



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS MÉDICO-  
CIRÚRGICAS**

**VANESSA NOGUEIRA LAGES BRAGA**

**A PRÓPOLIS VERMELHA E *L*-LISINA EM LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS  
COLORRETAIS INDUZIDAS PELO AZOXIMETANO**

**FORTALEZA**

**2018**

VANESSA NOGUEIRA LAGES BRAGA

**A PRÓPOLIS VERMELHA E L-LISINA EM LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS  
COLORRETAIS INDUZIDAS PELO AZOXIMETANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *strictu sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Orientador: Profa. Dra. Conceição Aparecida Dornelas.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- B796p Braga, Vanessa Nogueira Lages.  
A própolis vermelha e L-lisina em lesões pré-neoplásicas colorretais induzidas pelo azoximetano /  
Vanessa Nogueira Lages Braga. – 2018.  
138 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Profa. Dra. Conceição Aparecida Dornelas.
1. Câncer Colorretal. 2. Própolis Vermelha. 3. L-Lisina. 4. Biomarcadores Tumorais. I. Título.  
CDD 617
-

VANESSA NOGUEIRA LAGES BRAGA

**A PRÓPOLIS VERMELHA E L-LISINA EM LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS  
COLORRETAIS INDUZIDAS PELO AZOXIMETANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *strictu sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Bruno Coelho Cavalcanti  
Faculdade Mauricio de Nassau

---

Profa. Dra. Ana Carolina Lindoso Melo  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Conceição Aparecida Dornelas (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Agradeço a **Deus**, porque é a força, luz, proteção e sabedoria que dá sentido à minha vida. Peço-lhe que eu tenha sempre esse sentimento de gratidão.

Ao meu marido, **Marcus Davis**, pelo incentivo, carinho e ensinamentos na minha vida e jornada profissional, aos meus amados filhos, **Rodrigo e Eunice**, que me enchem de luz, alegria, amor e de gratidão a **DEUS** por ele ter me escolhido para ser sua mãe.

## AGRADECIMENTOS

À minha **família**, pelo apoio, compreensão e incentivo para que eu pudesse seguir com meus sonhos.

A Professora Doutora **Conceição Aparecida Dornelas**, professora Adjunta do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade em participar como mestranda no programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* de Ciências Médico-Cirúrgicas, pela orientação nesse curso, ensinamentos oportunos, possibilitando a minha titulação.

Ao Professor Doutor **Francisco Vagnaldo Fechine Jamacaru**, por sua disponibilidade em nos acolher calorosamente em seu laboratório e nos prestigiar com suas valiosas orientações como membro da banca de qualificação, como também nas avaliações estatísticas dos dados obtidos nesse estudo, sempre apoiando e tirando dúvidas durante esse percurso.

Ao Professor Doutor e PhD em Farmacologia **Bruno Coêlho Cavalcanti**, pela participação como membro da banca de qualificação e valiosa contribuição na execução dos Ensaios Biológicos apresentados no trabalho.

A professora Doutora **Márcia Valéria Pitombeira Ferreira**, pela participação como membro da banca de qualificação, por suas importantes observações e sugestões e por disponibilizar seu precioso tempo engrandecendo esse estudo.

A professora **Telma Leda Gomes de Lemos e a Doutoranda Gisele Rocha Aguiar** do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, laboratório de bioprospecção de produtos naturais da Universidade Federal do Ceará, pela orientação na extração do extrato etanólico da própolis vermelha.

As amigas mestrandas, **Camila de Carvalho Juanes e Nayanna de Oliveira Ramos Melo**, pelo apoio nessa jornada, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas, tornando menos árdua essa jornada.

As Senhoras **Maria Luciene Vieira de Oliveira e Magda Maria Gomes Fontenele**, funcionárias do Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela grande dedicação, seriedade, amizade, incentivo e ajuda constante nessa jornada.

Ao Senhor **Bento Francisco de Oliveira**, técnico do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela dedicação, apoio e seriedade no trabalho desenvolvido nos cuidados dos animais utilizados no experimento.

Aos alunos do curso de Medicina da Universidade Federal do Ceará **Hélio de Souza Peres Júnior e Jefferson Matheus da Costa Freire**, pela dedicação durante o experimento, com empenho e disciplina contribuindo para a realização desse estudo.

Aos alunos do curso de Biomedicina da Faculdade Mauricio Nassau **José Robson de Sousa, Ana Karoline Alves Costa e Jocélia Holanda Felix**, pela dedicação durante o experimento, com empenho, esforço e disciplina contribuindo para a realização desse estudo.

A **Todos** que direta e indiretamente ajudaram nas várias etapas de elaboração desse estudo, meu sincero e especial agradecimento.

A **CAPES**, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

Galileu Galilei.

## RESUMO

**A PRÓPOLIS VERMELHA E L-LISINA EM LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS COLORRETAIS INDUZIDAS PELO AZOXIMETANO** VANESSA NOGUEIRA LAGES BRAGA. Pós-Graduação *strictu sensu*, Departamento de cirurgia, Faculdade de medicina, Universidade Federal do Ceará (Grau de mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas). Abril, 2018. Orientadora: Profa. Dra. Conceição Aparecida Dornelas.

O câncer colorretal (CCR) é a terceira neoplasia maligna mais frequente no mundo. Os focos de criptas aberrantes (FCAs) displásicos são considerados marcadores para o câncer colorretal. Própolis é um produto resinoso, usada para proteger a colmeia, e possui propriedades antitumorais. A *L*-lisina é um aminoácido essencial com relato de promoção de carcinogênese química em bexiga de rato. Objetivou-se avaliar os efeitos da própolis vermelha e *L*-lisina em lesões pré-neoplásicas colônicas induzidas pelo azoximetano (AOM - 15mg/kg intraperitoneal). Foram estudadas 48 ratas wistar que foram distribuídas em: GI- água, GII- *L*-lisina, GIII- própolis vermelha, GIV- goma arábica 1%, GV- AOM+água, GVI- AOM+*L*-lisina, GVII- AOM+própolis vermelha e GVIII- AOM +goma arábica 1%, durante 16 semanas. Foram quantificados os FCAs, analisados o estresse oxidativo (Glutathione e TBARS), a genotoxicidade, ensaio cometa (sangue periférico) e micronúcleo (sangue periférico e medula óssea) e a relação reticulócitos/hemácias em sangue periférico. A própolis vermelha reduziu o número total de FCAs em cólon distal nos animais que receberam AOM e própolis ( $p < 0,01$ ), e em todo segmento colônico considerando o número de FCAs de até 4 criptas ( $p < 0,05$ ). A *L*-lisina, não demonstrou efeito protetor e nem promotor em lesões pré-neoplásicas induzidas pelo AOM. A própolis vermelha e a *L*-lisina não demonstraram efeitos de proteção para a genotoxicidade nem mutagênese nos grupos que foram submetidos ao AOM, nas doses e tempos administrados. O estresse oxidativo (TBARS) se mostrou presente em todos os animais que receberam AOM, e a própolis vermelha reduziu o estresse oxidativo ( $p < 0,01$ ). A goma arábica (controle utilizado para extração da própolis) teve ação protetora reduzindo os FCAs em colon distal ( $p < 0,05$ ) considerando o número total de FCAs e em todo o segmento colônico reduzindo o número de FCAs com até 4 criptas ( $p < 0,05$ ) nos que receberam AOM e goma. Assim, os resultados indicam que a própolis vermelha e a goma arábica tiveram ação protetora reduzindo as lesões pré-neoplásicas na carcinogênese colorretal induzida pelo AOM. A própolis vermelha também reduziu o estresse oxidativo provocado pelo carcinógeno.

**Palavras-chave:** Câncer Colorretal. Própolis Vermelha. *L-Lisina*. Biomarcadores Tumorais.

## ABSTRACT

**RED PROPOLIS AND L-LYSINE IN COLORECTAL PRE-NEOPLASTIC DAMAGE INDUCED BY AZOXIMETHANE** VANESSA NOGUEIRA LAGES BRAGA. Post-Graduation *strictu sensu*, Department of Surgery, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará (Master's degree in Medical-Surgical Sciences). April, 2018. Advisor: Profa. Dr. Conceição Aparecida Dornelas.

