sup>†</sup>	228.2 ± 88.7 <sup>†</sup>	562.7 ± 90.0* <sup>†</sup>	45.9 ± 8.1 <sup>†</sup>
<i>Distal</i>						
G1	251.2 ± 26.2	34.2 ± 5.5	1507.1 ± 437.0	106.6 ± 52.1	409.1 ± 87.3	31.7 ± 7.1
G2	389.8 ± 45.1*	65.9 ± 11.1*	2807.4 ± 449.3*	308.9 ± 88.5*	825.7 ± 120.9*	75.7 ± 14.5*
G3	342.8 ± 31.4*	60.0 ± 8.6*	2550.4 ± 508.2*	286.7 ± 67.1*	712.1 ± 91.7*	64.8 ± 10.7*
G4	314.5 ± 47.3*	52.8 ± 6.9*	2031.0 ± 599.2*	235.2 ± 52.8*	669.5 ± 106.5*	53.2 ± 10.2*
G5	240.2 ± 40.5 <sup>†</sup>	42.3 ± 9.1 <sup>†</sup>	1678.7 ± 459.6 <sup>†</sup>	114.0 ± 52.9 <sup>†</sup>	451.2 ± 82.9 <sup>†</sup>	47.3 ± 9.5 <sup>†</sup>

Valores expressos como média e desvio-padrão (média ± DP). G1(sadio), NaCl 0,9%; G2, (controle da indução) DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Naringina (10 mg/kg); G4, DMH + Naringina (100 mg/kg); G5, DMH + Naringina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \* vs. G1, <sup>†</sup> vs G2.

A análise histoquímica indicou redução significativa da expressão de mucinas ácidas e neutras e da densidade de células mucossecretoras nas criptas de todos os segmentos intestinais em G2 e G3 comparado à G1. Em G4 e G5 a expressão de mucinas e a densidade de células caliciformes foram significativamente maiores comparados à G2. Em G5 o número de células mucossecretoras foi similar, enquanto a proporção da área histológica ocupada por mucinas foi inferior ao observado em G1, respectivamente (Figura 5 e Tabela 3).



**Figura 5.** Distribuição de células produtoras de mucinas ácidas (A, B, C e D) e neutras (E e F) nas criptas do cólon distal de ratos sadios (G1) e expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) (G2). O painel (A e E) mostra ampla densidade e distribuição homogênea de células caliciformes nas criptas de animal sadio (A, coloração Alcian blue, barra = 110  $\mu\text{m}$ ; E, coloração Ácido Periódico de Schiff e Hematoxilina, barra = 70  $\mu\text{m}$ ). No painel (B) a mesma

imagem (A) é observada sob luz polarizada. Notar a polarização e distribuição uniforme do muco por toda a área tecidual (barra = 110  $\mu\text{m}$ ). No painel (C) são observadas criptas displásicas dilatadas de um animal exposto à DMH. Notar a reduzida densidade de criptas e células caliciformes, e a maior área ocupada por tecido conjuntivo circundando as criptas apresentando vasos sanguíneos (seta) (coloração Alcian blue, barra = 110  $\mu\text{m}$ ). (D) Redução da área ocupada pelo muco é claramente observada na imagem sob luz polarizada (barra = 110  $\mu\text{m}$ ). Em (F) criptas displásicas com epitélio hipertrófico apresentam drástica redução de células caliciformes (seta) (coloração Ácido Periódico de Schiff e Hematoxilina, barra = 70  $\mu\text{m}$ ).

**Tabela 3.** Distribuição de células produtoras de mucinas ácidas e neutras nas criptas do cólon de ratos sadios e expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH).

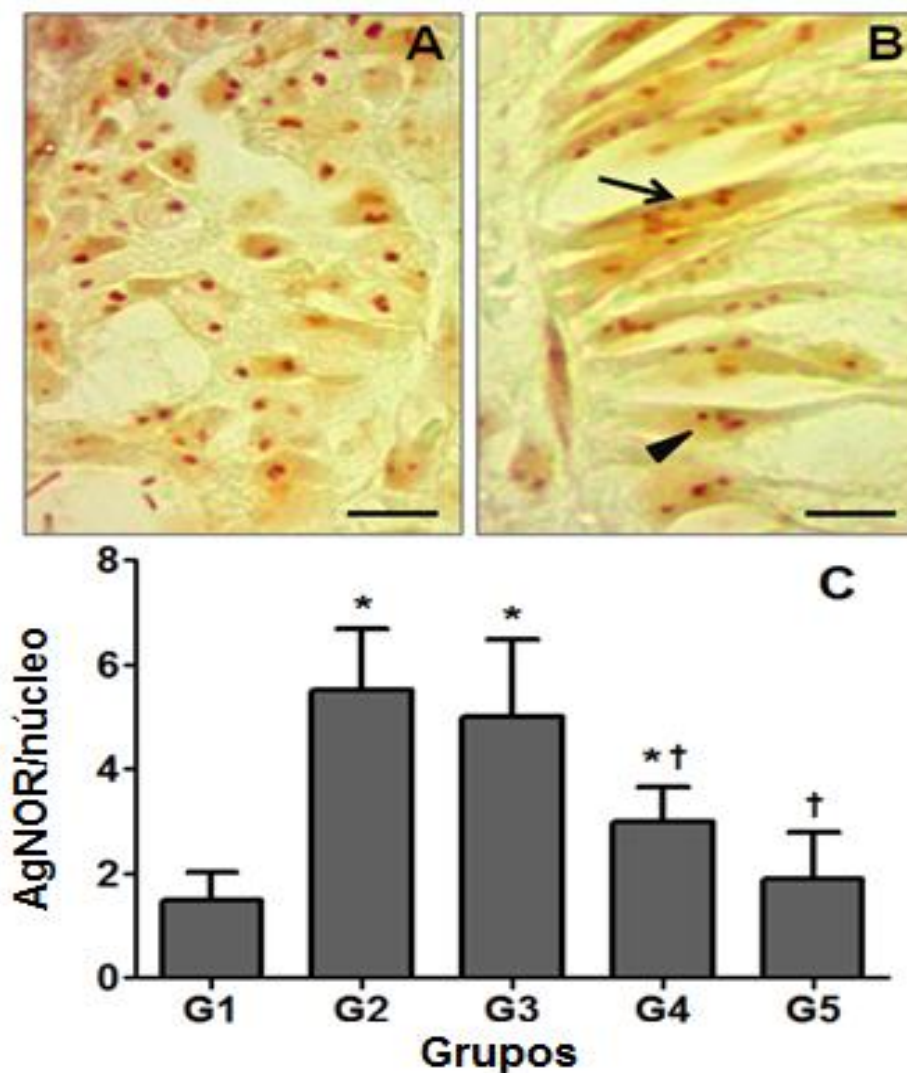
Segmento intestinal	Células AB+ (N/mm <sup>2</sup> )	Vv[Mucinas ácidas] (%) <sup>‡</sup>	Células PAS+ (N/mm <sup>2</sup> )	Vv[Mucinas neutras] (%) <sup>‡</sup>
<b><i>Proximal</i></b>				
G1	512.8 ± 62.1	35.0 ± 6.5	481.3 ± 55.7	33.1 ± 7.0
G2	277.1 ± 50.6*	11.1 ± 5.2*	225.8 ± 48.2*	10.4 ± 5.8*
G3	318.5 ± 53.9*	11.9 ± 4.9*	289.1 ± 45.1*	12.6 ± 5.1*
G4	449.7 ± 64.0 <sup>†</sup>	22.5 ± 5.0* <sup>†</sup>	383.2 ± 50.8 <sup>†</sup>	23.7 ± 5.3 <sup>†</sup>
G5	465.3 ± 61.7 <sup>†</sup>	27.4 ± 6.0 <sup>†</sup>	443.3 ± 59.3 <sup>†</sup>	28.6 ± 5.7 <sup>†</sup>
<b><i>Médio</i></b>				
G1	617.4 ± 70.4	36.2 ± 6.9	535.9 ± 61.3	35.0 ± 6.7
G2	312.8 ± 60.4*	12.8 ± 4.7*	328.1 ± 50.1*	11.2 ± 3.8*
G3	398.7 ± 57.8*	13.6 ± 5.3*	379.5 ± 49.5*	14.1 ± 4.5*
G4	491.3 ± 60.1 <sup>†</sup>	25.1 ± 5.8 <sup>†</sup>	450.1 ± 55.7 <sup>†</sup>	22.1 ± 6.3 <sup>†</sup>
G5	573.1 ± 57.2 <sup>†</sup>	28.3 ± 6.5 <sup>†</sup>	482.6 ± 50.3 <sup>†</sup>	27.9 ± 6.9 <sup>†</sup>
<b><i>Distal</i></b>				
G1	702.5 ± 88.3	39.3 ± 6.1	685.7 ± 57.9	36.8 ± 6.5
G2	421.3 ± 61.1*	12.5 ± 4.7*	373.2 ± 65.8*	11.3 ± 5.4*
G3	447.9 ± 50.4*	15.0 ± 6.2*	392.8 ± 57.5*	12.8 ± 4.0*
G4	476.2 ± 55.1* <sup>†</sup>	22.7 ± 5.4* <sup>†</sup>	548.6 ± 60.2*	20.6 ± 6.1* <sup>†</sup>
G5	660.8 ± 70.6 <sup>†</sup>	26.5 ± 5.3* <sup>†</sup>	613.1 ± 55.8 <sup>†</sup>	25.3 ± 4.1* <sup>†</sup>

AB+, células positivas ao Alcian blue; PAS+, células positivas ao Ácido Periódico de Schiff.

(%)<sup>‡</sup> percentual da área histológica ocupado pelos tipos de mucina. Valores expressos como média e desvio-padrão (média ± DP). G1(sadio), NaCl 0,9%; G2, (controle da indução)

DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Naringina (10 mg/kg); G4, DMH + Naringina (100 mg/kg); G5, DMH + Naringina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \* vs. G1, † vs G2.

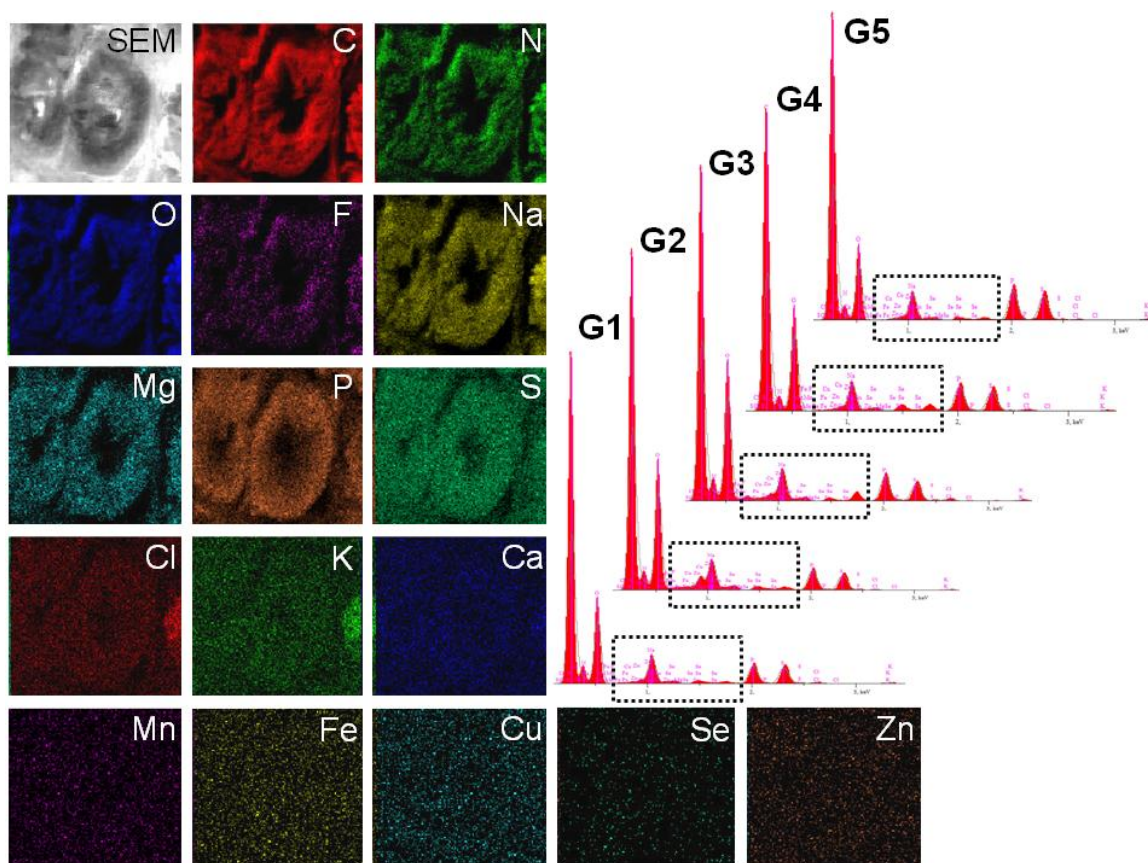
Para todos os segmentos intestinais investigados nos grupos G2 e G3, houve aumento significativo do número de regiões organizadoras de nucléolo por núcleo de enterócitos (AgNORs/núcleo) comparados à G1. Em G4 e G5 o número AgNORs/núcleo foi significativamente menor comparados à G2. Não houve diferença estatística nesse parâmetro entre G1 e G5 (Figura 6).



**Figura 6.** Regiões organizadoras de nucléolo argirófilas (AgNORs) em enterócitos de ratos expostos a 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Naringina. (A) Fotomicrografia representativa do grupo sadio (G1) indicando núcleos celulares ovóides com uma ou duas AgNORs (barra = 15 $\mu$ m). Em (B) são observados núcleos celulares alongados com três (cabeça de seta) a sete (seta) AgNORs em animais expostos à DMH (G2) (barra = 15 $\mu$ m). (C) Número de AgNORs por núcleo de enterócitos em todos os grupos investigados. Valores expressos como média e desvio-padrão (média  $\pm$  DP) para todo o intestino. G1(sadio), NaCl 0,9%; G2, (controle da indução) DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Naringina (10 mg/kg); G4, DMH + Naringina (100 mg/kg); G5, DMH + Naringina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \* vs. G1, † vs G2.

### *Análise bioquímica e de elementos químicos*

A análise de EED indicou distribuição homogênea dos elementos químicos na superfície da mucosa em todos os segmentos intestinais investigados, tanto sobre o tecido displásico dos FCA (Figura 7) quanto sobre o tecido normal (dados não mostrados). A quantificação dos elementos químicos indicou redução significativa nos níveis teciduais de Mg, Mn, Cu, Se, e Zn; e aumento significativo de Cl, Fe, Na, e K em G2 e G3 comparado à G1, respectivamente. Em G4 e G5 os níveis de Mg, Mn, Cu, Se, e Zn foram significativamente superiores; enquanto os níveis de Cl, Fe, Na, e K foram significativamente inferiores ao observado em G2, com os melhores resultados encontrados em G5, o qual foi similar à G1 (Figura 7 e Tabela 4).



**Figura 7.** Distribuição de elementos químicos no epitélio do intestino grosso de ratos expostos a 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Naringina. As imagens representam o mapa de distribuição dos diferentes elementos químicos em um foco com duas

criptas aberrantes no cólon distal de uma animal do grupo 2. Notar a homogeneidade na distribuição mineral. Os gráficos constituem os espectros representativos dos elementos químicos analisados no cólon distal em todos os grupos investigados. A área tracejada indica os picos referentes aos minerais que participam em processos oxidativos/antioxidantes. G1(sadio), NaCl 0,9%; G2, (controle da indução) DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Naringina (10 mg/kg); G4, DMH + Naringina (100 mg/kg); G5, DMH + Naringina (200 mg/kg).

**Tabela 4.** Conteúdo de elementos químicos no epitélio do intestino grosso de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Naringina.

Elementos	Concentração [%]				
	G1	G2	G3	G4	G5
<b>C</b>	37.5 ± 6.3	37.8 ± 5.7	38.1 ± 6.0	39.2 ± 5.9	40.8 ± 4.6
<b>N</b>	8.1 ± 2.0	8.9 ± 1.8	9.1 ± 1.3	7.7 ± 1.1	8.5 ± 1.5
<b>O</b>	34.5 ± 5.4	35.3 ± 4.9	35.9 ± 5.1	35.5 ± 4.6	34.1 ± 4.2
<b>F</b>	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.2
<b>Na</b>	3.7 ± 0.3	5.4 ± 0.8*	5.0 ± 0.6*	4.4 ± 0.5	4.0 ± 0.5 <sup>†</sup>
<b>Mg</b>	1.0 ± 0.1	0.3 ± 0.1*	0.4 ± 0.1*	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.1* <sup>†</sup>
<b>P</b>	1.5 ± 0.2	2.0 ± 0.6	1.7 ± 0.4	1.9 ± 0.4	2.0 ± 0.7
<b>S</b>	1.6 ± 0.3	2.9 ± 0.6*	1.8 ± 0.6	2.3 ± 0.6	2.0 ± 0.5
<b>Cl</b>	0.1 ± 0.1	0.6 ± 0.1*	0.5 ± 0.1*	0.4 ± 0.1*	0.2 ± 0.1 <sup>†</sup>
<b>K</b>	0.1 ± 0.1	1.0 ± 0.3*	0.7 ± 0.2*	0.8 ± 0.3*	0.3 ± 0.1 <sup>†</sup>
<b>Ca</b>	3.0 ± 0.6	2.5 ± 0.5	2.7 ± 0.1	2.9 ± 0.6	2.7 ± 0.7
<b>Mn</b>	1.1 ± 0.3	0.1 ± 0.1*	0.2 ± 0.1*	0.5 ± 0.1* <sup>†</sup>	0.9 ± 0.3 <sup>†</sup>
<b>Fe</b>	0.2 ± 0.1	1.6 ± 0.5*	1.7 ± 0.5*	0.9 ± 0.1* <sup>†</sup>	0.4 ± 0.2 <sup>†</sup>
<b>Cu</b>	1.1 ± 0.3	0.4 ± 0.2*	0.6 ± 0.1*	0.8 ± 0.1 <sup>†</sup>	1.1 ± 0.1
<b>Zn</b>	1.0 ± 0.2	0.4 ± 0.1*	0.4 ± 0.2*	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.2 <sup>†</sup>
<b>Se</b>	0.9 ± 0.2	0.1 ± 0.1*	0.3 ± 0.1*	0.5 ± 0.1* <sup>†</sup>	0.8 ± 0.2

Valores expressos como média e desvio-padrão (média ± DP) para todo o intestino.

G1(sadio), NaCl 0,9%; G2, (controle da indução) DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Naringina (10 mg/kg); G4, DMH + Naringina (100 mg/kg); G5, DMH + Naringina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \* vs. G1, <sup>†</sup> vs G2.

Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos entre grupos investigados, com exceção dos níveis séricos de proteínas totais, os quais foram significativamente reduzidos (18,1%) em G2 comparado à G1 e aumentados (23,02 %) em G5 comparado à G2 (Tabela 5).

**Tabela 5.** Parâmetros bioquímicos séricos de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Naringina.

Grupos	Proteínas totais		Albumina		Triacilgliceróis		Colesterol		Glicose	
	Conteúdo médio (g/dL)	Variação (%)	Conteúdo médio (g/dL)	Variação (%)	Conteúdo médio (mg/dL)	Variação (%)	Conteúdo médio (mg/dL)	Variação (%)	Conteúdo médio (mg/dL)	Variação (%)
<b>G1</b>	81.7 ± 3.7	-	3.6 ± 0.5	-	180.2 ± 24.3	-	58.2 ± 14.1	-	105.6 ± 33.1	-
<b>G2</b>	66.9 ± 11.0*	- 18,1*	3.5 ± 0.5	- 2,8	161.0 ± 58.9	- 10,6	58.9 ± 16.2	+ 1,2	116.8 ± 28.4	+ 10,6
<b>G3</b>	79.2 ± 6.9	- 3,0	3.8 ± 0.2	+ 5,5	129.4 ± 22.9	- 28,2	73.8 ± 7.7	+ 26,8	138.9 ± 26.2	+ 31,5
<b>G4</b>	77.7 ± 4.5	- 4,9	3.7 ± 0.3	+ 2,7	157.1 ± 63.1	- 12,8	67.8 ± 6.8	+ 16,5	149.0 ± 30.4	+ 41,1
<b>G5</b>	82.3 ± 4.9 <sup>†</sup>	+ 0,7 <sup>†</sup>	3.9 ± 0.2	+ 8,3	143.0 ± 77.6	- 20,6	74.5 ± 8.9	+ 28	127.4 ± 21.7	+ 20,7

Valores expressos como média e desvio-padrão (média ± DP). G1(sadio), NaCl 0,9%; G2, (controle da indução) DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH +

Naringina (10 mg/kg); G4, DMH + Naringina (100 mg/kg); G5, DMH + Naringina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \* vs. G1, <sup>†</sup> vs G2.

## **Discussão**

No presente estudo foi investigado o efeito do flavonóide Naringina em lesões pré-neoplásicas colorretais induzidas por carcinógeno químico. Os resultados demonstraram que o tratamento com o flavonóide contribuiu parcialmente para a reorganização morfológica do epitélio intestinal, reduzindo a formação dos FCA, o número total de criptas aberrantes por foco, o número de AgNORs/núcleo em enterócitos, a intensidade de displasia do epitélio das criptas, e aumentando a expressão de muco e a densidade de suas células produtoras.

A redução dos FCA nos ratos tratados foi mais expressiva no cólon médio e proximal, caracterizando a maior sensibilidade destes segmentos ao tratamento com o flavonóide Naringina. Além dos efeitos sistêmicos, existem evidências que indicam uma atuação local dos flavonóides na superfície da mucosa do intestino grosso, principalmente nos segmentos iniciais. Sugere-se que esse evento esteja relacionado à degradação progressiva e inativação dos compostos flavônicos ao longo do trânsito intestinal, com maior taxa de degradação nos segmentos distais do intestino (Larangeira et al., 1998; Wolfram et al., 2002). Também deve ser considerada uma maior susceptibilidade da mucosa colônica distal à DMH. Essa característica pode ser associada com a maior taxa segmentar de renovação celular, determinada pelo microambiente intestinal que expõe a mucosa distal ao contato com elevados níveis de toxinas derivadas da digestão dos alimentos e metabolismo bacteriano, assim como forças físicas abrasivas decorrentes do transporte e armazenamento de material fecal mais consistente (Choudhary & Hansen, 1998; Ullman & Itzkowitz, 2011).

Em todos os animais expostos à DMH foi observada baixa frequência de tumores, evento possivelmente relacionado à duração insuficiente do experimento para o desenvolvimento de lesões avançadas. Em estudos prévios, maior frequência de tumores

foi alcançada a partir da 28<sup>a</sup> semana de exposição à DMH (Bird, 1995; Rodrigues 2002; Thurnherr et al., 1973). Entretanto, o modelo experimental utilizado no presente estudo foi delineado considerando uma abordagem quimiopreventiva, no sentido de reverter e/ou inibir a progressão de lesões pré-neoplásicas (FCA) e, conseqüentemente, prevenir o desenvolvimento do câncer colorretal. Embora o tratamento com o flavonóide tenha sido eficiente na redução dos FCA, efeito semelhante não foi observado em lesões avançadas (tumor). Dessa forma, sugere-se que a Naringina apresenta um potencial efeito inibitório em estágios iniciais da carcinogênese, com influência limitada sobre lesões tumorais previamente estabelecidas. Entretanto, esse aspecto permanece pouco compreendido e requer estudos adicionais.

A análise dos resultados indicou um possível efeito inibitório dose-dependente do flavonóide Naringina sobre a progressão das lesões pré-neoplásicas em todos os segmentos intestinais investigados. Os melhores resultados foram encontrados no grupo tratado com a maior dosagem do flavonóide (200mg/kg). Têm sido sugerida uma relação entre elevada taxa de proliferação celular e o aumento no número de AgNORs/núcleo em diferentes tipos de câncer (Tanaka et al., 1997; Sengottuvelan et al., 2006). Além disso, a quantificação das AgNORs tem sido utilizada como marcador do estágio de desenvolvimento e progressão de lesões cancerosas (Sengottuvelan et al., 2006). Corroborando os resultados do presente estudo, foi previamente demonstrada a eficácia de flavonóides como diosmina e hesperidina na redução das AgNORs/núcleo em células do epitélio intestinal de animais expostos à carcinógenos químicos (Tanaka et al., 1997). Assim, o menor número de AgNORs/núcleo sugere que a redução do número de lesões pré-neoplásicas pode ser decorrente de um efeito inibitório da Naringina sobre a proliferação celular.

A atividade anticarcinogênica de alguns flavonóides, por meio da inibição da iniciação e/ou progressão de tumores, tem sido demonstrada *in vitro* (Araújo et al., 2011; Ramos et al., 2011) e *in vivo* (Lee et al., 2005, Tanaka et al., 1997). O efeito inibitório de flavonóides contra células de câncer gástrico foi demonstrado por Lee et al. (2005). Fukai et al., (2002) relataram que os flavonóides de extrato de *Glycyrrhiza glabra* podem ser úteis como agentes quimiopreventivos para úlcera péptica ou câncer gástrico em indivíduos infectados por *Helicobacter pylori*. Em adição, Kajimoto et al., (2002) verificaram a ação de flavonóides na inibição do crescimento celular e indução da apoptose em diversas linhagens de células cancerosas, tais como células MKN7 de câncer gástrico humano. Lee et al. (2005) sugeriram que os efeitos antitumorais da Naringenina são mediados pela sua capacidade de regular negativamente a sinalização celular mediada por  $\beta$ -catenina/Tcf, uma importante via relacionada às etapas iniciais da carcinogênese gástrica. Vanamala et al., 2006 observaram efeito quimiopreventivo da suplementação dietética com fitoquímicos isolados de toranja, incluindo a Naringina (200mg/kg), sobre a carcinogênese de cólon induzida por azoximetano. Em estudo conduzido por Seo et al. (2003), a adição de Naringina à dieta em até 1250 mg/kg foi bem tolerada em ratos Sprague-Dawley. Assim, admite-se que a ingestão inferior à 1250 mg/kg desse flavonóide é potencialmente segura em modelos murinos, minimizando a possibilidade de danos à órgãos e tecidos saudáveis. Esses achados são corroborados pelos resultados dos pesos dos animais e dos parâmetros bioquímicos séricos, que não indicaram toxicidade do flavonóide nas doses utilizadas.

Os efeitos antioxidantes e antiinflamatórios da Naringina foram verificados por Jain & Parmar (2011), que constataram redução significativa da peroxidação lipídica e atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione redutase no plasma e tecido de ratos tratados com este flavonóide. Esses achados indicaram que a Naringina

apresenta atividade antioxidante intrínseca, a qual é parcialmente independente de sua ação sobre a expressão e/ou atividade das enzimas antioxidantes celulares. Além disso, a administração de Naringina foi previamente associada à diminuição da síntese de NF-kappa $\beta$  (fator de necrose tumoral kappa $\beta$ ) e da atividade da enzima óxido nítrico sintase, componentes envolvidos em eventos pró-oxidantes celulares durante a carcinogênese (Kanno et al., 2006).

Muitos minerais presentes na alimentação destacam-se como importantes protetores ou moduladores do risco contra o desenvolvimento de neoplasias (Park et al., 2011). Minerais como cobre, magnésio, selênio e zinco apresentam importante papel nos estágios de iniciação, promoção e progressão do desenvolvimento neoplásico (Jaiswal & Narayan, 2004; Dani et al., 2007). No presente estudo, esses minerais foram marcadamente reduzidos no epitélio displásico dos FCA em todos os segmentos intestinais. Segundo Anetor et al., (2007) micronutrientes como o zinco podem reduzir o risco de neoplasias devido suas propriedades antioxidantes, uma vez que eventos pró-oxidantes participam de vários estágios da carcinogênese. Têm sido descrito que este mineral é capaz de inibir o crescimento e proliferação de diversos tipos de células tumorais, incluindo células de câncer de cólon (Park et al., 2002; Klein et al., 2006). Estudos com modelos animais e culturas de células cancerosas indicaram que o selênio e as selenoproteínas estão envolvidos na manutenção das funções intestinais e prevenção do câncer colorretal (Méplan & Hesketh, 2012, Duffield-Lillico et al., 2002). Foi demonstrado em células e tecidos cancerosos baixos níveis de enzimas antioxidantes dependentes de selênio e zinco, as quais apresentam importante ação antagonista da carcinogênese (Grigolo et al., 1998). De acordo com Méplan & Hesketh (2012), mesmo não sendo fortes as provas epidemiológicas para vincular o risco de carcinoma colorretal aos níveis séricos e teciduais de Se, evidências experimentais

sugerem um importante papel do Se e das selenoproteínas na função da célula epitelial da mucosa colônica, o qual está associado à inibição da iniciação e progressão de lesões pré-neoplásicas. Aspecto que também deve ser enfatizado é a elevação dos níveis teciduais do elemento ferro. Tem sido descrito que o aumento dos estoques teciduais de ferro pode favorecer o crescimento de células neoplásicas, efeitos potencialmente relacionados à atividade catalítica do ferro sobre a formação de radicais hidroxila (reação de Fenton), com consequentes danos oxidativos aos lipídios, proteínas e DNA, inibição da atividade das células de defesa imunológica, e favorecimento da hiperplasia celular (Okada, 1996; Weinberg, 1996). Embora a quantificação dos níveis de ferro tenha sido indicada como potencialmente útil no prognóstico de pacientes com câncer (Weinberg, 1996), as evidências atuais da associação entre ferro e câncer de cólon permanecem extremamente limitadas e controversas, o que requer estudos adicionais.

Os resultados indicaram que o flavonóide Naringina, especialmente na dose de 200mg/kg, foi eficaz em minimizar o remodelamento morfológico colorretal, reduzindo o número de lesões pré-neoplásicas em ratos expostos ao carcinógeno químico DMH. Os segmentos inicial e médio do cólon parecem ser mais sensíveis ao efeito inibitório desse flavonóide sobre a displasia das criptas intestinais, o qual aparentemente apresenta influência limitada sobre lesões tumorais previamente estabelecidas. Acredita-se que parte dos resultados pode ser decorrente dos efeitos da Naringina na redução da proliferação celular, redução dos níveis teciduais de ferro e recuperação dos níveis de minerais antioxidantes. Embora esses efeitos sejam possíveis, como não foram avaliados os mediadores oxidativos e as enzimas antioxidantes na parede intestinal, não foi possível determinar a relação entre o nível de minerais e status oxidativo tecidual, o que constituiu a principal limitação do estudo e indica a necessidade de investigações futuras.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao “*Núcleo de Microscopia e Microanálise*” da Universidade Federal de Viçosa (UFV) pelo auxílio na análise de Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X.

## **Referências bibliográficas\***

*\*De acordo com as normas do periódico Micron ISSN: 0968-4328*

Anetor, J.L., Wanibuchi, H., Fukushima, S., 2007. Arsenic exposure and its health effects and risk of in developing countries: micronutrients as host defence. *Asian Pacific J. Cancer.* 8, 13-23.

Araújo, J.R., Gonçalves, P., Martel, F., 2011. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutr. Res.* 31, 77-87.

Bird, R.P., 1987. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.* 37,147-151.

Bird, R.P., 1995. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett.* 93,55-71.

Chen, M.C., Ye, Y.Y., Ji, G., Liu, J.W., 2010. Hesperidin upregulates heme oxygenase-1 to attenuate hydrogen peroxide-induced cell damage in hepatic L02 cells. *J Agric Food Chem.* 58, 3330-3335.

Choudhary, G., Hansen, H., 1998. Human health perspective on environmental exposure to hydrazines: a review. *Chemosphere.* 37, 801–843.

Dani, V., Goel, A., Vaiphei, K., Dhawan, D.K., 2007. Chemopreventive potential of zinc in experimentally induced colon carcinogenesis. *Toxicol Lett.* 171, 10-18.

Duffield-Lillico, A.J., Reid, M.E., Turnbull, B.W., Combs, G.F., Slate, E.H., Fischbach, L.A., Marshall, J.R., Clark, L.C., 2002. Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11, 630-639.

Fukai, T., Marumo, A., Kaitou, K., Kanda, T., Terada, S., Nomura, T., 2002. Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. *Life Sci.* 71, 1449–1463.

Grigolo, B., Lisignoli, G., Toneguzzi, S., Mazzetti, I., Facchini, A., 1998. Copper/zinc superoxide dismutase expression by different human osteosarcoma cell lines. *Anticancer Res.* 18, 1175-1180.

Howell, W.M., Black, D.A., 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia.* 36,1014-1015.

Jain, M., Parmar, H.S., 2011. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation. *Inflamm Res.* 60, 483–491.

Jaiswal, A.S., Narayan, S., 2004. Zinc stabilizes adenomatous polyposis coli (APC) protein levels and induces cell cycle arrest in colon cancer. *J. Cell Biochem.* 93, 345-357.

Kajimoto, S., Takanashi, N., Kajimoto, T., Xu, M., Cao, J., Masuda, Y., Aiuchi, T., Nakajo, S., Ida, Y., Nakaya, K., 2002. Sophoranone, extracted from a traditional Chinese medicine Shan Dou Gen, induces apoptosis in human leukemia U937 cells via formation of reactive oxygen species and opening of mitochondrial permeability transition pores. *Int. J. Cancer.* 99, 879–890.

Kanno, S., Shouji, A., Tomizawam, A., Hiura, T., Osanai, Y., Ujibe, M., Obara, Y., Nakahata, N., Ishikaw, M., 2006. Inhibitory effect of naringin on lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock in mice and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci.* 78, 673-681.

Kanno, S., Tomizawa, A., Hiura, T., Osanai, Y., Shouji, A., Ujibe, M., Ohtake, T., Kimura, K., Ishikawa, M., 2005. Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 527-530.

Klein, C., Creach, K., Irintcheva, V., Hughes, K.J., Blackwell, P.L., Corbett, J.A., Baldassare, J.J., 2006. Zinc induces ERK-dependent cell death through a specific Ras isoform. *Apoptosis.* 11, 1933-1944.

Larangeira, L.L.S., Taha, M.O., Ferme, A., Lemos, R., Plapler, H., 1998. Localização de lesões tumorais induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no cólon de ratos. *Acta Cir. Bras.* 13, 00-00.

Lee, J.H., Park, C.H., Jung, K.C., Rhee, H.S., Yang, C.H., 2005. Negative regulation of b-catenin/Tcf signaling by naringenin in AGS gastric cancer cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 771-776.

Liu, M., Zou, W., Yang, C., Peng, W., Su, W., 2012. Metabolism and excretion studies of oral administered naringin, a putative antitussive, in rats and dogs. *Biopharm. Drug Dispos.* 33, 123–134.

Magnuson, B., Carr, I., Bird, R., 1993. Ability of aberrant crypt foci characteristics to predict colonic tumor incidence in rats fed cholic acid. *Cancer Res.* 53, 4499-4504.

Mandarim-de-Lacerda, C.A., 2003. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.* 75, 469-486.

Master, Z., Chaudhary, A., Sutter, T.R., Kristine, L., 2012. Willett effects of flavonoids on CYP1 expression in RL95-2 endometrial carcinoma cells. *Food Chem.* 133, 912-922.

Meira, L.B., Bugni, J.M., Green, S.L., Lee, C.W., Pang, B., Borenshtein, D., Rickman, B.H., Rogers, A.B., Moroski-Erkul, C.A., McFaline, J.L., Schauer, D.B., Dedon, P.C., Fox, J.G., Samson, L.D., 2008. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J Clin Invest.* 118, 2516-2525.

Méplan, C., Hesketh, J., 2012. The influence of selenium and selenoprotein gene variants on colorectal cancer risk. *Mutagenesis.* 279, 177–186.

Moon, J.Y., Wang, X., Morris, M.E., 2006. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro.* 20, 187–210.

Naczki, M., Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A.* 1054, 95–111.

Newell, L.E., Heddle, J.A., 2004. The potent colon carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. *Mutat Res.* 564, 1-7.

Nucci, M.R., Robinson, R.C., Patti, L., Campbell, P., Hamilton, S.R., 1997. Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. *Hum Pathol.* 28, 1396-1407.

Okada, S., 1996. Iron-induced tissue damage and cancer: The role of reactive oxygen species-free radicals. *Pathol Int.* 46, 311-332.

Park, K.S., Ahn, Y., Kim, J.A., Yun, M.S., Seong, B.L., Choi, K.Y., 2002. Extracellular zinc stimulates ERK dependent activation of p21 Cip/WAF1 and inhibits proliferation of colorectal cancer cells. *Br J Pharmacol.* 137, 597-607.

Park, S., Murphy, S.P., Wilkens, L.R., Henderson, B.E., Kolonel, L.N., 2011. Multivitamin use and the risk of mortality and cancer incidence. The multiethnic cohort study. *Am J Epidemiol.* 173, 906-914.

Perez-Holanda, S., Rodrigo, L., Vinas Salas, J., Pinol Felis, C., 2007. Efecto del ácido ursodeoxicólico en un modelo experimental de cáncer de colon. *Rev Esp Enferm Dig.* 99, 491-496.

Pierini, R., Gee, J.M., Belshaw, N.J., Ian, T., 2008. Flavonoids and intestinal cancers. *Br J Nutr.* 99, 53-59.

Pories, S.E., Ramchurren, N., Summerhayes, I., Steele, G., 1993. Animal models for colon carcinogenesis. *Arch Surg.* 128, 647-653.

Ramos, S., Rodríguez-Ramiro, I., Martín, M.A., Goya, L., Bravo, L., 2011. Dietary flavanols exert different effects on antioxidant defenses and apoptosis/proliferation in Caco-2 and SW480 colon cancer cells. *Toxicol In Vitro.* 25, 1771-1781.