Colorectal cancer (CRC) is a third most common malignant neoplasm in the world. Dysplastic aberrant crypt outbreaks (ACF) are important markers for colorectal cancer. Propolis is a resinous product, used to protect a hive, and has antitumor properties. L-Lysine is an essential amino acid reported as promoter of chemical carcinogens in the rat bladder. The objective of this work was to analyze effects of red propolis and L-lysine on azoxymethane-induced colonic pre-neoplastic lesions (AOM - 15mg / kg intraperitoneal). Forty-eight wistar rats were divided into eight groups denominated according to the substance administered along 16 weeks: GI-water, GII-L-lysine, GIII-red propolis, GIV-arabic gum 1%, GV-AOM + water, GVI-AOM + L-lysine, GVII-AOM + red propolis and GVIII-AOM + 1% gum arabic. Dysplastic aberrant crypt were quantified and analyzed oxidative stress (Glutathione and TBARS), genotoxicity through comet assay in peripheral blood and micronucleus in peripheral blood and bone marrow, as well as registered the reticulocyte / erythrocyte ratio in peripheral blood. Red propolis reduced the total number of ACF in the distal colon in animals receiving AOM and propolis ( $p < 0.01$ ), and in every colonic segment considering the number of ACF up to 4 crypts ( $p < 0.05$ ). L-lysine does not demonstrate protective or promoter effect on pre-neoplastic lesions induced by AOM. Red propolis and L-lysine have not demonstrated protective effects in genotoxicity or mutagenesis in groups that are submitted also to AOM at the doses and times administered. Oxidative stress (TBARS) was shown in all animals receiving AOM, and red propolis reduced oxidative stress ( $p < 0.01$ ). Gum arabic, used to extract propolis, showed a protective action reducing the distal colon ACFs ( $p < 0.05$ ) considering the total number of ACFs, as well as throughout the colonic segment reducing the number of FCAs with up to 4 crypts ( $p < 0.05$ ), in those ones receiving AOM and gum. Therefore, the results indicated that red propolis and gum arabic had protective action reducing pre-neoplastic lesions in colorectal carcinogenesis induced by AOM. Red propolis also reduced the oxidative stress caused by the carcinogen.

**Keywords:** Colorectal Neoplasms. Red Propolis. L-Lysine. Biomarkers Tumor.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	– Alterações histopatológicas no câncer.....	21
<b>Figura 2</b>	– Três tipos de focos de criptas aberrantes (FCAS).....	25
<b>Figura 3</b>	– Desenho experimental.....	51
<b>Figura 4</b>	– Aplicação do Carcinógeno.....	53
<b>Figura 5</b>	– Própolis diluída em goma arábica a 1%.....	54
<b>Figura 6</b>	– Administração por gavagem.....	56
<b>Figura 7</b>	– Coleta de sangue da aorta abdominal .....	57
<b>Figura 8</b>	– Cólon aberto limpo (A), em papel Kraft (B), em rocambole (C).....	57,58
<b>Figura 9</b>	– Cólon corando em azul de metileno 0,1% e ao microscópio estereoscópico (A, B e C).....	59
<b>Figura 10</b>	– Focos de Criptas Aberrantes em setas (FCAS).....	59
<b>Figura 11</b>	– Coleta de medula óssea: Retirada do fêmur (A); Extração da medula óssea (B).....	60,61
<b>Figura 12</b>	– Método do Cometa: Preparação das Lâminas (A); Eletroforese(B).....	62
<b>Figura 13</b>	– Tipos de cometas: Representação dos cometas corados com brometo de etídio e visualizados no microscópio de fluorescência.....	63
<b>Figura 14</b>	– Variação da massa corporal .....	68
<b>Figura 15</b>	– Número total de FCAs em segmento colônico proximal.....	68
<b>Figura 16</b>	– Número total de FCAs em segmento colônico médio.....	69
<b>Figura 17</b>	– Número total de FCAs em segmento colônico distal.....	70
<b>Figura 18</b>	– Número total de FCAs em todo o cólon.....	70
<b>Figura 19</b>	– Número de FCAs com até 4 criptas em segmento colônico proximal..	71
<b>Figura 20</b>	– Número de FCAs com até 4 criptas em segmento colônico médio.....	72
<b>Figura 21</b>	– Número de FCAs com até 4 criptas em segmento colônico distal.....	73
<b>Figura 22</b>	– Número de FCAs com até 4 criptas em todo o cólon.....	73

<b>Figura 23</b>	– Número de FCAs com 5 ou mais criptas em segmento colônico proximal.....	74
<b>Figura 24</b>	– Número de FCAs com 5 ou mais criptas em segmento colônico médio.....	75
<b>Figura 25</b>	– Número de FCAs com 5 ou mais criptas em segmento colônico distal.....	76
<b>Figura 26</b>	– Número de FCAs com 5 ou mais criptas em todo o cólon.....	76

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	– Ações farmacológicas dos componentes da própolis vermelha brasileira (PVB).....	36
<b>Tabela 2</b>	– Número de FCAs em grupos submetidos ao AOM considerando segmentos colônicos proximal, médio e distal, assim como o cólon inteiro.....	71
<b>Tabela 3</b>	– Número de FCAs com até 4 criptas em segmentos colônicos proximal, médio e distal, assim como o cólon inteiro.....	74
<b>Tabela 4</b>	– Número de FCAs com 5 ou mais criptas em segmentos colônicos proximal, médio e distal, assim como o cólon inteiro.....	77
<b>Tabela 5</b>	– Avaliação da genotoxicidade por meio do ensaio do cometa alcalino no sangue periférico.....	77
<b>Tabela 6</b>	– Avaliação da genotoxicidade por meio do teste do micronúcleo em reticulócitos no sangue periférico.....	78
<b>Tabela 7</b>	– Avaliação da genotoxicidade por meio do teste do micronúcleo na medula óssea.....	79
<b>Tabela 8</b>	– Avaliação da glutatona em sangue periférico.....	79
<b>Tabela 9</b>	– Avaliação de TBARS em sangue periférico.....	80
<b>Tabela 10</b>	– Relação reticulócitos/hemácias no sangue periférico.....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS/SÍMBOLOS E SIGLAS

<b>a.C</b>	Antes de Cristo
<b>A549</b>	Adenocarcinoma Humano
<b>AA</b>	Aminoácido
<b>Antígeno Tn</b>	Resíduo de N-Acetilgalactosamina
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>AOM</b>	Azoximetano
<b>APC</b>	Polipose Adenomatose Cólica (“Adenomatous Polyposis Coli”)
<b>B16-BL6</b>	Melanoma
<b>BBN</b>	n-butil-n-4-hidroxibutil-nitrosamina
<b>BCAC</b>	Criptas com acúmulo de $\beta$ -catenina (“ $\beta$ -catenin-accumulated crypts”)
<b>CCR</b>	Câncer Colorretal
<b>CEPA</b>	Comitê de Ética de Pesquisa em Animais
<b>CEPA</b>	Comitê de Ética de Pesquisas em Animais
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animal
<b>c-fos</b>	Proto-Oncogene celular
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>c-myc</b>	Proto-Oncogene celular
<b>CONCEA</b>	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
<b>DCC</b>	Deleted in Colorectal Cancer
<b>DMH</b>	1,2-dimetilhidrazina
<b>DNA</b>	Ácido Desoxiribonucléico
<b>DPPH</b>	1,1-Difenil-2-picrilhidrazil
<b>EC</b>	Ensaio Cometa
<b>EEP</b>	Extrato etanólico de própolis
<b>ENC</b>	Eritrócitos normocroáticos
<b>EPC</b>	Eritrócitos policromáticos
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FCAs</b>	Foco de Cripta Aberrante
<b>FDM</b>	Foco depletado de mucina (“Mucin Depleted Foci”)
<b>FLC</b>	Fluconazol
<b>Fpg</b>	Enzima Formamidopirimidina DNA glicosilase

<b>g</b>	Gramas
<b>GA</b>	Goma arábica
<b>GPx</b>	Glutathione Peroxidase
<b>GR</b>	Glutathione Redutase
<b>GSH</b>	Glutathione
<b>HCT-116</b>	Tumor de Cólon
<b>HEK-293</b>	Cultura celular composta de células de um rim humano
<b>HeLa</b>	Adenocarcinoma cervical humano
<b>Hep-2</b>	Carcinoma epidermóide laríngeo humano
<b>hMLH1</b>	Genes reparadores de defeitos de replicação de DNA (“mismatch repair genes”)
<b>hMSH2</b>	Genes reparadores de defeitos de replicação de DNA (“mismatch repair genes”)
<b>hMSH6</b>	Genes reparadores de defeitos de replicação de DNA (“mismatch repair genes”)
<b>HNPCC</b>	Câncer colorretal hereditário não-polipoide
<b>hPMS1</b>	Genes reparadores de defeitos de replicação de DNA (“mismatch repair genes”)
<b>hPMS2</b>	Genes reparadores de defeitos de replicação de DNA (“mismatch repair genes”)
<b>HT-1080</b>	Fibrosarcoma
<b>ID</b>	Índice de dano
<b>IL-6</b>	Interleucina tipo 6
<b>IL-8</b>	Interleucina tipo 8
<b>IMS</b>	Instabilidade de microsátélites
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>iNOS</b>	Óxido Nítrico Sintetase induzido
<b>IP</b>	Intra-peritoneal
<b>k-ras</b>	Proteína reguladora de divisão celular
<b>LBPN</b>	Laboratório de Biotransformação e Produtos Naturais
<b>LLC</b>	Leucemia Linfóide Crônica
<b>LOH</b>	Perda de heterozigosidade
<b>MAC</b>	Medicina Alternativa Complementar
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>MEP</b>	Extrato Metanólico de Própolis