Rodrigues, M.A.M., Silva, L.A.G., Salvadori, D.M.F., Camargo, J.L.V., Montenegro, M.R., 2002. 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.* 35, 351-355.

Rossi, M., Negri, E., Talamini, R., Bosetti, C., Parpinel, M., Gnagnarella, P., Franceschi, S., Dal Maso, L., Montella, M., Giacosa, A., La Vecchia, C., 2006. Flavonoids and colorectal cancer in Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15, 1555-1558.

Sengottuvelan, M., Viswanathan. P., Nalini. N., 2006. Chemopreventive effect of trans-resveratrol - a phytoalexin against colonic aberrant crypt foci and cell

proliferation in 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 27, 1038-1046.

Seo, H.J., Jeong, K.S., Lee, M.K., Park, Y.B., Jung, U.J., Kim, H.J., Choi, M.S., 2003. Role of naringin supplement in regulation of lipid and ethanol metabolism in rats. *Life Sci*. 73, 933-946.

Spilsbury, A., Vauzour, D., Spencer, J.P.E., Rattray, M., 2012. Regulation of NF- $\kappa$ B activity in astrocytes: effects of flavonoids at dietary-relevant concentrations. *Biochem. Biophys Res Commun*. 418, 578-583.

Talalay, P., De Long, M.J., Prochaska, H.J., 1988. Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85, 8261-8265.

Tanaka, T., Makita, H., Kawabata, K., Mori, H., Kakumoto, M., Satoh, K., Hara, A., Sumida, T., Tanaka, T., Ogawa, H., 1997. Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesis*. 18, 957-965.

Theodoratou, E., Kyle, J., Cetnarskyj, R., Farrington, S.M., Tenesa, A., Porteous, B., Dunlop, M., Campbell, H., 2007. Dietary Flavonoids and the risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 16, 684-693.

Thurnherr, N., Deschner, E.E., Stonehill, E.H., Lipkin, M., 1973. Induction of adenocarcinomas of the colon in mice by weekly injections of 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res*. 33, 940-945.

Ullman, T.A., Itzkowitz, S.H., 2011. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology*. 140, 1807-1816.

Vanamala, J., Leonardi, T., Patil, B.S., Taddeo, S.S., Murphy, M.E., Pike, L.M., Chapkin, S., Lupton, J.R., Turner, N.D., 2006. Suppression of colon

carcinogenesis by bioactive compounds in grapefruit. *Carcinogenesis*. 27, 1257–1265.

Wargovich, M.J., Jimenez, A., McKee, K., Steele, V.E., Velasco, M., Woods, J., Price, R., Gray, K., Kelloff, G. J. 2000. Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression. *Carcinogenesis*. 21, 1149-1155.

Weinberg, W., 1996. The role of iron in cancer. *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 19-36.

Wolffram, S., Blöck, M., Ader, P., 2002. Quercetin-3-Glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *J. Nutr.* 132, 630-635.

Yoshimi, N., Morioka, T., Kinjo, T., Inamine, M., Kaneshiro, T., Shimizu, T., Suzui, M., Yamada, Y., Mori, H., 2004. 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.* 95, 792-797.

## CAPÍTULO 2

### **Efeito do flavonóide Crisina na redução de lesões pré-neoplásicas no cólon de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina**

#### **RESUMO**

O câncer colorretal é formado a partir do desenvolvimento inicial de criptas intestinais displásicas, que podem evoluir para pólipos adenomatosos e em seguida câncer. Os compostos fenólicos são substâncias bioativas de ocorrência natural com marcada atividade antioxidante e anti-inflamatória. O flavonóide Crisina, encontrado em níveis elevados na própolis e no mel de abelha, possui atividade inibitória de enzimas envolvidas na bioativação de carcinógenos. O objetivo do estudo foi investigar o efeito do flavonóide Crisina na formação de lesões pré-neoplásicas (focos de criptas aberrantes – FCA) colorretais induzidas por carcinógeno químico em ratos. Ratos Wistar fêmeas pesando  $130,8 \pm 27,1$  g receberam injeção subcutânea semanal de 1,2-dimetilhidrazina (DMH, 20 mg/kg) durante 10 semanas. Os animais foram divididos em 5 grupos com 7 animais em cada grupo. Grupo 1: NaCl 0,9%; Grupo 2: DMH + NaCl 0,9%; Grupo 3: DMH + Crisina (10 mg/kg); Grupo 4: DMH + Crisina (100 mg/kg); Grupo 5: DMH + Crisina (200 mg/kg). Em G2 e G3 houve aumento significativo do número de FCA e regiões organizadora de nucléolo por núcleo de enterócitos (AgNORs/núcleo) comparado à G1. Em G4 e G5 houve redução significativa do número de FCA e AgNORs/núcleo comparado à G2. O nível de minerais antioxidantes como cobre, magnésio, selênio e zinco foi significativamente reduzido no epitélio dos FCA em G2 e G3, mas similar nos grupos G4 e G5, comparados à G1. Em G4 e G5 o número de células enteroendócrinas foi significativamente maior comparado à G2. A Crisina, nas doses de 100mg/kg e 200mg/kg, foi eficaz em diminuir a displasia tecidual e a dilatação das criptas reduzindo o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas em

ratos expostos à 1,2-dimetilhidrazina. Sugere-se que parte desse efeito pode ser decorrente da redução da proliferação celular e recuperação dos níveis de minerais antioxidantes induzidos por esse flavonóide.

**Palavras-chave:** flavonóide, patologia, intestino, 1,2-dimetilhidrazina.

## **Introdução**

Em países ocidentais o carcinoma colorretal é uma das neoplasias mais frequentes do trato gastrointestinal, sendo considerado o terceiro carcinoma de maior incidência no mundo e o segundo, em países desenvolvidos (Levy et al., 2008). O câncer colorretal resulta da transformação progressiva do tecido epitelial colônico, com o desenvolvimento inicial de criptas intestinais displásicas, pólipos adenomatosos e em seguida câncer (Lyra et al., 2005). Frequentemente, o câncer colorretal encontra-se associado a alterações epigenéticas do DNA, principalmente metilação, a qual resulta em instabilidade dos mecanismos de expressão e reparo gênicos (Ricciardiello et al., 2003; Jass, 2004). Além dessas alterações epigenéticas, modificações do status oxidativo tecidual, com o predomínio de eventos pró-oxidante e falhas nos mecanismos de defesa imunológica são igualmente implicados nos distúrbios na divisão e diferenciação celular que conduzem à formação de lesões cancerosas (Ullman & Itzkowitz, 2011; Hofseth et al., 2003).

Tem sido demonstrado que a exposição à carcinógenos químicos como a 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e azoximetano (AOM) é capaz de induzir eficientemente o câncer colorretal em ratos (Bird, 1987; Bird, 1995). A ação desses carcinógenos na transformação celular é mediada por danos oxidativos celulares e metilação do DNA (Issa et al., 2001), eventos semelhantes ao que ocorre em cânceres humanos (Nascimbeni et al., 1999). Morfologicamente, nas fases iniciais da carcinogênese colorretal são observadas alterações microscópicas da mucosa intestinal com variado grau de complexidade, denominadas focos de criptas aberrantes (FCA) (Bird, 1987; Rodrigues 2002). Os FCA são lesões pré-neoplásicas da mucosa colônica comumente

utilizadas como marcadores para o risco do desenvolvimento de câncer colorretal (Hurlstone & Cross, 2005).

Por décadas, a DMH tem sido aplicada com sucesso em diferentes modelos experimentais para investigar o efeito de compostos bioativos na prevenção e/ou tratamento do câncer colorretal (Rodrigues, 2002; Thurnherr et al., 1973). Utilizando esses modelos, diversas classes de substâncias com atividade anti-inflamatória e antioxidante demonstraram potencial anticarcinogênico em estudos pré-clínicos (Wargovich et al., 2000; Suganuma et al., 2001).

Os compostos fenólicos são substâncias bioativas de ocorrência natural com marcada atividade antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* (Haslam, 1996; Spilsbury et al., 2012) e *in vivo* (Youdima et al., 2000; Sun et al., 2002). Compostos fenólicos derivados de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (Naczki & Shahidi, 2004). Atualmente tem aumentado o interesse sobre as funções biológicas de diferentes tipos de flavonóides. Nesse contexto, flavonóides isolados de plantas como luteolina, apigenina, crisina, rutina, quercetina têm demonstrado efeitos protetores em doenças cardíacas, acidente vascular cerebral e câncer (Pietta, 2000). O flavonóide Crisina é encontrado em níveis elevados na própolis e no mel de abelha (Siess et al., 1996). Foi previamente descrito que esse flavonóide é um potente inibidor da ativação do vírus da imunodeficiência humana em infecções latentes (Critchfield et al., 1996). Além disso, a Crisina também mostrou atividade inibitória das enzimas metabolizadoras de drogas como o CYP1A1 e fenolsulfotransferase, ambas envolvidas na bioativação de carcinógenos (Siess et al., 1996). Entretanto, ainda é pouco conhecido se os potenciais efeitos anticarcinogênicos *in vitro* da Crisina podem ser extrapolados para a situação *in vivo*.

Assim, para esclarecer sua relevância e eficácia, o objetivo desse estudo foi investigar o efeito do flavonóide Crisina no tratamento de lesões pré-neoplásicas no cólon de ratos expostos ao carcinógeno químico 1,2 dimetilhidrazina.

## **Materiais e Métodos**

### ***Indução de lesões pré-neoplásicas e grupos experimentais***

Foram utilizados 30 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas, com 8 semanas de idade e peso inicial de  $137,2 \pm 24,3$  gramas fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Durante todo o experimento os animais foram mantidos em caixas individuais com sistema de ventilação automatizado (Ventilife Alesco<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil), em ambiente com temperatura ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade (60% - 70%) e luminosidade (12/12 h claro/escuro) controladas, recebendo água e ração *ad libitum*. Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais com 7 animais em cada grupo de acordo com o tratamento recebido: Grupo 1 (controle), NaCl 0,9%; Grupo 2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; Grupo 3, DMH + Crisina (10 mg/kg); Grupo 4, DMH + Crisina (100 mg/kg); Grupo 5, DMH + Crisina (200 mg/kg). O estudo foi conduzido de acordo com as normas internacionalmente aceitas para o uso e cuidados com animais de laboratório, aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde - UNIVIÇOSA (protocolo de aprovação 00002/2012-I).

A carcinogênese colorretal foi induzida por meio de uma injeção subcutânea de 1,2-dimetilhidrazina (Aldrich Chemical Co, Milwaukee, USA) na dose de 20 mg/kg a cada semana durante 10 semanas (Larangeira et al., 1998). A partir da 11<sup>a</sup> semana, o flavonóide Crisina foi diluído em 700 µl de NaCl 0,9% (veículo) e administrado por gavagem 3 vezes semana, durante 14 semanas. Os animais dos grupos 1 e 2 receberam

gavagem apenas com NaCl 0,9% (700 µl). O peso dos animais foi registrado semanalmente. Ao final das 25 semanas os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical sob anestesia (ketamina, 10 mg/kg; and xilazina 2 mg/kg i.p.) após jejum de 12 horas.

### ***Análise dos focos de criptas aberrantes***

Após a eutanásia o intestino grosso foi removido *in totum*, lavado em NaCl 0,9%, aberto longitudinalmente, e fixado durante 24 horas em placas de parafina contendo formol tamponado a 10%, pH= 7,2 (Bird 1987). Os intestinos foram medidos e divididos em três fragmentos iguais (cólon proximal, médio e distal + reto) em relação ao ceco. O reto foi avaliado juntamente com o cólon distal em todas as análises. Em seguida, foram corados com azul de metileno 0,1% por um minuto e lavados em tampão fosfato, pH=7,2, para análise microscópica. Para identificação e quantificação dos focos de criptas aberrantes (FCA), a superfície mucosa do intestino grosso foi observada a partir dos fragmentos intactos do intestino com auxílio de microscópio de luz (Olympus BX-60<sup>®</sup>, Tóquio, Japan), com lente objetiva de 10 vezes (Bird 1987, 1995). Toda a área intestinal foi avaliada e a categorização dos FCA foi realizada mediante a determinação da frequência observada de criptas aberrantes em cada foco. Dessa forma, as categorias estabelecidas incluíram focos com 1, 2, 3, 4 a 10, acima de 10 criptas aberrantes, e tumor.

### ***Histopatologia, histoquímica e histomorfometria***

Após a análise dos FCA, os fragmentos intestinais foram descorados com lavagens sucessivas em etanol 50%, desidratados em etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Foram obtidos cortes de 4µm de espessura em micrótomo

rotativo (Leica Multicut 2045<sup>®</sup>, Reichert-Jung Products, Alemanha) que foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para caracterização morfológica geral do tecido, Alcian blue (AB) e Ácido Periódico de Schiff (PAS) para marcação de células mucossecretoras (Yoshimi et al., 2004; Meira et al., 2008). Para evitar a análise da mesma área histológica, foram utilizados 1 a cada 20 cortes de tecido. Os cortes foram visualizados e as imagens capturadas por meio de um microscópio de luz (Olympus BX-60<sup>®</sup>, Tóquio, Japan) conectado a uma câmera digital (Olympus QColor-3<sup>®</sup>, Tokyo, Japan). Para cada coloração e grupo investigado, foram obtidos aleatoriamente sessenta campos microscópicos com objetiva de 40 vezes de aumento, de modo que uma área total de  $8,27 \times 10^5 \mu\text{m}^2$  foi analisada para cada segmento intestinal.

Os parâmetros histopatológicos analisados foram a presença de displasia tecidual, dilatação de criptas e morfologia dos enterócitos (Meira et al., 2008). A partir de secções longitudinais coradas com H&E, foram determinados os parâmetros morfométricos de comprimento e largura das criptas. Em secções transversais foi determinada a área das criptas e do seu lúmen. O volume das criptas e do lúmen foi estimado multiplicando o comprimento das criptas pela área das criptas e área do lúmen, respectivamente. Em secções transversais coradas com AB e PAS foi determinado o número de células mucossecretoras por unidade de área histológica. Nessas mesmas secções, a densidade de volume (Vv) ocupada por mucinas ácidas (AB+) e neutras (PAS+) na área histológica foi estimada por contagem de pontos usando a seguinte fórmula:  $Vv [AB+, PAS+] = P_p [AB+, PAS+] / P_T$ ; onde  $P_p$  é o número de pontos que incidem sobre cada tipo de mucina e  $P_T$  é o número total de pontos de teste. Para essa análise foi utilizado um sistema de teste com 72 pontos aplicados sobre uma área histológica padronizada de  $20,0 \times 10^3 \mu\text{m}^2$  (Mandarim-de-Lacerda, 2003).

### ***Análise de AgNORs e células enteroendócrinas***

A marcação e quantificação das regiões organizadoras de nucléolo (AgNORs) foi realizada por meio do método descrito por Howell e Black, (1980). Brevemente, cortes de 4 µm dos três segmentos intestinais foram incubados com solução de prata coloidal na ausência de luz durante 60 minutos a temperatura ambiente. AgNORs foram visualizados em microscópio de luz (Olympus BX-60<sup>®</sup>, Tóquio, Japan) com lente objetiva de 1000x e contadas em núcleos de 120 enterócitos amostrados aleatoriamente em 40 criptas intestinais de cada segmento do cólon para cada animal. Os resultados foram expressos para todo o intestino como o número de AgNORs por núcleo.

A marcação de células enteroendócrinas foi realizada pelo método de Grimelius (Grimelius e Wilander, 1980). Para cada animal e segmento intestinal, a quantificação das células enteroendócrinas foi realizada em dez campos histológicos obtidos aleatoriamente com objetiva de 40x. Assim, uma área total de  $1,38 \times 10^5 \mu\text{m}^2$  foi analisada para cada segmento intestinal. Os resultados foram expressos para todo o intestino como o número de células enteroendócrinas por unidade de área histológica. Toda a análise histomorfométrica foi realizada por meio do software Image Pro-plus 4.5<sup>®</sup> (Media Cybernetcs, Silver Spring, MD, USA).

### ***Análise bioquímica***

Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca no momento da eutanásia. O sangue foi centrifugado e o soro utilizado para dosagem bioquímica de albumina, proteínas totais, glicose, colesterol e triacilgliceróis (Alizè<sup>®</sup>, França). No soro, a concentração de óxido nítrico foi determinada pelo método de Griess (Ricart-Jané et al., 2002). Brevemente, alíquotas do soro foram incubadas com o reagente de

Griess (sulfanilamida 2% (w/v) e N-(1-naftil) etilenodiamina 0,2% (w/v) em água deionizada) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro na absorvância de 540 nm.

### ***Microanálise de elementos químicos***

Fragmentos do terço proximal, médio e distal de cada um dos três segmentos do cólon foram dissecados e submetidos à secagem ao ponto crítico (CPD 030, Bal-tec, Witten, North Rhine-Westphalia, Germany). O conteúdo e a distribuição dos elementos químicos foram investigados por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EED) usando um microscópio eletrônico de varredura (Leo 1430VP) acoplado a um detector de Raios-X (Tracor TN5502, Middleton, WI, USA). Foi aplicado um aumento de 300×, voltagem de aceleração de 20 kV e distância de trabalho de 19 mm. Para cada grupo foi investigada uma área total de cada segmento do cólon de  $36.18 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ . A proporção dos elementos carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O), flúor (F), sódio (Na), magnésio (Mg), fósforo (P), enxofre (S), cloro (Cl), potássio (K), cálcio (Ca), manganês (Mn); ferro (Fe), cobre (Cu) selênio (Se) e Zinco (Zn) foi mensurada e expressa como o valor médio para todo o intestino.

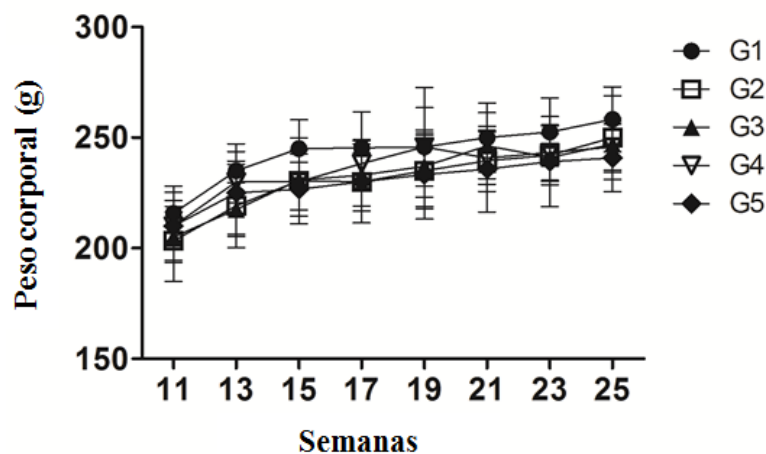
### ***Análise estatística***

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (média  $\pm$  DP). Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks) seguidos pelo teste de Dunnett. Resultados com valor  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## Resultados

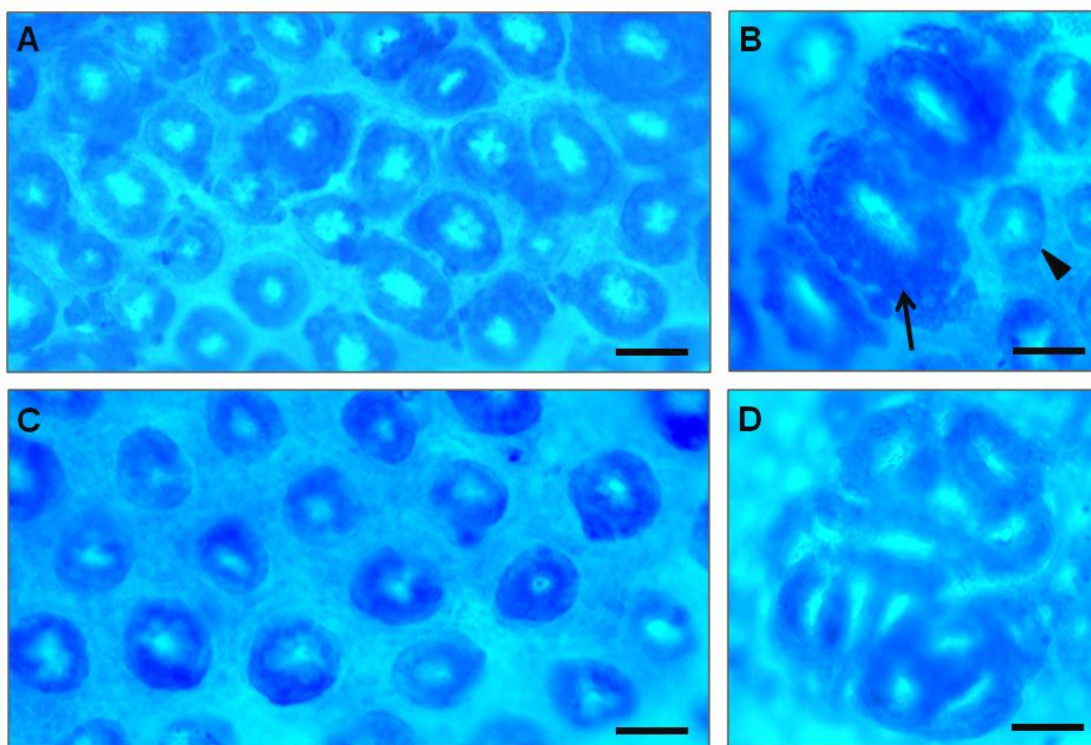
### *Análise biométrica e dos focos de criptas aberrantes*

Não houve diferença significativa no peso corporal entre os grupos durante as 25 semanas de experimento (Figura 1).



**Figura 1.** Evolução do peso corporal de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonoide Crisina. G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Crisina (10 mg/kg); G4, DMH + Crisina (100 mg/kg); G5, DMH + Crisina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \*vs. G1, †vs. G2.

Foram observados FCA distribuídos ao longo de toda a superfície intestinal nos três segmentos investigados em todos os grupos expostos à DMH. Diferentes níveis de desenvolvimento dos FCA foram observados, com predomínio de focos contendo entre 1 e 3 criptas aberrantes circundadas por criptas normais, distribuídos principalmente no cólon médio e distal (Figura 2)



**Figura 2.** Fotomicrografias representativas de criptas do cólon médio de ratos do grupo 1 (A) e expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) no grupo 2 (B, C e D) obtidas por montagem total do intestino. Em (A) são observadas criptas normais homogeneamente distribuídas. No painel (C) são observadas criptas aberrantes hiperpigmentadas em estágio inicial de displasia. São identificados focos com 3 (B), e 13 (D) criptas aberrantes, caracterizadas por dilatação do epitélio de revestimento intestinal e protrusão em direção à luz intestinal. No painel (B) são observadas criptas normais (cabeça de seta) ao redor do foco de criptas aberrantes (seta) (Coloração Azul de Metileno, barras = 40  $\mu$ m).

Foi observado de modo geral, que em todos os grupos tratados com flavonóide apresentaram redução significativa do número total de criptas aberrantes por foco em relação à G2, principalmente nos segmentos médio e proximal. Esse resultado não foi observado para o cólon distal, uma vez em que o número de criptas aberrantes por foco em G3, G4 e G5 foi semelhante à G2. Em todos os animais expostos à DMH houve baixa frequência de tumores (Tabela 1).

**Tabela 1.** Análise dos focos de criptas aberrantes de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonoide Crisina.

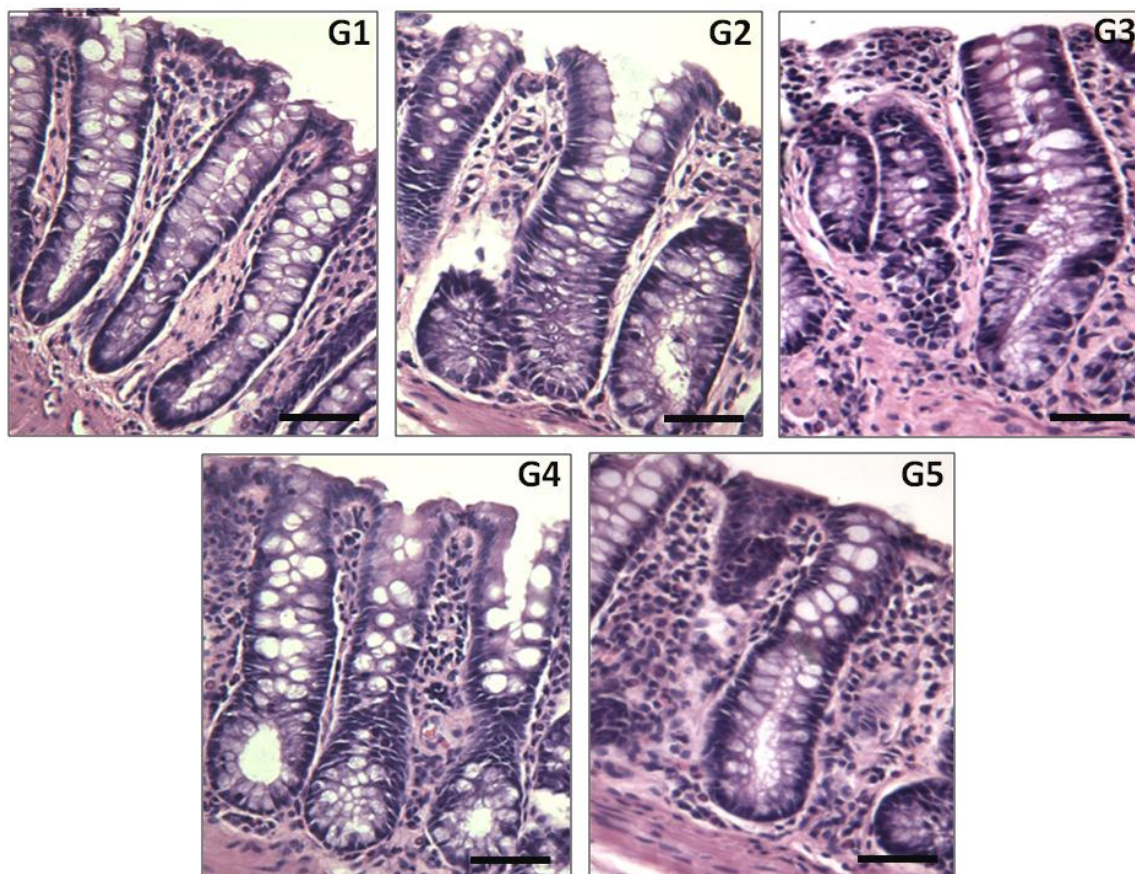
Segmento intestinal / Número de cripta aberrante por foco	G1	G2	G3	G4	G5
<b><i>Proximal</i></b>					
1	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.1*	6.5 ± 2.8* <sup>†</sup>	9.0 ± 4.0* <sup>†</sup>	8.6 ± 4.2* <sup>†</sup>
2	0.0 ± 0.0	12.3 ± 4.7*	4.0 ± 3.5* <sup>†</sup>	3.0 ± 1.4* <sup>†</sup>	1.5 ± 1.0* <sup>†</sup>
3	0.0 ± 0.0	5.3 ± 1.4*	2.8 ± 1.9*	1.5 ± 0.8* <sup>†</sup>	1.2 ± 0.5* <sup>†</sup>
4 to 10	0.0 ± 0.0	3.0 ± 1.0*	1.2 ± 0.4* <sup>†</sup>	1.2 ± 0.3* <sup>†</sup>	0.8 ± 0.4* <sup>†</sup>
> 10	0.0 ± 0.0	1.3 ± 0.4*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Tumor	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.1*	0.3 ± 0.1* <sup>†</sup>	0.2 ± 0.1* <sup>†</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>†</sup>
<b><i>Médio</i></b>					
1	0.3 ± 0.1	55.3 ± 9.3*	46.3 ± 14.5*	45.4 ± 13.0*	29.2 ± 4.1* <sup>†</sup>
2	0.2 ± 0.1	10.7 ± 2.5*	5.0 ± 1.6* <sup>†</sup>	2.7 ± 1.0* <sup>†</sup>	3.8 ± 1.0* <sup>†</sup>
3	0.0 ± 0.0	6.7 ± 1.0*	6.2 ± 1.4*	1.8 ± 0.7* <sup>†</sup>	2.2 ± 0.9* <sup>†</sup>
4 to 10	0.0 ± 0.0	9.7 ± 3.4*	5.8 ± 2.2*	4.8 ± 1.5* <sup>†</sup>	3.0 ± 1.0* <sup>†</sup>
> 10	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.2*	0.2 ± 0.1* <sup>†</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>†</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>†</sup>
Tumor	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.2	0.2 ± 0.1* <sup>†</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>†</sup>	0.2 ± 0.1* <sup>†</sup>
<b><i>Distal</i></b>					
1	0.5 ± 1.2	28.3 ± 20.5*	33.8 ± 10.7*	32.5 ± 10.5*	33.2 ± 7.4*
2	0.0 ± 0.0	9.8 ± 4.1*	5.8 ± 2.1*	9.3 ± 3.0*	6.2 ± 2.9*
3	0.2 ± 0.4	4.5 ± 2.2*	3.3 ± 1.7*	4.3 ± 2.0*	5.2 ± 2.2*
4 to 10	0.0 ± 0.0	4.7 ± 2.4*	3.2 ± 2.2*	5.2 ± 1.7*	2.8 ± 1.5*
> 10	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1* <sup>†</sup>	0.0 ± 0.0
Tumor	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.1*	0.2 ± 0.1* <sup>†</sup>	0.2 ± 0.1* <sup>†</sup>	0.0 ± 0.0

Valores expressos como média e desvio-padrão (média ± DP). G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução) + NaCl 0,9%, DMH; G3, DMH + Crisina (10 mg/kg); G4, DMH + Crisina (100 mg/kg); G5, DMH + Crisina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \*vs. G1, <sup>†</sup>vs. G2.

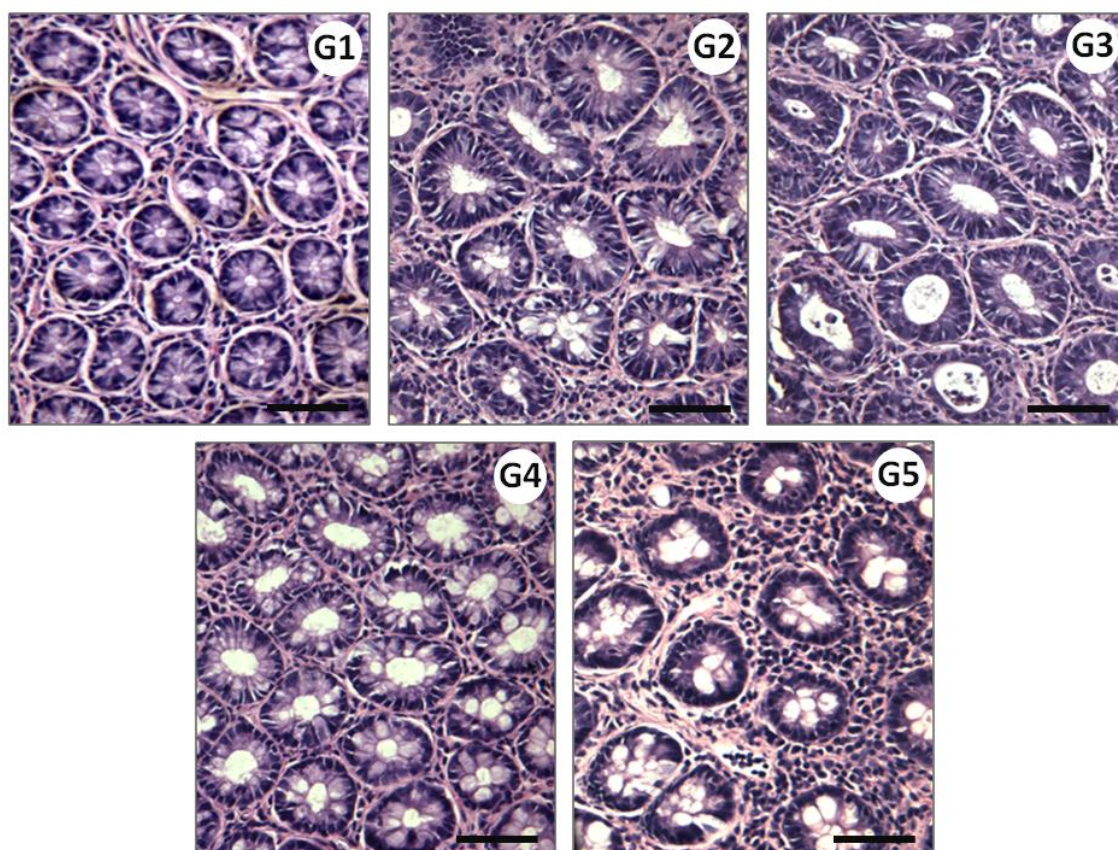
### ***Análise histopatológica, histoquímica e histomorfométrica***

A análise histopatológica indicou a presença de marcada reorganização morfológica das criptas intestinais. Em G2 e G3 foram observadas criptas com intensa displasia, principalmente no terço basal. Nesses grupos, houve hipertrofia e aumento da

densidade de enterócitos com citoplasma e núcleo alongados, marcada redução da densidade de células caliciformes em toda a extensão das criptas, e dilatação do espaço luminal. Em G4 e G5 houve evidente redução da displasia das criptas, com espaço luminal variando de moderadamente (G4) à levemente (G5) dilatado (Figuras 3 e 4).



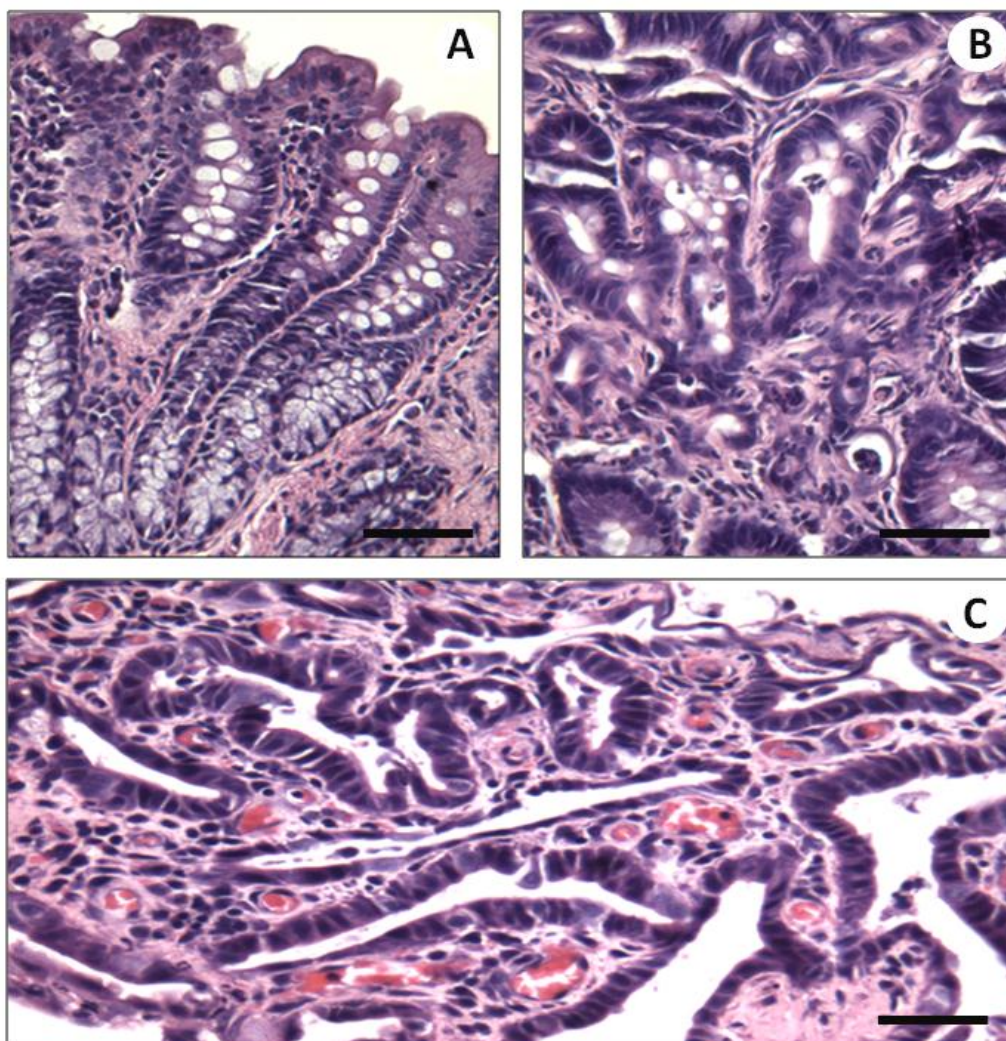
**Figura 3.** Fotomicrografias representativas de secções longitudinais de criptas do cólon médio de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Crisina. Animais sadios (G1) apresentaram criptas normais com lúmen estreito e elevada densidade de células caliciformes. Em G2 e G3 são observadas criptas displásicas com enterócitos alongados, principalmente na base das criptas, e reduzida densidade de células caliciformes. Em G4 e G5 são observadas criptas com as bases levemente dilatadas (Coloração H&E, barra = 50  $\mu$ m). G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Crisina (10 mg/kg); G4, DMH + Crisina (100 mg/kg); G5, DMH + Crisina (200 mg/kg).