<b>Met-fr</b>	Fração metanólica
<b>mg</b>	Miligramas
<b>MGE</b>	Eletroforese de microgel
<b>ml</b>	Mililitro
<b>MMP</b>	Matriz de Metaloproteinases
<b>MNs</b>	Micronúcleos
<b>NaNoHA</b>	Hidroxiapatita
<b>° C</b>	Graus centígrados
<b>ORAC</b>	Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigenação
<b>OVCAR-8</b>	Tumor de Ovário
<b>p53</b>	Proteína supressora tumoral
<b>PAF</b>	Polipose Adenomatosa Familiar
<b>PANC-1</b>	Tumor de pâncreas
<b>PAS</b>	<i>Periodic acid-Schiff</i>
<b>PEC</b>	Feniletil caféico
<b>PEDMC</b>	Feniletil dimetil caféico
<b>PEMC</b>	Feniletil -3- metil- caféico
<b>PGE 2</b>	Prostaglandina E2
<b>POPs</b>	Produtos de Oxidação de Fitosterol
<b>ppm</b>	Parte por milhão
<b>PSE</b>	Ésteres de esterol vegetal
<b>PVB</b>	Própolis Vermelha Brasileira
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>RNAm</b>	Ácido Ribonucléico mensageiro
<b>SCG</b>	Células individualizadas em gel
<b>SF-295</b>	Glioblastoma
<b>SPSS</b>	Statistical Package for the Social Sciences
<b>TBARS</b>	Substância Tiobarbitúrica Reativa ao Ácido
<b>TBARS</b>	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral Alfa – citocina
<b>UFC</b>	Universidade Federal do Ceará
<b>UNICAMP</b>	Universidade de Campinas
<b><math>\omega</math>-3 FA</b>	Ácido graxo ômega 3

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1	Câncer colorretal.....	19
1.2	Focos de Criptas Aberrantes (FCAs).....	23
1.3	Carcinogênese química /Azoximetano (AOM).....	28
1.4	Própolis.....	30
1.4.1	Aspectos gerais.....	30
1.4.2	Própolis vermelha brasileira (PVB).....	33
1.5	Goma arábica (GA) ou Goma Acácia.....	37
1.6	<i>L</i> -Lisina.....	39
1.7	Ensaio biológicos.....	42
1.7.1	Testes de detecção de genotoxicidade.....	42
1.7.1.1	Ensaio cometa.....	43
1.7.1.2	Ensaio do micronúcleo em reticulócitos (Medula óssea e Sangue periférico).....	44
1.7.2	Estresse oxidativo.....	45
1.7.2.1	Glutathione (GSH) – (Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione Redutase (GR)).....	46
1.7.2.2	TBARs.....	46
1.7.3	Relação Reticulócitos/Hemácias.....	47
1.8	Justificativa e Relevância.....	48
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	49
3	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	50
3.1	Considerações éticas.....	50
3.2	Amostra.....	50
3.3	Modelo Experimental.....	50
3.4	Carcinógeno.....	53
3.5	<i>L</i> -Lisina.....	53
3.6	Própolis Vermelha.....	53
3.7	Pesagem dos animais, avaliação clínica e gavagem.....	55
3.8	Procedimento cirúrgico e Avaliação macroscópica.....	56
3.9	Estudo de Criptas Aberrantes.....	58

3.10	Ensaio biológico.....	60
3.10.1.	Testes de avaliação da genotoxicidade.....	60
3.10.1.1	Cometa Alcalino (Sangue periférico e Fígado).....	61
3.10.1.2	Micronúcleos em Reticulócitos (sangue periférico e fígado).....	63
3.10.1.3	Micronúcleos em Células da Medula Óssea.....	64
3.10.2	Estresse oxidativo.....	64
3.10.2.1	Dosagem da concentração de glutathione (GSH).....	65
3.10.2.2	Dosagem da concentração das substâncias reagentes do ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	65
3.10.2.3	Relação Reticulócitos/Hemácias.....	65
3.11	Análise estatística.....	65
4	<b>RESULTADOS</b> .....	67
4.1	Avaliação clínica.....	67
4.2	Avaliação da mortalidade dos animais.....	67
4.3	Avaliação das Doses das substâncias administradas.....	67
4.4	Avaliação da variação da massa corporal.....	67
4.5	Estudo dos Focos de Cripta Aberrante (FCAs).....	68
4.5.1	Número total de FCAs em segmento proximal.....	68
4.5.2	Número total de FCAs em segmento médio.....	69
4.5.3	Número total de FCAs em segmento distal.....	69
4.5.4	Número total de FCAs em todo o cólon.....	70
4.6	Multiplicidade dos FCAs: até 4 criptas.....	71
4.6.1	Multiplicidade dos FCAs em segmento proximal: até 4 criptas.....	71
4.6.2	Multiplicidade dos FCAs em segmento médio: até 4 criptas.....	72
4.6.3	Multiplicidade dos FCAs em segmento distal: até 4 criptas.....	72
4.6.4	Multiplicidade dos FCAs em todo o cólon: até 4 criptas.....	73
4.7	Multiplicidade dos FCAs: 5 ou mais criptas.....	74
4.7.1	Multiplicidade dos FCAs em segmento proximal: 5 ou mais criptas.....	74
4.7.2	Multiplicidade dos FCAs em segmento médio: 5 ou mais criptas.....	75
4.7.3	Multiplicidade dos FCAs em segmento distal: 5 ou mais criptas.....	75
4.7.4	Multiplicidade dos FCAs em todo o cólon: 5 ou mais criptas.....	76
4.8	Ensaio biológico.....	77
4.8.1	Avaliação da Genotoxicidade.....	77

4.8.1.1	Cometa Alcalino em sangue periférico.....	77
4.8.1.2	Micronúcleo em Reticulócitos de sangue periférico.....	78
4.8.1.3	Micronúcleo em Medula Óssea.....	78
4.8.2	Avaliação do Estresse Oxidativo.....	79
4.8.2.1	Glutationa no Sangue periférico.....	79
4.8.2.2	TBARS em sangue periférico.....	79
4.8.2.3	Relação entre Reticulócitos/Hemácias no Sangue periférico.....	80
4.9	Avaliação do peso dos órgãos.....	81
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	82
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	94
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	95
	<b>APÊNDICE A – TABELA DOS PESOS DOS ANIMAIS/GRUPO</b> .....	114
	<b>APÊNDICE B – TABELA DE PESOS DOS ÓRGÃOS DOS ANIMAIS</b> (gramas).....	115
	<b>APÊNDICE C – TABELA DE ACOMPANHAMENTO DO NÚMERO</b> <b>TOTAL DOS FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES NOS ANIMAIS</b> <b>DE CADA GRUPO</b> .....	116
	<b>APÊNDICE D – TABELA DAS DOSES DAS SUBSTÂNCIAS</b> <b>ADMINISTRADAS</b> .....	120
	<b>APÊNDICE E – AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DE PESOS DOS</b> <b>ÓRGÃOS DOS ANIMAIS</b> .....	121
	<b>APÊNDICES F – GRÁFICOS DOS PESOS DOS ÓRGÃOS</b> .....	122
	<b>APÊNDICE G – ENSAIO COMETA ALCALINO EM HEPATÓCITOS</b>	124
	<b>APÊNDICE H – ENSAIO COMETA ALCALINO EM HEPATÓCITOS</b> <b>COM ENZIMA ENDONUCLEASE FORMAMIDOPYRIMIDINA DNA</b> <b>GLICOSILASE (FPG)</b> .....	125
	<b>APÊNDICE I – TESTE DO MICRONÚCLEO EM HEPATÓCITOS</b> ...	126
	<b>ANEXO A – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE</b> <b>ÉTICA E PESQUISA ANIMAL</b> .....	127
	<b>ANEXO B – COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DA DIETA PADRÃO</b> ..	128
	<b>ANEXO C – DECLARAÇÕES DE PERIGO E PRECAUÇÃO DO</b> <b>AZOXIMETANO</b> .....	129
	<b>ANEXO D – CONTROLE DE QUALIDADE DA L-LISINA</b> .....	137



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer colorretal

O câncer é um problema de saúde pública global e a segunda causa de morte mundial, com 190 mil óbitos por ano. Sua incidência no mundo cresceu 20% na última década e espera-se para 2030 cerca de 27 milhões de novos casos, com seu impacto comprometendo 80% da população dos países em desenvolvimento, bem mais do que os 20 milhões de casos novos estimados para 2025 (INCA, 2018). O Instituto Nacional de Câncer – INCA, do Ministério da Saúde, prevê em torno de 600 mil novos casos de câncer no Brasil em 2018, e o aumento da expectativa de vida, a urbanização e a globalização são alguns dos fatores que podem explicar parte dessas ocorrências. Entre os homens, são esperados no Brasil 220.000 casos, e entre as mulheres 200.000 para 2018 (INCA, 2018).

O câncer colorretal (CCR) é a terceira neoplasia maligna mais frequente no mundo. Teve sua incidência aumentada nos últimos anos principalmente na Europa, América do Norte e Austrália (MARLEY; NAN, 2016). É a segunda maior causa de morte relacionada ao câncer nos EUA, independente do sexo, apesar dos protocolos de rastreamento generalizados (WARGOVICH, 2010; SIEGEL *et al*, 2016). Mesmo com os avanços no diagnóstico e no tratamento, a mortalidade causada por cânceres continua alta e manteve-se praticamente inalterada nas últimas quatro décadas (URBAN, *et al*, 2012). Esse tipo de câncer é um dos que mais acomete a população brasileira.

Segundo a estimativa do INCA, o número de casos novos de câncer de cólon e reto estimado para o Brasil em 2018 será de 17.380 casos em homens e de 16.370 em mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de cólon e reto em homens é o terceiro mais frequente no Brasil e o segundo mais frequente entre as mulheres (INCA, 2018).

A carcinogênese é um processo de múltiplos passos envolvendo eventos celulares, moleculares e morfológicos que são divididos em três estágios: iniciação, promoção e progressão (BIRD, 2000).

Na iniciação acontece uma exposição de células normais á agentes de natureza química, biológica (vírus, bactérias e fungos), ou física, todos com potenciais carcinogênicos, que levam a mudanças no genoma e um crescimento seletivo das células. A promoção é realizada por agentes promotores em células iniciadas, envolvendo sua expansão clonal, onde em geral estão relacionadas a alterações morfológicas e fenotípicas. Na progressão há uma

evolução, ou continuidade de anormalidades cromossômiais que podem levar a malignidade e/ou metástase (BIRD, 1995; WASHINGTON, *et al.*, 2013).

O cólon e o reto, constituindo a porção terminal do tubo digestivo têm como principal função absorver água dos restos dos alimentos digeridos. A mucosa é caracterizada pela ausência de vilosidades e pela presença de criptas profundas (CIDRE, 2012).

O câncer colorretal (CCR) abrange tumores na região do intestino grosso (o cólon) e reto (INCA, 2018). Indivíduos com parentes de primeiro grau com história de câncer colorretal têm risco de ter esse tipo de câncer fortemente associado ao número e à idade em que os parentes foram acometidos. Cerca de 1,5 a 3% dos pacientes submetidos à ressecção de um único CCR têm chance de recidivar o tumor, nos primeiros cinco anos pós-operatório. Ter um único parente de primeiro grau afetado aumenta o risco em 1,7 vezes, em relação ao da população geral (ZANDONÁ, 2011; MARLEY ; NAN, 2016). Antes dos 40 anos de idade é raro o diagnóstico da doença, mas a idade mais avançada é um fator importante para o aparecimento de CCR esporádico. Porém, a incidência começa a aumentar significativamente após 50 anos, e a cada década seguinte, as taxas de incidência se tornam cada vez mais expressivas. Os adenomas são encontrados em aproximadamente 25% das colonoscopias realizadas em pessoas com 50 anos, e em 50% das pessoas com 70 anos (EDDY, 1990).

A etiologia do CCR é reconhecidamente multifatorial, o consumo excessivo de bebidas alcoólicas, ingestão de gordura animal, dieta pobre em fibras alimentares, consumo de produtos industrializados ou em conservas, tabagismo, falta de exercícios e doenças crônicas intestinais são apontadas como os principais fatores de risco para esse tipo de câncer (MARLEY; NAN, 2016). É mais frequente a ocorrência deste câncer em pessoas com mais de 60 anos de idade associadas aos fatores de risco citados acima. O aumento da ingestão de gordura promove elevação na produção de ácidos biliares que são mutagênicos e citotóxicos. Igualmente acontece com peixes desidratados ou conservados com sal que aumentam o risco de câncer de 1,3 a 2,8% (MARLEY; NAN, 2016).

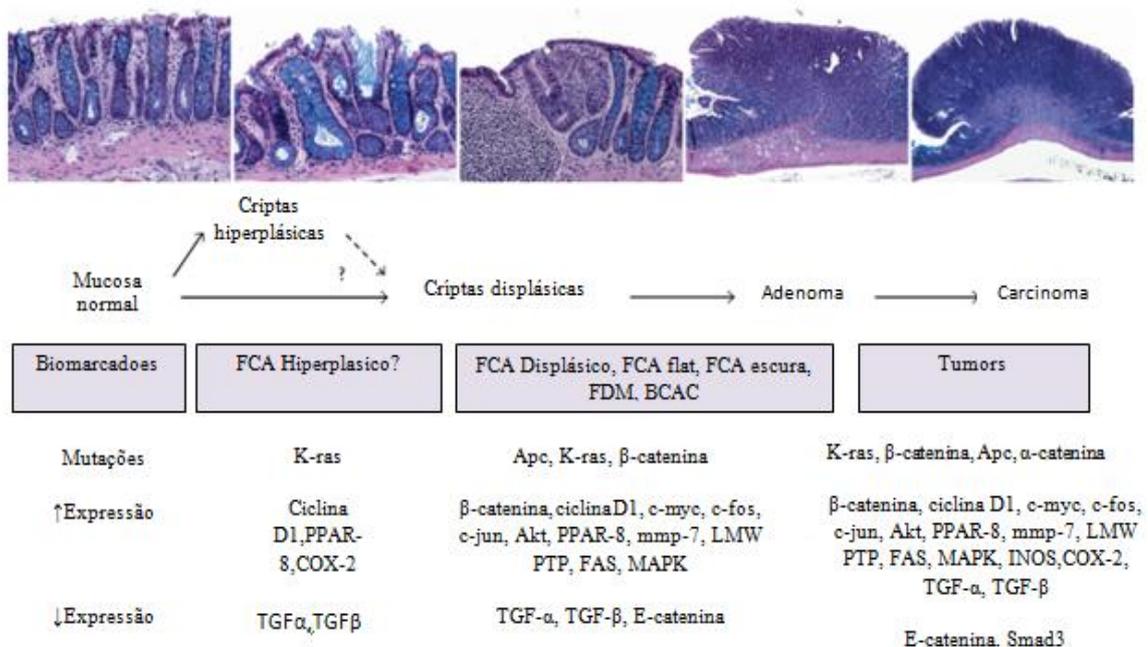
Geralmente o CCR é detectado tardiamente e há dificuldade em detectar esse tipo de câncer em seu estágio inicial devido às suas insidiosas manifestações clínicas. Isso tem estimulado campanhas de prevenção do câncer colorretal e identificação de substâncias e/ou alimentos contendo moléculas com propriedades quimiopreventivas que podem inibir o câncer. Os sintomas e sinais iniciais vão depender do tipo de tumor e sua localização, tumores que ficam no cólon direito levam ao surgimento de diarreia e dor vaga no abdome (síndrome dispéptica). Em estágios mais avançados pode surgir anemia e outros sintomas, com tumor palpável no quadrante inferior direito. No entanto, os tumores do cólon esquerdo, aparecem

obstipação intestinal progressiva, fezes em fitas, escuras ou algumas vezes com sangue. Pode ocorrer algumas vezes alternância entre diarreia e constipação. Já nos tumores do reto o sangramento é frequente, misturado ou não com fezes, muco ou pus, bem como também a sensação de evacuação incompleta (BALLESTER *et al.*, 2016).

O diagnóstico das neoplasias colorretais é feita através do exame digital do reto, do teste das fezes para perda de sangue oculto, o enema de bário, a sigmoidoscopia, colonoscopia que devem ser acompanhadas por biópsia confirmatória (MOREIRA, 2012).