**Figura 4.** Fotomicrografias representativas secções transversais de criptas do cólon médio de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Crisina. Animais sadios (G1) apresentaram criptas normais com formato circular ou oval e lúmen estreito. Em G2 e G3 apresentaram criptas displásicas com lúmen diltado e enterócitos alongados, Em G4 são observadas criptas moderadamente dilatadas. Em G5 são mostradas criptas levemente dilatadas com lúmen estreito (Coloração H&E, barra = 60  $\mu$ m). G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Crisina (10 mg/kg); G4, DMH + Crisina (100 mg/kg); G5, DMH + Crisina (200 mg/kg).

Para os grupos expostos à DMH a análise histopatológica indicou diferentes níveis de displasia da mucosa intestinal nos segmentos do cólon que apresentaram lesões tumorais, principalmente em G2. Nesse grupo, foi verificada intensa desorganização da camada mucosa com a identificação de criptas longas distantes da

camada muscular da mucosa, expansão da área de tecido conjuntivo, elevada densidade de vasos sanguíneos e com poucas células caliciformes (Figura 5).



**Figura 5.** Fotomicrografias representativas do tumor no cólon médio em ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) (G2). São observados diferentes níveis de displasia da mucosa colônica. Em (A) notar a moderada displasia da mucosa com a presença de criptas longas distantes da camada muscular da mucosa. Em (B e C) observar intensa displasia, expansão da área de tecido conjuntivo, elevada densidade de vasos sanguíneos, com redução (B) ou desaparecimento (C) das células caliciformes (Coloração H&E, barra = 60  $\mu$ m). G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Crisina (10 mg/kg); G4, DMH + Crisina (100 mg/kg); G5, DMH + Crisina (200 mg/kg).

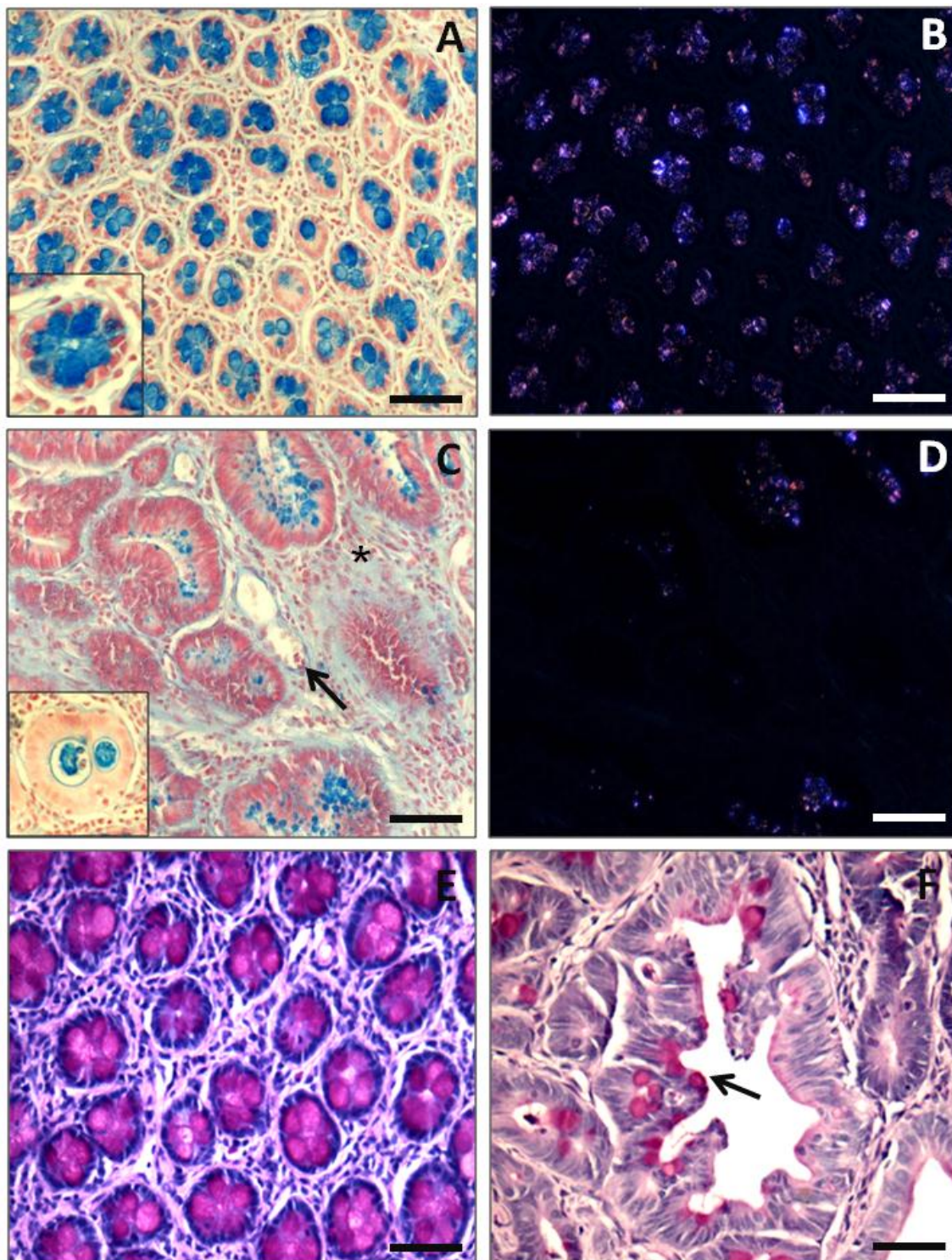
A análise morfométrica das criptas mostrou aumento significativo de todos os parâmetros avaliados nos três segmentos intestinais em G2 comparado à G1 (Tabela 2). Para todos os segmentos, G5 apresentou redução significativa de todos os parâmetros avaliados comparados à G2. Em G4, houve redução significativa de todos os parâmetros morfométricos nos cólons proximal e médio comparado à G2. Não houve diferença estatística nesses parâmetros entre G2 e G3.

**Tabela 2.** Análise histomorfométrica das criptas do cólon de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonoide Crisina.

Segmento intestinal	Largura ( $\mu\text{m}$ )	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Área da cripta ( $\mu\text{m}^2$ )	Área do lúmen ( $\mu\text{m}^2$ )	Volume da cripta ( $\mu\text{m}^3$ )x10 <sup>3</sup>	Volume do lúmen ( $\mu\text{m}^3$ )x10 <sup>3</sup>
<b><i>Proximal</i></b>						
G1	208.6 ± 38.1	35.4 ± 6.7	1773.8 ± 581.5	179.2 ± 51.6	423.15 ± 87.0	40.7 ± 8.3
G2	333.9 ± 36.7*	69.9 ± 16.3*	3730.2 ± 662.6*	454.1 ± 65.8*	700.3 ± 99.2*	104.5 ± 20.4*
G3	275.5 ± 37.8	47.1 ± 9.2	2507.5 ± 810.1	373.7 ± 45.1*	551.7 ± 70.9	80.5 ± 9.7*
G4	228.8 ± 33.6 <sup>†</sup>	43.0 ± 7.3 <sup>†</sup>	2122.9 ± 613.1 <sup>†</sup>	110.0 ± 42.4 <sup>†</sup>	441.4 ± 75.4 <sup>†</sup>	43.2 ± 6.9 <sup>†</sup>
G5	237.6 ± 43.5 <sup>†</sup>	36.2 ± 5.1 <sup>†</sup>	1757.6 ± 526.5 <sup>†</sup>	122.8 ± 91.6 <sup>†</sup>	448.8 ± 80.1 <sup>†</sup>	41.6 ± 8.5 <sup>†</sup>
<b><i>Médio</i></b>						
G1	250.8 ± 35.0	34.2 ± 8.4	1678.3 ± 401.8	167.0 ± 70.0	360.9 ± 62.4	40.9 ± 10.7
G2	385.9 ± 58.5*	66.7 ± 10.3*	3116.8 ± 705.7*	525.3 ± 125.7*	902.5 ± 115.9*	116.1 ± 27.8*
G3	389.1 ± 40.3	51.8 ± 7.2*	2828.5 ± 600.2*	370.9 ± 60.5*	709 ± 100.7*	77.2 ± 20.4*
G4	297.9 ± 47.8	40.3 ± 6.4 <sup>†</sup>	1791.6 ± 490.1 <sup>†</sup>	116.8 ± 57.0 <sup>†</sup>	404.5 ± 71.5 <sup>†</sup>	52.4 ± 9.8 <sup>†</sup>
G5	261.0 ± 49.8 <sup>†</sup>	40.1 ± 7.4 <sup>†</sup>	1530.2 ± 387.7 <sup>†</sup>	123.6 ± 47.3 <sup>†</sup>	418.1 ± 78.2 <sup>†</sup>	54.7 ± 10.1 <sup>†</sup>
<b><i>Distal</i></b>						
G1	251.2 ± 26.2	34.2 ± 5.5	1507.1 ± 437.0	106.6 ± 52.1	409.1 ± 87.3	31.7 ± 7.1
G2	389.8 ± 45.1*	65.9 ± 11.1*	2807.4 ± 449.3*	308.9 ± 88.5*	825.7 ± 120.9*	75.7 ± 14.5*
G3	336.4 ± 38.5*	56.1 ± 7.5*	2207.6 ± 501.8	271.8 ± 57.2*	680.7 ± 77.3*	59.5 ± 8.7*
G4	315.7 ± 49.0*	53.7 ± 8.4*	2481.7 ± 431.7*	260.4 ± 44.4*	758.3 ± 93.6*	53.8 ± 10.2*
G5	229.2 ± 50.3 <sup>†</sup>	38.8 ± 6.9 <sup>†</sup>	1524.4 ± 368.4 <sup>†</sup>	120.5 ± 62.9 <sup>†</sup>	589.1 ± 78.4 <sup>†</sup>	45.6 ± 8.3 <sup>†</sup>

Valores expressos como média e desvio-padrão (média ± DP). G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Crisina (10 mg/kg); G4, DMH + Crisina (100 mg/kg); G5, DMH + Crisina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \* vs. G1, <sup>†</sup> vs G2.

A análise histoquímica indicou redução significativa da expressão de mucinas ácidas e neutras e da densidade de células mucossecretoras nas criptas de todos os segmentos intestinais em G2 e G3 comparados à G1. De forma geral, a expressão de mucinas e a densidade de células caliciformes foram significativamente maiores em G4 e G5 comparados à G2. No cólon distal, a proporção da área histológica ocupada por mucinas foi significativamente menor em G4 comparado à G1 (Figura 6 e Tabela 3).



**Figura 6.** Distribuição de células caliciformes produtoras de mucinas ácidas (A, B, C e D) e neutras (E e F) nas criptas do cólon médio de ratos sadios (G1) e expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) (G2). O painel (A) mostra ampla densidade e distribuição homogênea de células caliciformes nas criptas (painel em destaque) de animal sadio (Coloração Alcian blue, barra = 110  $\mu$ m). No painel (B) a mesma imagem é observada sob luz polarizada. Notar a

polarização e distribuição uniforme do muco por toda a área tecidual (barra = 110  $\mu\text{m}$ ). No painel (C) são observadas criptas displásicas dilatadas induzidas por DMH. Um foco com duas criptas aberrantes confluentes apresenta-se em destaque na imagem. Notar a reduzida densidade de criptas e células caliciformes, e a maior área ocupada por tecido conjuntivo (asterisco) apresentando vasos sanguíneos (seta) (Coloração com Alcian blue, barra = 110  $\mu\text{m}$ ). (D) Redução da área ocupada pelo muco é claramente observada na imagem sob luz polarizada (barra = 110  $\mu\text{m}$ ). Em (E) é observada ampla distribuição de células produtoras de mucinas neutras nas criptas (coloração Ácido Periódico de Schiff, barra = 70  $\mu\text{m}$ ), com marcada redução no epitélio intestinal displásico de um animal exposto à DMH (F) (coloração Ácido Periódico de Schiff, barra = 70  $\mu\text{m}$ ).

**Tabela 3.** Distribuição de células produtoras de mucinas ácidas e neutras nas criptas do cólon de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Crisina.

Segmento intestinal	Células AB+ (N/mm <sup>2</sup> )	Vv[Mucinas ácidas] (%) <sup>‡</sup>	Células PAS+ (N/mm <sup>2</sup> )	Vv[Mucinas neutras] (%) <sup>‡</sup>
<b><i>Proximal</i></b>				
G1	512.8 ± 62.1	35.0 ± 6.5	481.3 ± 55.7	33.1 ± 7.0
G2	277.1 ± 50.6*	11.1 ± 5.2*	225.8 ± 48.2*	10.4 ± 5.8*
G3	347.9 ± 30.4*	15.0 ± 6.0*	292.8 ± 37.5*	12.8 ± 4.0*
G4	426.2 ± 45.1 <sup>†</sup>	22.4 ± 5.4* <sup>†</sup>	448.6 ± 40.2 <sup>†</sup>	20.6 ± 6.1 <sup>†</sup>
G5	470.8 ± 50.6 <sup>†</sup>	27.1 ± 5.2 <sup>†</sup>	465.1 ± 55.8 <sup>†</sup>	25.3 ± 4.1 <sup>†</sup>
<b><i>Médio</i></b>				
G1	617.4 ± 70.4	36.2 ± 6.9	535.9 ± 61.3	35.0 ± 6.7
G2	312.8 ± 60.4*	12.8 ± 4.7*	328.1 ± 50.1*	11.2 ± 3.8*
G3	345.3 ± 43.1*	12.5 ± 4.9*	350.53 ± 51.2*	13.3 ± 4.0*
G4	470.8 ± 49.5 <sup>†</sup>	25.1 ± 6.7 <sup>†</sup>	437.1 ± 44.6 <sup>†</sup>	24.7 ± 5.7 <sup>†</sup>
G5	552.9 ± 67.7 <sup>†</sup>	27.0 ± 6.0 <sup>†</sup>	469.8 ± 57.1 <sup>†</sup>	28.5 ± 5.5 <sup>†</sup>
<b><i>Distal</i></b>				
G1	702.5 ± 88.3	39.3 ± 6.1	685.7 ± 57.9	36.8 ± 6.5
G2	421.3 ± 61.1*	12.5 ± 5.7*	373.2 ± 65.8*	11.3 ± 5.4*
G3	418.3 ± 62.1*	14.6 ± 5.5*	384.1 ± 60.7*	11.9 ± 4.8*
G4	500.7 ± 51.3* <sup>†</sup>	20.5 ± 6.0*	531.6 ± 57.9* <sup>†</sup>	18.2 ± 5.6*
G5	653.1 ± 65.4 <sup>†</sup>	27.2 ± 4.9* <sup>†</sup>	607.5 ± 69.2 <sup>†</sup>	27.9 ± 5.7 <sup>†</sup>

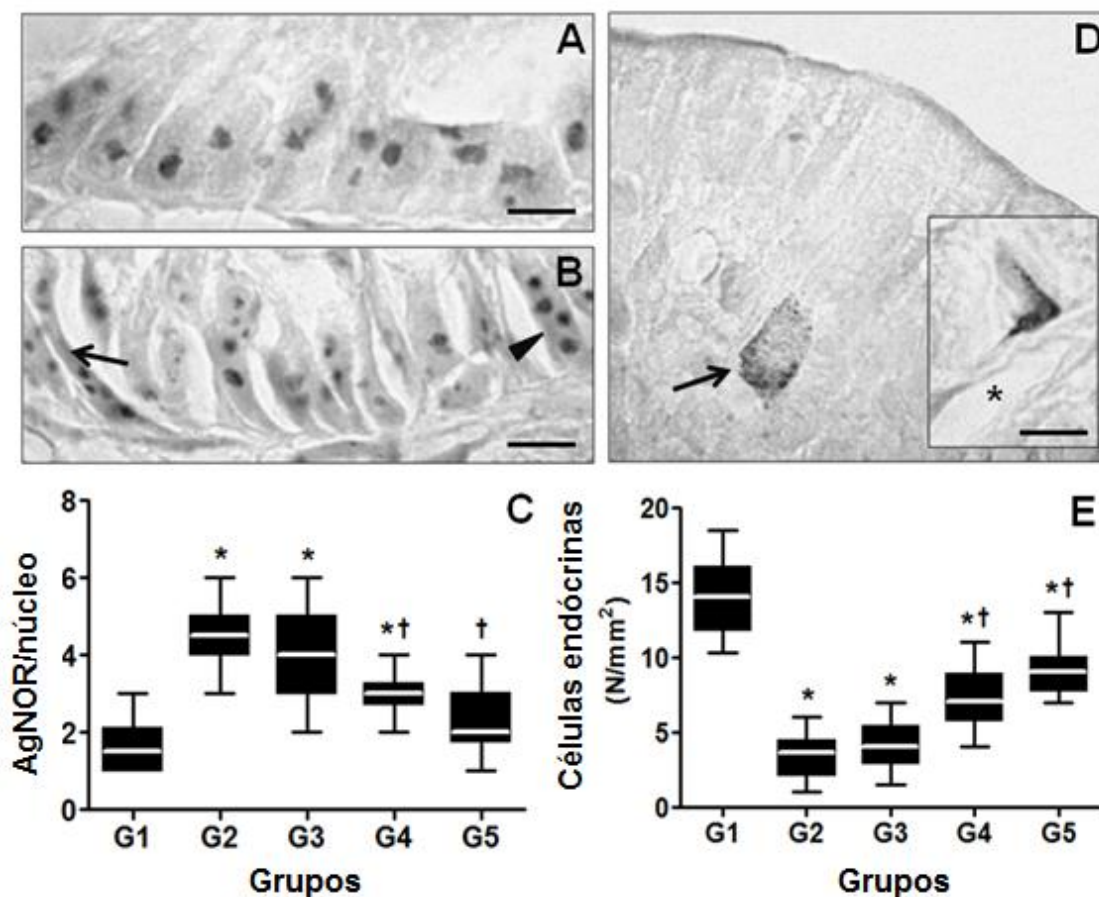
AB+, células positivas ao Alcian blue; PAS+, células positivas ao Ácido Periódico de Schiff.

(%)<sup>‡</sup> percentual da área histológica ocupado pelos tipos de mucina. Valores expressos como média e desvio-padrão (média ± DP). G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução),

DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Crisina (10 mg/kg); G4, DMH + Crisina (100 mg/kg); G5, DMH + Crisina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \*vs. G1, †vs. G2.

### *Análise de AgNORs e células enteroendócrinas*

Para todos os segmentos intestinais investigados, houve aumento significativo do número de regiões organizadoras de nucléolo por núcleo de enterócitos (AgNORs/núcleo) em G2 e G3 comparados à G1. Em G4 e G5 o número AgNORs/núcleo foi significativamente menor comparado à G2. Não houve diferença estatística nesse parâmetro entre G1 e G5 (Figura 7 A, B, C). Em todos os grupos expostos à DMH, houve redução significativa do número de células enteroendócrinas comparados à G1. Em G4 e G5 o número de células enteroendócrinas foi significativamente maior comparado à G2 (Figura 7 D, E).



**Figura 7.** Regiões organizadoras de nucléolo por núcleo de enterócitos (AgNORs/núcleo) e células enteroendócrinas do intestino grosso de ratos expostos a 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Crisina. (A) Fotomicrografia representativa do grupo sadio (G1) indicando núcleos celulares ovóides com um ou três AgNORs/núcleo (barra = 15 $\mu$ m). Em (B) são observados núcleos polimórficos com quatro (cabeça de seta) a seis (seta) AgNORs/núcleo em animais expostos à DMH (G2) (barra = 15 $\mu$ m). (C) Distribuição de AgNORs/núcleo nos grupos investigados. (D) Célula enteroendócrina na base do epitélio intestinal (seta) com grânulos de secreção polarizados na base da célula. Em destaque célula endócrina próxima a um vaso sanguíneo (asterisco) (método de Grimélius, barra = 20  $\mu$ m). (E) Distribuição de células enteroendócrinas por área histológica nos grupos investigados. Valores expressos como média e desvio-padrão (média  $\pm$  DP) para todos os segmentos intestinais. G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH+ NaCl 0,9%; G3, DMH + Crisina (10 mg/kg); G4, DMH + Crisina (100 mg/kg); G5, DMH + Crisina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \*vs. G1, †vs. G2.

### ***Análise bioquímica e de elementos químicos***

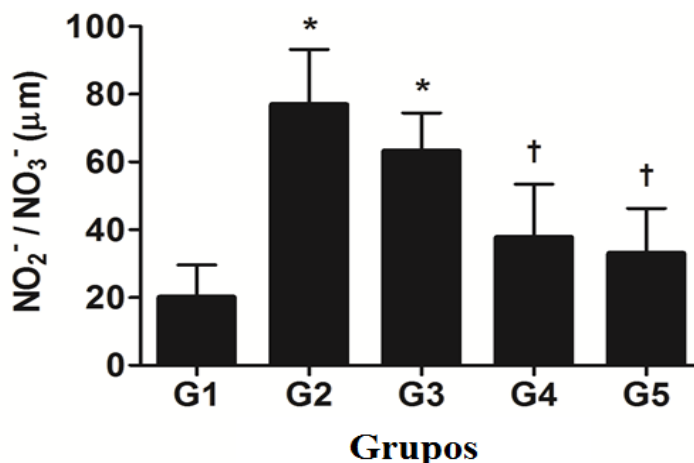
A análise dos parâmetros bioquímicos indicou níveis séricos de proteínas totais significativamente reduzidos em G2 comparado aos demais grupos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4). Os níveis séricos de nitrito/nitrato em G2 foram similares à G3, mas significativamente superiores em relação à G1, G4 e G5 ( $p > 0,05$ ), os quais não apresentaram diferença entre si (Figura 8). Os demais parâmetros avaliados não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Tabela 4).

**Tabela 4.** Parâmetros bioquímicos séricos de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Crisina.

Grupos	Proteínas totais		Albumina		Triacilgliceróis		Colesterol		Glicose	
	Conteúdo médio (g/dL)	Variação (%)	Conteúdo médio (g/dL)	Variação (%)	Conteúdo médio (mg/dL)	Variação (%)	Conteúdo médio (mg/dL)	Variação (%)	Conteúdo médio (mg/dL)	Variação (%)
<b>G1</b>	81.7 ± 3.7	-	3.6 ± 0.5	-	180.2 ± 24.3	-	58.2 ± 14.1	-	105.6 ± 33.1	-
<b>G2</b>	66.9 ± 11.0*	- 18,1*	3.5 ± 0.5	- 2,8	161.0 ± 58.9	- 10,6	58.9 ± 16.2	+ 1,2	116.8 ± 28.4	+ 10,6
<b>G3</b>	84.3 ± 7.4 <sup>†</sup>	+ 3,2 <sup>†</sup>	4.0 ± 0.2	+ 11,1	160.0 ± 44.9	- 11,2	74.7 ± 16.8	+ 27,8	134.7 ± 17.1	+ 27,5
<b>G4</b>	82.3 ± 6.9 <sup>†</sup>	+ 0,7 <sup>†</sup>	3.9 ± 0.2	+ 8,3	125.3 ± 50.3	- 30,4	65.7 ± 14.2	+ 12,8	159.4 ± 78.4	+ 50,9
<b>G5</b>	85.0 ± 2.1 <sup>†</sup>	+ 4,0 <sup>†</sup>	4.0 ± 0.2	+ 11,1	128.4 ± 24.6	- 28,7	69.6 ± 8.8	+ 19,6	102.3 ± 1.4	- 3,1

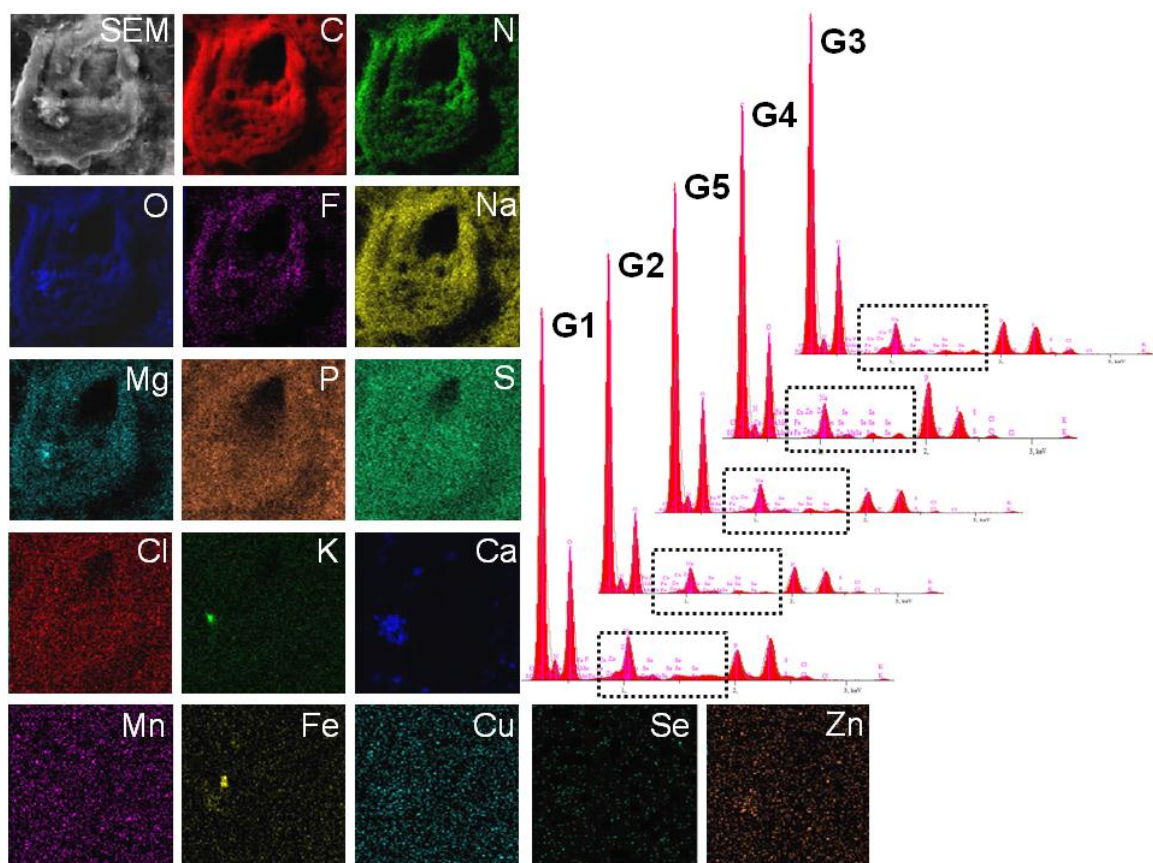
Valores expressos como média e desvio-padrão (média ± DP). G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Crisina (10

mg/kg); G4, DMH + Crisina (100 mg/kg); G5, DMH + Crisina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \* vs. G1, <sup>†</sup>vs. G2.



**Figura 8.** Níveis de óxido nítrico no soro de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Crisina. A concentração de nitrito/nitrato ( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ) foi determinada pelo método de Griess. Valores expressos como média e desvio-padrão (média  $\pm$  DP). G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Crisina (10 mg/kg); G4, DMH + Crisina (100 mg/kg); G5, DMH + Crisina (200 mg/kg).

A análise de EED indicou distribuição homogênea dos elementos químicos, a exceção do cálcio (Ca), na superfície da mucosa em todos os segmentos intestinais investigados, tanto sobre o tecido displásico dos FCA (Figura 9) quanto sobre o tecido normal (dados não mostrados). De forma geral, houve redução significativa nos níveis teciduais de Mg, Mn, Cu, Se, e Zn; e aumento significativo de Cl, Fe, Na, e K, S em G2 e G3 comparados à G1. Em G4 e G5 os níveis de Na, Mg, Mn, Cu, Se, Zn e foram significativamente superiores ao observado em G2, com os melhores resultados encontrados em G5, o qual foi similar à G1 (Figura 9 e Tabela 5).



**Figura 9.** Análise representativa da distribuição de elementos químicos no cólon médio de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Crisina. As imagens representam o mapa de distribuição dos diferentes elementos químicos em uma cripta aberrante no cólon distal de uma animal do grupo 2. Notar a homogeneidade na distribuição mineral, com exceção do cálcio (Ca). Os gráficos constituem os espectros representativos dos elementos químicos analisados no cólon distal em ambos os grupos investigados. A área tracejada indica os picos referentes aos minerais que participam em processos oxidativos/antioxidantes. G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Crisina (10 mg/kg); G4, DMH + Crisina (100 mg/kg); G5, DMH + Crisina (200 mg/kg).

**Tabela 5.** Conteúdo de elementos químicos no cólon de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonoide Crisina.

Elementos	Concentração (%)				
	G1	G2	G3	G4	G5
<b>C</b>	37.5 ± 6.3	37.8 ± 5.7	39.8 ± 4.9	40.1 ± 5.3	39.0 ± 5.0
<b>N</b>	8.1 ± 2.0	8.9 ± 1.8	8.0 ± 1.4	7.4 ± 1.0	7.7 ± 1.7
<b>O</b>	34.5 ± 5.4	35.3 ± 4.9	36.7 ± 3.9	34.2 ± 4.6	32.1 ± 4.2
<b>F</b>	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.2	1.1 ± 0.5	1.2 ± 0.6
<b>Na</b>	3.7 ± 0.3	5.4 ± 0.8*	5.2 ± 0.4*	4.6 ± 0.4*	3.9 ± 0.3 <sup>†</sup>
<b>Mg</b>	1.0 ± 0.1	0.3 ± 0.1*	0.4 ± 0.1*	0.7 ± 0.1* <sup>†</sup>	0.7 ± 0.3 <sup>†</sup>
<b>P</b>	1.5 ± 0.2	2.0 ± 0.6	1.8 ± 0.4	1.8 ± 0.5	2.1 ± 0.7
<b>S</b>	1.6 ± 0.3	2.9 ± 0.6*	2.6 ± 0.6*	2.7 ± 0.5*	1.9 ± 0.5
<b>Cl</b>	0.1 ± 0.1	0.6 ± 0.1*	0.7 ± 0.2*	0.5 ± 0.2*	0.3 ± 0.1 <sup>†</sup>
<b>K</b>	0.1 ± 0.1	1.0 ± 0.3*	1.0 ± 0.4*	0.9 ± 0.2*	0.4 ± 0.2 <sup>†</sup>
<b>Ca</b>	3.0 ± 0.6	2.5 ± 0.5	2.8 ± 0.6	2.7 ± 0.8	3.1 ± 0.7
<b>Mn</b>	1.1 ± 0.3	0.1 ± 0.1*	0.4 ± 0.1* <sup>†</sup>	0.6 ± 0.1* <sup>†</sup>	1.0 ± 0.3 <sup>†</sup>
<b>Fe</b>	0.2 ± 0.1	1.6 ± 0.5*	1.8 ± 0.5*	1.1 ± 0.2*	0.6 ± 0.2* <sup>†</sup>
<b>Cu</b>	1.1 ± 0.3	0.4 ± 0.2*	0.5 ± 0.1*	0.9 ± 0.2 <sup>†</sup>	1.3 ± 0.1 <sup>†</sup>
<b>Zn</b>	1.0 ± 0.2	0.4 ± 0.1*	0.4 ± 0.1*	0.7 ± 0.1 <sup>†</sup>	0.9 ± 0.2 <sup>†</sup>
<b>Se</b>	0.9 ± 0.2	0.1 ± 0.1*	0.2 ± 0.1*	0.4 ± 0.1* <sup>†</sup>	0.7 ± 0.2 <sup>†</sup>

Valores expressos como média e desvio-padrão (média ± DP). Devido ausência de diferença estatística entre os segmentos do cólon, os dados são expressos para todo o intestino grosso. G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Crisina (10 mg/kg); G4, DMH + Crisina (100 mg/kg); G5, DMH + Crisina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \*vs. G1, <sup>†</sup>vs. G2.

## Discussão

No presente estudo foi avaliado o efeito do flavonóide Crisina na redução de lesões pré-neoplásicas no cólon de ratos expostos ao carcinógeno químico DMH. Os resultados indicaram que a administração de Crisina nas doses de 100mg/Kg e 200mg/Kg reduziu a

desorganização morfológica do epitélio intestinal. Nessas doses, o flavonóide reduziu a formação dos FCA, o número total de criptas aberrantes por foco, o número de AgNORs/núcleo em enterócitos, e a intensidade de displasia do epitélio das criptas, aumentando a densidade das células mucossecretoras e enteroendócrinas no epitélio colônico.

Conforme descrito previamente para modelo murino de câncer de cólon induzido por azoximetano (Miyamoto et al., 2006), o tratamento com Crisina foi efetivo na redução de lesões pré-neoplásicas. Diversos estudos têm utilizado os FCA como marcadores para a triagem de compostos indutores e inibidores da carcinogênese colorretal, principalmente em fases iniciais (Demarzo & Garcia, 2004; Newell & Heddle, 2004; Ma et al., 2002). Evidências experimentais demonstram que os FCA representam as manifestações precoces dos fenômenos hiperplásicos e displásicos do epitélio intestinal, com elevado potencial de evolução para carcinomas intestinais (Murillo et al., 2004; Suzuki et al., 2004; Fujita et al., 2004).

Nos animais expostos à DMH, foi observado número reduzido de tumores, provavelmente pelo reduzido tempo de indução aplicado. Têm sido demonstrado que a carcinogênese colorretal é diretamente influenciada pelo tempo de exposição à DMH em modelos murinos. Assim, o desenvolvimento de tumores pode ser efetivamente alcançado com a administração desse carcinógeno por aproximadamente 28 semanas (Bird, 1995; Rodrigues, 2002; Thurnherr et al., 1973). Entretanto, uma vez que seis semanas de exposição DMH são suficientes para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas, modelos experimentais que utilizam curtos períodos de indução são mais aplicáveis em estudos de quimioprevenção (Larangeira et al., 1998; Wargovich et al., 2000). Assim, os resultados presente estudo sugerem que a Crisina apresenta potencial efeito inibitório da carcinogênese em estágios iniciais, com influência limitada sobre lesões cancerosas

avançadas. Entretanto, esse aspecto permanece pouco compreendido e requer estudos adicionais.

No estudo de Walle et al. (2001), a biodisponibilidade da Crisina após administração oral foi investigada em humanos. Nesse estudo, a ingestão de 400 mg deste flavonóide por indivíduos saudáveis foi acompanhada de elevada concentração plasmática do metabólito sulfato de crisina. Segundo Miyamoto et al. (2006), uma fração da Crisina não é absorvida pelo intestino e permanece inalterada na luz intestinal. Esse achado corrobora evidências que demonstraram a ação local de flavonóides como quercetina, rutina e isoquercetina na mucosa intestinal (Olthof et al., 2000; Wolfram et al., 2002). Assim, tem sido sugerido que o efeito da Crisina na inibição da carcinogênese colorretal pode ser relacionado à ação sistêmica e local desse flavonóide na modulação da proliferação das células do epitélio colônico (Miyamoto et al., 2006). Além disso, ação inibitória da Crisina sobre o crescimento celular foi demonstrada *in vitro* pela down-regulation da expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) em células HeLa (Zhang et al., 2004). Além disso, esse flavonoide também foi capaz de inibir a divisão celular e induzir a apoptose de células de câncer de cólon humano via ativação de caspases (Wang et al., 2004). Considerando que instalação e manutenção de um estado pró-inflamatório sistêmico contribuem para a carcinogênese, compostos anti-inflamatórios seriam potencialmente aplicáveis como agentes anticarcinogênicos (Hertog et al., 1995; Hertog & Hollman, 1996). Nesse contexto, a atividade anti-inflamatória da Crisina, mediada pela inibição das enzimas ciclooxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintase (NOS) (Murakami et al., 2003) poderiam representar um importante mecanismo de ação da Crisina na carcinogênese colorretal. De fato, no presente estudo foram identificados reduzidos níveis séricos de nitrito/nitrato nos grupos tratados com Crisina, compostos frequentemente utilizados como indicadores indiretos da inibição da síntese de óxido nítrico e consequentemente da

expressão e/ou atividade da NOS (Woo et al., 2003; Leonardi et al., 2010). Atualmente o estresse oxidativo e nitrosativo tem reconhecido papel no desenvolvimento e progressão de lesões cancerosas. Em geral, neoplasias malignas do endométrio, cérebro, pulmão, pâncreas, ovário, próstata e cólon apresentam elevada expressão da NOS (Hirst & Robson, 2007). Assim, a formação de óxido nítrico e seus derivados reativos contribuem para o dano à lipídios, proteínas, e DNA nas células de tecidos em transformação maligna ou cancerosos (Hirst & Robson, 2007; Ambs et al., 1998). No presente estudo, o nível sérico de nitrito/nitrato indicou elevado estresse nitrosativo sistêmico no grupo G2, condição efetivamente inibida nos grupos tratados com o as maiores doses do flavonoide Crisina.

A análise de AgNORs tem sido descrita como um dos melhores indicadores do comportamento biológico de diferentes tipos de tumor. Assim, a quantificação de AgNORs é utilizada como marcador da gravidade e taxa de crescimento de tumores (Trerè et al., 1989; Öfner et al., 1992). É geralmente aceito que o elevado número de AgNOR/núcleo em células tumorais, independentemente da sua origem, está diretamente relacionado com reduzido tempo de ciclo celular e conseqüentemente elevado ritmo de divisão celular (Derenzini et al., 1998; Trerè et al., 1996; Ohishi et al., 2002). Assim, foi demonstrado em vários tipos de carcinomas humanos, amplo potencial da quantificação de AgNOR no prognóstico em oncologia cirúrgica (Öfner et al., 1995). Na carcinogênese colorretal induzida por azoximetano, o número de AgNORs/núcleo de enterócitos foi significativamente reduzido nos grupos de ratos tratados com epigallocatequina galato e um anti-inflamatório não-esteroidal, indicando redução da proliferação celular no epitélio colônico nesses grupos (Ohishi et al., 2002).