Calcula-se que 75-80% dos casos de câncer colorretal sejam classificados como esporádicos (não hereditários) (DA SILVA *et al.*, 2016). Existem duas vias moleculares da carcinogênese colorretal, a sequência adenoma-carcinoma e a via do reparo do emparelhamento errôneo (ou instabilidade microsatélite). Cada uma dessas vias mostra que há um acúmulo gradual e sequencial de quatro a cinco mutações genéticas diferentes (gene APC, ativação da proteína K-ras e mutação das proteínas p53 e DCC (Deleted in colorectal cancer) e genes de reparo do emparelhamento errôneo de DNA), onde causam mudanças histológicas e moleculares que levam á transformação do epitélio normal colônico para o fenótipo maligno e invasivo. (FEARON e VOGELSTEIN, 1990, RADTKE; CLEVERS, 2005) (Figura 1).

**Figura 1** - Alterações histopatológicas na carcinogênese



Fonte: Adaptado de Perse e Cerar, 2011

A maioria dos CCRs desenvolve-se através da via tradicional, também conhecida por via da instabilidade cromossômica, ou ainda, via “supressora”, ou sequência adenoma-carcinoma. A lesão desta via mais precocemente identificada é a cripta aberrante que pode se apresentar em grupo, caracterizando os focos de criptas aberrantes (FCAs). Esses focos são criptas de Lieberkühn mais largas, com aberturas luminiais alteradas, espessamento epitelial e hiperocrômicas semelhantes aos adenomas diminutos que apresentam aumento da atividade proliferativa celular, displasia, produção do antígeno carcinoembrionário detectado por imuno-histoquímica e mutação do gene K-ras. São lesões microscópicas da mucosa, que algumas vezes antecedem o aparecimento de pólipos, podendo evoluir como focos de múltiplas criptas aberrantes (BIRD, 2000).

O fator hereditário é uma causa importante no desenvolvimento da doença, e das formas hereditárias, o mais comum é o câncer colorretal hereditário não-polipóide (HNPCC), responsável por 20-30% destes, o que equivale 3% a 5% de todas as neoplasias colorretais. Nesse tipo de câncer o defeito genético é resultado de mutação nos genes reparadores do DNA (hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 e hMSH6), localizados nos cromossomos 2, 3 e 7 (COTTI *et al.*, 2000).

O câncer colorretal não-polipóide se desenvolve muito rápido, e muitas vezes é precedido por pouco ou nenhum pólipo, e ocorre em idade mais jovem, em localização mais proximal do cólon, ou em localizações múltiplas (tumores sincrônicos) por ocasião do diagnóstico ou durante o seguimento (tumores metacrônicos) (MENDONÇA *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2016).

Pesquisas revelaram que, histologicamente, tumores no cólon distal são na sua maioria adenomas e adenocarcinomas bem ou moderadamente diferenciados. No cólon proximal, os tumores são principalmente mal diferenciados, mucinosos, ou adenocarcinomas com célula de anel de sinete (PARK, GOODLAD; WRIGHT, 1997).

As terapêuticas tradicionais usadas no tratamento do câncer empregam a cirurgia, quimioterapia e radioterapia. A escolha do tratamento ideal para um tipo de câncer em geral está baseada em ensaios clínicos com um grande número de pacientes, os quais indicam o melhor esquema terapêutico a ser utilizado. No entanto, ao longo dos ensaios clínicos pode-se encontrar uma grande variação de resposta entre os pacientes, indicando que uma melhor estratificação em subgrupos poderia apontar diferentes níveis de resposta a um esquema terapêutico empregado (EFFERTH, 2012).

## 1.2 Focos de Criptas Aberrantes (FCAs)

A utilização de lesões preneoplásicas como biomarcadores de câncer colorretal não era possível até 1987, quando Bird desenvolveu um modelo de abordagem metodológica rápida e relativamente barata para detectar FCAs (focos de criptas aberrantes) (BIRD,1987; BIRD,1995). Ele utilizou roedores (ratos, hamsters e camundongos) tratados com carcinógenos químicos e corados em azul de metileno (BIRD, 2000).

A partir de então, pesquisadores identificaram, biomarcadores adicionais da carcinogênese de cólon, como FCAs Dark (LU *et al*, 2008), FCAs Flat (PAULSEN *et al*, 2005), FCAs displásico (OCHIAI *et al*, 2005), FDM (foco depletado de mucina) (CADERNI *et al*, 2003) e criptas acumuladas com  $\beta$ -catenina (BCAC) (YAMADA *et al*, 2000).

Estudos que objetivam identificar os biomarcadores envolvidos na progressão do câncer e os processos por eles regulados ajudam no melhor direcionamento do tratamento, na medida em que são usados como base para a elaboração de ferramentas para o bloqueio molecular desses processos (SOUZA *et al.*, 2014).

Os mecanismos pelos quais os carcinógenos induzem criptas displásicas do cólon e a importância dessas criptas na gênese das neoplasias colônicas está bem reconhecida e documentada. Estudos para identificar e caracterizar essas criptas aberrantes e avaliar sua significância na gênese do câncer, já foram realizados e comprovados (BIRD, 1987).

O uso do carcinogênico azoximetano (AOM) em camundongos induziu o crescimento de criptas colônicas maiores, mais grossas e mais escuras do que as criptas normais quando visualizadas com azul de metileno (a microscopia estereoscópica), e foram relatados pela primeira vez no epitélio do cólon de roedores, onde foram denominados de focos de criptas aberrantes (FCAs) (BIRD, 1987). Além disso, as criptas aberrantes encontradas em modelos de roedores têm aberturas luminiais distorcidas, semelhantes a fendas e epitélios visivelmente espessados (BIRD, 1989).

Outro fator observado é que a formação de criptas aberrantes em modelos de roedores é dose responsiva ao AOM, ou seja, o tamanho e o número de criptas por foco, bem como o tamanho do foco aumenta com doses crescentes do carcinógeno (MCLELLAN, 1988). Essas lesões são facilmente visíveis normalmente com o auxílio de um microscópio de dissecação com uma ampliação de 40 x (BIRD, 1987).

Foram observadas pela primeira vez em humanos criptas aberrantes na mucosa colônica de pacientes com câncer colorretal em 1991. Esses achados revelaram que aglomerados de criptas encontrados na mucosa humana aparecem a microscopia

estereoscópica como criptas elevadas da superfície da mucosa normal do cólon periférica ao tumor (PRETLOW, 1991).

Os FCAs são considerados precursores para o câncer colorretal. Assim intervenções e terapêuticas são direcionadas para alterar a fase dessas lesões ou interromper a progressão dessas á neoplasia, na tentativa de reverter ou prevenir a formação de FCAs. A formação desses focos acompanha mudanças na morfologia das criptas colônicas em ambas as doenças do intestino, benignas e adenocarcinomas. Considera-se a formação de FCAs a alteração observada mais precocemente. Como já citado, são visíveis a microscopia estereoscópica e microscopia ótica e são utilizadas como um biomarcador para o câncer colorretal (WARGOVICH; BROWN; MORRIS, 2010).

O número total de FCAs pode ser considerado um biomarcador válido somente numa fase muito precoce da carcinogênese, enquanto que, nas semanas subsequentes, os FCAs com as multiplicidades de criptas por foco (mais de cinco criptas) são considerados um biomarcador mais específico do que o número total de FCAs. Assim, numa etapa mais avançada da carcinogênese colorretal, o foco de cripta aberrante pode não ser por si só, um biomarcador intermediário confiável da carcinogênese do cólon, mas sim, a multiplicidade de criptas em cada foco de criptas aberrantes (BIRD; GOOD, 2000; RAJU, 2008).

Na literatura há uma abundância considerável de descrições histopatológicas dos principais tipos de FCAs, que são grupos de lesões heterogêneas, e sua classificação em humanos encontrou-se uma considerável controvérsia. Microscopicamente, foi realizada uma diferenciação entre foco de cripta aberrante displásico e não displásico (constantemente incluindo foco de cripta aberrante hiperplásico serrilhado) (GUPTA; SCHOEN, 2009; STEVENS *et al*, 2008).

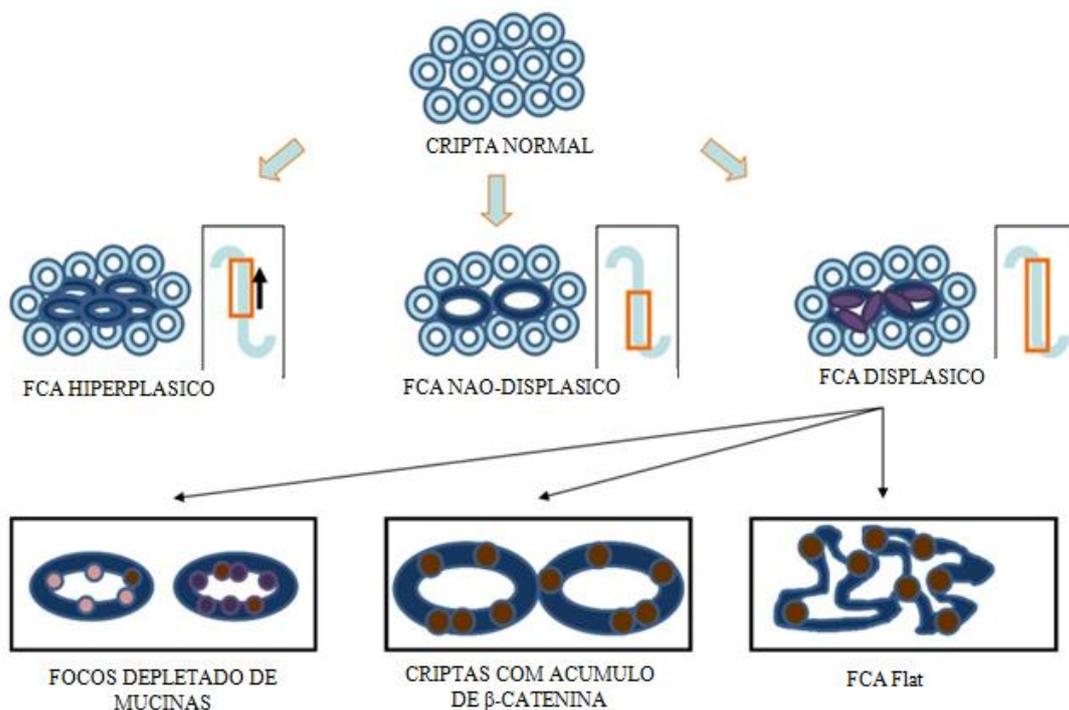
Pesquisas publicadas reforçam a hipótese de que os FCAs displásicos são precursores do câncer colorretal, pelo menos com base na histopatologia, e são considerados como biomarcadores, havendo algumas indicações de que FCAs tem fatores comuns com adenomas. Estão esgotadas em mucina, têm origem monoclonal, demonstram displasia superficial a profunda, são hiperproliferativos, e evidenciam coloração nuclear para  $\beta$ -catenina (BIRD, 1995; GUPTA, PRETLOW, SCHOEN, 2007, MORI, *et al*, 2004; CHENG, MAO-DE, 2003; ALRAWI, *et al*, 2006). Principalmente, para aqueles focos de criptas aberrantes vistos em carcinogênicos ou modelos animais transgênicos para câncer colorretal (WARGOVICH; BROWN; MORRIS, 2010).

Para melhor se entender a patogênese do câncer do cólon e para avaliar a progressão dos FCAs em estudos de carcinogênese experimental, deve-se usar a multiplicidade de criptas

como um parâmetro importante (CHENG; LAI, 2003).

Na figura 2, ilustra-se três tipos de focos de criptas aberrantes e caminhos previsíveis da carcinogênese cólica. A inserção mostra o padrão especulado da zona de proliferação na cripta de subtipos de FCAs. Esse esquema supõe uma transição de criptas de normal para FCAs displásicas mostrando morfometria nuclear (azul escuro é FCAs, roxo é o núcleo estratificado). Três tipos de FCAs displásicas são citados na literatura: os focos de depleção de mucina (FDM, células em cálice em rosa são perdidos e substituídos por núcleos estratificados em roxo, marrom representam  $\beta$ -catenina que pode se acumular em FDM), criptas com acúmulo de  $\beta$ -catenina (BCAC, marrom apresentando  $\beta$ -catenina nuclear dentro das criptas) e flat-displásica FCAs (flat FCAs, marrom é  $\beta$ -catenina e dentro altamente displásica e pleiomórficas) (WARGOVICH; BROWN; MORRIS, 2010).

**Figura 2-** Três tipos de focos de criptas aberrantes (FCAs)



Fonte: Adaptado de WARGOVICH; BROWN; MORRIS, 2010.

É possível caracterizar os perfis genéticos do FCAs para avaliar seus riscos de progressão para câncer, isso devido ao advento de novos ensaios de biologia molecular (ALRAWI *et al*, 2006). Esses ensaios consistem em silenciamento epigenético, mutação genética, instabilidade de microssatélites e perda de heterozigosidade (HEINEN *et al*, 1996;

WANG *et al*, 2001).

Na formação de FCAs ocorre um processo de várias etapas e existem várias mutações consideráveis que ocorrem em diferentes tempos dentro do desenvolvimento da cripta. A análise do estado mutacional genética dentro de FCAs pode ajudar a definir o poder carcinogênico das criptas, embora algumas características sejam mais adequadas para serem estudadas em estágios posteriores do desenvolvimento do pólipó (ORLANDO, *et al*, 2008). Pesquisa realizada mostrou a ocorrência de p53 mutante em 42% de FCAs, mas estudos posteriores mostraram que a perda de p53 não ocorre muito nos FCAs, mas sim, mais frequentemente, em estágios posteriores do desenvolvimento do pólipó (ORLANDO, *et al*, 2008).

As mutações do gene k-ras no modelo de carcinogênese química em ratos são tão frequentes como na carcinogênese colorretal em humanos. Da mesma maneira que ocorre em seres humanos, observou-se uma mutação de k-ras mais frequentemente em FCAs com epitélio hiperplásico do que em FCAs com características displásicas (MCLELLAN, MEDLINE; BIRD, 1991; TAKAHASHI *et al*, 2000; STOPERA, MURPHY e BIRD, 1992; PERSE, MLINARIC e CERAR, 2010).

A presença de instabilidade de microsátélites (IMS) também é outro aspecto a caracterizar FCAs e acontece durante o estágio inicial de FCAs com um alto grau de frequência (HEINEN *et al*, 1996; PEDRONI, *et al*, 2001; GREENSPAN, *et al*, 2007). Apesar de a IMS ser um fator no câncer colorretal não-polipose hereditário (HNPCC) (PEDRONI, *et al*, 2001), e em menor frequência na carcinogênese colorretal esporádica, ainda pode representar um alvo diagnóstico na formação de FCAs. A perda de heterozigosidade (LOH) tem sido normalmente associada a etapas posteriores da carcinogênese e na formação de FCAs não é notada com frequência, mas trabalhos recentes têm mostrado que a LOH em algumas áreas pode ocorrer possivelmente antes das mutações da APC (LUO, *et al*, 2006). Existem inúmeros outros componentes genéticos de FCAs, e a análise histopatológica juntamente com as assinaturas moleculares reforçam a evidência de que FCAs podem ser úteis como biomarcadores de câncer colorretal (CHO, *et al*, 2008; WARGOVICH; BROWN; MORRIS, 2010).

Em numerosos estudos têm sido usado os FCAs como marcadores de CCR e estes variaram desde ensaios clínicos testando terapêutica experimental em pacientes com HNPCC até a documentação de FCAs em pacientes com carcinomas de cólon esporádicos (CHAN, *et al*, 2002; PEDRONI, *et al*, 2001; CHO, *et al*, 2008). O lúmen intestinal é um ambiente em constante mudança e de grande volume de renovação celular onde se faz rastreamento de

desenvolvimento de FCAs. Por outro lado, nem todos os FCAs culminarão em tumores e para alguns indivíduos as características moleculares de FCAs variam de um padrão correlativo elevado de possível progressão a câncer para características mais remanescentes de tecido mucoso saudável e normal (LANCÉ; HAMILTON, 2008; HEINEN *et al.*, 1996).

Os FCAs displásicos podem, de fato, ter uma maior correlação de progressão para carcinomas. O uso de identificação microscópica de maior potência e diagnóstico molecular dos tecidos aliviarão algumas limitações no uso de FCAs como biomarcadores de CCR (WARGOVICH; BROWN; MORRIS, 2010).

No entanto, um subconjunto de FCAs que apresentam displasia, caracterizada ainda pela alteração de vias genéticas que controlam a proliferação celular, são potencialmente úteis como marcadores para avaliar indivíduos de alto risco, risco futuro em indivíduos assintomáticos e alvos atuais para compostos quimioterápicos e quimiopreventivos. Essas conclusões são baseadas na evidência de que FCAs demonstram semelhanças histológicas com adenomas e adenocarcinomas de cólon e compartilham defeitos moleculares com pelo menos alguns tumores colorretais (WARGOVICH; BROWN; MORRIS, 2010).

Existem, portanto, três tipos de FCAs displásicos. Focos de depleção de mucina-FDM; FCAs de criptas com acúmulo de  $\beta$ -catenina-BCAC; e FCAs flat-displásica-flat FCAs (WARGOVICH; BROWN; MORRIS, 2010). Dentre eles, os focos de depleção de mucina (FDM), ou seja, com redução acentuada do teor de mucina são importantes marcadores para lesões preneoplásicas do câncer colorretal.