Como sistemas integrados, o sistema nervoso autônomo intrínseco e extrínseco ao intestino atua de forma sinérgica com as células enteroendócrinas para modular processos essenciais á homeostase intestinal como a renovação celular, absorção de nutrientes,

secreção endócrina e exócrina, e motilidade intestinal (Pinto & Clevers, 2005). No presente estudo houve marcada redução do número de células enteroendócrinas nos animais expostos à DMH. Embora essa redução tenha sido parcialmente minimizada pelo tratamento com Crisina, o papel das células enteroendócrinas no câncer de intestino permanece amplamente inexplorado. Sabe-se que cânceres intestinais frequentemente subvertem a via de sinalização Wnt, a qual é necessária para a renovação das células do epitélio intestinal (Gregorieff & Clevers, 2005). Assim, em alguns casos, a contínua ativação dessa via de sinalização pode resultar na deleção do exon 3 do gene da  $\beta$ -catenina e estimular a diferenciação das células enterendócrinas, conduzindo ao desenvolvimento de adenomas intestinais produtores de serotonina (Wang et al., 2007). Assim como as células mucossecretoras (Fodde et al., 2001; Shibata et al., 1997), acredita-se que as células enteroendócrinas podem ser potencialmente úteis como marcadores da evolução do câncer colorretal. Reconhecidamente, ambas as células compartilham de um elevado grau de diferenciação e especialização (Garabedian et al., 1997). Assim, considerando que as células cancerosas frequentemente demonstram características de regressão evolutiva, com a perda de sua diferenciação, não é irrealístico assumir que o grau de depleção das células enteroendócrinas pode indicar o status evolutivo de neoplasias intestinais. Entretanto, essa relação ainda precisa ser comprovada em estudos futuros, principalmente considerando as implicações dessa depleção para a estrutura e função do tubo digestivo.

Os resultados indicaram que o flavonóide Crisina, especialmente o tratamento com a maior dosagem, foi eficaz em minimizar a desorganização morfológica colorretal, reduzindo o número de lesões pré-neoplásicas em ratos expostos ao carcinógeno químico DMH. Os segmentos inicial e médio do cólon parecem ser mais sensíveis ao efeito inibitório desse flavonóide sobre a displasia do epitélio intestinal, o qual aparentemente apresenta influência limitada sobre lesões tumorais previamente estabelecidas. Acredita-se

que parte dos resultados encontrados pode ser decorrente dos efeitos da Crisina na redução da proliferação celular e recuperação dos níveis de minerais antioxidantes na mucosa intestinal.

### **Referências bibliográficas\***

*\*De acordo com as normas do periódico Cell and Tissue Research ISSN: 1432-0878*

Ambs S, Merriam WG, Bennett WP, Felley-Bosco E, Ogunfusika MO, Oser SM, Klein S, Shields PG, Billiar TR, Harris CC (1998) Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. *Cancer Res* 58:334-341

Barreiros ALBS, David JM, David JP (2006) Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Quim Nova* 29:113-123

Bird R P (1987) Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* 37:147-51.

Bird RP (1995) Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett* 93:55-71

Critchfield JW, Butera ST, Folks TM (1996) Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12:39-46

Demarzo MM, Garcia SB (2004) Exhaustive physical exercise increases the number of colonic preneoplastic lesions in untrained rats treated with a chemical carcinogen. *Cancer Lett* 216:31-34

Derenzini M, Trerè D, Pession A, Montanaro L, Sirri V, Ochs RL (1998) Nucleolar function and size in cancer cells. *Am J Pathol* 152:1291-1297

Fodde R, Smits R, Clevers H (2001) APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 1:55-67

Fujita K, Matsuda E, Sekine K, Iigo M, Tsuda H (2004) Lactoferrin modifies apoptosis-related gene expression in the colon of the azoxymethane-treated rat. *Cancer Lett* 213: 21-29

Garabedian EM, Roberts LJ, McNevin MS, Gordon JI (1997) Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice. *J Biol Chem* 272:23729-23740

Gregorieff A, Clevers H (2005) Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* 19:877-890

Grimelius L, Wilander E (1980) Silver stains in the study of endocrine cells of the gut and pancreas. *Invest Cell Pathol* 3:3-12

Haslam E (1996) Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J Nat Prod* 59:205-215

Hertog MGL, Hollman PCH (1996) Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *Eur J Clin Nutr* 50:63-71

Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, Pekkarinen M, Simic BS, Toshima H, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB (1995) Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in The Seven Countries Study. *Arch Intern Med* 155:381-386

Hirst DG, Robson T (2007) Nitrosative stress in cancer therapy. *Front Biosci* 12:3406-3418

Hofseth LJ, Saito S, Hussain SP, Espey MG, Miranda KM, Araki Y, Jhappan C, Higashimoto Y, He P, Linke SP, Quezado MM, Zurer I, Rotter V, Wink DA, Appella E, Harris CC (2003) Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:143-148

Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experimentia* 62:361-367

Hurlstone DP, Cross SS (2005) Role of aberrant crypt foci detected using high-magnification-chromoscopy colonoscopy in human colorectal carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 20:173-181

Issa JP, Ahuja N, Toyota M, Bronner MP, Brentnall TA (2001) Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res* 61:3573-3577

Jass JR (2004) Hyperplastic polyps and colorectal cancer: is there a link? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2:1-8

Larangeira LLS, Taha MO, Ferme A, Lemos R, Plapler H (1998) Localização de lesões tumorais induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no cólon de ratos. *Acta Cir Bras* 13:00-00

Leonardi T, Vanamala J, Taddeo SS, Davidson LA, Murphy ME, Patil BS, Wang N, Carroll RJ, Chapkin RS, Lupton JR, Turner ND (2010) Apigenin and naringenin suppress colon carcinogenesis through the aberrant crypt stage in azoxymethane-treated rats. *Exp Biol Med* 235:710-717

Levy M, Visokai V, Lipska L, Topolcan O (2008) Tumor markers in staging and prognosis of colorectal carcinoma. *Neoplasma* 55:138-42

Lyra Júnior HF, Bonardi MA, Schiochet VJC, Baldin Júnior A, Carnes ER, Sartor MC, Pisani JC, Brenner S, Bonardi RA (2005) Importância da Colonoscopia no Rastreamento de Pólipos e Câncer Colorretal em Pacientes Portadores de Pólipos Retais. *Rev Bras Coloproct* 25:226-234

Ma QY, Williamson KE, Rowlands BJ (2002) Variability of cell proliferation in the proximal and distal colon of normal rats and rats with dimethylhydrazine induced carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 8:847-852

Mandarim-de-Lacerda CA (2003) Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 75:469-486

Meira LB, Bugni JM, Green SL, Lee C-W, Pang B, Borenshtein D, Rickman BH, Rogers AB, Moroski-Erkul CA, McFaline JL, Schauer DB, Dedon PC, Fox JG, Samson LD (2008) DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J Clin Invest* 118:2516-2525

Miyamoto S, Kohno H, Suzuki R, Sugie S, Murakami A, Ohigashi H, Tanaka T (2006) Preventive effects of chrysin on the development of azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Oncol Rep* 15:1169-1173

Murakami A, Matsumoto K, Koshimizu K, Ohigashi H (2003) Effects of selected food factors with chemopreventive properties on combined lipopolysaccharide and interferon gamma-induced kappaB degradation in RAW264.7 macrophages. *Cancer Lett* 195:17-25

Murillo G, Choi JK, Pan O, Contantinou AI, Mehta RG (2004) Efficacy of garbanzo and soybean flour in suppression of aberrant crypt foci in the colons of CF-1 mice. *Anticancer Res* 24:3049-3055

Naczki M, Shahidi F (2004) Extractions and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A* 1054:95-111

Nascimbeni RMD, Villanacci VMD, Mariani PPMD, Di Betta EMD, Ghirardi MMD, Donato FMD, Salerni BMD (1999) Aberrant crypt foci in the human colon: frequency and histologic patterns in patients with colorectal cancer or diverticular disease. *Am J Surg Pathol* 23:1256-1263

Newell LE, Heddle JA (2004) The potent colon carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. *Mutat Res.* 564:1-7

Nielsen SE, Breinholt V, Justesen U, Cornett C, Dragsted LO (1998) In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. *Xenobiotica* 28:389-401

Öfner D, Hittmair A, Marth C, Öfner C, Totsch M, Daxenbichler G, Mikuz G, Margreiter R, Schmid KW (1992) Relationship between quantity of silver stained nucleolar organizer regions associated proteins (Ag-NORs) and population doubling time in ten breast cancer cell lines. *Pathol Res Pract* 188:742-746

Öfner D, Riedmann B, Maier H, Hittmair A, Rumer A, Tötsch M, Spechtenhauser B, Böcker W, Schmid KW (1995) Standardized staining and analysis of argyrophilic nucleolar organizer region associated proteins (AgNORs) in radically resected colorectal adenocarcinoma - correlation with tumour stage and long-term survival. *J Pathol* 175:441-448

Ohishi T, Kishimoto Y, Miura N, Shiota G, Kohri T, Hara Y, Hasegawa J, Isemura M (2002) Synergistic effects of (-)-epigallocatechin gallate with sulindac against colon carcinogenesis of rats treated with azoxymethane. *Cancer Lett* 177:49-56

Olthof MR, Hollman PCH, Vree TB, Katan MB (2000) Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *J Nutr* 130:1200-1203

Pietta P (2000) Flavonoids as Antioxidants. *J Nat Prod* 63:1035-1042

Pinto D, Clevers H (2005) Wnt, stem cells and cancer in the intestine. *Biol Cell* 97:185-196

Ricart-Jané D, Llobera M, López-Tejero MD (2002) Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the griess method. *Nitric Oxide* 6:178-185

Ricciardiello L, Goel A, Mantovani V, Fiorini T, Fossi S, Chang DK, Lunedei V, Pozzato P, Zagari RM, De Luca L, Fuccio L, Martinelli GN, Roda E, Boland CR, Bazzoli

F (2003) Frequent loss of hMLH1 by promoter hypermethylation leads to microsatellite instability in adenomatous polyps of patients with a single first-degree member affected by colon cancer. *Cancer Res* 63:787-792

Rikako S, Hiroyuki K, Akira M, Koichi K, Hajime O, Masamichi Y, Harukuni T, Hoyoku N, Takuji T (2004) Citrus nobiletin inhibits azoxymethane-induced large bowel carcinogenesis in rats. *Biofactors* 22:111-114

Roberts CK, Barnard RJ (2005) Effects of exercise and diet on chronic disease. *J Appl Physiol* 98:3-30

Rodrigues MAM, Silva LAG, Salvadori DMF, Camargo JLV, Montenegro MR (2002) 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* 35:351-355

Shibata H, Toyama K, Shioya H, Ito M, Hirota M, Hasegawa S, Matsumoto H, Takano H, Akiyama T, Toyoshima K (1997) Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene. *Science* 278:120-123

Siess MH, Le Bon AM, Canivenc-Lavier MC, Amiot MJ, Sabatier S, Aubert SY, Suschetet M (1996) Flavonoids of honey and propolis: Characterization and effects on hepatic drugmetabolizing enzymes and benzo[a]pyrene-DNA binding in rats. *J Agric Food Chem* 44:2297-2301

Spilsbury A, Vauzour D, Spencer JPE, Rattray M (2012) Regulation of NF- $\kappa$ B activity in astrocytes: effects of flavonoids at dietary-relevant concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* 418:578-583

Suganuma M, Ohkura Y, Okabe S, Fujiki H (2001) Combination cancer chemoprevention with green tea extract and sulindac shown in intestinal tumor formation in Min mice. *J Cancer Res Clin Oncol* 127:69-72

Sun CL, Yuan JM, Lee MJ, Yang CS, Gao YT, Ross RK, Yu MC (2002) Urinary tea polyphenols in relation to gastric and esophageal cancers: a prospective study of men in Shanghai, China. *Carcinogenesis* 23:1497-1503

Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Sasaki K, Yoshimura T, Wada K, Tanaka T (2004) 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* 210:159-169

Thurnherr N, Deschner EE, Stonehill EH, Lipkin M (1973) Induction of adenocarcinomas of the colon in mice by weekly injections of 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res* 33:940-945

Trerè D, Gramantieri L, Siringo S, Melchiorri C, Barbara L, Bolondi L, Derenzini M, (1996) In hepatocellular carcinoma AgNOR protein expression correlates with tumour mass doubling time. *J Hepatol* 24:60-65

Trerè D, Pession A, Derenzini M (1989) The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. *Exp Cell Res* 184:131-137

Ullman TA, Itzkowitz SH (2011) Intestinal Inflammation and Cancer. *Gastroenterology* 140:1807-1816

Walle T, Otake Y, Brubaker JA, Walle UK, Halushka PV (2001) Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 51:143-146

Wang W, Vanalstyne PC, Irons KA, Chen S, Stewart JW, Birt DF (2004) Individual and interactive effects of apigenin analogs on G2/M cell-cycle arrest in human colon carcinoma cell lines. *Nutr Cancer* 48:106-114

Wang Y, Giel-Moloney M, Rindi G, Leiter AB (2007) Enteroendocrine precursors differentiate independently of Wnt and form serotonin expressing adenomas in response to active  $\beta$ -catenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:11328-11333

Wargovich MJ, Jimenez A, McKee K, Steele VE, Velasco M, Woods J, Price R, Gray K, Kelloff GJ (2000) Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression. *Carcinogenesis* 21:1149-1155

Wolffram S, Blöck M, Ader P (2002) Quercetin-3-Glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *J Nutr* 132:630-635

Woo CWH, Cheung F, Chan VWH, Siow YL, Karmin O (2003) Homocysteine, stimulates inducible nitric oxide synthase expression in macrophages: antagonizing effect of ginkgolides and bilobalide. *Mol Cell Biochem* 243:37-47

Yoshimi N, Morioka T, Kinjo T, Inamine M, Kaneshiro T, Shimizu T, Suzui M, Yamada Y, Mori H (2004) 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* 95:792-797

Youdima KA, Shukitt-Halea B, MacKinnonb S, Kaltb W, Joseph JA (2000) Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1523:117-122

Zhang T, Chen X, Qu L, Wu J, Cui R, Zhao Y (2004) Chrysin and its phosphate ester inhibit cell proliferation and induce apoptosis in Hela cells. *Bioorg Med Chem* 12: 6097-6105

### CAPÍTULO 3

#### **Efeito do flavonóide hesperidina na progressão de lesões pré-cancerosas colorretais em ratos expostos ao carcinógeno 1,2 dimetilhidrazina**

**RESUMO** - A carcinogênese do cólon é uma doença crônico-degenerativa influenciada por fatores genéticos, ambientais, dietéticos e relacionados ao estilo de vida. A hesperidina é um glicosídeo de ocorrência natural predominante em frutas cítricas, que apresenta uma variedade de efeitos farmacológicos antioxidante, anti-inflamatório, neuroprotetor, anticarcinogênico e antiviral. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do flavonóide hesperidina na progressão de lesões pré-cancerosas colorretais em ratos expostos ao carcinógeno 1,2 dimetilhidrazina. Ratos Wistar fêmeas pesando  $130,8 \pm 27,1$ g receberam injeção subcutânea semanal de 1,2-dimetilhidrazina (DMH, 20 mg/kg) durante 10 semanas. Os animais foram divididos em 5 grupos com 7 animais em cada grupo. Grupo 1: NaCl 0,9%; Grupo 2: DMH + NaCl 0,9%; Grupo 3: DMH + Hesperidina (10 mg/kg); Grupo 4: DMH + Hesperidina (100 mg/kg); Grupo 5: DMH + Hesperidina (200 mg/kg). Em G2 e G3 houve aumento significativo do número de FCA e regiões organizadora de nucléolo por núcleo de enterócitos (AgNORs/núcleo) comparado à G1. Para todos os segmentos intestinais os melhores resultados foram observados em G5. Em todos os grupos tratados com o flavonóide, a redução dos FCA foi mais acentuada nos cólons médio e distal. O número de AgNORs/núcleo e o nível de minerais antioxidantes como cobre, magnésio, selênio e zinco foi significativamente reduzido no epitélio dos FCA em G2 e G3, mas significativamente superiores em G5, comparado à G1. A Hesperidina, especialmente na dose de 200mg/kg, foi eficaz em minimizar o remodelamento morfológico colorretal, reduzindo o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas em ratos expostos à 1,2-dimetilhidrazina. Sugere-se que parte desse efeito pode ser decorrente da

redução da proliferação celular e dos níveis de ferro teciduais, e recuperação dos níveis de minerais antioxidantes induzidos por esse flavonóide.

**Palavras-chave:** câncer, intestino, flavonóide, 1,2-dimetilhidrazina

## **Introdução**

O câncer é uma doença crônico-degenerativa influenciada por fatores genéticos, ambientais, dietéticos e relacionados com o estilo de vida. Devido ao aumento da incidência, prevalência e ao elevado impacto socioeconômico, diferentes tipos de câncer caracterizam-se como importantes problemas de saúde pública em todo o mundo (Tonon et al., 2007).

A carcinogênese do cólon ocorre através de uma seqüência de eventos, tais como mutações em células somáticas seguido de sua expansão clonal (Ullman & Itzkowitz, 2011). O desenvolvimento do câncer colorretal envolve vários processos de alterações genotípicas e fenotípicas, que morfológicamente podem se apresentar como focos de criptas aberrantes (FCA) que são lesões pré-neoplásicas da mucosa colônica, utilizados como marcadores para o risco de desenvolvimento do câncer colorretal e podem ser induzidos quimicamente (Bird, 1987; Bird, 1995; Newell & Heddle, 2004).

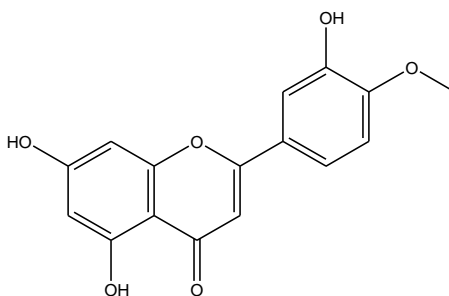
1,2 dimetilhidrazina (DMH) ou o seu metabólito azoximetano (AOM) são frequentemente utilizados para a indução da carcinogênese experimental do colorretal. A DMH é um agente de alquilação e o tratamento com este produto químico promove metilação ao DNA, causando mutações pontuais, assim como o aumento da proliferação das células epiteliais do cólon (Ma et al., 2002).

O desenvolvimento do câncer colorretal resulta de uma transformação no tecido epitelial colônico, que vai de normal para pólipo adenomatoso e, subsequentemente, câncer, esta é uma modificação que ocorre lentamente, provavelmente em vários anos (Júnior et al., 2005). Algumas etapas estão relacionadas com a evolução do carcinoma de colorretal como o acúmulo de mutações genéticas nos genes de supressão tumoral (APC e p53) e oncogenes (K-ras) que permitem a progressão para adenocarcinoma (East et al.,

2008). O gene APC atua principalmente na regulação de uma proteína denominada  $\beta$ -catenina importante na aderência celular (Chen et al., 2007) e a perda da função do gene p53 é um passo importante na progressão do câncer colorretal (Yin et al., 1993).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Destas últimas destacam-se tocoferóis, ácido ascórbico, polifenóis, selênio e carotenóides (Haslam, 1996). Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células, quando há limitação na sua biodisponibilidade podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo (Barreiros et al., 2006).

A hesperidina (4'-metoxi-7-O-rutinosil-3',5-dihidroxi-flavanona), é um glicosídeo de ocorrência natural predominante em frutas cítricas, que é hidrolisado pela microflora intestinal formando a aglicona hesperitina (4'-metoxi-3',5,7-trihidroxi-flavanona) (figura 1) (Haidari et al., 2009).



**Figura 1.** Fórmula estrutural da aglicona hesperitina

Tem sido bem documentado que hesperidina e hesperitina (aglicona) mostraram grande variedade de efeitos farmacológicos antioxidante, anti-inflamatório, neuroprotetor, anticarcinogênico e antiviral (Yang et al., 2012; Hosseinimehr & Nemati, 2006). Assim, baseado em relatos anteriores, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da hesperidina na

formação de focos de criptas aberrantes colorretais induzida pelo carcinógeno químico DMH em ratos.

## **Material e Métodos**

### ***Animais e modelo experimental***

Foram utilizados 35 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas, com 8 semanas de idade e peso inicial de  $130,8 \pm 27,1$  gramas fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Durante todo o experimento os animais foram alojados individualmente em caixas com sistema de ventilação automatizado (Ventilife Alesco®, São Paulo, Brasil), mantidas em ambiente com temperatura ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade (60% - 70%) e luminosidade (12/12 h claro/escuro) controladas, recebendo água e ração *ad libitum*. Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais com 7 animais em cada grupo. Grupo 1 (controle): NaCl 0,9%; Grupo 2 (controle da indução): DMH + NaCl 0,9%; Grupo 3: DMH + Hesperidina (10 mg/kg); Grupo 4: DMH + Hesperidina (100 mg/kg); Grupo 5: DMH + Hesperidina (200 mg/kg). O estudo foi conduzido de acordo com as normas internacionalmente aceitas para o uso e cuidados com animais de laboratório, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde - UNIVIÇOSA (protocolo de aprovação 00002/2012-I).

A carcinogênese colorretal foi induzida por meio de uma injeção subcutânea de 1,2 dimetilhidrazina (Aldrich Chemical Co, Milwaukee, USA) na dose de 20 mg/kg a cada semana durante 10 semanas (Larangeira et al., 1998). A partir da 11ª semana, o flavonóide Hesperidina diluído em 700 µl de NaCl 0,9% (veículo) foi administrado por gavagem 3 vezes semana, durante 14 semanas. Os animais dos grupos 1 e 2 receberam gavagem apenas com NaCl 0,9% (700 µl). O peso dos animais foi registrado semanalmente. Ao final

das 25 semanas os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical sob anestesia (ketamina 10 mg/kg e xilazina 2 mg/kg i.p.) após jejum de 12 horas.

### ***Determinação dos focos de criptas aberrantes***

Após a eutanásia o intestino grosso foi removido *in totum*, lavado em NaCl 0,9%, aberto longitudinalmente, e fixado durante 24 horas em placas de parafina contendo formol tamponado a 10%, pH= 7,2 (Bird 1987). Os intestinos foram medidos e divididos em três fragmentos iguais (cólon proximal, médio e distal) em relação ao ceco. Em seguida, foram corados com azul de metileno 0,1% por um minuto e lavados em tampão fosfato, pH= 7,2, para análise microscópica. Para identificação e quantificação dos focos de criptas aberrantes (FCA), a superfície mucosa do intestino grosso foi observada a partir dos fragmentos intactos do cólon com auxílio de microscópio de luz (Olympus BX-60<sup>®</sup>, Tóquio, Japan), com lente objetiva de 10 vezes (Bird 1987, 1995). Toda a área do cólon foi avaliada e categorização dos FCA foi realizada mediante a determinação da frequência observada de criptas aberrantes em cada foco. Dessa forma, as categorias estabelecidas incluíram focos com 1, 2, 3, 4 a 10, acima de 10 criptas aberrantes, e tumor.

### ***Histopatologia, histoquímica de mucinas e histomorfometria***

Após a análise dos FCA, os fragmentos intestinais foram descorados com lavagens sucessivas em etanol 50%, desidratados em etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Foram obtidos cortes de 4µm de espessura em micrótomo rotativo (Leica Multicut 2045<sup>®</sup>, Reichert-Jung Products, Alemanha) que foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para caracterização morfológica geral do tecido, Alcian blue (AB) e Ácido Periódico de Schiff (PAS) para marcação de células mucossecretoras (Yoshimi et al., 2004). Para evitar a análise da mesma área histológica, foram utilizados 1 a cada 20 cortes de

tecido. Os cortes foram visualizados e as imagens capturadas por meio de um microscópio de luz (Olympus BX-60<sup>®</sup>, Tóquio, Japan) conectado a uma câmera digital (Olympus QColor-3<sup>®</sup>, Tokyo, Japan). Para cada coloração e grupo investigado, foram obtidos aleatoriamente sessenta campos microscópicos com lente objetiva de 40x, de modo que uma área total de  $8,27 \times 10^5 \mu\text{m}^2$  foi analisada para cada segmento intestinal.

Os parâmetros histopatológicos analisados foram a presença de displasia tecidual, dilatação de criptas e morfologia dos enterócitos (Yoshimi et al., 2004). A partir de secções longitudinais coradas com H&E, foram determinados os parâmetros morfométricos de comprimento e largura das criptas. Em secções transversais foi determinada a área das criptas e do seu lúmen. O volume das criptas e do lúmen foi estimado multiplicando o comprimento das criptas pela área das criptas e área do lúmen, respectivamente. Em secções transversais coradas com AB e PAS foi determinado o número de células mucossecretoras por unidade de área histológica. Nessas mesmas secções, a densidade de volume (Vv) ocupada por mucinas ácidas (AB+) e neutras (PAS+) na área histológica foi estimada por contagem de pontos usando a seguinte fórmula:  $V_v [AB+, PAS+] = P_p [AB+, PAS+] / P_T$ ; onde  $P_p$  é o número de pontos que incidem sobre cada tipo de mucina e  $P_T$  é o número total de pontos de teste. Para essa análise foi utilizado um sistema de teste com 72 pontos aplicados sobre uma área histológica padronizada de  $20,0 \times 10^3 \mu\text{m}^2$  (Mandarim-de-Lacerda, 2003).

#### ***Análise de AgNORs e células enteroendócrinas***

A marcação e quantificação das regiões organizadoras de nucléolo (AgNORs) foi realizada por meio do método descrito por Howell e Black, (1980). Brevemente, cortes de 4  $\mu\text{m}$  dos três segmentos intestinais foram incubados com solução de prata coloidal na ausência de luz durante 60 minutos a temperatura ambiente. AgNORs foram visualizados

em microscópio de luz (Olympus BX-60<sup>®</sup>, Tóquio, Japan) com lente objetiva de 1000x e contadas em núcleos de 120 enterócitos amostrados aleatoriamente em 40 criptas intestinais de cada segmento do cólon para cada animal. Os resultados foram expressos para todo o intestino como o número de AgNORs por núcleo.

A marcação de células enteroendócrinas foi realizada pelo método de Grimelius (Grimelius e Wilander, 1980). Para cada animal e segmento intestinal, a quantificação das células enteroendócrinas foi realizada em dez campos histológicos obtidos aleatoriamente com objetiva de 40x. Assim, uma área total de  $1,38 \times 10^5 \mu\text{m}^2$  foi analisada para cada segmento intestinal. Os resultados foram expressos para todo o intestino como o número de células enteroendócrinas por unidade de área histológica. Toda a análise histomorfométrica foi realizada por meio do software Image Pro-plus 4.5<sup>®</sup> (Media Cybernetcs, Silver Spring, MD, USA).

#### ***Microanálise de elementos químicos***

Fragmentos do terço proximal, médio e distal de cada um dos três segmentos do cólon (proximal, médio e distal) foram dissecados, desidratados em etanol e submetidos à secagem ao ponto crítico (CPD 030, Bal-tec, Witten, North Rhine-Westphalia, Alemanha). O conteúdo e a distribuição dos elementos químicos foram investigados por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EED) usando um microscópio eletrônico de varredura (Leo 1430VP) acoplado a um detector de Raios-X (Tracor TN5502, Middleton, WI, EUA). Foi utilizado um aumento de 300 vezes, voltagem de aceleração de 20 kV e distância de trabalho de 19 mm. Para cada grupo foi investigada uma área total de  $36.18 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  em cada segmento do cólon. A proporção dos elementos carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O), sódio (Na), magnésio (Mg), fósforo (P), enxofre

(S), potássio (K), cálcio (Ca), manganês (Mn), ferro (Fe), cobre (Cu) selênio (Se) e Zinco (Zn) foi mensurada e expressa como o valor médio para todo o cólon.

#### ***Análise bioquímica e hematológica***

Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca no momento da eutanásia. Uma alíquota do sangue foi centrifugada e o soro utilizado para dosagem bioquímica de albumina, proteínas totais, glicose, colesterol e triacilgliceróis (Alizè<sup>®</sup>, França). A concentração de óxido nítrico foi determinada pelo método de Griess (Ricart-Jané et al., 2002). Brevemente, alíquotas do soro foram incubadas com o reagente de Griess (sulfanilamida 2% (w/v) e N-(1-naftil) etilenodiamina 0,2% (w/v) em água deionizada) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro na absorvância de 540 nm. A quantificação de hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos, e plaquetas foi realizada no sangue total contendo anticoagulante (EDTA) utilizando contador automático (Humacount, Human GmbH, Wiesbaden, Alemanha).

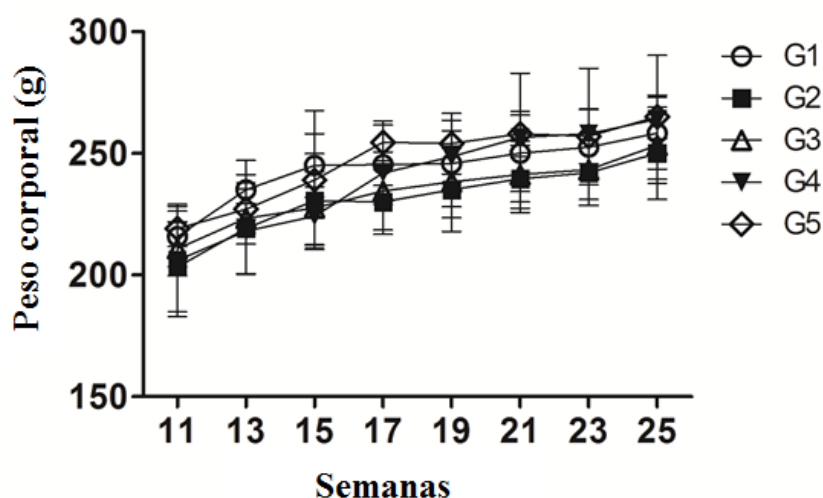
#### ***Análise estatística***

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (média  $\pm$  DP). Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks) seguidos pelo teste de Dunnett. Resultados com valor  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## Resultados

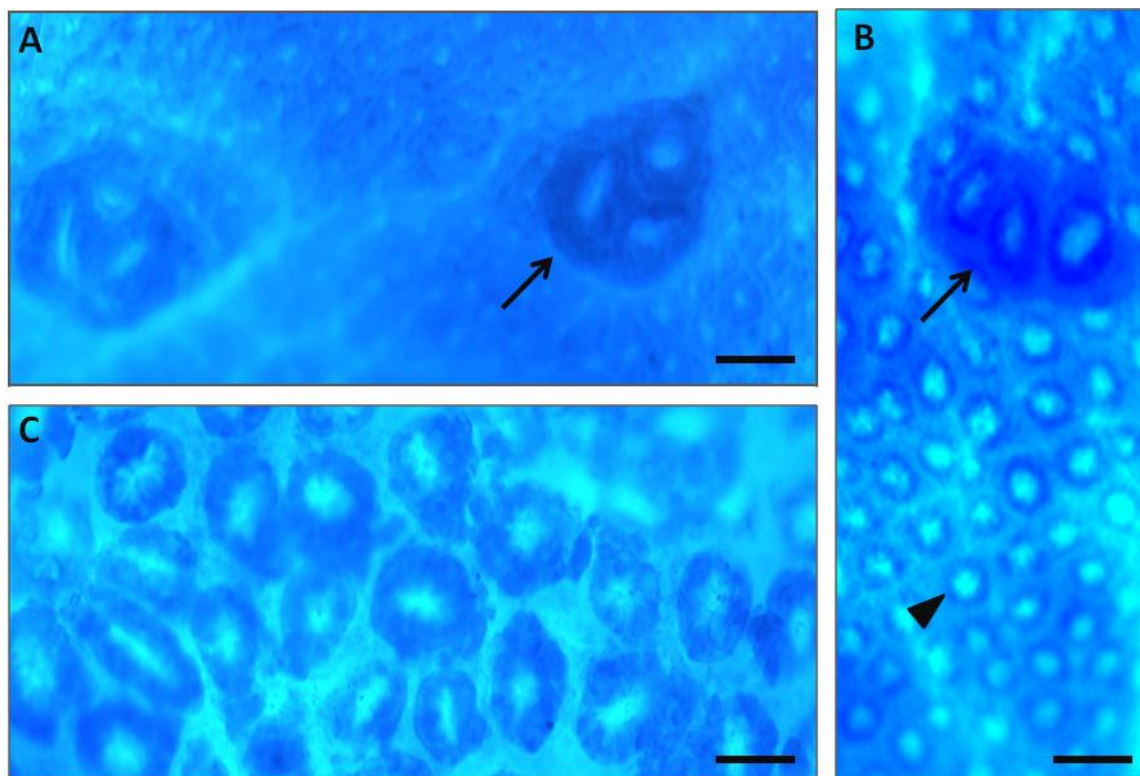
### *Análise biométrica e dos focos de criptas aberrantes*

Não houve diferença significativa no peso corporal (Figura 1) e comprimento intestinal (dados não mostrados) entre os grupos após as 25 semanas de experimento.



**Figura 2.** Evolução do peso corporal de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Hesperidina. G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Hesperidina (10 mg/kg); G4, DMH + Hesperidina (100 mg/kg); G5, DMH + Hesperidina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \* vs. G1, † vs G2.

A análise da superfície da mucosa intestinal demonstrou a presença de FCA em todos os segmentos do cólon nos grupos expostos à DMH. Os FCA apresentaram-se distribuídos ao longo de toda a superfície do cólon. Diferentes níveis de desenvolvimento dos FCA foram observados, com predomínio de focos contendo entre 1 e 3 criptas aberrantes circundadas por criptas normais, distribuídos principalmente no cólon médio e distal (Figura 2).



**Figura 3.** Fotomicrografias representativas de criptas do cólon distal de ratos sadios (C) e expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) (A, B) obtidas por montagem total do intestino. Nos animais expostos à DMH são identificados focos com 3 (A, B) criptas aberrantes, caracterizadas por dilatação do epitélio de revestimento intestinal e protrusão em direção à luz intestinal. No painel (B) são observadas criptas normais (cabeça de seta) ao redor do foco de cripta aberrante (seta) (Coloração Azul de Metileno, barras = 40  $\mu$ m).

A quantificação das lesões da mucosa intestinal mostrou aumento do número de FCA nos três segmentos cólon em todos os grupos expostos à DMH. De forma geral, o tratamento com o flavonóide hesperidina não mostrou bons resultados em relação à G2. Para todos os segmentos intestinais os melhores resultados foram observados em G5. Em todos os grupos tratados com o flavonóide, a redução dos FCA foi mais acentuada nos cólons médio e distal. Foi observada baixa frequência de tumores nos animais expostos à DMH. Os tratamentos com o flavonóide nem sempre foram eficientes na redução do número destes tumores (Tabela 1).

**Tabela 1.** Análise dos focos de criptas aberrantes de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Hesperidina.