Agentes quimiopreventivos seriam aqueles com a capacidade de modularem a mutagenicidade e/ou a carcinogênese. Quando estes agem interferindo sobre a mutagênese, são considerados antimutagênicos e quando interferem nos processos da carcinogênese, são chamados de anticarcinogênicos (DASHWOOD, 2002). Nos estudos da área de mutagênese o poder quimiopreventivo de uma substância é testado contrastando o suposto antimutagênico com uma substância sabidamente mutagênica, e depois se observando se houve uma redução das lesões produzidas no DNA (LUIZ, 2002).

Alterações gênicas envolvidas na formação destas criptas aberrantes decorrem, algumas vezes, da atividade genotóxica de carcinógenos químicos. Nesse sentido, a avaliação dessa atividade completaria o estudo dos fatores envolvidos com o aspecto morfológico daquelas lesões pré-neoplásicas. Entretanto, a melhor maneira de avaliá-las seria, não só em células intestinais, mas também em células de alto turnover, como as células do sangue e medula óssea, as quais estão disponíveis também em maior quantidade (SAMPAIO *et al.*, 2012).

### 1.3 Carcinogênese química /Azoximetano (AOM)

O protagonismo no desenvolvimento de modelos experimentais para avaliação de criptas aberrantes como dissemos anteriormente, coube a Bird, 1987 e 1995. Nesse modelo observa-se semelhanças nos aspectos genéticos, morfológicos e histopatológicos aos seres humanos, proporcionando mais conhecimento sobre a progressão biológica dessa doença, ajudando a elucidar caminhos moleculares, identificando novos biomarcadores, assim como a identificação de metas terapêuticas e novas estratégias de prevenção (WASHINGTON *et al.*, 2013).

Os dois agentes mais empregados na carcinogênese química são 1,2-dimetilhidrazina - DMH e/ou seu metabólito, o azoximetano - AOM. O azoximetano administrado na dose de 15mg/kg de peso em duas doses via intraperitoneal em ratos, induzem a formação de biomarcadores intermediários de carcinogênese colorretal denominados focos de criptas aberrantes (FCAs), em estudos de curta duração 8-12 semanas após a aplicação, ou tumores do cólon por 40 semanas, mais tarde, portanto, em estudo de longo prazo (BIRD, 1998; FEMIA; CADERNI, 2008).

Alguns estudos mostram que o modelo de DMH / AOM em ratos possui muitas características encontradas no CCR esporádico humano. Esse processo ocorre através de múltiplos passos caracterizados pela sequência de lesões histopatológicas parecidas às observadas na carcinogênese espontânea em humanos, incluindo semelhanças na resposta a alguns agentes promocionais e preventivos observados na clínica (CARDENI, *et al.*, 2003; PERSE e CERAR, 2011). Desta forma torna-se uma ferramenta importante para o estudo de diferentes CCRs que não pode ser, obviamente, estudado em seres humanos (PERSE e CERAR, 2011).

O CCR induzido pelo AOM envolve múltiplas alterações gênicas, assim como em CCR em humanos. Uma das vias que envolvem tumores de cólon encontrado em modelo de carcinogênese em roedores apresenta mutações no gene supressor de tumor APC/ $\beta$ -catenina, ativação da proteína K-ras, mutações das proteínas p53 e podem também ocorrer através da instabilidade de microsatélite (MSI), ou instabilidade cromossômica. O azoximetano aumenta a expressão do gene c-fos e a diminuição do gene c-myc, como também a mutação do gene k-ras (BIRD, 1995).

Além de mutações gênicas, defeitos moleculares e celulares são encontrados em modelos de carcinogênese de CCR em ratos, assim como em humanos. Essas alterações envolvem vários caminhos que são via de Wnt/ $\beta$ -catenina, via K-ras, via da sinalização do

fator de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e do processo inflamatório relacionado.

O TGF- $\beta$ , em células normais exerce efeito supressor de tumor, pois essa enzima funciona parando o ciclo celular no estágio G1, estancando a proliferação celular, induzindo a diferenciação e promovendo a apoptose. No entanto, em adenocarcinomas induzido por AOM em ratos, ela fica superexpressa juntamente com a superexpressão da COX-2, enzima responsável pela formação de prostaglandinas, sugerindo que a última seja consequência do aumento da atividade do TGF- $\beta$ . Da mesma forma a superexpressão de iNOS, enzima responsável pela formação de óxido nítrico, também está presente no carcinoma induzido pelo AOM. Ambas as enzimas estão diretamente envolvidas no processo inflamatório e modelos inibidores destas ressaltam seu envolvimento no estabelecimento do carcinoma colorretal. (TAKAHASHI e WAKABAYASHI, 2004; FEMIA *et al*, 2008). Aumento da expressão de iNOS e COX-2 em células epiteliais frequentemente foram observados em FCAs displásicas, em adenomas e carcinogênese colorretal induzida por DMH / AOM (TAKAHASHI *et al*, 2000).

O AOM é um metabólito ativo do DMH e foi usado em vários modelos experimentais de câncer colorretal em ratos e camundongos. É metabolizado no fígado onde é ativado por oxidação gerando então, compostos reativos fundamentais para a carcinogênese química, que são metilazoximetanol e íon metildiazóxido, que depois chegam até o cólon através da corrente sanguínea ou pela via biliar na forma de glucoronídeo conjugado. Depois de ativado o DNA é metilado principalmente nas posições  $N^7$ - e  $O^6$ - da guanina (CARDENI, *et al*, 2003; LAHOUAR, *et al*, 2014). Induz então, a metilação DNA  $O^6$ - metilguanina, que, se não for reparada, pode disparar timidina durante a replicação do DNA, resultando em uma transição G: C para A: T (PERSE e CERAR, 2011), gerando instabilidade no DNA.

O metabólito cancerígeno final de DMH e AOM é responsável pela metilação das bases de DNA de células de vários órgãos, incluindo as células epiteliais no compartimento proliferativo das criptas, o que resulta em grande perda de células colônicas por apoptose, aumento da sua proliferação e um aumento aparente nas mutações das células epiteliais colorretais (CHANG, 1984). Além do intestino grosso e delgado, os órgãos mais afetados por esse carcinógeno durante a indução de câncer de cólon são o fígado e os pulmões (CHAN, COOK, STANNERS, 2006).

O uso do modelo DMH / AOM permite monitorar o desenvolvimento de CCR em condições experimentais definidas, mesmo não sendo iguais à complexidade da doença humana e não possam substituir os estudos com o material do paciente, servem como uma estratégia para estudar os eventos moleculares do CCR e para desenvolver e avaliar novos

agentes quimiopreventivos para o câncer. Já produziram informações muito importantes a respeito da histologia e bioquímica do desenvolvimento tumoral, bem como sobre fatores que retardam ou aceleram a tumorigênese (PERSE e CERAR, 2011).

Para se fazer tratamento quimiopreventivo pode-se usar a substância antes da exposição ao carcinógeno, durante a fase de iniciação, durante a fase de promoção ou progressão, ou através de ambas as fases. Esses protocolos, que foram detalhados por Bird, 1998 e Femia e Caderni, 2008, são usados para avaliar os efeitos promocionais ou de proteção de substâncias usadas e quando acompanhados de perto, fornecem dados bastante reprodutíveis (PERSE e CERAR, 2011).

## **1.4 Própolis**

### **1.4.1 Aspectos gerais**

Própolis é um produto resinoso, balsâmico coletado por abelhas africanizadas *Apis mellifera* L., adquiridos a partir da casca das árvores e brotos de folhas, onde esse material é misturado pelas abelhas às suas enzimas salivares, a cera e pólen (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1995; BANKOVA *et al.*, 2000). Ela é usada para vedar a colmeia, protegê-la contra micro-organismo, isolamento térmico e com ela as abelhas revestem toda a parede interna da colmeia (MARCUCI, 1995; MARCUCCI, 2001; PEREIRA. *et al.*, 2015). A palavra própolis é de origem grega e significa: pro – a favor de e polis – cidade, em defesa da cidade ou da colmeia (NOGUEIRA-NETO, 1997; CASTALDO e CAPASSO, 2002; CUNHA *et al.*, 2004).

Utilizada pelo homem desde o Egito antigo e à Mesopotâmia, cerca de 1700 a.C., a própolis era chamada de “cera negra”. Os primeiros registros relatam que era utilizada pelo homem como um dos materiais para embalsamar os mortos (CASTALDO e CAPASSO, 2002; PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002; MATSUNO, 1997). Hipócrates usava a própolis como cicatrizante, e Plínio, em Roma, a utilizavam para reduzir inchaços e aliviar dores (IOIRISH, 1982). Hoje em dia, a indústria farmacêutica mundialmente comercializa a própolis como medicamento alternativo (LOTTI *et al.*, 2010).