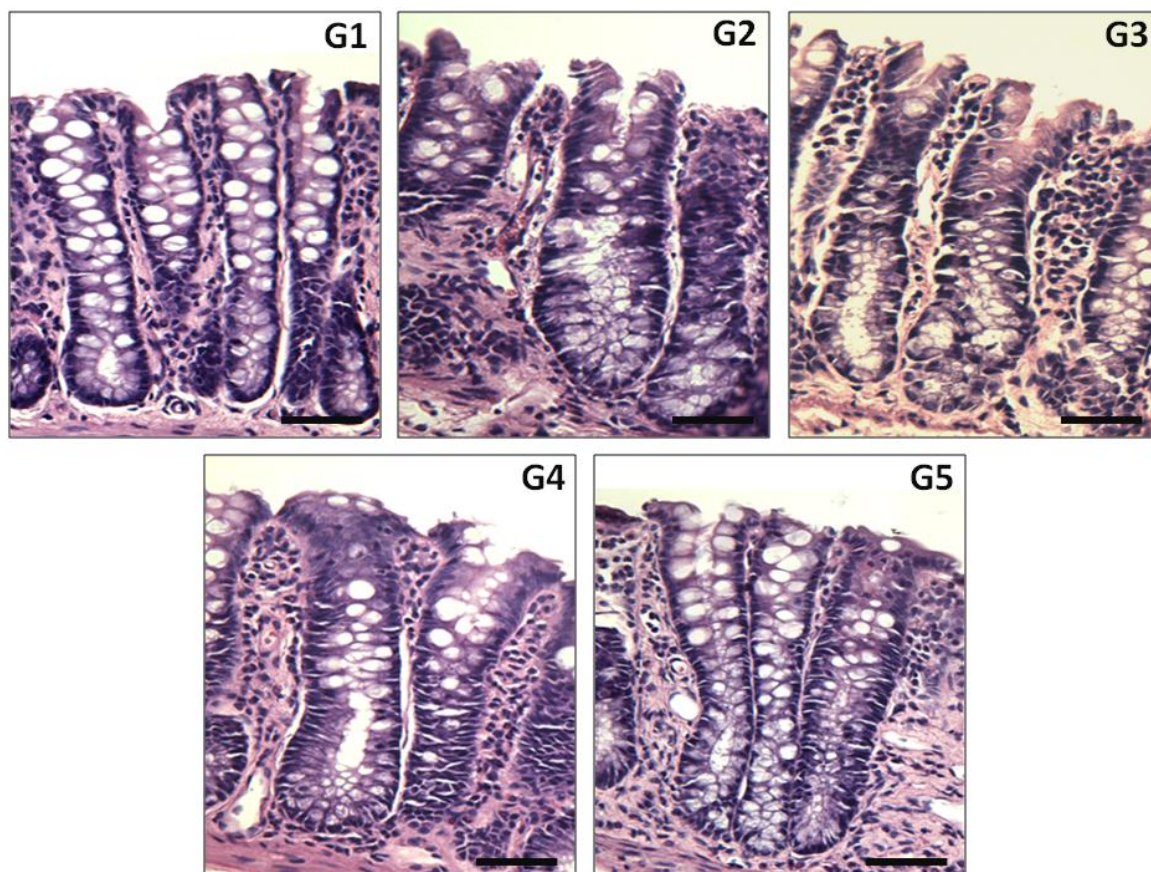
Segmento intestinal / Número de cripta aberrante por foco	G1	G2	G3	G4	G5
<b>Proximal</b>					
1	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,1*	10,3 ± 4,2*†	16,8 ± 7,7*†	12,0 ± 6,8*†
2	0,0 ± 0,0	12,3 ± 4,7*	10,3 ± 5,4*	5,2 ± 4,9*	4,8 ± 2,9*†
3	0,0 ± 0,0	5,3 ± 1,4*	6,2 ± 1,7*	3,7 ± 2,0*	4,0 ± 1,0*
4 to 10	0,0 ± 0,0	3,0 ± 1,0*	3,5 ± 1,0*	3,7 ± 1,2*	3,2 ± 1,1*
> 10	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,4*	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,1*†	0,0 ± 0,0†
Tumor	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,1*	0,5 ± 0,1*	0,3 ± 0,1*	0,2 ± 0,1*†
<b>Médio</b>					
1	0,3 ± 0,1	55,3 ± 9,3*	47,0 ± 12,5*	58,3 ± 20,2*	52,2 ± 41,7*
2	0,2 ± 0,1	10,7 ± 3,5*	9,3 ± 2,9*	8,3 ± 3,0*	6,5 ± 2,5*
3	0,0 ± 0,0	6,7 ± 1,0*	8,2 ± 3,1*	6,3 ± 2,3*	4,8 ± 1,9*
4 to 10	0,0 ± 0,0	9,7 ± 3,4*	8,3 ± 6,4*	6,8 ± 4,7*	3,7 ± 1,2*†
> 10	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,4*†	1,3 ± 0,6*†	0,2 ± 0,1*†
Tumor	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,2	0,2 ± 0,1*†	0,3 ± 0,1*†	0,2 ± 0,1*†
<b>Distal</b>					
1	0,5 ± 1,2	28,3 ± 20,5*	36,5 ± 11,3*	29,7 ± 10,4*	45,7 ± 14,7*
2	0,0 ± 0,0	9,8 ± 4,1*	10,6 ± 5,1*	9,4 ± 3,9*	6,3 ± 2,4*
3	0,2 ± 0,4	4,5 ± 2,2*	7,3 ± 2,9*	5,7 ± 2,2*	1,3 ± 0,5*†
4 to 10	0,0 ± 0,0	4,7 ± 2,4*	6,0 ± 2,7*	5,1 ± 2,5*	1,2 ± 0,8*†
> 10	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,1*†	0,2 ± 0,1*†	0,0 ± 0,0
Tumor	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,1*	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,1*	0,2 ± 0,1*†

Valores expressos em relação à média e desvio-padrão (média ± SD). G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Hesperidina (10 mg/kg); G4, DMH + Hesperidina (100 mg/kg); G5, DMH + Hesperidina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \* vs. G1, † vs. G2.

### **Análise histopatológica, histoquímica e histomorfométrica**

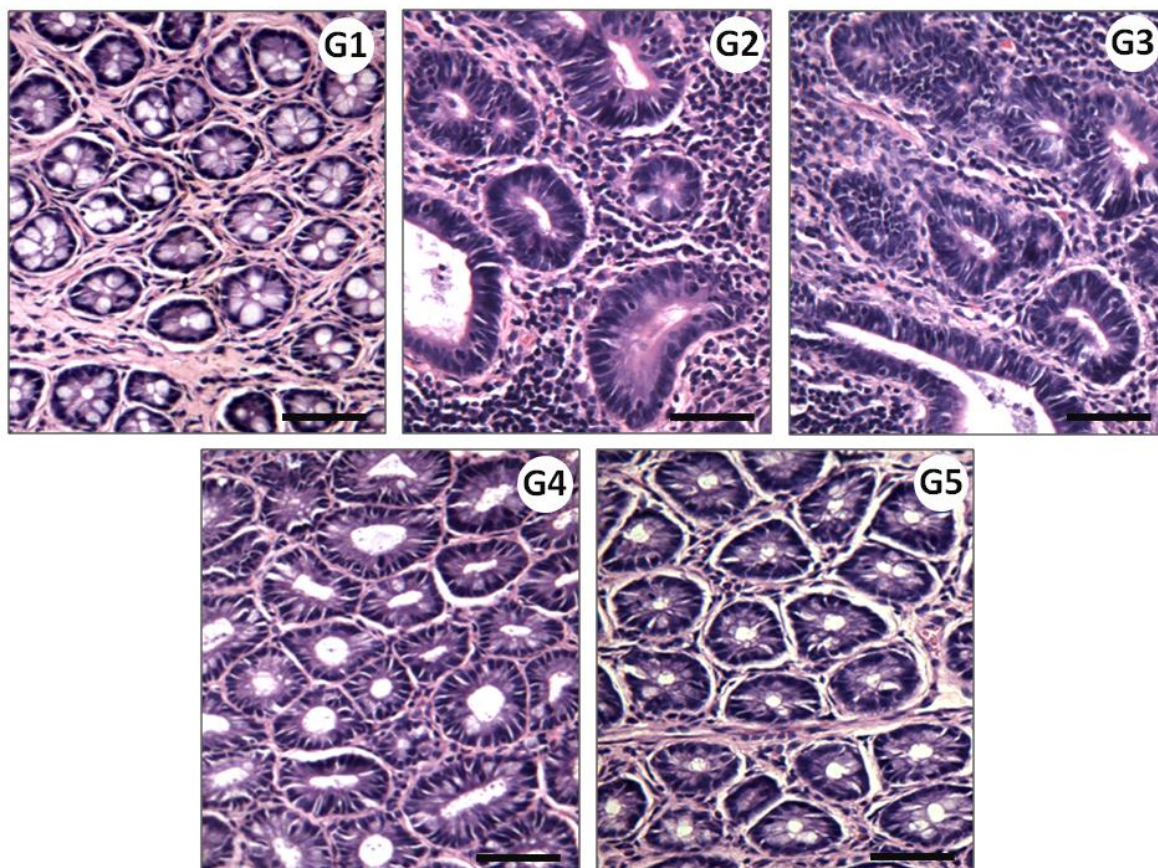
A análise histopatológica indicou a presença de marcada reorganização morfológica das criptas intestinais. Em G2 e G3 foram observadas criptas hipertrofiadas com intensa displasia, principalmente no terço basal. Nesses grupos, houve hipertrofia e aumento da

densidade de enterócitos com citoplasma e núcleo alongados, marcada redução da densidade de células caliciformes em toda a extensão das criptas, dilatação do espaço luminal e intensa infiltração de células inflamatórias. Em G4 e G5 houve evidente redução da displasia das criptas, com a presença de enterócitos alongados, e espaço luminal variando de moderadamente (G4) à levemente (G5) dilatado (Figuras 3 e 4).



**Figura 4.** Fotomicrografias representativas de secções longitudinais de criptas do cólon proximal de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Hesperidina. Animais sadios (G1) apresentaram criptas normais com lúmen estreito e elevada densidade de células caliciformes. Em G2 e G3 são observadas criptas com enterócitos alongados, intensa displasia na base das criptas, e reduzida densidade de células caliciformes. Em G4 são observadas criptas alongadas com as bases moderadamente dilatadas. Em G5 são mostradas criptas com enterócitos alongados (Coloração H&E, barra = 50  $\mu$ m). G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da

indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Hesperidina (10 mg/kg); G4, DMH + Hesperidina (100 mg/kg); G5, DMH + Hesperidina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \* vs. G1, † vs. G2.



**Figura 5.** Fotomicrografias representativas secções transversais de criptas do cólon proximal de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Hesperidina. Animais sadios (G1) apresentaram criptas normais com formato circular ou oval e lúmen estreito. Em G2 e G3 são observadas criptas displásicas com lúmen dilatado, enterócitos alongados, e com intensa infiltração de células inflamatórias. Em G4 são observadas criptas moderadamente dilatadas e enterócitos alongados. Em G5 são mostradas criptas com lúmen levemente dilatado (Coloração H&E, barra = 60  $\mu$ m). G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Hesperidina (10 mg/kg); G4, DMH + Hesperidina (100 mg/kg); G5, DMH + Hesperidina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \* vs. G1, † vs. G2.

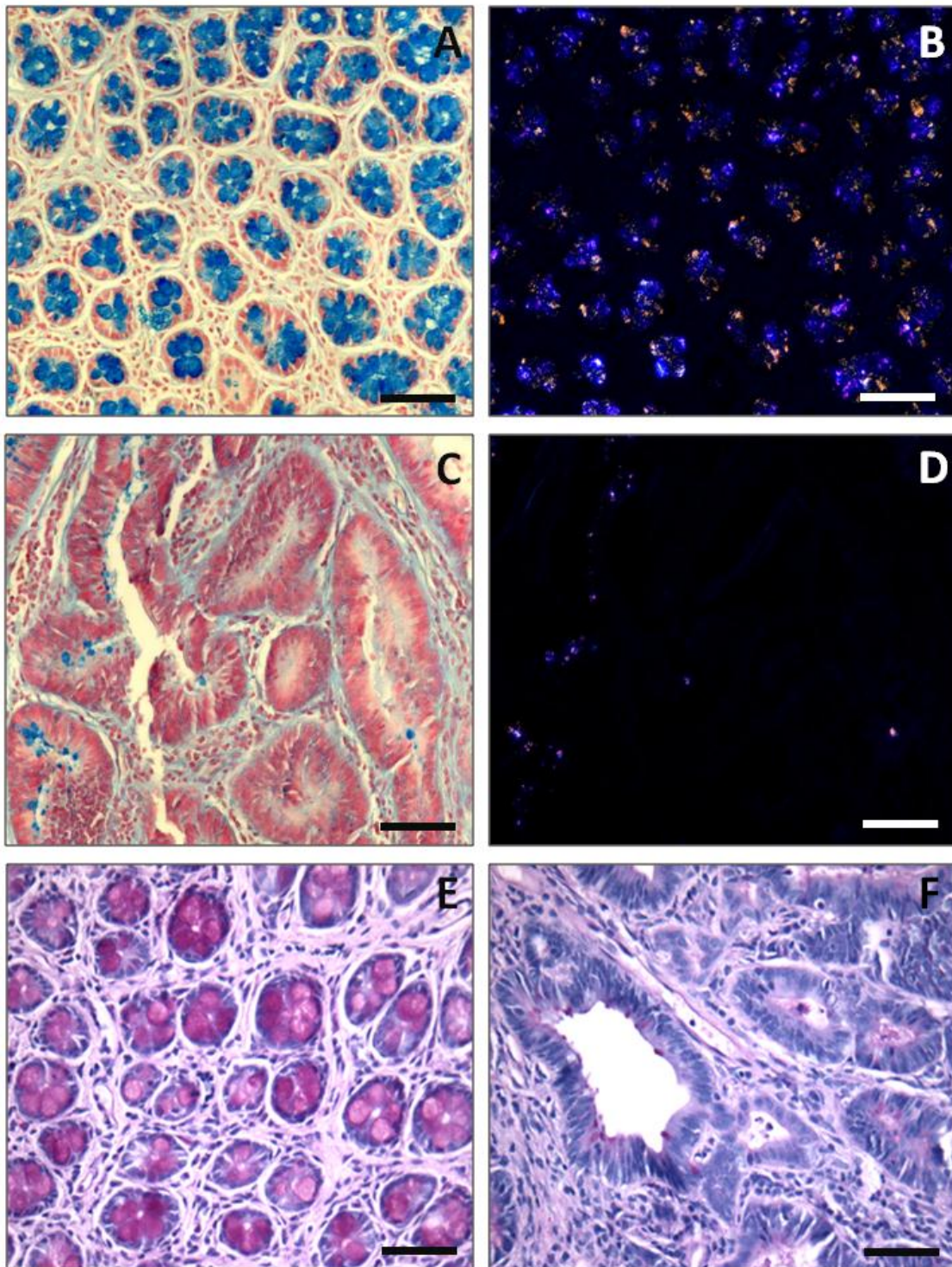
A análise histomorfométrica das criptas mostrou aumento significativo de todos os parâmetros avaliados em G2 em relação à G1 nos três segmentos do cólon. De forma geral, todos os grupos tratados apresentaram redução dos parâmetros avaliados em relação à G2, principalmente nos cólons médio e proximal. Esses parâmetros foram significativamente inferiores em todos os segmentos intestinais em G5 comparados à G2 (tabela 2).

**Tabela 2.** Histomorfometria das criptas do cólon de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Hesperidina.

Segmento intestinal	Largura ( $\mu\text{m}$ )	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Área da cripta ( $\mu\text{m}^2$ )	Área do lúmen ( $\mu\text{m}^2$ )	Volume da cripta ( $\mu\text{m}^3$ )x10 <sup>3</sup>	Volume do lúmen ( $\mu\text{m}^3$ )x10 <sup>3</sup>
<b><i>Proximal</i></b>						
G1	197.3 ± 40.4	38.4 ± 7.1	1801.8 ± 496.1	126.8 ± 30.7	397.1 ± 72.4	39.2 ± 9.6
G2	340.7 ± 39.0*	72.4 ± 18.3*	3825.4 ± 612.0*	447.9 ± 59.8*	713.5 ± 101.6*	118.1 ± 19.9*
G3	256.0 ± 59.7	48.1 ± 7.1	2389.7 ± 847.3	130.5 ± 35.7 <sup>†</sup>	524.4 ± 91.4	80.7 ± 8.1 <sup>†</sup>
G4	244.6 ± 38.1 <sup>†</sup>	41.6 ± 7.5 <sup>†</sup>	2095.1 ± 831.8 <sup>†</sup>	141.8 ± 57.8 <sup>†</sup>	463.3 ± 83.8 <sup>†</sup>	52.3 ± 11.7
G5	250.4 ± 35.5 <sup>†</sup>	39.0 ± 8.5 <sup>†</sup>	1450.3 ± 591.8 <sup>†</sup>	139.0 ± 41.3 <sup>†</sup>	400.1 ± 76.5 <sup>†</sup>	46.8 ± 9.3 <sup>†</sup>
<b><i>Médio</i></b>						
G1	231.9 ± 42.1	37.2 ± 6.5	1799.3 ± 425.6	181.2 ± 55.8	355.1 ± 70.0	44.6 ± 9.2
G2	390.4 ± 60.3*	70.4 ± 11.5*	3102.5 ± 689.4*	519.7 ± 111.9*	895.8 ± 105.3*	120.5 ± 25.0*
G3	292.1 ± 43.5	48.0 ± 7.4	2645.8 ± 580.3*	354.1 ± 62.7*	744.3 ± 76.2*	83.8 ± 18.2*
G4	265.6 ± 54.9 <sup>†</sup>	42.4 ± 8.3 <sup>†</sup>	1893.4 ± 404.3 <sup>†</sup>	290.4 ± 81.1 <sup>†</sup>	425.4 ± 97.6 <sup>†</sup>	68.1 ± 16.4 <sup>†</sup>
G5	240.8 ± 38.3 <sup>†</sup>	43.6 ± 8.0 <sup>†</sup>	1803.8 ± 684.6 <sup>†</sup>	204.6 ± 60.5 <sup>†</sup>	403.6 ± 60.4 <sup>†</sup>	60.5 ± 11.7 <sup>†</sup>
<b><i>Distal</i></b>						
G1	265.8 ± 24.7	37.5 ± 6.3	1611.3 ± 425.6	115.2 ± 48.5	427.1 ± 79.5	40.1 ± 7.3
G2	372.3 ± 40.7*	68.4 ± 12.7*	2844.4 ± 416.1*	313.5 ± 70.4*	813.9 ± 116.4*	70.9 ± 12.8*
G3	350.5 ± 45.2*	59.2 ± 10.1*	2151.3 ± 618.2	225.6 ± 46.9*	701.4 ± 95.1*	55.4 ± 10.6
G4	315.9 ± 28.7*	48.6 ± 8.6	2526.0 ± 466.5*	230.4 ± 42.2*	722.6 ± 81.3*	53.9 ± 12.8
G5	272.2 ± 23.6 <sup>†</sup>	36.8 ± 6.5 <sup>†</sup>	1758.5 ± 556.6 <sup>†</sup>	150.1 ± 59.5 <sup>†</sup>	503.9 ± 97.5 <sup>†</sup>	39.3 ± 15.7 <sup>†</sup>

Valores expressos como média e desvio-padrão (média ± DP). G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH+ NaCl 0,9%; G3, DMH + Hesperidina (10 mg/kg); G4, DMH + Hesperidina (100 mg/kg); G5, DMH + Hesperidina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \*vs. G1, <sup>†</sup>vs. G2.

A análise histoquímica indicou redução significativa da expressão de mucinas ácidas e neutras e da densidade de células mucossecretoras nas criptas de todos os segmentos intestinais em G2 e G3 comparado à G1. Em G4 e G5 a expressão de mucinas e a densidade de células caliciformes foram significativamente maiores comparados à G2. Em G5 o número de células mucossecretoras e a proporção da área histológica ocupada por mucinas foram semelhantes ao observado em G1 (Figura 5 e Tabela 3).



**Figura 6.** Distribuição de células produtoras de mucinas ácidas (A, B, C e D) e neutras (E e F) nas criptas do cólon proximal de ratos controle (G1) e expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) (G2). O painel (A e E) mostra ampla densidade e distribuição homogênea de células caliciformes nas criptas de animal sadio (A, coloração Alcian blue, barra = 110  $\mu\text{m}$ ; E, coloração Ácido Periódico de Schiff e Hematoxilina, barra = 70  $\mu\text{m}$ ). No painel (B) a seção A é

observada sob luz polarizada. Notar a polarização e distribuição uniforme do muco na área tecidual (barra = 110  $\mu\text{m}$ ). No painel (C) são observadas criptas displásicas de um animal exposto à DMH. Notar a reduzida densidade de células caliciformes (coloração Alcian blue, barra = 110  $\mu\text{m}$ ). (D) Marcada redução da área ocupada pelo muco é observada na imagem sob luz polarizada (barra = 110  $\mu\text{m}$ ). Em (F) criptas displásicas com epitélio hipertrófico apresentam drástica redução de células caliciformes (coloração Ácido Periódico de Schiff e Hematoxilina, barra = 70  $\mu\text{m}$ ).

**Tabela 3.** Densidade de número e volume de células produtoras de mucinas nas criptas do cólon de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Hesperidina.

Segmento intestinal	Células AB+ (N/mm <sup>2</sup> )	Vv[Mucinas ácidas] (%) <sup>‡</sup>	Células PAS+ (N/mm <sup>2</sup> )	Vv[Mucinas neutras] (%) <sup>‡</sup>
<i>Proximal</i>				
G1	500.3 ± 59.7	34.2 ± 6.1	477.2 ± 50.2	34.9 ± 6.3
G2	281.5 ± 47.9*	12.5 ± 5.0*	223.4 ± 45.1*	10.1 ± 4.2*
G3	355.3 ± 31.7*	14.8 ± 5.5*	286.6 ± 40.9*	13.3 ± 3.8*
G4	438.7 ± 44.6 <sup>†</sup>	23.9 ± 5.0* <sup>†</sup>	453.1 ± 45.7 <sup>†</sup>	21.1 ± 5.9 <sup>†</sup>
G5	481.3 ± 47.2 <sup>†</sup>	28.6 ± 4.8 <sup>†</sup>	459.8 ± 51.5 <sup>†</sup>	26.7 ± 4.0 <sup>†</sup>
<i>Médio</i>				
G1	598.4 ± 68.1	37.8 ± 6.3	541.7 ± 60.1	36.8 ± 6.3
G2	305.3 ± 59.7*	11.5 ± 5.0*	319.3 ± 48.9*	10.7 ± 3.5*
G3	350.8 ± 40.3*	13.4 ± 4.5*	348.1 ± 55.6*	13.1 ± 3.7*
G4	466.3 ± 50.1 <sup>†</sup>	26.3 ± 6.4 <sup>†</sup>	440.5 ± 42.0 <sup>†</sup>	25.2 ± 5.1 <sup>†</sup>
G5	561.7 ± 60.5 <sup>†</sup>	29.1 ± 6.3 <sup>†</sup>	475.3 ± 54.6 <sup>†</sup>	28.9 ± 5.3 <sup>†</sup>
<i>Distal</i>				
G1	698.9 ± 79.7	37.9 ± 6.0	677.5 ± 55.3	35.6 ± 6.3
G2	411.0 ± 57.4*	12.8 ± 5.3*	361.4 ± 63.4*	10.7 ± 5.1*
G3	425.1 ± 59.7*	13.5 ± 4.9*	390.5 ± 59.9*	11.2 ± 4.7*
G4	519.3 ± 50.4* <sup>†</sup>	21.6 ± 5.7*	546.8 ± 54.1* <sup>†</sup>	20.1 ± 5.0*
G5	640.8 ± 60.7 <sup>†</sup>	29.1 ± 5.2* <sup>†</sup>	623.2 ± 64.8 <sup>†</sup>	28.5 ± 5.9 <sup>†</sup>

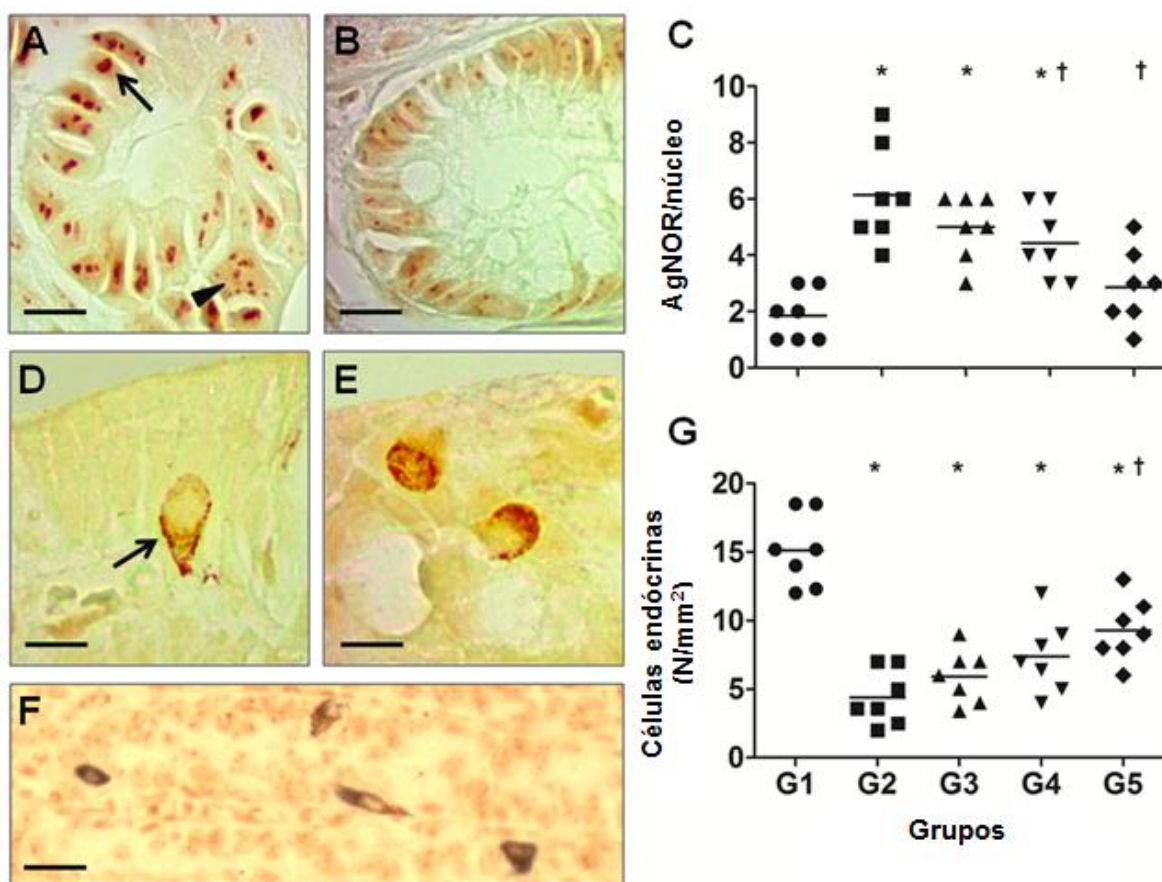
AB+, células positivas ao Alcian blue; PAS+, células positivas ao Ácido Periódico de Schiff.

(%)<sup>‡</sup> percentual da área histológica ocupado pelos tipos de mucina. Valores expressos como média e desvio-padrão (média ± DP). G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Hesperidina (10 mg/kg); G4, DMH + Hesperidina (100

mg/kg); G5, DMH + Hesperidina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \*vs. G1, †vs. G2.

### *Análise de AgNORs e células enteroendócrinas*

Para todos os segmentos intestinais investigados nos grupos G2 e G3, houve aumento significativo do número de regiões organizadoras de nucléolo por núcleo de enterócitos (AgNORs/núcleo) comparados à G1. Em G4 e G5 o número AgNORs/núcleo foi significativamente menor comparados à G2. Não houve diferença estatística nesse parâmetro entre G1 e G5 (Figura 6 A, B e C). Em todos os grupos expostos à DMH, houve redução significativa do número de células enteroendócrinas comparados à G1. Em G5 o número de células enteroendócrinas foi significativamente maior comparado à G2 (Figura 6 D, E, F e G).



**Figura 7.** Regiões organizadoras de nucléolo por núcleo de enterócitos (AgNORs/núcleo, A e B) e células enteroendócrinas (D, E e F) do intestino grosso de ratos expostos a 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Hesperidina. Em (A) são observados núcleos polimórficos com um (seta) a nove (cabeça de seta) AgNORs/núcleo em animais expostos à DMH (G2) (barra= 20  $\mu$ m). (B) Fotomicrografia representativa do grupo controle (G1) indicando núcleos com um ou três AgNORs/núcleo (barra = 15 $\mu$ m). (C) Distribuição de AgNORs/núcleo nos grupos investigados. (D, E) Célula enteroendócrina na base do epitélio (seta) (método de Grimélius, barra = 10 $\mu$ m). (F) Célula enteroendócrina nas bordas das criptas intestinais (método de Grimélius, barra = 35 $\mu$ m). (G) Distribuição de células enteroendócrinas por área histológica nos grupos investigados. Os pontos representam valores médios para cada animal e para todos os segmentos intestinais. As linhas indicam os valores médios para cada grupo. G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Hesperidina (10 mg/kg); G4, DMH + Hesperidina (100 mg/kg); G5, DMH + Hesperidina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \*vs. G1, †vs. G2.

#### ***Análise bioquímica, hematológica e de elementos químicos***

A análise dos parâmetros bioquímicos indicou níveis séricos de proteínas totais significativamente reduzidos em G2 comparado à G1 e aumento significativo em G3 comparado à G2 ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4). As análises hematológicas não mostraram alterações significativas com exceção da contagem total de eritrócitos (RBC) que apresentou redução significativa em G2, comparado à G1 e aumento significativo em G3 comparado à G2 ( $p > 0,05$ ) (Tabela 5). Os níveis de séricos de nitrito/nitrato em G2, G3 e G4 foram significativamente superiores em relação à G1 ( $p > 0,05$ ), os quais não apresentaram diferença entre si (Figura 7). O G5 apresentou redução significativa do nível sérico de nitrito/nitrato em relação à G2.

**Tabela 4.** Parâmetros bioquímicos de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Hesperidina.

Grupos	Proteínas totais		Albumina		Triacilgliceróis		Colesterol		Glicose	
	Conteúdo médio (g/dL)	Variação (%)	Conteúdo médio (g/dL)	Variação (%)	Conteúdo médio (mg/dL)	Variação (%)	Conteúdo médio (mg/dL)	Variação (%)	Conteúdo médio (mg/dL)	Variação (%)
<b>G1</b>	81.7 ± 3.7	-	3.6 ± 0.5	-	180.2 ± 24.3	-	58.2 ± 14.1	-	105.6 ± 33.1	-
<b>G2</b>	66.9 ± 11.0*	- 18,1*	3.5 ± 0.5	- 2,8	161.0 ± 58.9	- 10,6	58.9 ± 16.2	+ 1,2	116.8 ± 28.4	+ 10,6
<b>G3</b>	84.3 ± 2.8 <sup>†</sup>	+ 3,2 <sup>†</sup>	3.8 ± 0.3	+5,5	146.3 ± 65.3	- 18,8	68.4 ± 5.1	+ 17,5	109.1 ± 20.1	+ 3,3
<b>G4</b>	78.6 ± 3.1	- 3,8	3.7 ± 0.1	+ 2,7	132.6 ± 22.7	- 26,4	65.3 ± 5.9	+ 12,2	121.0 ± 18.5	+ 14,6
<b>G5</b>	77.1 ± 1.8	- 5,6	3.7 ± 0.1	+ 2,7	152.4 ± 25.7	- 15,4	66.6 ± 4.4	+ 14,4	127.0 ± 15.2	+ 20,3

G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Hesperidina (10 mg/kg); G4, DMH + Hesperidina (100 mg/kg);

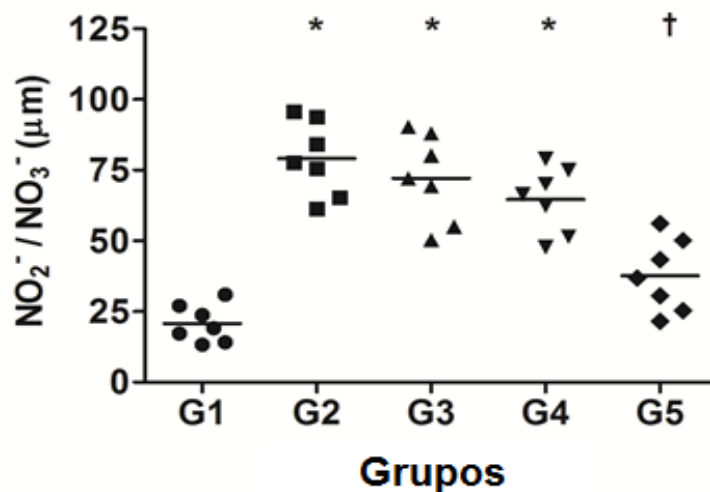
G5, DMH + Hesperidina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \* vs. G1, <sup>†</sup>vs. G2.

**Tabela 5.** Parâmetros hematológicos de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Hesperidina.

Grupos	RBC		HCT (%)		HGB		WBC		PLT	
	Valor médio (x10 <sup>6</sup> µL)	Variação (%)	Valor médio (%)	Variação (%)	Conteúdo médio (g/dL)	Variação (%)	Valor médio (x10 <sup>3</sup> µL)	Variação (%)	Valor médio (x10 <sup>4</sup> µL)	Variação (%)
<b>G1</b>	8.5 ± 0.4	-	43.8 ± 1.9	-	15.4 ± 0.4	-	6.8 ± 1.3	-	114.4 ± 76.4	-
<b>G2</b>	7.6 ± 0.4*	- 10,6*	41.0 ± 2.3	- 6,4	15.0 ± 0.5	- 2,6	7.5 ± 1.8	+ 10,3	104.9 ± 51.1	- 8,3
<b>G3</b>	7.9 ± 0.4	- 7,0	41.5 ± 0.9	- 5,2	14.8 ± 0.5	- 3,9	7.9 ± 1.6	+ 16,1	84.8 ± 13.7	- 25,9
<b>G4</b>	7.9 ± 0.4	- 7,0	40.9 ± 1.9	- 6,6	14.7 ± 0.6	- 4,5	6.5 ± 2.6	- 4,4	134.2 ± 145.3	+ 17,3
<b>G5</b>	8.6 ± 0.5 <sup>†</sup>	+1,2 <sup>†</sup>	42.4 ± 2.4	- 3,2	15.0 ± 0.6	- 2,6	5.8 ± 0.8	- 14,7	76.7 ± 26.5	- 32,9

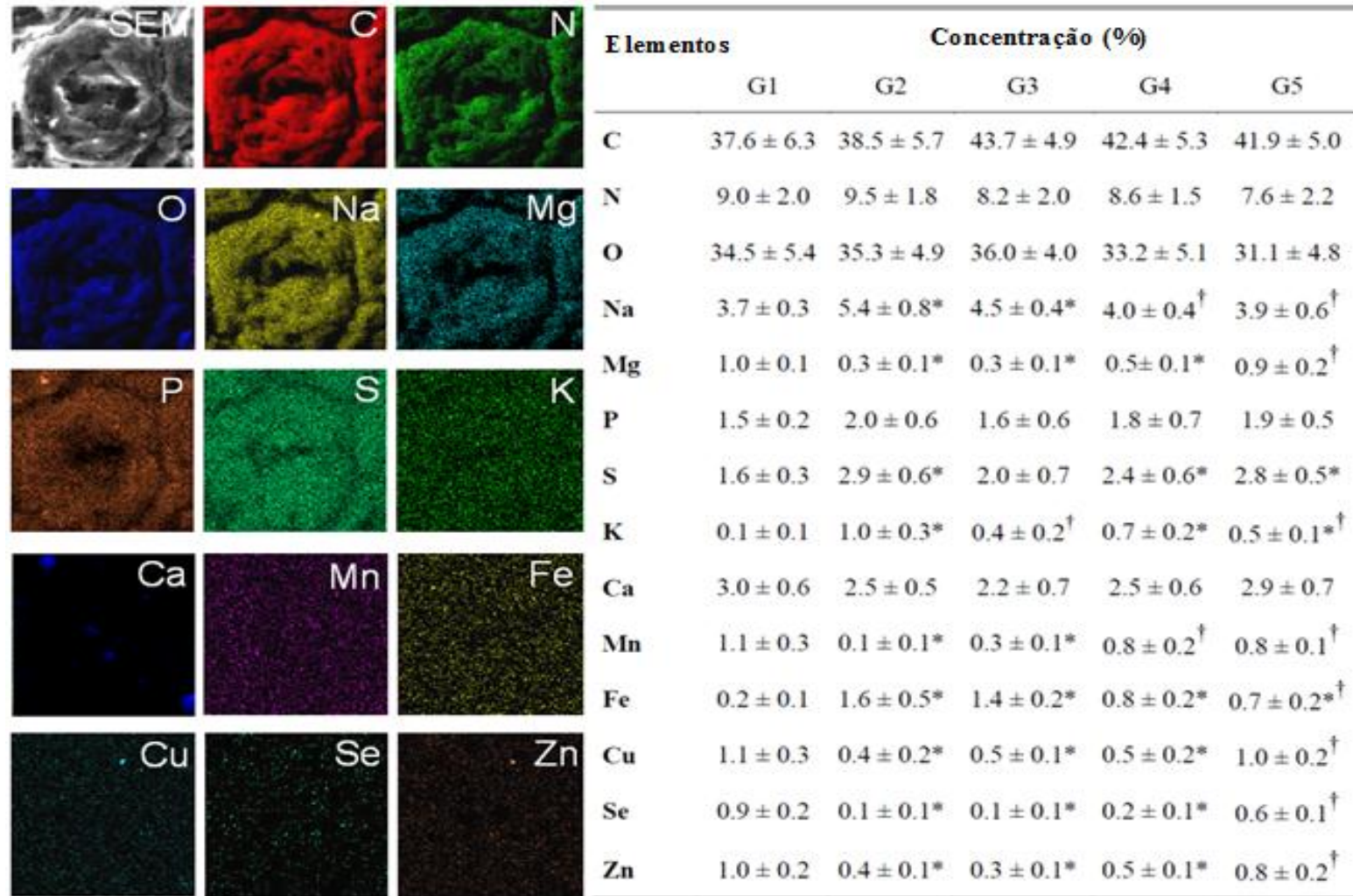
RBC, contagem total de eritrócitos; HCT, hematócrito; HGB, hemoglobina; WBC, contagem total de leucócitos; PLT, contagem total de plaquetas.

Valores expressos como média e desvio-padrão (média ± SD). G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Hesperidina (10 mg/kg); G4, DMH + Hesperidina (100 mg/kg); G5, DMH + Hesperidina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \* vs. G1, <sup>†</sup> vs. G2.



**Figura 8.** Níveis de óxido nítrico no soro de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o flavonóide Hesperidina. A concentração de nitrito/nitrato ( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ) foi determinada pelo método de Griess. Os pontos representam valores individuais para cada amostra de soro avaliada. As linhas indicam os valores médios de  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ . G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Hesperidina (10 mg/kg); G4, DMH + Hesperidina (100 mg/kg); G5, DMH + Hesperidina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \* vs. G1, † vs. G2.

A análise de EED indicou distribuição homogênea dos elementos químicos, a exceção do cálcio (Ca), na superfície da mucosa em todos os segmentos intestinais investigados, tanto sobre o tecido displásico dos FCA quanto sobre o tecido normal (dados não mostrados). De forma geral, houve redução significativa nos níveis teciduais de Mg, Mn, Cu, Se, e Zn; e aumento significativo de Fe, Na, e K, S em G2 e G3 comparados à G1. Em G4 e G5 os níveis de Mg, Mn, Cu, Se e Zn foram significativamente superiores ao observado em G2, com os melhores resultados encontrados em G5, o qual foi similar à G1(Figura 8).



**Figura 9.** Análise representativa da distribuição e do conteúdo de elementos químicos no cólon médio de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados

com o flavonóide Hesperidina. As imagens representam o mapa de distribuição dos diferentes elementos químicos em uma cripta aberrante no cólon médio de um animal exposto à DMH (G2). Notar a homogeneidade na distribuição mineral, exceto para o cálcio (Ca). Na tabela, os percentuais de cada mineral analisado são expressos como média e desvio-padrão (média  $\pm$  DP). Devido ausência de diferença estatística entre os segmentos do cólon, os dados são expressos para todo o intestino grosso. G1(sadio), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH + NaCl 0,9%; G3, DMH + Hesperidina (10 mg/kg); G4, DMH + Hesperidina (100 mg/kg); G5, DMH + Hesperidina (200 mg/kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \*vs. G1, †vs. G2.

### **Discussão**

No presente estudo foi investigado o efeito do flavonóide Hesperidina em lesões pré-neoplásicas colorretais induzidas pelo carcinógeno químico DMH. Os resultados demonstraram que o tratamento com o flavonóide contribuiu parcialmente para a reorganização morfológica do epitélio intestinal, reduzindo a formação dos FCA, o número total de criptas aberrantes por foco, o número de AgNORs/núcleo de enterócitos, a intensidade de displasia do epitélio das criptas, e aumentando a expressão de muco, a densidade de suas células produtoras e a distribuição de células enteroendócrinas. Os resultados mais expressivos para todos os parâmetros avaliados foram encontrados no tratamento que utilizou a maior dose deste flavonóide. O segmento médio do intestino foi o que apresentou o maior número de FCA nos três grupos tratados conforme já relatado por Tanaka et al. (1997), Rao et al. (2001) e Larangeira et al. (1998).

Estudos anteriores sugeriram que o flavonóide hesperidina exerceu ação eficaz na carcinogênese oral e esofágica em ratos (Tanaka et al., 1997). No entanto, há algumas controvérsias quanto ao significado de potenciais agentes quimiopreventivos sobre a formação de criptas aberrantes (Hardman & Cameron, 1996), nem todos os agentes

quimiopreventivos são eficazes no bloqueio e desenvolvimento dos FCA na carcinogênese do cólon (Pereira et al., 1994).

A baixa atividade do flavonóide hesperidina observada na redução dos FCA pode estar relacionada à sua biodisponibilidade *in vivo*. A solubilidade da hesperidina em água é inferior a 0,01%, o que limita seu emprego farmacológico (Yamada et al., 2006). Por conseguinte, a glicosilação da hesperidina aumentou a solubilidade em água 10000 vezes maior do que a da hesperidina com quase a mesma atividade antioxidante e biológica *in vitro* (Yamada et al., 2003).

Muitos flavonóides são pouco solúveis em água, portanto, para administração via oral, estes flavonóides são geralmente dissolvidos em veículos, tais como carboximetilcelulose e propilenoglicol para elevar a sua absorção (Yamada et al., 2006). O flavonóide quercetina dissolvido em propilenoglicol, foi absorvido de forma mais eficiente que a suspensão em água (Piskula & Terao, 1998). Isto significa que a extensão da absorção dos flavonóides depende da solubilidade no veículo utilizado para a administração. Isto quer dizer que o aumento da solubilidade é importante para aumentar a biodisponibilidade (Yamada et al., 2006).

A avaliação das propriedades antioxidantes da hesperidina em ratos mostrou eficácia na supressão dos efeitos carcinogênicos somente quando administrada durante as fases de iniciação e pós-iniciação do desenvolvimento do tumor colorretal (Qureshi et al., 1994). A atividade da hesperidina no estresse oxidativo celular foi relacionada à diminuição da glutathiona peroxidase e glutathiona redutase e à diminuição dos danos ao DNA por agentes oxidativos (Hwang & Yen, 2008).

Tem sido documentado que tanto a hesperidina quanto a hesperitina mostraram uma grande variedade de efeitos farmacológicos incluindo antioxidante, anti-inflamatório, neuroprotetor, anticarcinogênico e antiviral (Cho, 2006; Lee et al., 2010). Alguns genes

como p38, JNK 1/2 e ERK 1/2 fazem parte das vias de transdução de sinais inflamatórios que também regulam a expressão das enzimas óxido nítrico sintase e ciclooxigenase-2 em macrófagos através da ativação de NF- $\kappa$ B (Lai et al., 2009; Kim et al., 2001; Kundu & Surh, 2005). As propriedades antioxidantes e antiinflamatórias atribuídas aos flavonóides hesperidina e hesperetina foram relacionadas à inibição da expressão destas vias de sinalização (Kumar & Wang, 2009).

Metabólitos da hesperetina obtidos a partir do soro de ratos tratados com este flavonóide mostraram potencial ação antiinflamatória ao diminuir o estresse oxidativo, como evidenciado pela regulação da produção de espécies reativas de oxigênio, geração de óxido nítrico e produção de prostaglandinas, devido à inibição da expressão das enzimas óxido nítrico sintase e ciclooxigenase-2 em macrófagos e/ou células musculares lisas (Cho, 2006). Os resultados obtidos a partir de vários estudos de sistemas antioxidantes suportam a ideia de que os metabólitos da hesperetina exercem efeitos antioxidantes observados a partir da atividade quelante de metal *in vitro*, reduzindo os ânions superóxido e os radicais livres (Lee et al., 2010; Paredes et al., 2003).

O metabolismo de metais, especialmente o zinco, é afetado em pacientes com câncer (Hronek et al., 2000). Este mineral, com importante atividade antioxidante, é liberado durante o catabolismo de proteínas e pode passar através da membrana glomerular sendo eliminado (Melichar et al., 1993). A redução dos níveis séricos de zinco está relacionada à diminuição da resposta proliferativa de linfócitos, contribuindo para a queda da resposta imunológica (Ferraroni et al., 1994).

Estudos anteriores mostraram uma diminuição na dosagem de selênio sanguíneo em pacientes com câncer (Kogata et al., 1988; Hocman 1988; Pawlowicz et al., 1991). Em modelos de carcinogênese experimental o selênio inibiu a formação e crescimento dos tumores, isto sugere que as enzimas dependentes de selênio como a glutathiona peroxidase

que protegem as membranas contra danos oxidativos, desempenham um papel chave neste processo (Hocman 1988).

A diminuição dos minerais selênio e zinco no epitélio displásico dos FCA e o aumento destes nos animais tratados com a maior dose do flavonóide reforça a importância da atividade antioxidante no processo de carcinogênese.

O óxido nítrico (NO) é um regulador da diferenciação celular, essencial para numerosos processos biológicos, incluindo a vasodilatação, neurotransmissão e imunidade mediada por macrófagos (Xu et al., 2002, Lala & Chakraborty, 2001). Também modula a etiologia e fenótipo de células cancerosas (Perez-Sala & Lamas, 2001). Alguns estudos vêm enfatizando a importância da via  $\beta$ -catenina/wnt nos estágios iniciais do desenvolvimento do câncer colorretal, o acúmulo de  $\beta$ -catenina pode ocorrer pelo aumento de NO nas células do carcinoma colorretal (Bienz & Clevers, 2000; Kinzler & Vogelstein, 1966). NO é gerado a partir de altos níveis de expressão da enzima óxido nítrico sintase, fenômeno comum em doenças inflamatórias crônicas e pólipos adenomatosos, ambas lesões precursoras do câncer colorretal, ou produzidos por células do sistema imunológico em estados inflamatórios (Rao et al., 2001; Ambs et al., 1998; Takahashi et al., 1997). No presente estudo, o nível sérico de nitrito/nitrato indicou elevado estresse nitrosativo sistêmico no grupo G2, condição efetivamente inibida no grupo tratado com o a maior dose do flavonóide Hesperidina.

O antígeno de proliferação nuclear (PCNA) e as regiões organizadoras de nucléolo argirofílicas (AgNOR) foram estabelecidos como valioso meio de estudar o comportamento biológico das células malignas (Tsuji et al., 1992). A marcação de AgNOR é um valioso método para avaliar as atividades metabólicas globais da célula, tais como a proliferação, diferenciação e síntese de proteínas (Chomette et al., 1991; Cabrini et al., 1992). É geralmente aceito que o elevado número de AgNOR/núcleo em células tumorais,

independentemente da sua origem, está diretamente relacionado com reduzido tempo de ciclo celular e conseqüentemente elevado ritmo de divisão celular (Derenzini et al., 1998; Trerè et al., 1996). No presente estudo, ocorreu redução significativa do número AgNORs/núcleo nos animais tratados com o flavonóide hesperidina na maior dosagem, indicando diminuição da proliferação celular no epitélio colônico neste grupo. Situação similar foi relatada por Ohishi et al. (2002) na carcinogênese colorretal induzida por azoximetano, onde o número de AgNORs/núcleo de enterócitos foi significativamente reduzido nos grupos de ratos tratados com uma substância de origem vegetal.

O plasma contém uma mistura de proteínas como albumina, enzimas, proteínas específicas de transporte, hormônios protéicos e fatores de coagulação, que são em sua maioria sintetizados pelo fígado a partir de aminoácidos (Tvedten, 1993). A mensuração da proteína total é bastante utilizada para complementar a interpretação correta do hemograma, auxiliando na avaliação das hemoconcentrações e no diagnóstico de algumas hipoproteinemias (Dameron et al., 1992). Neste estudo, os níveis séricos de proteínas totais significativamente reduzidos nos animais expostos ao carcinógeno químico podem estar relacionados a uma maior perda proteica ou a um déficit na produção provocado pela utilização da DMH, sendo, portanto necessárias análises complementares para esta confirmação.

O hemograma deve abranger as análises qualitativas dos eritrócitos, dos leucócitos e das plaquetas, principalmente as que consideram o tamanho, a forma celular, a coloração, as inclusões citoplasmáticas e nucleares, e as atipias celulares (Al Sahhaf, 2006). De forma geral, neste estudo, não foram observadas alterações significativas dos parâmetros hematológicos nos animais tratados com o flavonóide, quando comparados ao grupo controle e a pequena redução de hemoglobina observada nos animais do grupo do grupo

controle da indução, tratado apenas com o carcinógeno DMH, pode ser indicativo de anemia.

O muco, secretado pelas células caliciformes localizadas nas criptas intestinais ao longo da superfície mucosa, forma uma camada gelatinosa que, aderida ao epitélio mucoso, confere proteção química contra a agressão ocasionada por antígenos, toxinas e enzimas digestivas existentes no interior da luz intestinal (Pravda, 2005; Swidsinski et al., 2007). A maior parte do efeito protetor exercido pela camada de muco encontra-se relacionada à presença de mucinas, glicoproteínas predominantes na sua composição química (Finnie et al., 1995). O muco também possui propriedades lubrificantes favorecendo a progressão do conteúdo fecal pelo trato gastrintestinal, principalmente nos segmentos mais distais do cólon e reto (Florey, 1955).

A análise histoquímica neste estudo mostrou que o tratamento com o flavonóide hesperidina aumentou o número de células mucossecretoras e a proporção da área histológica ocupada por estas células nas criptas de todos os segmentos intestinais. Anormalidades da secreção, composição e padrão de distribuição das mucinas no epitélio intestinal vêm sendo demonstradas em diversas afecções que acometem o cólon, representadas, principalmente, pelas colites bacterianas, retocolite ulcerativa inespecífica, doença de Crohn, colite de exclusão, pólipos adenomatosos e o câncer colorretal (Finnie et al., 1995; Keli et al., 1997).

Assim como as células mucossecretoras (Fodde et al., 2001; Shibata et al., 1997), acredita-se que as células enteroendócrinas podem ser potencialmente úteis como marcadores da evolução do câncer colorretal. Reconhecidamente, ambas as células compartilham de um elevado grau de diferenciação e especialização (Garabedian et al., 1997). No presente estudo houve marcada redução do número de células enteroendócrinas nos animais expostos à DMH. Embora essa redução tenha sido parcialmente minimizada

pelo tratamento com hesperidina, o papel das células enteroendócrinas no carcinoma colorretal necessita de estudos adicionais.

Os resultados indicaram que o flavonóide hesperidina, especialmente o tratamento com a maior dosagem, foi eficaz em minimizar a desorganização morfológica colorretal, reduzindo o número de lesões pré-neoplásicas em ratos expostos ao carcinógeno químico DMH. O efeito inibitório do flavonóide hesperidina sobre a displasia do epitélio intestinal, aparentemente apresenta influência limitada sobre lesões tumorais previamente estabelecidas. Acredita-se que parte dos resultados encontrados pode ser decorrente dos efeitos deste flavonóide na redução da proliferação celular e recuperação dos níveis de minerais antioxidantes na mucosa intestinal.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao “*Núcleo de Microscopia e Microanálise*” da Universidade Federal de Viçosa (UFV) pelo auxílio na análise de Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X.

### **Referências Bibliográficas\***

*\*De acordo com as normas do periódico Cell Tissues Organs ISSN: 1422-6405*

Al Sahhaf, Z.Y. (2006) Toxicity of sumithion in albino rats: hematological and biochemical studies. J Appl Oral Sci 6: 2959-2962.

Ambs, S., W.G. Merriam, W.P. Bennett, E. Felley-Bosco, M.O. Ogunfusika, S.M. Oser, S. Klein, P.G. Shields, T.R. Billiar, C.C. Harris (1998) Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. Cancer Res. 58: 334-341.

Barreiros, A.L.B.S., J.M. David, J.P. David (2006) Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Quim Nova* 29: 113-123.

Bienz, M., H. Clevers (2000) Linking Colorectal Cancer to Wnt Signaling *Cell* 103: 311-320.

Bird, R.P. (1987) Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* 37: 147-151.

Bird, R.P. (1995) Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett* 93: 55-71.

Cabrini, R.L., A.E. Schwint, A. Mendez, F. Femopase, H. Lanfranchi, M.E. Itoiz (1992) Morphometric study of nucleolar organizer regions in human oral normal mucosa, papilloma and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol* 21: 275-279.

Chen, W.C., M.S. Lin, B.F. Zhang, J. Fang, Q. Zhou, Y. Hu (2007) Survey of molecular profiling during human colon cancer development and progression by immunohistochemical staining on tissue microarray. *World J Gastroenterol* 13: 699-708.

Cho, J. (2006) Antioxidant and neuroprotective effects of hesperidin and its aglycone hesperetin. *Arch Pharm Res* 29: 699-706.

Chomette, G.P., M.M. Auriol, F. Labrousse, J. M. Vaillant (1991) Mucoepidermoid tumors of salivary glands: Histoprognostic value of NORs stained with AgNOR technique. *J Oral Pathol* 20: 130-132.

Dameron, G.W., K.W. Weingand, J.M. Duderstadt, L.W. Odioso, T.A. Dierckman, W. Schwecke, K. Baran (1992) Effect of bleeding site on clinical laboratory testing of rats: orbital venous plexus versus posterior vena cava. *Lab Anim Sci* 42: 299-301.

Derenzini, M., D. Trerè, A. Pession, L. Montanaro, V. Sirri, R.L. Ochs (1998) Nucleolar function and size in cancer cells. *Am J Pathol* 152: 1291-1297.

East, J.E., B.P. Saunders, J.R. Jass (2008) Sporadic and syndromic hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colon: classification, molecular genetics, natural history, and clinical management. *Gastroenterol Clin North Am* 37: 25-46.

Ferraroni, M., C. La Vecchia, B. D'Avanzo, E. Negri, S. Franceschi, A. Decarli (1994) Selected micronutrient intake and the risk of colorectal cancer. *Br J Cancer* 70: 1150-1155.

Finnie, I.A., A.D. Dwarakanath, B.A. Taylor, J.M. Rhodes (1995) Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate. *Gut* 36: 93-99.

Florey, H. (1955) Mucin and the protection of the body. *Proc R Soc Lond* 143: 144-158.

Fodde, R., R. Smits, H. Clever (2001) APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 1:55-67.

Garabedian, E.M., L.J. Roberts, M.S. McNevin, J.I. Gordon (1997) Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice. *J Biol Chem* 272: 23729-23740.

Grimelius, L., E. Wilander (1980) Silver stains in the study of endocrine cells of the gut and pancreas. *Invest Cell Pathol* 3: 3-12.

Haidari, F., S.A. Keshavarz, M.R. Rashidi, M.M. Shahi (2009) Orange juice and hesperetin supplementation to hyperuricemic rats alter oxidative stress markers and xanthine oxidoreductase activity. *J Clin Biochem Nutr* 45: 285-291.

Hardman, W.E. Cameron IL. Letter to the Editor. *Carcinogenesis*. 17 (7): 1539–1540, 1996.

Haslam, E. (1996) Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J Nat Prod* 59: 205-215.

Hocman, G. Chemoprevention of cancer: selenium (1988) *Int J Biochem* 20:123-33.

Hosseinimehr, S.J., A. Nemati (2006) Radioprotective effects of hesperidin against c-irradiation in mouse bone marrow cells. *Br J Radiol* 79: 415-418.

Howell, W.M., D.A. Black (1982) Controlled silver-staining of nucleolus organizer with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 62: 361-367.

Hronek, M., Z. Zadak, D. Solichova, P. Jandik, B. Melichar (2000) The association between specific nutritional antioxidants and manifestation of colorectal cancer. *Nutrition* 16: 189-191.

Hwang, S.L., G.C. Yen (2008) Neuroprotective effects of the citrus flavanones against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced cytotoxicity in PC12 cells. *J Agric Food Chem* 56: 859-864.

Júnior, H.F.L., M.A. Bonardi, V.J.C Schiochet, A.B. Júnior, E.R. Carmes, M.C. Sartor, J.C. Pisani, S. Brenner, R.A. Bonardi (2005) Importância da colonoscopia no rastreamento de pólipos e câncer colorretal em pacientes portadores de pólipos retais. *Rev Bras Coloproctol* 25: 226-234.

Keli, E., M. Bouchoucha, G. Devroede, F. Carnot, T. Ohrant, P.H. Cugnenc (1997) Diversion Related Experimental Colitis in Rats. *Dis Colon Rectum* 40: 222-228.

Kim, H.G., D.H. Yoon, W.H. Lee, S.K. Han, B. Shrestha, C.H. Kim, M.H. Lim, W. Chang, S. Lim, S. Choi, W.O. Song, J.M. Sung, K.C. Hwang, T.W. Kim (2007) *Phellinus linteus* inhibits inflammatory mediators by suppressing redox-based NF- $\kappa$ B and MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophage. *J Ethnopharmacol* 114: 307-315.

Kinzler, K.W., B. Vogelstein (1996) Lessons from hereditary review colorectal cancer. *Cell* 87: 159-170.

Kogata, M., M. Kobayashi, M. Yamamura, K. Hioki, M. Yamamoto (1988) Selenium levels in malignant and normal tissues of gastrointestinal cancer patients. *J Clin Biochem Nutr* 5: 93-101.

Kumar, K.J.S., S.Y. Wang (2009) Lucidone inhibits iNOS and COX-2 expression in LPS-induced RAW264.7 murine macrophage cells via NFkB and MAPKs signaling pathways. *Planta Med* 75: 494-500.

Kundu, J.K., Y.J. Surh (2005) Breaking the relay in deregulated cellular signal transduction as a rationale for chemoprevention with antiinflammatory phytochemicals. *Mutat Res* 591: 123-146.

Lai, C.S., J.H. Lee, C.T. Ho, C.B. Liu, J.M. Wang, M.H. Pan (2009) Rosmanol potently inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression through down regulating MAPK, NF-kB, STAT3 and c/EBP signaling pathway. *J Agric Food Chem* 57: 10990-10998.

Lala, P.K., C. Chakraborty (2001) Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol* 2: 149-156.

Larangeira, L.L.S., M.O. Taha, A. Ferme, R. Lemos, H. Plapler (1998) Localização de lesões tumorais induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no cólon de ratos. *Acta Cir Bras* 13: 00-00.

Lee, K.H., M.H. Yeh, S.T. Kao, C.M. Hung, C.C. Yeh (2010) The inhibitory effect of hesperidin on tumor cell invasiveness occurs via suppression of activator protein 1 and nuclear factor- $\kappa$ B in human hepatocellular carcinoma cells. *Toxicol Lett* 194: 42-49.

Ma, Q.Y., K.E. Williamson, B.J. Rowlands (2002) Variability of cell proliferation in the proximal and distal colon of normal rats and rats with dimethylhydrazine induced carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 8: 847-852.

Mandarim-de-Lacerda, C.A. (2003). Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.* 75, 469-486.

Melichar, B., A. Zeimet, E. Artner-Dvorzak, H. Schrocksnadel, C. Marth, H. Wachter, D. Fuchs (1993) Association between increased urinary zinc and neopterin concentrations in women with gynecological cancer. *Tumor Diagn Ther* 14: 110-112.

Newell, L.E., J.A. Heddle (2004) The potent colon carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. *Mutat Res* 564: 1-7.

Ohishi, T., Y. Kishimoto, N. Miura, G. Shiota, T. Kohri, Y. Hara, J. Hasegawa, M. Isemura (2002) Synergistic effects of (-)-epigallocatechin gallate with sulindac against colon carcinogenesis of rats treated with azoxymethane. *Cancer Lett* 177: 49-56.

Paredes, A., M. Aluzuru, J. Mendez, M. Rodriguez-Ortega (2003) Antisindbis activity of flavanones hesperetin and naringenin. *Biol Pharm Bull* 26: 108-109.

Pawlowicz, Z., B.A. Zachara, U. Trafikowska, A. Maciag, E. Marchaluk, A. Nowicki (1991) Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in patients with breast cancer and with advanced gastrointestinal cancer. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 5: 275-277.

Pereira, M.A., L.H. Barnes, V.L. Rassman, G.V. Kelloff, V.E. Steele (1994) Use of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon to identify potential cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis* 15: 1049-1054.

Perez-Sala, D., S. Lamas (2001) Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression by Nitric Oxide in Cells. *Antioxid Redox Signal* 3: 231-248.

Piskula, M.K., J.Terao (1998) Quercetin's solubility affects its accumulation in rat plasma after oral administration. *J Agric Food Chem* 46: 4313-4317.

Pravda, J. (2005) Radical induction theory of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 11: 2371-2384.

Ricart-Jané D, Llobera M, López-Tejero MD (2002) Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the griess method. *Nitric Oxide* 6:178-185.

Qureshi, A., T.F. Gorey, P. Byrne, E. Kay, J. McKeever, T.P.J. Hennessy (1994) Oxygen free radical activity in experimental colonic carcinoma. *Br J Surg* 81: 1058-1059.

Rao, C.V., C. Indranie, B. Simi, P.T. Manning, J.R. Connor, B.S. Reddy (2002) Chemopreventive properties of a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor in colon carcinogenesis, administered alone or in combination with celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res* 62: 165–170.

Rao, C.V., Y. Hirose, C. Indranie, B.S. Reddy (2001) Modulation of experimental colon tumorigenesis by types and amounts of dietary fatty acids. *Cancer Res.* 61:1927-1933.

Shibata, H., K. Toyama, H. Shioya, M. Ito, M. Hirota, S. Hasegawa, H. Matsumoto, H. Takano, T. Akiyama, K. Toyoshima (1997) Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene. *Science* 278:120-123.

Swidsinski, A., V. Loening-Baucke, F. Theissig, H. Engelhardt, S. Bengmark, S. Koch, H. Lochs, Y. Dorffel (2007) Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut* 56: 343-350.

Takahashi, M., K. Fukuda, T. Ohata, T. Sugimura, K. Wakabayashi (1997) Increased expression of inducible and endothelial constitutive nitric oxide synthases in rat colon tumors induced by azoxymethane. *Cancer Res* 57: 1233-1237.

Tanaka, T., H. Makita, M. Ohnishi, H. Mori, K. Satoh, A. Hara, T. Sumida, K. Fukutani, T. Tanaka, H. Ogawa (1997) Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats by flavonoids References diosmin and hesperidin, each alone and in combination. *Cancer Res* 57:246-252.

Tanon, L.M., S.R. Secoli, R. Caponero (2007) A review of bevacizumab and its use in colorectal cancer. *Rev Bras Cancerol* 53: 173-182.

Trerè, D., L. Gramantieri, S. Siringo, C. Melchiorri, L. Barbara, L. Bolondi, M. Derenzini (1996) In hepatocellular carcinoma AgNOR protein expression correlates with tumour mass doubling time. *J Hepatol* 24: 60-65.

Tsuji, T., P. Shrestha, K. Yamada, H. Takagi, F. Shinozaki, K. Sasaki, K. Maeda, M. Mori (1992) Proliferating cell nuclear antigen in malignant and pre-malignant lesions of epithelial origin in the oral cavity and the skin: An immunohistochemical study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 420: 377-383.

Tvedten, H. (1993) Advanced hematology analyzers interpretation of results. *Vet Clin Pathol* 22: 72-80.

Ullman, T.A., S.H. Itzkowitz (2011) Intestinal Inflammation and Cancer. *Gastroenterology* 140: 1807-1816.

Xu, W., L.Z. Liu, M. Loizidou, M. Ahmed, I.G. Charles (2002) The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res* 12: 311-320.

Yamada, M., F. Tanabe, N. Arai, H. Mitsuzumi, Y. Miwa, M. Kubota, H. Chaen, M. Kibata (2006) Bioavailability of glucosyl hesperidin in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 1386-1394.

Yamada, M., H. Mitsuzumi, Y. Tsuzaki, Y. Miwa, H. Chaen (2003) Antioxidant activity of glycosylated vitamin P and its suppressive effect on oxidative stress in hyperlipidemic mice. *J Jpn Soc Nutr Food Sci* 56: 355-363.

Yamada, M., F. Tanabe, N. Arai, H. Mitsuzumi, Y. Miwa, M. Kubota, H. Chaen, M. Kibata (2006) Bioavailability of Glucosyl Hesperidin in Rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 1386-1394.

Yang, H., S. Chen, K.J.S. Kumar, K. Yu, P.L. Chao, S. Tsai, Y. Hou, Y.Hseu (2012) Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential of Hesperetin Metabolites Obtained from Hesperetin administered Rat Serum: An Ex Vivo Approach. *J Agric Food Chem* 60: 522-532.

Yin, J., N. Harpaz, Y. Tong, Y. Huang, J. Laurin, B.D. Greenwald, M. Hontanosas, C. Newkirk, S.J. Meltzer (1993) p53 point mutations in dysplastic and cancerous ulcerative colitis lesions. *Gastroenterology* 104: 1633-1639.

Yoshimi, N., Morioka, T., Kinjo, T., Inamine, M., Kaneshiro, T., Shimizu, T., Suzui, M., Yamada, Y., Mori, H., 2004. 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.* 95, 792-797.

## CAPÍTULO 4

### **Estudo da ação antineoplásica do extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* na carcinogênese induzida por 1,2 dimetilhidrazina em ratos**

**RESUMO** - O câncer colorretal é uma das neoplasias mais frequentes na população adulta mundial, com grande prevalência e mortalidade dentre as neoplasias do trato gastrointestinal. As plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos, para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica. O *Helianthus annuus* (girassol) é rico em alguns fitoquímicos como flavonóides, fitatos, ácido clorogênico, fitoesteróis entre outros, possivelmente relacionados à sua capacidade antioxidante. O objetivo deste estudo foi investigar a ação antineoplásica do extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* na carcinogênese induzida por 1,2 dimetilhidrazina. Ratos Wistar fêmeas pesando  $130,8 \pm 27,1$ g receberam injeção subcutânea semanal de 1,2-dimetilhidrazina (DMH, 20 mg/kg) durante 10 semanas. Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais com 7 animais em cada grupo. Grupo 1 (controle): NaCl 0,9%; Grupo 2 (controle da indução): DMH + NaCl 0,9%; Grupo 3: DMH + extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* (10mg/Kg); Grupo 4: DMH + extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* (100mg/Kg); Grupo 5: DMH + extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* (200mg/Kg). Os resultados da prospecção fitoquímica qualitativa do extrato indicaram a presença de compostos fenólicos, flavonóides e taninos. Em G2 e G3 houve aumento significativo do número de FCA e regiões organizadora de nucléolo por núcleo de enterócitos (AgNORs/núcleo) comparado à G1. Em G4 e G5 houve redução significativa do número de FCA e AgNORs/núcleo comparado à G2. Foi observada redução significativa do nível sérico de nitrito/nitrato em G4 e G5 em relação à G2. O nível de minerais antioxidantes como cobre, magnésio, selênio e zinco foi significativamente reduzido no epitélio dos FCA em G2 e

G3, mas similar nos grupos G4 e G5, comparados à G1. O extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus*, especialmente na maior dose utilizada, foi parcialmente eficaz em minimizar o remodelamento morfológico colorretal, reduzindo o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas em ratos expostos à 1,2-dimetilhidrazina. Sugere-se que parte desse efeito pode ser decorrente da mistura de componentes químicos presentes no extrato que podem estar contribuindo em conjunto para o resultado observado neste estudo

**Palavras-chave:** câncer, intestino, *Helianthus annuus*, 1,2-dimetilhidrazina.

## Introdução

Em todo o mundo, a cada ano, mais de 1 milhão de indivíduos irão desenvolver câncer colorretal, doença com taxa de mortalidade próxima a 33% em países desenvolvidos (Parkin et al., 2005). As lesões polipóides, características deste tipo de tumor, são originadas a partir de uma projeção ou elevação na superfície da mucosa intestinal em direção à luz intestinal e podem originar-se de elementos da mucosa ou de camadas mais profundas da parede intestinal (Park et al., 2008).

O processo evolutivo do câncer colorretal envolve uma série de etapas que estão relacionadas com o acúmulo de mutações genéticas (Chen et al., 2007). Mutações nos genes K-ras e APC, por exemplo, têm importante papel na carcinogênese colorretal, o gene APC atua principalmente na regulação da expressão de uma proteína denominada  $\beta$ -catenina (Smith et al., 1994). Esta proteína, cuja função é aderência celular, é degradada no citoplasma por meio de proteólise pelo complexo de ataque APC/axina/GSK-3 $\beta$ , a mutação do gene APC pode ativar uma via que desestabiliza o complexo de ataque. Com isso, a proteólise da  $\beta$ -catenina não ocorre e esta molécula torna-se estável no citoplasma, podendo posteriormente alcançar o núcleo (Yang et al., 2006). No núcleo, a  $\beta$ -catenina pode modular a expressão de vários genes alvos que favorecem a carcinogênese, assim, a partir de um epitélio normal, dá-se início a proliferação celular, passando pela etapa de adenoma até carcinoma invasor (Huang & Du, 2008).

A carcinogênese é um processo presumivelmente complexo, onde ocorrem eventos celulares, moleculares e morfológicos (Bird, 1995; Fodde, 2001). O processo de carcinogênese depende da proliferação, diferenciação e morte das células. A proliferação celular desempenha um papel importante no processo de formação do tumor (Farber, 1995) por aumentar a frequência de mutações através da indução de erros na replicação do DNA,

reduzir o tempo de reparo do DNA e estar envolvida na determinação da relação dose-resposta para alguns carcinogênicos (Tomatis, 1993).

O desenvolvimento do câncer colorretal envolve vários processos de alterações genótípicas e fenotípicas, que morfológicamente podem se apresentar como alterações microscópicas discretas da mucosa, denominadas focos de criptas aberrantes (FCA). Os FCA são considerados lesões pré-neoplásicas da mucosa colônica, utilizados como marcadores para o risco de desenvolvimento do câncer colorretal e podem ser induzidos, quimicamente, pela administração dos carcinógenos 1,2-dimetilhidrazina (DMH) ou azoximetano (AOM) em animais de experimentação (Bird, 1987; Bird, 1995).

Os carcinógenos químicos estimulam a proliferação celular e induzem a formação de tumores numa variedade de órgãos e tecidos, dependendo da via de administração, tempo de administração, dose, duração, frequência da administração, e sexo do animal (Balish et al., 1977). A DMH é considerada um carcinógeno de ação indireta, que possui alto grau de especificidade para o cólon de variadas espécies de roedores (Oliveira et al., 2001). A droga 1,2-dimetilhidrazina tem a capacidade de promover hipermetilação do DNA das células epiteliais colônicas (Hoffman-Goetz, 2003). Este modelo têm sido de grande importância em estudos sobre diversos aspectos da morfologia e patogênese da doença, contribuindo para o aperfeiçoamento do seu diagnóstico, prevenção e tratamento (Oliveira et al., 2001).

O crescente interesse pelo uso das plantas medicinais e de seus respectivos extratos na terapêutica constitui uma ajuda nos cuidados primários de saúde e um complemento terapêutico, compatível com a medicina convencional (Soares, 1998). As plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos, para a obtenção de vários fármacos, amplamente utilizados na clínica, como a

emetina, a vincristina, a colchicina, a rutina, a forscolina, o taxol e a artemisinina (Cechinel Filho & Yunes, 1998).

A espécie mais importante do gênero *Helianthus* do ponto de vista comercial é o girassol, *Heliantus annuus* L., o qual é utilizado como semente oleaginosa na alimentação (Leite et al., 2005). O *Helianthus annuus* L é uma oleaginosa de ampla adaptabilidade às diferentes condições climáticas, cujo rendimento agrícola é pouco influenciado pela latitude, altitude e fotoperíodo (Sachs et al., 2006).

O girassol é rico em alguns fitoquímicos como fitatos, ácido clorogênico e fitoesteróis (Buerkert et al., 1998). O ácido fítico forma complexo insolúvel com cálcio, zinco e magnésio e também com proteínas sendo, portanto, considerado como antinutriente que reduz a biodisponibilidade desses minerais (Maga, 1982). Pesquisas anteriores demonstram que o fitato tem papel benéfico na inibição de oxidação lipídica (Lee & Hendricks, 1997) e na prevenção de doenças do coração e câncer (Giada & Mancini-Filho 2009). O girassol possui também compostos fenólicos como os ácidos clorogênico, caféico e quínico, sendo os dois últimos provenientes da hidrólise do primeiro (Farang, 1999).

Dois dos grupos mais abundantes de metabólitos secundários presentes no gênero *Helianthus* são os sesquiterpenos especialmente guaianolídeos, heliangolídeos e diterpenos (Macías et al., 2004). Díaz-Viciedo et al. (2008) isolaram três diterpenóides de *Helianthus annuus* L., que possuem atividade antiinflamatória pela redução na liberação do TNF- $\alpha$  e, inibição da COX-2 e NOS-2. Também foram isolados os flavonóides tambulina, kukulkanina, heliannona A e heliannona B da espécie *H. annuus* L (Macías et al., 1997). As cumarinas escopoletina e aiapina são encontradas no girassol e acumulam-se nos tecidos da planta após lesão mecânica, ataque por insetos ou inoculação com fungos (Urdangarín et al., 1999). Giada & Mancini-Filho (2009) verificaram a capacidade antioxidante das sementes de girassol e observaram uma alta capacidade antioxidante do

extrato aquoso. Weisz et al., (2009), extraíram compostos fenólicos com atividade antioxidante das sementes e cascas das sementes de girassol.

## **Material e Métodos**

### ***Preparo do extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus****

O extrato foi obtido a partir das raízes da planta. O material coletado foi lavado em água corrente, seco em estufa à 40°C e umidade relativa controlada e moído em moinho de facas (Marconi® - Modelo 340). Uma amostra de 10 g do material seco e triturado foi adicionado a 100 mL de solvente. O solvente utilizado foi uma solução hidroalcoólica a 30%. Em seguida, a suspensão foi submetida a 60 minutos de ultrasonicação (Unique® - MaxiClean 1400), a temperatura ambiente (25°C). O extrato foi filtrado à vácuo e o filtrado resultante analisado quimicamente.

### ***Prospecção fitoquímica***

O extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* foi submetido a uma série de reações de caracterização, entre elas: açúcares redutores, compostos fenólicos, naftoquinonas, caracterização de flavonóides, taninos, cumarinas, triterpenos e esteróides, identificação de heterosídeos cardiotônicos e caracterização de saponinas, tendo sido realizadas em triplicata. Os testes se baseiam em reações cromáticas e de precipitação conforme descrito por Simões et al. (1999).

### ***Animais e modelo experimental***

Foram utilizados 35 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas, com 8 semanas de idade e peso inicial de  $130,8 \pm 27,1$  gramas fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Durante todo o experimento os animais foram

alojados individualmente em caixas com sistema de ventilação automatizado (Ventilife Alesco®, São Paulo, Brasil), mantidas em ambiente com temperatura ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade (60% - 70%) e luminosidade (12/12 h claro/escuro) controladas, recebendo água e ração *ad libitum*. Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais com 7 animais em cada grupo. Grupo 1 (controle): NaCl 0,9%; Grupo 2 (controle da indução): DMH + NaCl 0,9%; Grupo 3: DMH + extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* (10mg/kg); Grupo 4: DMH + extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* (100mg/Kg); Grupo 5: DMH + extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* (200mg/Kg). O estudo foi conduzido de acordo com as normas internacionalmente aceitas para o uso e cuidados com animais de laboratório e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde - UNIVIÇOSA (protocolo de aprovação 00002/2012-I).

A carcinogênese colorretal foi induzida por meio de uma injeção subcutânea de 1,2 dimetilhidrazina (Aldrich Chemical Co, Milwaukee, USA) na dose de 20 mg/kg a cada semana durante 10 semanas (Larangeira et al., 1998). A partir da 11ª semana, o extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* foi administrado por gavagem 3 vezes, durante 14 semanas. Os animais dos grupos 1 e 2 receberam gavagem apenas com NaCl 0,9% (700 µl). O peso dos animais foi registrado semanalmente. Ao final das 25 semanas os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical sob anestesia (ketamina, 10 mg/kg; and xilazina 2 mg/kg i.p.) após jejum de 12 horas.

#### ***Determinação dos focos de criptas aberrantes***

Após a eutanásia o intestino grosso foi removido *in totum*, lavado em NaCl 0,9%, aberto longitudinalmente, e fixado durante 24 horas em placas de parafina contendo formol tamponado a 10%, pH=7,2 (Bird 1987). Os intestinos foram medidos e divididos em três fragmentos iguais (cólon proximal, médio e distal) em relação ao ceco. Em seguida, foram

corados com azul de metileno 0,1% por um minuto e lavados em tampão fosfato, pH=7,2, para análise microscópica. Para identificação e quantificação dos focos de criptas aberrantes (FCA), a superfície mucosa do intestino grosso foi observada a partir dos fragmentos intactos do cólon com auxílio de microscópio de luz (Olympus BX-60<sup>®</sup>, Tóquio, Japan), com lente objetiva de 10 vezes (Bird 1987, 1995). Toda a área do cólon foi avaliada e categorização dos FCA foi realizada mediante a determinação da frequência observada de criptas aberrantes em cada foco. Dessa forma, as categorias estabelecidas incluíram focos com 1 a 3, 4 a 10, acima de 10 criptas aberrantes, e tumor.

#### ***Análise histopatológica e histomorfométrica***

Após a análise dos FCA, os fragmentos do cólon foram descorados com lavagens sucessivas em etanol 50%, desidratados em etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Foram obtidos cortes de 4 $\mu$ m de espessura em micrótomo rotativo (Leica Multicut 2045<sup>®</sup>, Reichert-Jung Products, Alemanha) que foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para caracterização morfológica geral do tecido, e Alcian blue (AB), e Ácido Periódico de Schiff (PAS) para marcação de células mucossecretoras (Yoshimi et al., 2004; Meira et al., 2008). Para evitar a análise da mesma área histológica, foram utilizados 1 a cada 20 cortes do tecido. Os cortes foram visualizados e as imagens capturadas por meio de um microscópio de luz (Olympus BX-60<sup>®</sup>, Tóquio, Japan) conectado a uma câmera digital (Olympus QColor-3<sup>®</sup>, Tokyo, Japan). Para cada coloração e grupo investigado, foram obtidos aleatoriamente sessenta campos microscópicos com objetiva de 40 vezes, de modo que uma área total de 8,27x10<sup>5</sup> $\mu$ m<sup>2</sup> foi analisada para cada segmento intestinal.

Os parâmetros histopatológicos analisados foram a presença de displasia tecidual, dilatação de criptas e morfologia dos enterócitos (Meira et al., 2008). A partir de secções

longitudinais corada com H&E, foram determinados os parâmetros morfométricos de comprimento, largura, e volume das criptas. Em secções transversais foi determinada a área das criptas e do seu lúmen. Em secções transversais coradas com AB e PAS foi determinado o número de células mucossecretoras por unidade de área histológica. Nessas mesmas secções, a densidade de volume ( $V_v$ ) ocupada por mucinas ácidas (AB+) e neutras (PAS+) na área histológica foi estimada por contagem de pontos usando a seguinte fórmula:  $V_v[AB+, PAS+] = P_p [AB+, PAS+] / P_T$ ; onde  $P_p$  é o número de pontos que incidem sobre cada tipo de mucina e  $P_T$  é o número total de pontos de teste. Para essa análise foi utilizado um sistema de teste com 72 pontos aplicados sobre uma área histológica padronizada de  $20,0 \times 10^3 \mu m^2$  (Mandarim-de-Lacerda, 2003).

A marcação das regiões organizadoras de nucléolo (AgNORs) foi realizada por meio do método descrito por Howell and Black, (1980). Brevemente, cortes de 4  $\mu m$  dos três segmentos intestinais foram incubados com solução de prata coloidal na ausência de luz durante 60 minutos a temperatura ambiente. AgNORs foram visualizados em microscópio de luz (Olympus BX-60<sup>®</sup>, Tóquio, Japan) com aumento de 1000 vezes e contadas em núcleos de 90 enterócitos amostrados aleatoriamente em 30 criptas intestinais de cada segmento intestinal para cada animal. Os resultados foram expressos para todo o intestino como o número de AgNORs por núcleo. Toda a análise histomorfométrica foi realizada por meio do software Image Pro-plus 4.5<sup>®</sup> (Media Cybernetcs, Silver Spring, MD, USA).

#### ***Microanálise de elementos químicos***

Fragmentos dos três segmentos intestinais (proximal, médio e distal + reto) foram dissecados, desidratados em etanol e submetidos à secagem ao ponto crítico (CPD 030, Bal-tec, Witten, North Rhine-Westphalia, Alemanha). O conteúdo e a distribuição dos elementos químicos foram investigados por Espectroscopia de Energia Dispersiva de

Raios-X (EED) usando um microscópio eletrônico de varredura (Leo 1430VP, Zeiss, Jena, Alemanha) acoplado a um detector de Raios-X (Tracor TN5502, Middleton, WI, EUA). Foi utilizado um aumento de 300 vezes, voltagem de aceleração de 20 kV e distância de trabalho de 19 mm. Para cada grupo foi investigada uma área total de  $36.18 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  em cada segmento do cólon. A proporção dos elementos carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O), flúor (F), sódio (Na), magnésio (Mg), fósforo (P), enxofre (S), cloro (Cl), potássio (K), cálcio (Ca), manganês (Mn), ferro (Fe), cobre (Cu) selênio (Se) e Zinco (Zn) foi mensurada e expressa como o valor médio para todo o intestino.

#### ***Análise bioquímica***

Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca no momento da eutanásia. O sangue foi centrifugado e o soro utilizado para dosagem bioquímica de albumina, proteínas totais, glicose, colesterol e triacilgliceróis (Alizè<sup>®</sup>, França).

#### ***Análise estatística***

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (média  $\pm$  DP). Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks) seguido pelo teste de Dunnett. Resultados com valor  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## Resultados

### *Prospecção fitoquímica*

Os resultados da prospecção fitoquímica qualitativa do extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* indicaram a presença de compostos fenólicos, flavonóides e taninos (Tabela 1).

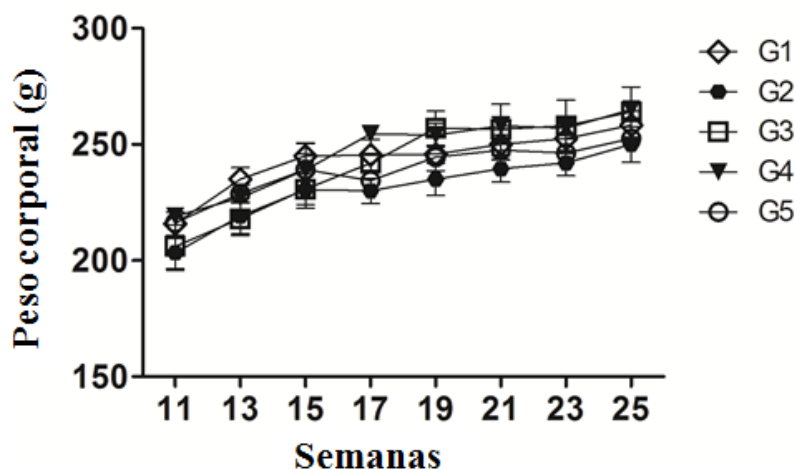
**Tabela 1.** Prospecção fitoquímica do extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus*.

Constituintes Químicos	Extrato hidroalcoólico 30%
Compostos fenólicos	+
Naftoquinonas	-
Flavonóides	++
Taninos	+
Cumarinas	-
Triterpenos e esteróides	-
Heterosídeos cardiotônicos	-
Saponinas	-

(+) resultado positivo e (-) resultado negativo

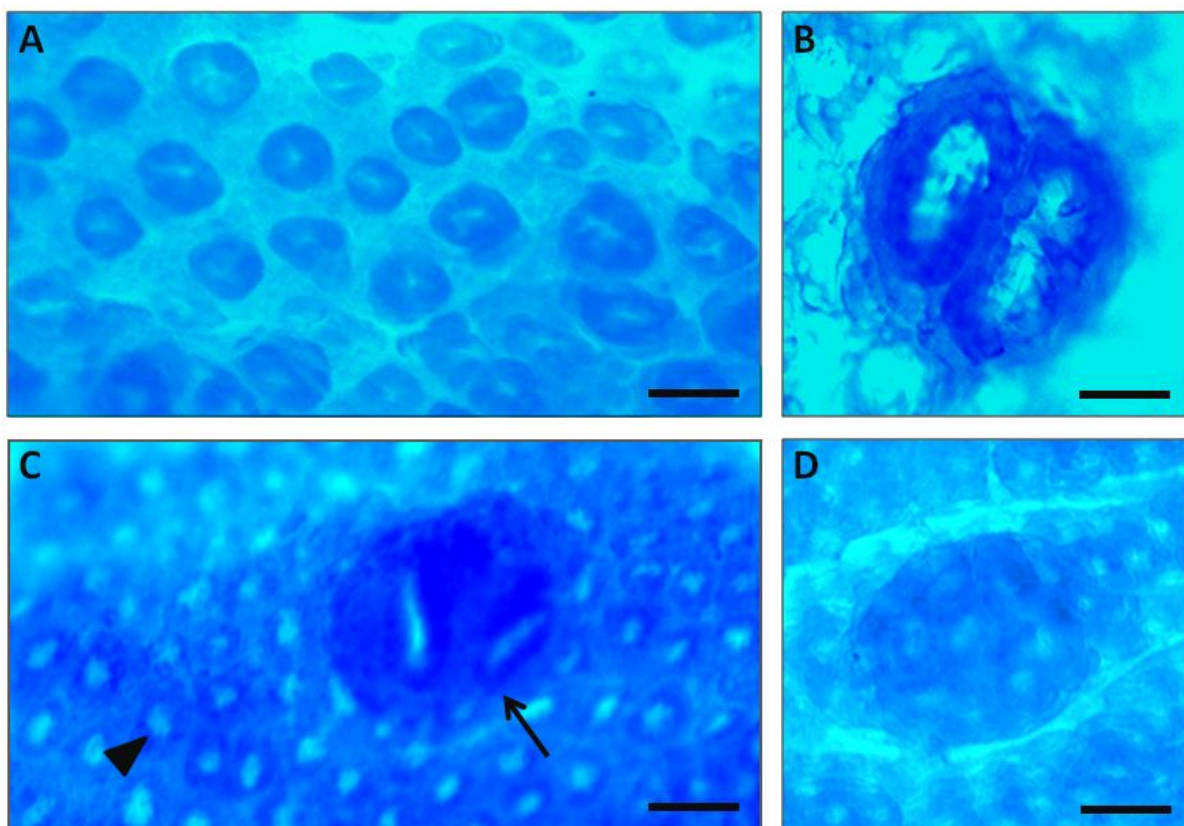
### *Análise biométrica e dos focos de criptas aberrantes*

Não houve diferença significativa no peso corporal (Figura 1) e comprimento intestinal (dados não mostrados) entre os grupos após as 25 semanas de experimento.



**Figura 1.** Evolução do peso corporal de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus*. \*vs. G1(sadio), NaCl 0,9%; †vs. G2 (controle da indução), DMH 20 mg/kg + NaCl 0,9%; G3, DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 10mg/Kg; G4, DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 100mg/Kg; G5, DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 200mg/Kg.

A análise da superfície da mucosa intestinal demonstrou a presença de FCA em todos os segmentos investigados nos grupos expostos à DMH. Os FCA apresentaram-se distribuídos ao longo de toda a superfície intestinal. Diferentes níveis de desenvolvimento dos FCA foram observados, com predomínio de focos contendo entre 1 e 3 criptas aberrantes circundadas por criptas normais, distribuídos por toda a extensão do intestino grosso dos animais (Figura 2).



**Figura 2.** Fotomicrografias representativas de criptas do cólon distal de ratos controle (A) e expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) (B, C e D) obtidas por montagem total do intestino. No painel (A) são observadas criptas normais homogeneamente distribuídas. Nos animais expostos à DMH são identificados focos com 2 (B e C) e aproximadamente 10 (D) criptas aberrantes, caracterizadas por dilatação do epitélio de revestimento intestinal e protrusão em direção à luz intestinal. No painel (C) são observadas criptas normais (cabeça de seta) ao redor do foco de cripta aberrante (seta) (Coloração Azul de Metileno, barras = 40 µm).

A quantificação das lesões da mucosa mostrou aumento do número de FCA nos três segmentos intestinais em todos os grupos expostos à DMH, especialmente em G2. De modo geral, foi observada que as dosagens do extrato utilizadas em G4 e G5 promoveram redução significativa do número total de criptas aberrantes por foco em relação à G2. Em todos os grupos tratados com o extrato houve redução dos FCA nos 3 segmentos do intestino. Foi observada baixa frequência de tumores nos animais expostos à DMH, os tratamentos com o

extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* foram eficientes na redução do número destes tumores (Tabela 2).

**Tabela 2.** Análise dos focos de criptas aberrantes no intestino grosso de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus*.

Segmento intestinal / Número de cripta aberrante por foco	G1	G2	G3	G4	G5
<b>Proximal</b>					
1-3	0,0 ± 0,0	18,1 ± 2,1*	26,8 ± 3,8*†	20,0 ± 3,9*†	17,8 ± 3,6*†
4-10	0,0 ± 0,0	3,0 ± 1,0*	3,0 ± 1,3*	1,8 ± 0,7*	1,3 ± 0,5*†
> 10	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,4*	0,2 ± 0,1*†	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Tumor	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,1*	0,4 ± 0,1*	0,0 ± 0,0†	0,0 ± 0,0†
<b>Médio</b>					
1-3	2,5 ± 0,1	72,7 ± 4,6*	53,4 ± 6,8*	48,2 ± 4,4*	34,8 ± 2,5*†
4 to 10	0,0 ± 0,0	9,7 ± 3,4*	6,4 ± 2,0*	6,5 ± 1,9*	4,2 ± 1,2*†
> 10	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1*†	0,2 ± 0,1*†	0,5 ± 0,1*†
Tumor	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,2	0,0 ± 0,0†	0,0 ± 0,0†	0,5 ± 0,1*†
<b>Distal</b>					
1-3	0,7 ± 0,3	42,6 ± 8,9*	29,0 ± 2,8*	29,2 ± 3,6*	29,8 ± 3,0*
4-10	0,0 ± 0,0	4,7 ± 2,4*	3,8 ± 1,7*	1,0 ± 0,4*†	0,5 ± 0,1*†
> 10	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Tumor	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,1*	0,4 ± 0,1*	0,2 ± 0,1*†	0,2 ± 0,1*†

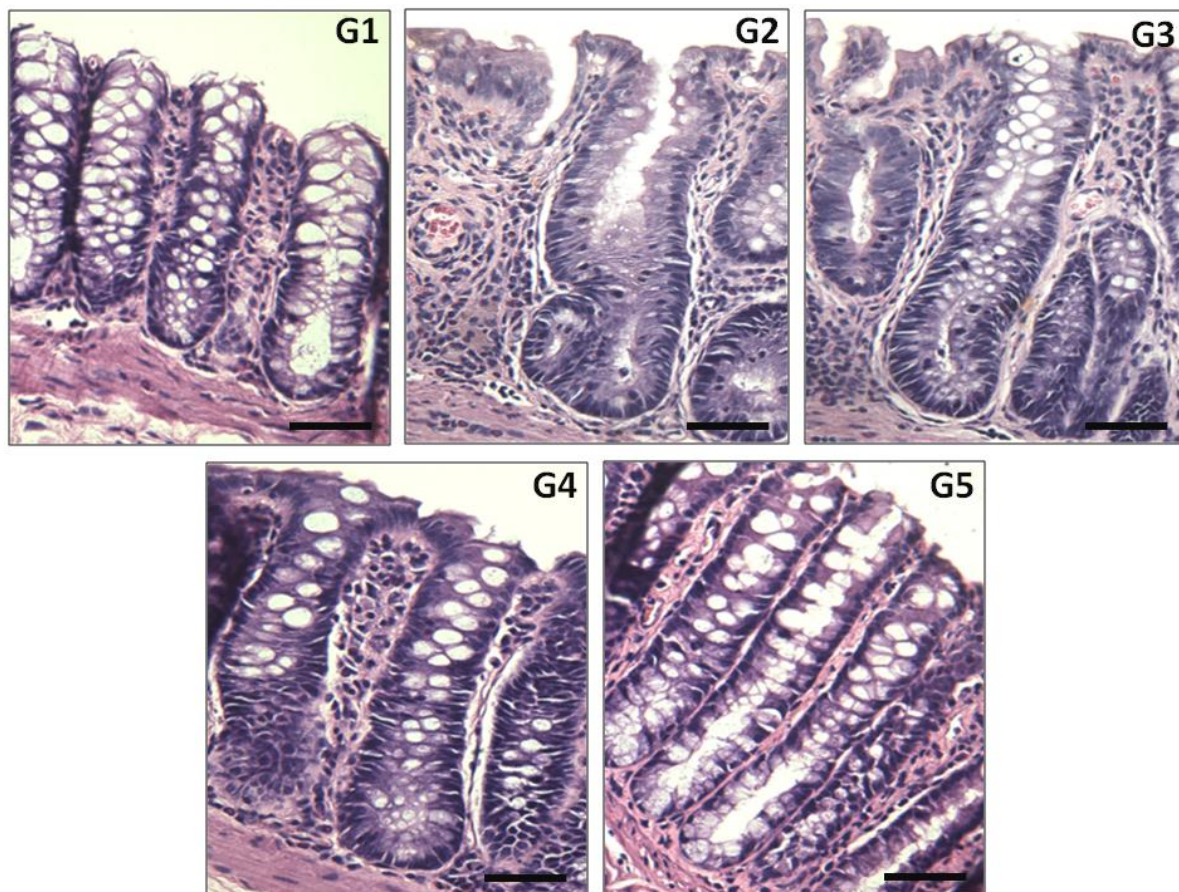
Valores expressos em relação à média e desvio-padrão  $p < 0,05$  \*vs. G1(sadio), NaCl 0,9%; † vs.

G2 (controle da indução), DMH 20mg/kg + NaCl 0,9%; G3, DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 10mg/Kg; G4, DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 100mg/Kg; G5, DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 200mg/Kg.

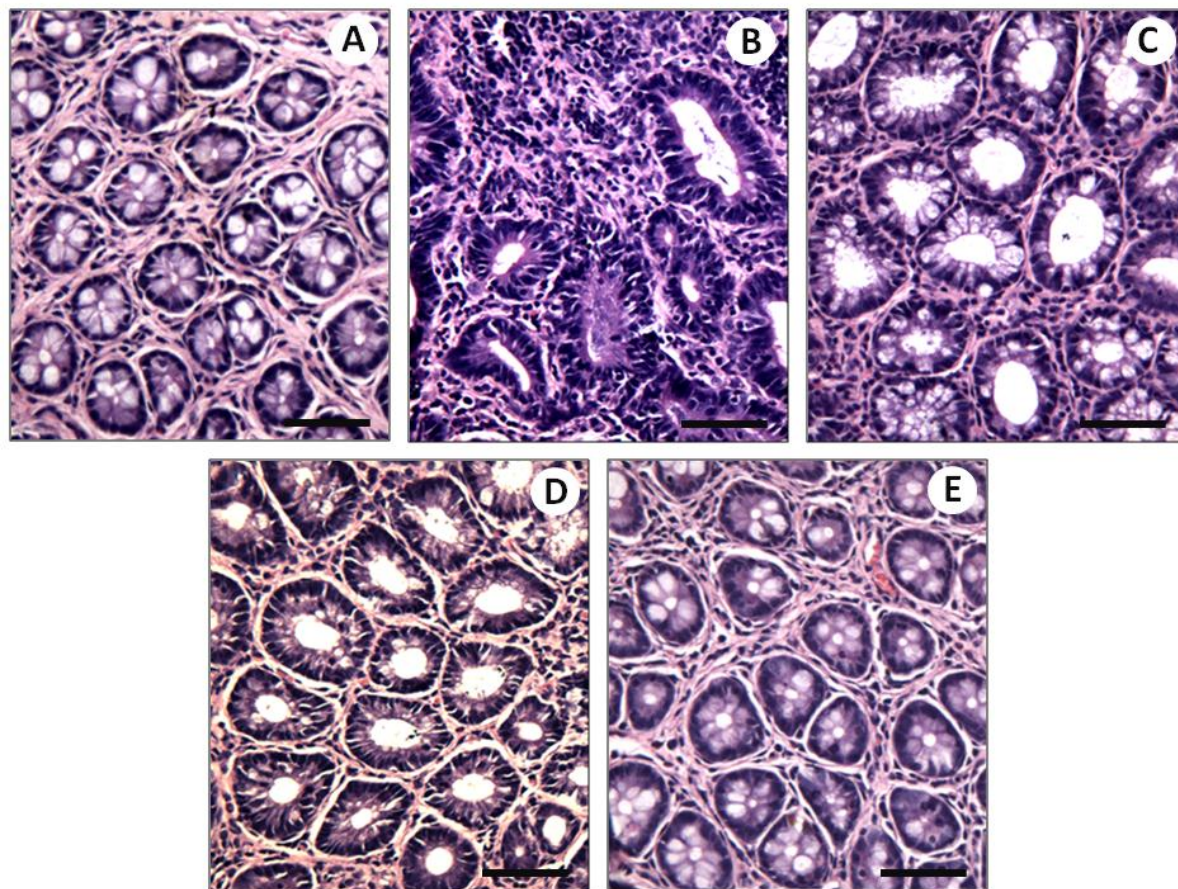
### **Análise histopatológica, histoquímica e histomorfométrica**

A análise histopatológica indicou a presença de marcada reorganização morfológica das criptas intestinais. Em G2 foram observadas criptas hipertrofiadas com intensa displasia. Neste grupos houve hipertrofia e aumento da densidade de enterócitos com citoplasma e núcleo alongados, marcada redução da densidade de células caliciformes em toda a extensão das criptas, dilatação do espaço luminal e acentuado infiltrado de células inflamatórias. Em

G3 e G4 houve evidente redução da displasia das criptas, com a presença de enterócitos alongados, e espaço luminal consideravelmente dilatado. Em G5 pode-se observar o remodelamento morfológico com criptas semelhantes à G1 (Figuras 3 e 4).



**Figura 3.** Fotomicrografias representativas de secções longitudinais de criptas do cólon distal de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus*. Animais controle (G1) apresentaram criptas normais com lúmen estreito e elevada densidade de células caliciformes. Em G2 e G3 são observadas criptas com intensa displasia com enterócitos alongados e reduzida densidade de células caliciformes. Em G4 são observadas criptas alongadas com as bases levemente dilatadas. Em G5 são mostradas criptas semelhantes à G1. (Coloração H&E, barra = 50  $\mu$ m). \*vs. G1 (sadio), NaCl 0,9%; †vs. G2 (controle da indução), DMH 20mg/kg + NaCl 0,9%; G3, DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 10mg/Kg; G4, DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 100mg/Kg; G5, DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 200mg/Kg.



**Figura 4.** Fotomicrografias representativas secções transversais de criptas do cólon distal de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus*. Em A (G1) as criptas intestinais apresentam estrutura normal com formato circular ou oval e lúmen estreito. Em B (G2) e C (G3) são mostradas criptas displásicas com lúmen dilatado e enterócitos alongados. Em D (G4) são observadas criptas moderadamente dilatadas. Em E (G5) são mostradas criptas levemente dilatadas com lúmen estreito (Coloração H&E, barra = 60  $\mu$ m). \*vs. G1 (controle negativo), NaCl 0,9%; †vs. G2 (controle da indução), DMH 20mg/kg + NaCl 0,9%; G3, DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 10mg/Kg; G4, DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 100mg/Kg; G5, DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 200mg/Kg.

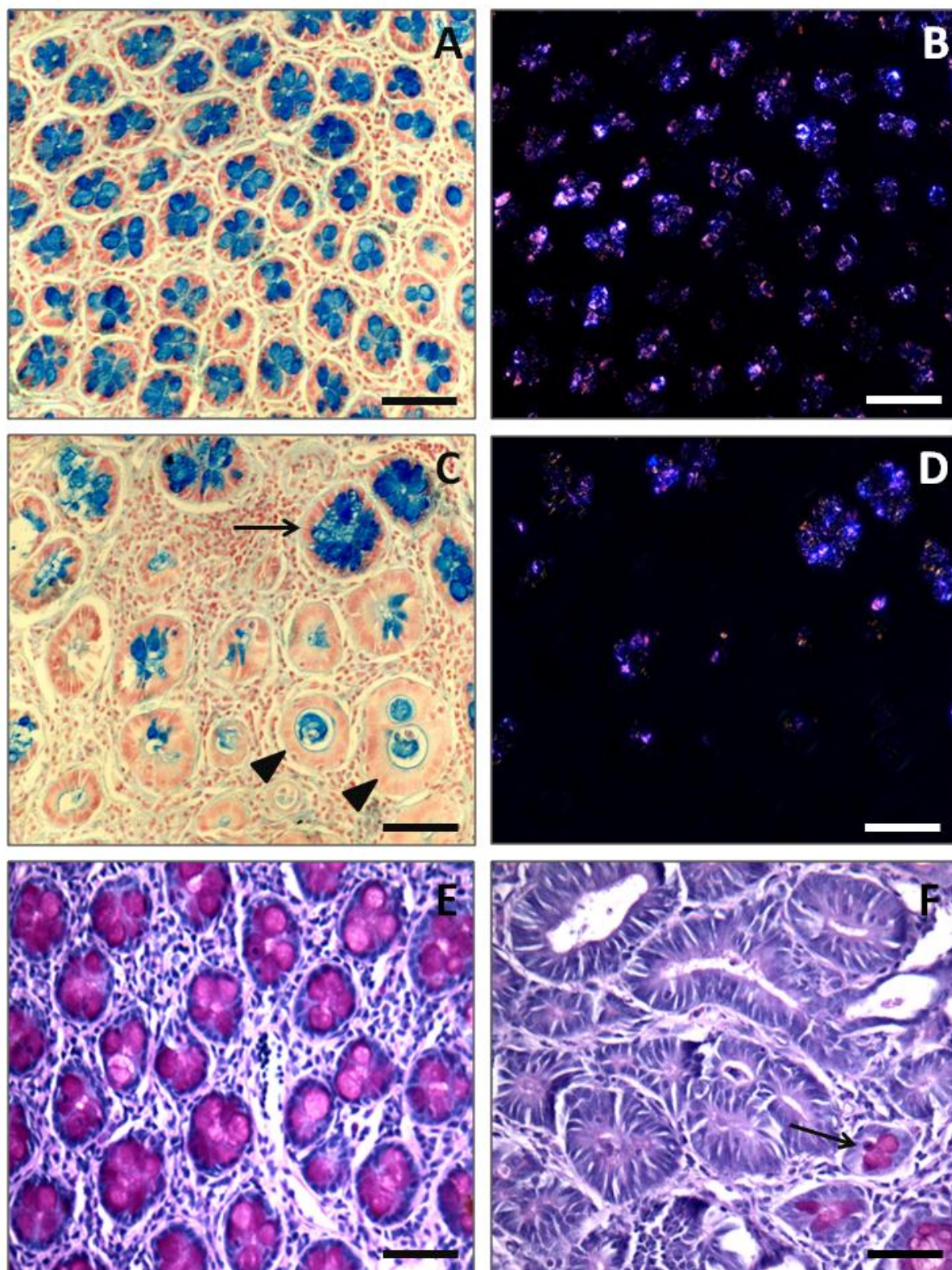
A análise histomorfométrica das criptas mostrou aumento significativo de todos os parâmetros avaliados em G2 em relação à G1 nos três segmentos do cólon. De forma geral, todos os grupos tratados mostraram redução dos parâmetros avaliados em relação ao G2 em toda extensão do intestino grosso. O G3 mostrou ser o tratamento menos eficiente quando comparado ao G2, principalmente nos segmentos médio e distal. Os parâmetros analisados foram significativamente inferiores em todos os segmentos intestinais em G5 comparados à G2 (tabela 3).

**Tabela 3.** Análise morfométrica de criptas do intestino grosso de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus*.

Segmento intestinal	Largura ( $\mu\text{m}$ )	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Área da cripta ( $\mu\text{m}^2$ )	Área do lúmen ( $\mu\text{m}^2$ )	Volume da cripta ( $\mu\text{m}^3$ )x10 <sup>3</sup>	Volume do lúmen ( $\mu\text{m}^3$ )x10 <sup>3</sup>
<b>Proximal</b>						
G1	222,6 ± 30,1	34,9 ± 7,1	1801,3 ± 551,7	146,2 ± 47,8	403,9 ± 75,2	39,5 ± 7,1
G2	337,5 ± 40,3*	71,9 ± 18,5*	3717,5 ± 659,1*	463,5 ± 60,2*	698,7 ± 100,1*	110,7 ± 17,9*
G3	243,4 ± 29,3 <sup>†</sup>	44,7 ± 6,4 <sup>†</sup>	2016,8 ± 421,5 <sup>†</sup>	155,8 ± 47,3 <sup>†</sup>	482,6 ± 80,9 <sup>†</sup>	57,5 ± 9,1 <sup>†</sup>
G4	215,1 ± 53,2 <sup>†</sup>	33,0 ± 6,3 <sup>†</sup>	1134,4 ± 495,4 <sup>†</sup>	140,7 ± 40,8 <sup>†</sup>	444,9 ± 81,9 <sup>†</sup>	42,1 ± 10,3
G5	212,5 ± 46,5 <sup>†</sup>	38,8 ± 9,0 <sup>†</sup>	1692,6 ± 621,9 <sup>†</sup>	146,3 ± 53,3 <sup>†</sup>	417,7 ± 78,3 <sup>†</sup>	38,9 ± 10,9
<b>Médio</b>						
G1	242,6 ± 28,4	37,0 ± 8,1	1709,5 ± 398,3	177,3 ± 65,2	382,1 ± 49,5	39,9 ± 9,2
G2	379,6 ± 51,8*	70,3 ± 11,0*	3106,1 ± 605,4*	531,8 ± 119,0*	937,4 ± 121,6*	120,5 ± 24,1*
G3	300,9 ± 40,3	51,3 ± 10,8	2891,1 ± 597,8*	329,2 ± 51,8*	615,8 ± 81,4* <sup>†</sup>	71,5 ± 14,2* <sup>†</sup>
G4	268,0 ± 35,7 <sup>†</sup>	45,2 ± 7,3 <sup>†</sup>	1818,5 ± 504,1 <sup>†</sup>	232,2 ± 51,8 <sup>†</sup>	518,9 ± 68,0* <sup>†</sup>	45,9 ± 11,4 <sup>†</sup>
G5	245,3 ± 50,3 <sup>†</sup>	46,0 ± 8,1 <sup>†</sup>	1725,4 ± 437,7 <sup>†</sup>	202,5 ± 47,7 <sup>†</sup>	500,2 ± 97,4 <sup>†</sup>	53,7 ± 15,9 <sup>†</sup>
<b>Distal</b>						
G1	261,7 ± 19,4	44,3 ± 6,8	1425,6 ± 418,3	121,7 ± 46,0	399,6 ± 73,1	42,3 ± 6,5
G2	400,8 ± 53,7*	68,7 ± 9,5*	2900,4 ± 411,7*	340,4 ± 75,1*	849,8 ± 117,3*	80,2 ± 11,9*
G3	350,6 ± 29,6*	56,9 ± 6,0*	2716,2 ± 445,1*	285,6 ± 50,2*	690,0 ± 90,8*	60,4 ± 11,6*
G4	219,7 ± 33,6 <sup>†</sup>	47,6 ± 6,1 <sup>†</sup>	1885,4 ± 451,8 <sup>†</sup>	129,1 ± 62,1 <sup>†</sup>	504,3 ± 95,1 <sup>†</sup>	37,3 ± 7,5 <sup>†</sup>
G5	254,9 ± 32,1 <sup>†</sup>	47,1 ± 7,2 <sup>†</sup>	1605,9 ± 498,6 <sup>†</sup>	130,5 ± 56,7 <sup>†</sup>	483,8 ± 84,2 <sup>†</sup>	38,5 ± 10,1 <sup>†</sup>

Valores expressos em relação à média e desvio-padrão p < 0,05 \*vs. G1 (controle negativo), NaCl 0,9%; <sup>†</sup>vs. G2 (controle da indução), 1,2 dimetilhidrazina-DMH 20 mg/kg + NaCl 0,9%; G3 (DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 10mg/Kg); G4 (DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 100mg/Kg); G5 (DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 200mg/Kg).

A partir da análise histoquímica foi observada redução da expressão de células produtoras de mucinas ácidas e neutras nas criptas dos animais expostos à 1,2 dimetilhidrazina comparados aos sadios. Nos animais sadios foi observada ampla densidade e distribuição homogênea de células caliciformes enquanto que nos animais expostos à 1,2 dimetilhidrazina notou-se reduzida densidade de criptas e células caliciformes, epitélio hipertrófico e uma maior área ocupada por tecido conjuntivo circundando as criptas (Figura 5).

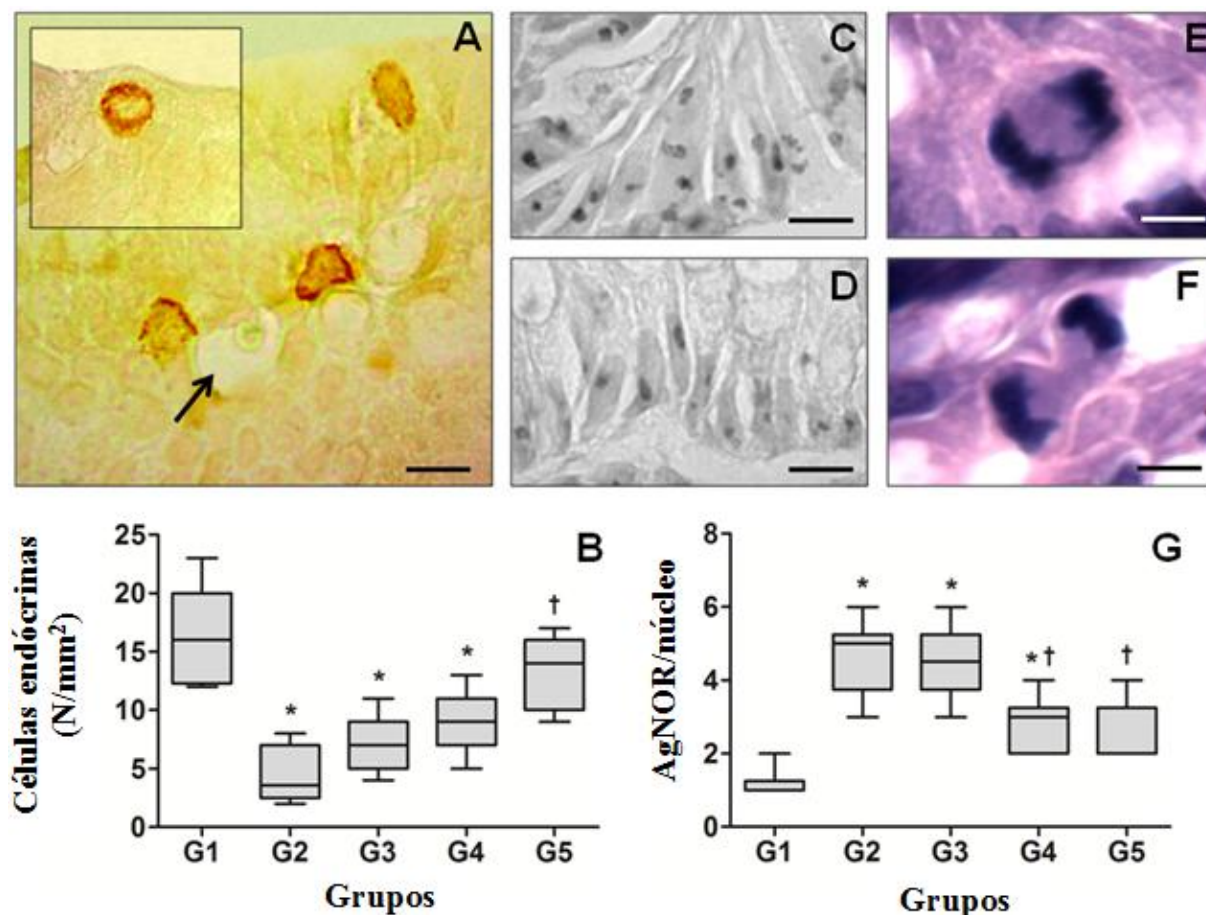


**Figura 5.** Distribuição de células produtoras de mucinas ácidas (A, B, C e D) e neutras (E e F) nas criptas do cólon distal de ratos sadios (G1) e expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) (G2). O painel (A e E) mostra ampla densidade e distribuição homogênea de células caliciformes nas criptas de

animal sadio (A, coloração Alcian blue, barra = 110  $\mu\text{m}$ ; E, coloração Ácido Periódico de Schiff e Hematoxilina, barra = 70  $\mu\text{m}$ ). No painel (B) a mesma imagem (A) é observada sob luz polarizada. Notar a polarização e distribuição uniforme do muco por toda a área tecidual (barra = 110  $\mu\text{m}$ ). No painel (C) são observadas criptas displásicas dilatadas (seta) de um animal exposto à DMH, observar os focos com 1 e 2 criptas aberrantes confluentes (cabeça de seta). Notar a reduzida densidade de criptas e células caliciformes, e a maior área ocupada por tecido conjuntivo circundando as criptas (coloração Alcian blue, barra = 110  $\mu\text{m}$ ). (D) Redução da área ocupada pelo muco é claramente observada na imagem sob luz polarizada (barra = 110  $\mu\text{m}$ ). Em (F) criptas displásicas com epitélio hipertrófico apresentando drástica redução de células caliciformes (seta) (coloração Ácido Periódico de Schiff e Hematoxilina, barra = 70  $\mu\text{m}$ ).

### *Células enteroendócrinas e AgNORs*

De forma geral, em todos os grupos expostos à DMH, houve redução significativa do número de células enteroendócrinas comparados à G1. Em G5 o número de células enteroendócrinas foi significativamente maior comparado à G2. Não houve diferença estatística nesse parâmetro entre G1 e G5 (Figura 6 A, B). Para todos os segmentos intestinais investigados, houve aumento significativo do número de regiões organizadoras de nucléolo por núcleo de enterócitos (AgNORs/núcleo) em G2, G3 e G4 comparados à G1. Em G5 o número AgNORs/núcleo foi significativamente menor comparado à G2. Não houve diferença estatística nesse parâmetro entre G1 e G5 (Figura 6 C, D e G). Em todos os grupos investigados foram observadas células do epitélio das criptas em diferentes fases da divisão celular, principalmente no epitélio displásico e tecido tumoral em G2.



**Figura 6.** Células enteroendócrinas do intestino grosso, regiões organizadoras de nucléolo por núcleo de enterócitos (AgNORs/núcleo) e células do epitélio das criptas em divisão de ratos expostos a 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus*. (A) Fotomicrografia representativa de células enteroendócrinas na base do epitélio intestinal (método de Grimélius, barra= 25 $\mu$ m). (B) Distribuição de células enteroendócrinas por área histológica nos grupos investigados. Valores expressos como mediana e intervalos interquartil para todo o intestino. Fotomicrografia representativa dos grupos 2 e 1 mostrando núcleos celulares com até 5 (C) ou 2 (D) AgNORs, respectivamente (barra= 15 $\mu$ m). (G) Distribuição de AgNORs/núcleo nos grupos investigados. Células do epitélio das criptas em divisão nas fases de anáfase (E) e telófase (F). G1(sadio), NaCl 0,9%; G2, (controle da indução) DMH+NaCl 0,9%; G3, DMH+extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* (10mg/Kg); G4, DMH+extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* (100mg/Kg); G5, DMH+extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* (200mg/Kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \*vs. G1, †vs. G2.

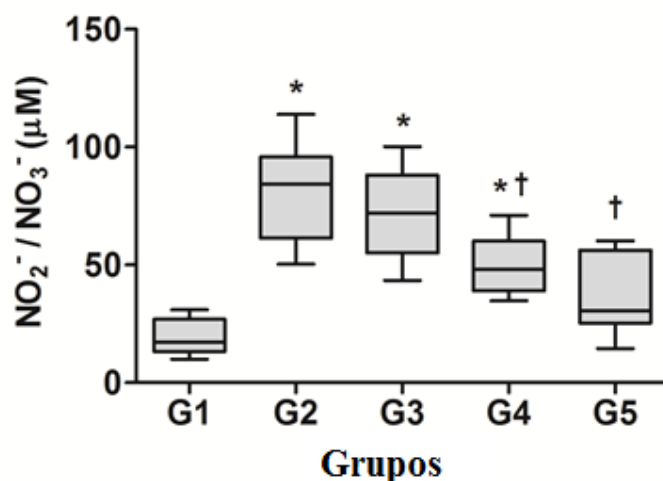
### ***Análise bioquímica e de elementos químicos***

A análise dos parâmetros bioquímicos não mostrou diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos entre grupos investigados, para a dosagem de albumina, colesterol total e glicose. A dosagem de proteínas totais indicou níveis séricos significativamente reduzidos em G2 e G3 em relação ao G1, assim como a análise sérica dos triglicerídeos que no G5 também foi significativamente reduzida quando comparado ao G1 ( $p>0,05$ ) (Tabela 4). Os níveis de séricos de nitrito/nitrato em G2, G3 e G4 foram significativamente superiores em relação à G1 ( $p>0,05$ ) (Figura 7). Em G4 e G5 foi observada redução significativa do nível sérico de nitrito/nitrato em relação à G2.

**Tabela 4.** Parâmetros bioquímicos séricos de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus*

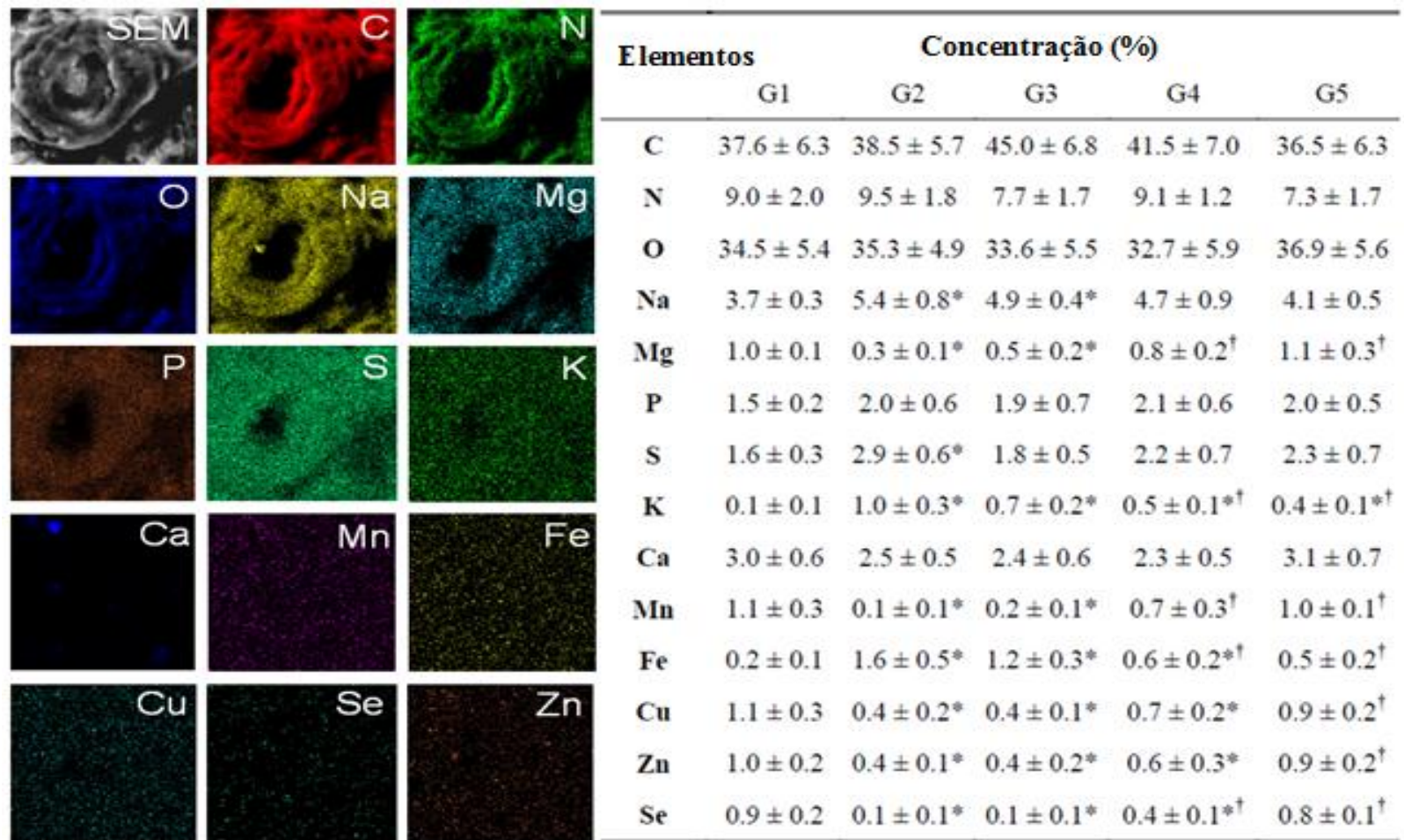
Grupos	Proteínas totais		Albumina		Triacilgliceróis		Colesterol		Glicose	
	Conteúdo médio (g/dL)	Variação (%)	Conteúdo médio (g/dL)	Variação (%)	Conteúdo médio (mg/dL)	Variação (%)	Conteúdo médio (mg/dL)	Variação (%)	Conteúdo médio (mg/dL)	Variação (%)
<b>G1</b>	81,7 ± 3,7	-	3,6 ± 0,5	-	180,2 ± 24,3	-	58,2 ± 14,1	-	105,6 ± 33,1	-
<b>G2</b>	66,9 ± 11,0*	- 18,1*	3,5 ± 0,5	- 2,8	161,0 ± 58,9	- 10,6	58,9 ± 16,2	+ 1,2	116,8 ± 28,4	+ 10,6
<b>G3</b>	73,5 ± 2,4*	- 10,0*	3,7 ± 0,3	+ 2,8	140,4 ± 40,1	- 22,1	68,6 ± 9,4	+ 17,8	132,4 ± 16,3	+ 25,4
<b>G4</b>	75,7 ± 1,8	- 7,3	3,9 ± 0,1	+ 8,3	156,6 ± 56,7	- 13,1	61,3 ± 7,5	+ 5,3	138,4 ± 24,9	+ 31,0
<b>G5</b>	77,7 ± 3,6	- 4,9	3,8 ± 0,1	+ 5,5	92,8 ± 12,5*	- 48,5*	76,8 ± 9,7	+ 31,9	132,7 ± 19,0	+ 25,7

Valores expressos em relação à média e desvio-padrão  $p < 0,05$  \* vs G1 (controle negativo), NaCl 0,9%; † vs G2 (controle da indução), 1,2 DMH 20mg/kg + NaCl 0,9%; G3 (DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 10mg/Kg); G4 (DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 100mg/Kg); G5 (DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 200mg/Kg).



**Figura 7.** Níveis de óxido nítrico no soro de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e tratados com o extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus*. A concentração de nitrito/nitrato ( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ) foi determinada pelo método de Griess. Valores expressos como média e desvio-padrão (média  $\pm$  DP). G1 (controle negativo), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH 20 mg/kg + NaCl 0,9%; G3 (DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 10mg/Kg); G4 (DMH-tratado 100mg/Kg); G5 (DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 200mg/Kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \* vs. G1, † vs. G2.

A análise de EED indicou distribuição homogênea dos elementos químicos, a exceção do cálcio (Ca), na superfície da mucosa em todos os segmentos intestinais investigados, tanto sobre o tecido displásico dos FCA quanto sobre o tecido normal (dados não mostrados). De forma geral, houve redução significativa nos níveis teciduais de Mg, Mn, Fe, Cu, Zn e Se; e aumento significativo de Na, K e S em G2 e G3 comparados à G1. Em G4 e G5 os níveis de Mg, Mn e Se foram significativamente superiores, enquanto que os níveis de K e Fe foram significativamente inferiores ao observado em G2, com os melhores resultados encontrados em G5, o qual foi similar à G1 (Figura 8).



**Figura 8.** Análise representativa da distribuição e do conteúdo de elementos químicos no cólon médio de ratos expostos à 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e

tratados com o extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus*. As imagens representam o mapa de distribuição dos diferentes elementos químicos em uma cripta aberrante no cólon médio de um animal exposto à DMH (G2). Notar a homogeneidade na distribuição mineral, exceto para o cálcio (Ca). Na tabela, os percentuais de cada mineral analisado são expressos como média e desvio-padrão (média  $\pm$  DP). Devido ausência de diferença estatística entre os segmentos do cólon, os dados são expressos para todo o intestino grosso. G1 (controle negativo), NaCl 0,9%; G2 (controle da indução), DMH 20 mg/kg + NaCl 0,9%; G3 (DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 10mg/Kg); G4 (DMH- tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 100mg/Kg); G5 (DMH-tratado extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* 200mg/Kg). Diferença estatística  $p < 0.05$ ; \* vs. G1, † vs. G2.

### **Discussão**

No presente estudo foi investigado o efeito do extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* em lesões pré-neoplásicas colorretais induzidas pelo carcinógeno químico DMH. Os resultados demonstraram que o tratamento com o extrato contribuiu parcialmente para a reorganização morfológica do epitélio intestinal, reduzindo a formação dos FCA, o número total de criptas aberrantes por foco, a intensidade de displasia do epitélio das criptas, o número de AgNORs/núcleo de enterócitos, o estresse nitrosativo e aumentando a expressão de muco, a densidade de suas células produtoras e a distribuição de células enteroendócrinas.

A prospecção fitoquímica do extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* indicou a presença de metabólitos secundários como flavonóides, taninos e compostos fenólicos que podem estar relacionados à sua ação no tratamento de diversos distúrbios. Martínez-Flores et al. (2002) relata que os flavonóides atuam na estabilização de espécies reativas de oxigênio por possuírem grupo orto-dihidroxi ou grupo catecol, o que confere maior estabilidade a forma radicalar. Segundo Sanches et al., (2005), espécies vegetais com alto conteúdo de taninos são usadas na medicina popular como cicatrizantes, além de agirem como antimicrobianas e desativadoras de radicais livres.

Diversos estudos têm utilizado os FCA como marcadores para a triagem de compostos indutores e inibidores da carcinogênese colorretal, principalmente em estágios iniciais (Demarzo & Garcia, 2004; Newell & Heddle, 2004; Ma et al., 2002). A análise dos resultados deste estudo indicou um possível efeito inibitório dose-dependente do extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* sobre os FCA em todos os segmentos intestinais investigados, sendo que os melhores resultados foram encontrados no grupo tratado com a maior dosagem do extrato.

As criptas aberrantes podem ser identificadas na mucosa do cólon, como únicas ou na forma de focos, sendo designados de FCA (Tudek et al., 1989). Os FCAs são observados com maior frequência no cólon médio e distal, tanto em roedores como no homem (Di Gregorio et al., 1997; Rodrigues et al., 2002). Neste estudo, o segmento médio do intestino foi o que apresentou o maior número de FCA nos três grupos tratados conforme já relatado por Tanaka et al. (1997), Rao et al. (2001) e Larangeira et al. (1998).

Druckrey et al. (1967) demonstraram que a administração do carcinógeno químico 1,2-dimetilhidrazina (DMH) resultou no desenvolvimento de câncer, tanto no intestino delgado quanto no cólon de ratos. A partir de então, a DMH tem sido amplamente utilizada em pesquisas de carcinogênese do cólon para o estudo de vários aspectos da morfologia, patogênese, prevenção e tratamento desta neoplasia (Martin et al., 1973; Sunter et al., 1978; Ma et al., 2002). Os carcinógenos químicos são moléculas altamente reativas capazes de capturar elétrons de sítios nucleofílicos como DNA, RNA, proteínas e lipídeos em células-alvo específicas, o que resulta em alterações profundas que podem levar a célula a morte ou à aquisição de mutações em genes críticos que controlam o ciclo celular e apoptose (Schulte-Hermann et al., 1999; Baird et al., 2005).

Muitos minerais são fundamentais para manutenção da integridade do DNA e alterações nos seus níveis ideais produzem efeitos enzimáticos desordenados semelhantes aos causados

pela exposição a compostos carcinogênicos (Fenech & Ferguson, 2001). Minerais como cobre, magnésio, selênio e zinco apresentam importante papel nos estágios de iniciação, promoção e progressão do desenvolvimento neoplásico (Jaiswal & Narayan, 2004; Dani et al., 2007). No presente estudo, esses minerais foram marcadamente reduzidos no epitélio displásico dos FCA em todos os segmentos intestinais.

Evidências experimentais demonstram que os FCA representam as manifestações precoces dos fenômenos hiperplásicos e displásicos do epitélio intestinal, com elevado potencial de evolução para carcinomas intestinais (Murillo et al., 2004; Suzuki et al., 2004; Fujita et al., 2004). Estes focos apresentam mudanças no padrão de atividade enzimática, como redução das taxas da hexosaminidase (Pretlow et al., 1993) e da produção de mucinas, com aumento de sialomucinas e perda de sulfomucinas, fenômeno geralmente associado ao grau de displasia e multiplicidade das criptas (Femia et al., 2004). No presente estudo houve redução do número de células caliciformes produtoras de mucinas, com intensa displasia do epitélio das criptas nos animais expostos à DMH. Embora essas alterações tenham sido parcialmente minimizadas pelo tratamento com extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus*, o papel das células caliciformes no câncer de intestino permanece amplamente inexplorado.

O *Helianthus annuus* (girassol) tem sido um importante recurso de óleo natural e lipídeos ao longo dos séculos, além de ser usado como medicamento preventivo contra a diarreia, diurese e várias doenças inflamatórias (Lewi et al. 2006). Park et al. (2007) relataram a atividade inibitória do extrato aquoso de *Helianthus annuus* na inibição de danos celulares induzidos por peróxido de hidrogênio em células SH-SY5Y de neuroblastoma. As plantas da família Compositae a qual pertence esta espécie contém o helianol como componente predominante (29-86%), um triterpeno com atividade anti-inflamatória contra inflamação induzida por 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato em modelos animais (Atis et al., 2002).

Estudos anteriores demonstraram a presença de alterações genéticas nos FCAs tais como mutações nos genes K-ras, APC e TP53, relacionadas à proliferação celular, presença de instabilidade de microssatélites, um marcador de erros no sistema de reparo do DNA, e alterações em genes associados à inflamação tais como os relacionados com a expressão das enzimas óxido nítrico sintase e ciclooxigenase (Nucci et al., 1997; Takahashi & Wakabayashi, 2004). Portanto os resultados observados no presente estudo como a remodelação tecidual das criptas intestinais e o efeito inibitório na progressão das lesões principalmente na maior dose do extrato, podem estar relacionados ao já descrito efeito antioxidante e antiinflamatório de compostos presentes no extrato desta planta.

No presente estudo, ocorreu redução significativa do número AgNORs/núcleo nos animais tratados com o extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* na maior dosagem, indicando diminuição da proliferação celular no epitélio colônico neste grupo. Estudos correlacionando as AgNORs e variáveis histológicas convencionais como o estudo do núcleo interfásico através dos métodos citogenéticos, a cinética celular, a imunorreatividade e a citometria de fluxo sugerem que as AgNORs estejam associadas principalmente à proliferação celular (Crocker et al., 1988; Derenzini et al., 1989). As AgNORs variam em tamanho e forma, de acordo com a transcrição nucleolar, e estão intimamente relacionadas ao ciclo celular e à ploidia (Ploton, 1987). Além disso, têm sido usadas para diferenciar processos benignos e malignos em alguns tumores (Oshima & Forones, 2001).

O óxido nítrico é uma molécula importante como sinalizadora de diversas funções no organismo tais como vasodilatação, neurotransmissão, regulação da apoptose, carcinogênese e metabolismo do ferro (Bredt & Snyder, 1992). A produção elevada de óxido nítrico pode favorecer o crescimento e a disseminação tumoral através do estímulo angiogênico, do aumento da permeabilidade vascular e da supressão da resposta imune (Lala & Orucevic, 1998). Em tumores, o óxido nítrico assume particular importância na neovascularização,

contribuindo para manutenção do fluxo sanguíneo adequado (Buttery et al., 1993). A indução da síntese de óxido nítrico está no contexto das defesas do organismo contra infecções, inflamações e muitas neoplasias, contudo, dependendo das quantidades geradas, pode levar à morte celular e danos teciduais (Moncada & Higgs, 1993; Nathan & Xie, 1994; Wink et al., 1998). No presente estudo foram identificados reduzidos níveis séricos de nitrito/nitrato nos grupos tratados com o extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus*, compostos frequentemente utilizados como indicadores indiretos da inibição da síntese de óxido nítrico e consequentemente da expressão e/ou atividade da enzima óxido nítrico sintase (Woo et al., 2003; Leonardi et al., 2010).

As plantas representam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituíram modelos para a síntese de um grande número de fármacos (Wall & Wani, 1996). Vários compostos químicos já foram identificados no girassol como os ácidos clorogênico, caféico e quínico, os sesquiterpenos e diterpenos (Macías et al., 2004) e ainda alguns flavonóides como a tumbulina, kukulkanina, heliannona A e heliannona B (Macías et al., 1997). Dessa forma, de acordo com os resultados apresentados neste estudo e com os metabólitos secundários encontrados neste vegetal, sugere-se que a espécie *Helianthus annuus* apresenta um potencial efeito inibitório em estágios iniciais da carcinogênese, entretanto, esse aspecto permanece pouco compreendido e requer estudos adicionais.

O extrato hidroalcoólico de *Helianthus annuus* apresenta constituição complexa, devido à mistura de componentes químicos que podem estar contribuindo em conjunto para o resultado observado neste estudo, assim como relatado por Suzuki et al., (2004). Os constituintes de plantas medicinais com estruturas químicas bem definidas podem servir de amostras e modelos para a síntese de drogas análogas com maior eficácia e menos efeitos adversos. Contudo, apesar dessas preparações ter mostrado potencial terapêutico em modelos animais, há ainda a necessidade de maiores avaliações em estudos pré-clínicos e clínicos.

## Referências Bibliográficas\*

\* UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. Manual de normalização de trabalhos acadêmicos. Viçosa, MG, 2011. 88 p.

ATIS, S.; TUTLUOGLU, B.; SAHIN, K.; YAMAN, M.; KUCUKUSTA, A.R.; OKTAY, I. Sensitization to sunflower pollen and lung functions in sunflower processing workers. **Allergy**, v.57, p.35-39, 2002.

BAIRD, W.M., HOOVEN, L.A., MAHADEVAN, B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. **Environmental and molecular mutagenesis**, v.45, p.106-14, 2005

BALISH, E.; SHIH, C.N.; CROFT, W.A.; PAMUKCU, A.M.; LOWER, G.; BRYAN, G.T.; YALE, C.E. Effect of age, sex, and intestinal flora on the induction of colon tumors in rats. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 58, p.1103-1106, 1977.

BIRD, R.P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer letters**, v.37, p.147-151, 1987.

BIRD, R.P. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Cancer letters**, v.93, p.55-71, 1995.

BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: a novel neuronal messenger. **Neuron**, v. 8, p.3-11, 1992.

BUERKERT, A.; HAAKE, C.; RUCKWIED, M.; MARSCHNER, H. Phosphorus application effects the nutritional quality of millet grain in the Sahel. **Field Crops Research**, v. 57, p. 223-235, 1998.

BUTTERY, L.D.K.; SPRINGALL D.R.; ANDRADE S.P.; RIVEROS-MORENO V.; HART I.; PIPER P.J.; POLAK J.M. Induction of nitric oxide synthase in the neo-vasculature of experimental tumors in mice. **The journal of pathology**, v.171, p.311-19, 1993.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, p.99-105, 1998.

CHEN, W.C.; LIN, M.S.; ZHANG, B.F.; FANG, J.; ZHOU, Q.; HU, Y.; GAO, H.J. Survey of molecular profiling during human colon cancer development and progression by immunohistochemical staining on tissue microarray. **World journal of gastroenterology**, v.13, p. 699-708, 2007.

CROCKER, J.; MACARTNEY, J. C.; SMITH, P. J. Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in non-Hodgkin's lymphomas. **The Journal of pathology**, v. 154, p.151-156, 1988.

DANI, V.; GOEL, A.; VAIPHEI, K.; DHAWAN, D.K. Chemopreventive potential of zinc in experimentally induced colon carcinogenesis. **Toxicology letters**, v.171, p.10-18, 2007.

DEMARZO, M.M.; GARCIA, S.B. Exhaustive physical exercise increases the number of colonic preneoplastic lesions in untrained rats treated with a chemical carcinogen. **Cancer letters**, v.216, p.31-34, 2004.

DERENZINI, M.; PESSION, A.; FARABEGOLI, F.; TRERÈ, D.; BADIALI, M; DEHAN, P. Relationship between interphasic nucleolar organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell lines. **The American journal of pathology**, v. 134, p. 925-932, 1989.

DI GREGORIO, C.; LOSI, L.; FANTE, R.; MODICA, S.; GHIDONI, M.; PEDRONI, M.; TAMASSIA, M.G.; GAFÀ, L.; PONZ DE LEON, M.; RONCUCCI, L. Histology of aberrant crypt foci in the human colon. **Histopathology**, v. 30, p. 328-334, 1997.

DÍAZ-VICIEDO, R.; HORTELANO, S.; GIRÓN, N.; MASSÓ, J.M.; RODRIGUEZ, B.; VILLAR, A.; DE LAS HERAS, B. Modulation of inflammatory responses by diterpene

acids from *Helianthus annuus* L. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 369, p.761-766, 2008.

DRUCKREY, H.; PREUSSMANN, R.; MATZKIES, F.; IVANKOVIC, S. Selective production of intestinal cancer in rats by 1,2-dimethylhydrazine. **Naturwissenschaften**, v.54, p. 285-286, 1967

FARAG, M.D.E.D.H. Effect of radiation and other processing methods on protein quality of sunflower meal. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.79, p.1565-1570, 1999.

FARBER, E. Cell proliferation as a major risk factor for cancer: a concept of doubtful validity. **Cancer research**, v.55, p.3759-3762, 1995.

FEMIA, A.P.; DOLARA, P.; CADERNI, G. Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoximethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.25, p.277-281, 2004.

FENECH, M.; FERGUSON, L.R. Vitamins/minerals and genomic stability in humans. **Mutation research**, v. 18, p. 1-6, 2001.

FODDE, R. The APC gene in colorectal cancer. **European journal of cancer**, v. 38, p. 867-871, 2002.

FODDE, R.; SMITS, R.; CLEVER H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. **Nature reviews Cancer**, v.1, p. 55-67, 2001.

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 letters**, v. 213, p. 21-29, 2004.

GIADA, M.D., MANCINI FILHO, J. Antioxidant capacity of the striped sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed extracts evaluated by three in vitro methods. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 60, p.395-401, 2009.

GREGORIEFF, A.; CLEVERS H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to câncer. **Genes & development**, v.19, p.877-890, 2005.

HALL, P.A.; CROCKER J.; WATTS A.; STANSFELD A.G. A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. **Histopathology**, v. 12, p. 373-381, 1988.

HOFFMAN-GOETZ, L.; J. QUADRILATERO. Treadmill exercise in mice increases intestinal lymphocyte loss via apoptosis. **Acta physiologica Scandinavica**, v.179, p.289-297, 2003.

HOWELL, W.M.; BLACK D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experimentia**, v. 62, p.361-367, 1982.

HUANG, D.; DU, X. Crosstalk between tumor cells and microenvironment via Wnt pathway in colorectal cancer dissemination. **World journal of gastroenterology**, v. 14, p.1823-1827, 2008.

JAISWAL, A.S.; NARAYAN, S. Zinc stabilizes adenomatous polyposis coli (APC) protein levels and induces cell cycle arrest in colon cancer. **Journal of cellular biochemistry**. v.93, p. 345-357, 2004.

LALA, P. K.; ORUCEVIC, A. Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. **Cancer metastasis reviews**, v.17, p. 91-106, 1998.

LARANJEIRA, L.L.S.; TAHA, M.O.; 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 Cirúrgica Brasileira**, v.13, 1998.

LEE, B.J.; HENDRICKS, D.G. Metal catalysed oxidation of ascorbic deoxyribose and linoleic acid as affected by phytic acid in a model system. **Journal of Food Science**, v.62, p.935-938, 1997.

LEITE, R.M.V.B.C.; BRIGHENTI, A.M.; CASTRO, C. (Eds.). Girassol no Brasil. Londrina: **Embrapa Soja**. 317-373, 2005.

LEONARDI, T.; VANAMALA, J.; TADDEO, S.S.; DAVIDSON, L.A.; MURPHY, M.E.; PATIL, B.S.; WANG, N.; CARROLL, R.J.; CHAPKIN, R.S.; LUPTON, J.R.; TURNER, N.D. Apigenin and naringenin suppress colon carcinogenesis through the aberrant crypt stage in azoxymethane-treated rats. **Experimental biology and medicine**, v.235, p.710-717, 2010.

LEWI, D.M.; HOPP, H.E.; ESCANDON, A.S. Sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Methods in molecular biology**, v.343, p.291-297, 2006.

MA, Q.Y.; WILLIAMSON, K.E.; ROWLANDS, B.J. Variability of cell proliferation in the proximal and distal colon of normal rats and rats with dimethylhydrazine induced carcinogenesis. **World journal of gastroenterology**, v. 8, p.847-852, 2002.

MACÍAS, F.A.; LÓPEZ, A.; VARELA, R.M.; MOLINILLO, J.M.G.; ALVES P.L.C.A.; TORRES, A. HELIVYPOLIDE G. A novel dimeric bioactive sesquiterpene lactone. **Tetrahedron Letters**, v.45, p. 6567-6570, 2004.

MACÍAS, F.A.; MOLINILLO, J.M.G.; TORRES, A.; VARELA, R.M.; CASTELLANO, D. Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars. **Phytochemistry**, v.45, p. 683-687, 1997.

MAGA, J.A. Phytate: Its chemistry occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.30, p.1-9, 1982.

MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Stereological tools in biomedical research. **Brazilian Academy of Sciences**, v.75, p.469-486, 2003.

MARTIN, M.S.; MARTIN, F.; MICHIELS, R.; BASTIEN, H.; JUSTRABO, E.; BORDES M.; VIRY, B. An experimental model for cancer of the colon and rectum. Intestinal carcinoma induced in the rat 1,2-dimethylhydrazine. **Digestion**. v.8, p. 22-34. 1973.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M.J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición hospitalaria**, v.17, p.271-278, 2002.

MEIRA, L.B.; BUGNI, J.M.; GREEN, S.L.; LEE, C.W.; PANG, B.; BORENSHTEIN, D.; RICKMAN, B.H.; ROGERS, A.B.; MOROSKI-ERKUL, C.A.; MCFALINE, J.L.; SCHAUER, D.B.; DEDON, P.C.; FOX, J.G.; SAMSON, L.D. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. **The Journal of clinical investigation**, v.118, p. 2516-2525, 2008.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. The L-Arginine-nitric oxide pathway. **The New England Journal of Medicine**, v.27, p.2002-2012, 1993.

MURILLO, G.; CHOI, J.K.; PAN, O.; CONTANTINO, A.I.; MEHTA, R.G. Efficacy of garbanzo and soybean flour in suppression of aberrant crypt foci in the colons of CF-1 mice. **Anticancer research**, v.24, p.3049-3055, 2004.

NATHAN, N.C.; XIE, Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell**, v.78, p.915-918, 1994.

NEWELL, L.E.; HEDDLE, J.A. The potent colon carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. **Mutation research**, v.564, p.1-7, 2004.

NUCCI, M.R.; ROBINSON, C.R.; LONGO, P.; CAMPBELL, P.; HAMILTON, S.R. Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci human colorectal mucosa. **Human pathology**, v.28, p.1396-407, 1997.

OLIVEIRA, E.C.; LEITE, M.S.; MIRANDA, J.A.; ANDRADE, A.L.; GARCIA, S.B.; LUQUETTI, A.O.; MOREIRA, H. Chronic *Tripanossoma cruzi* infection associated with low

incidence of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. **Carcinogenesis**, v. 22, p.737-740, 2001.

OSHIMA, C. T.; FORONES, N. M. AgNOR in stomach neoplasm. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 38, p. 89-93, 2001.

PARK, D.H.; KIM, H.S.; KIM, T.I.; KIM, Y.H.; PARK, D.I.; KIM, H.J.; YANG, S.K.; BYEON, J.S.; LEE, M.S.; CHUNG, I.K.; JUNG, S.A.; JEEN, Y.T.; CHOI, J.H.; CHOI, H.; HAN, D.S. Clinicopathologic characteristics and malignant potential of colorectal flat neoplasia compared with that of polypoid neoplasia. **Diseases of the colon and rectum**, v. 51, p. 43-49, 2008.

PARK, J.Y.; HEO, J.C.; WOO, S.U.; LEE, S.H. Protective effects of water extract of *Helianthus annuus* seed by hydrogen-peroxide induced neuronal cell damage. **Korean Journal Food Preservation**, v.14, p. 213-219, 2007.

PARKIN, M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global Cancer Statistics 2002. **CA: a cancer journal for clinicians**, v.55, p.74-108, 2005.

PLOTON, D. Behaviour of nucleolus during mitosis. **Chromosoma**, v. 95, p. 95-107, 1987.

PRETLOW, T.P.; O'RIORDAN, M.A.; SPANCAKE, K.M.; PRETLOW, T.G. Two types of putative preneoplastic lesions identified by hexamedinidase activity in whole-mounts of colons from F344 rats treated with carcinogen. **The American journal of pathology**, v.142, p.1695-700, 1993.

RAO, C.V.; HIROSE Y.; INDRANIE C.; REDDY B.S. Modulation of experimental colon tumorigenesis by types and amounts of dietary fatty acids. **Cancer research**, v. 61, p.1927-1933, 2001.

RODRIGUES, M.A.; SILVA, L.A.; SALVADORI, D.M.; DE CAMARGO, J.L.; MONTENEGRO, M.R. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short-

and medium term bioassay for colon medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, p. 351-355, 2002.

SACHS, L.G.; PORTUGAL, A.P.; PRUDENCIO-FERREIRA, S.H.; IDA, E.I.; SACHS, P.J.D.; SACHS, J.P.D. Influence of NPK on yield and chemical components of sunflower. **Semina: Ciências Agrárias**, v.27, p. 533-546, 2006.

SANCHES, A.C.C.; LOPES, G.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; MELLO, J.C.P. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, p.101-106, 2005.

SCHULTE-HERMANN, R.; BURSCH, W.; MARIAN, B.; GRASL-KRAUPP, B. Active cell death (apoptosis) and cellular proliferation as indicators of exposure to carcinogens. **IARC scientific publications**, v.146, p.273-285, 1999.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. **Porto Alegre:UFSC** 1999.

SMITH, A.J.; STERN, H.S.; PENNER, M.; HAY, K.; MITRI, A.; BAPAT, B.V.; GALLINGER, S. Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. **Cancer research**, v. 54, p. 5527-5530, 1994.

SOARES, R.O.A.; FERNANDEZ-FERREIRA, E.; GIBALDI, D.; STUTZ, C.M.; SANTOS, R.R.; BARBI, N.S.; XAVIER, D.C.D.; TORMASSINI, T.C.B. Avaliação da capacidade antineoplásica de extratos de erva-de-passarinho *Struthanthus* sp. XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. **Águas de Lindóia**, Brasil; 1998.

SUNTER, J.P.; APPLETON, D.R.; WRIGHT, N.A.; WATSON, A.J. Pathological features of the colonic tumours induced in rats by the administration of 1,2-dimethylhydrazine. **Virchows Archiv. B: Cell pathology**, v.21, p. 211-23, 1978.

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 letters**, v.210, p.159-169, 2004.

TAKAHASHI, M.; WAKABAYASHI, K. Gene mutations and altered gene expression in azoximethane induced colon carcinogenesis in rodents. **Cancer science**, v.95, p. 475-480, 2004.

TANAKA, T.; MAKITA, H.; KAWABATA, K.; MORI, H.; KAKUMOTO, M.; SATOH, K.; HARA, A.; SUMIDA, T.; TANAKA, T.; OGAWA, H. Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. **Carcinogenesis**, v.18, p. 957-965, 1997.

TOMATIS, L. Cell proliferation and carcinogenesis: a brief history and current view based on IARC workshop report. **Environmental health perspectives**, v. 101, p.149-151, 1993.

Tudek, B.; Bird, R.P.; Bruce, W.R. Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. **Cancer research**, v. 49, p. 36-1240, 1989.

TUDEK, B.; BIRD, R.P.; BRUCE, W.R. Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. **Cancer research**, v. 49, p.1236-1240, 1989.

URDANGARÍN, C.; REGENTE, M.C.; JORRÍN, J.; DE LA CANAL, L. Sunflower Coumarin Phytoalexins Inhibit the Growth of the Virulent Pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Phytopathology**, v.147, p.441-443, 1999.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of ethnopharmacology**, v.51, p.239-254, 1996.

WEISZ, G.M.; KAMMERER, D.R.; CARLE, R. Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MS. **Food Chemistry**, v. 115, p. 758-765, 2009.

WINK, D.A.; VODOVOTZ, Y.; LAVAL, J.; LAVAL, F.; DEWHIRST, M.W.; MITCHELL, J.B. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. **Carcinogenesis**, v.19, p.711-721, 1998.

WOO, C.W.H.; CHEUNG, F.; CHAN, V.W.H.; SIOW, Y.L.; KARMIN, O. Homocysteine, stimulates inducible nitric oxide synthase expression in macrophages: antagonizing effect of ginkgolides and bilobalide. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 243, p. 37-47, 2003.

YANG, J.; ZHANG, W.; EVANS, P.M.; CHEN, X.; HE, X.; LIU, C. Adenomatous Polyposis Coli (APC) differentially regulates  $\beta$ -catenin phosphorylation and ubiquitination in colon. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, p.17751-17757, 2006.

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 science**, v.95, p.792-797, 2004.

## CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ A indução da carcinogênese colorretal a partir da 1,2-dimetilhidrazina e os tratamentos não provocaram diferenças significativas no peso corporal e comprimento intestinal dos animais após as 25 semanas de experimento.
  
- ✓ De forma geral, nos grupos controle da indução e tratado com a menor dose houve aumento significativo do número de FCA com criptas displásicas dilatadas, das AgNORs/núcleo e redução dos minerais antioxidantes como cobre, magnésio, selênio e zinco comparado ao grupo sadio.
  
- ✓ Nas dosagens de 100 mg/Kg e 200 mg/Kg utilizadas foi observada redução da desorganização morfológica colorretal, com a diminuição do número de lesões pré-neoplásicas em ratos expostos ao carcinógeno químico DMH.
  
- ✓ Os segmentos inicial e médio do cólon foram mais sensíveis ao efeito inibitório destes tratamentos sobre a displasia do epitélio intestinal, os quais aparentemente apresentam influência limitada sobre lesões tumorais previamente estabelecidas.
  
- ✓ Acredita-se que parte dos resultados encontrados pode ser decorrente dos efeitos destes tratamentos na redução da proliferação celular e recuperação dos níveis de minerais antioxidantes na mucosa intestinal.