A própolis é basicamente composta de 50-60% de resinas e bálsamos aromáticos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais e até 5% de outras substâncias. Encontra-se ainda em sua composição, micro-elementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre,

manganês, magnésio, silício, titânio, bromo, zinco e vitaminas B1, B2, B6, C e E (GHISALBERTI, 1979). Quando a temperatura é fria, em torno de 15°C a própolis torna-se dura e quebradiça, e quando submetida a uma temperatura quente, mais ou menos 30°C, ela torna-se suave e pegajosa (VANHAELEN; VANHAELEN-FASTRÉ, 1979; GHISALBERTI, 1979).

O voo das abelhas *Apis mellifera* alcançam um raio de cerca de 4-5 km em torno da colmeia, de onde essas coletam resina para a própolis, pólen e néctar para alimentação. Não se conhece o motivo da seletividade das abelhas coletoras por determinada vegetação, mas sabe-se que elas são bastante seletivas (PEREIRA. *et al.*, 2015).

A própolis pode ter cores variadas: negra, amarela, marrom, verde e vermelha, características essas que estão relacionadas com o tipo de vegetação circundando a colmeia (ALENCAR *et al.*, 2007). A própolis brasileira tem uma composição diversificada em virtude da rica botânica do Brasil. Doze tipos diferentes de própolis brasileira foram relatados por Park *et al.*, 2002, baseado na sua composição química, e localização geográfica.

O tipo de vegetação em torno do apiário irá definir a composição química de um determinado tipo de própolis, que por sua vez é dependente do produto químico constituinte da resina recolhida pelas abelhas. E conseqüentemente, irá determinar as propriedades medicinais e biológicas dos diversos tipos de própolis. Assim sendo, as própolis coletadas em diferentes estações do ano, em diferentes regiões geográficas, em uma determinada área ou um tempo determinado do ano, variam na sua composição química, e podem ser ligadas ao seu significado biológico ou aplicações médicas. (GHISALBERTI *et al.*, 1979; MARCUCCI, 1995; SFORCIN, 2000; CASTRO *et al.*, 2007; SIMÕES-AMBROSIO *et al.*, 2010).

Essas variações em relação à composição química que influenciam as atividades farmacológicas da própolis são, porém, um grande desafio para a descoberta de novas drogas, pois esse é um produto que tem potencial aplicação médica. Entretanto, a caracterização da sua composição precisa ser definida (PEREIRA *et al.*, 2002; LOTTI *et al.*, 2010; SFORCIN *et al.*, 2011).

Existe no Brasil um grande consumo de produtos naturais, principalmente devido à influência cultural e variedade de biomas o que contribui para a implantação dos mesmos nos sistemas de cuidado a saúde (OLIVEIRA *et al.*, 2012). A descoberta de novos compostos químicos tem sido alvo de vários estudos que focam principalmente a utilização de moléculas oriundas de produtos naturais (KUMAR *et al.*, 2007).

A própolis é utilizada atualmente de várias maneiras na medicina popular, constatou-se a existência de aproximadamente noventa produtos a base de própolis e está disponível no

mercado na forma de cápsulas, como um extrato (hidroalcoólico ou glicólico), na forma de pó como enxaguatório bucal, entre outras (CASTALDO e CAPASSO, 2002; SOARES et al., 2006, LUSTOSA *et al.*, 2008). É utilizada também em cosméticos e na indústria alimentícia, como alimentos funcionais (ALENCAR *et al.*, 2005; SFORCIN *et al.*, 2000). Como exemplo tem-se cápsulas, condicionadores, xampus, sabonetes, dentifrícios, batons, balas, chás, protetores solares, géis pós-barba, cremes, pomadas, etc. (LUSTOSA *et al.*, 2008).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA denomina os produtos que contêm própolis como opoterápicos (ANVISA, 2016). Os opoterápicos são preparações obtidas a partir de glândulas, tecidos, outros órgãos e secreções animais destinadas a fim terapêutico ou medicinal que apresentam indicações terapêuticas podem ser registrados como medicamentos específicos, segundo a RESOLUÇÃO - RDC NO -24, DE 14 de junho de 2011 (atualizada até A RDC 97 de 01 DE agosto de 2016) e a maioria dos produtos à base de própolis comercializadas no Brasil possui registro (BRASIL, 2001).

Burdock, 1998, relatou inúmeras propriedades farmacológicas da própolis. Dentre outras, atividades antibióticas, antifúngicas, antivirais e antitumorais. Essas propriedades são devido à rica variedade de constituintes da própolis.

Corroborando com as ideias de Burdock, 1998, a literatura científica vem relatando, nos últimos anos, as propriedades farmacológicas da própolis, tais como atividades antimicrobianas (MARCUCCI *et al.*, 2001); bacteriostática e bactericida, antifúngica (MURAD *et al.*, 2002, SIQUEIRA *et al.*, 2008), virustática e virucida, antioxidante (AHN *et al.*, 2004, CABRAL *et al.*, 2009; FROZZA *et al.*, 2013), antitumoral (ORSOLIC *et al.*, 2005; PADMAVATHI *et al.*, 2006, PINHEIRO *et al.*, 2014), antiinflamatória, cicatrizante, reparadora tissular, anestésica (REIS *et al.*, 2000, ALMEIDA *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2013), citotóxica (FRANCHI *et al.*, 2012), contra parasitas intestinais e sanguíneos, antimutagênica e contra doenças cardiovasculares e respiratórias (FONTANA *et al.*, 2004; GARCIA *et al.*, 2004; POTIN *et al.*, 2008).

Mas a composição do produto varia muito, sendo esse o principal fator que dificulta uma padronização química da própolis. Os diferentes tipos genéticos das abelhas que fabricam a própolis também interferem da qualidade do produto (BARBOSA, 2009).

Dentre as varias atividades farmacológicas da própolis, uma das mais estudadas é sua atividade antineoplásica. Pesquisadores tem se empenhado em isolar compostos contidos em amostras de própolis de diversas procedências com o intuito de achar novas drogas para conter o avanço dos diversos tipos de neoplasias (PEREIRA. *et al.*, 2015; SFORCIN *et al.*, 2016).

Marcucci, 1995, relatou mais de 200 compostos no extrato etanólico de própolis. O maior grupo dos componentes são os flavonoides, pois estão presentes em todo o reino vegetal e presumidamente nas plantas em que as abelhas colhem o material para a fabricação da própolis (BURDOCK,1998).

#### **1.4.2 Própolis vermelha brasileira (PVB)**

Um novo tipo de própolis brasileira chamado de própolis vermelha foi relatado por Dausch, 2007, às margens do mar e dos rios do Nordeste do Brasil. Esse tipo de própolis possui novos compostos bioativos em sua composição, de acordo com Alencar *et al.*, 2007, como também importante atividade antioxidante (OLDONI *et al.*, 2011).

A própolis vermelha brasileira (PVB) é encontrada nos Estados de Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Ceará e Bahia (BATISTA *et al.*, 2012). Para a produção desse tipo de própolis as abelhas colhem principalmente o exsudado resinoso vermelho da *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub (*Leguminosae*), conhecida popularmente como rabo de bugio, rabo de macaco, marmelo do mangue, marmeleiro da praia, moeda de videira, entre outros, que habita nas proximidades das colmeias nessa região do Brasil. Estudos mostraram que essa planta é a principal fonte desse produto natural, pois a resina da própolis e da planta em questão apresentaram altas porcentagens das mesmas isoflavonas (DAUGSCH *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008).

Foram identificadas novas substâncias na própolis vermelha com propriedades farmacológicas potencialmente antitumorais, analgésicas e antimicrobianas. Ensaio *in vitro* desenvolvidos nos laboratórios da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP em colaboração com a Faculdade de Ciências Médicas comprovaram que este último é capaz de induzir a apoptose (morte programada) em células leucêmicas humanas (FRANCHI *et al.*, 2012).

Foram achados em altas quantidades na própolis vermelha (PVB) as proantocianidinas, ou taninos condensados, substâncias que parecem ter um alto grau de correlação com a concentração de fenóis e que não são relatadas como constituintes de amostras de outras própolis (MAYWORM *et al.*, 2014).

Pesquisas sugerem que a PVB pode desempenhar uma via metabólica e proteger as células contra o estresse oxidativo, mas são necessárias mais pesquisas para confirmar seu potencial, por exemplo, como um antioxidante dietético ou ingrediente de uma formulação

farmacêutica. Embora existam vários estudos que corroboram o potencial de atividade antioxidante da própolis, em geral, não há dados robustos sobre a dose segura em seres humanos (DALEPRANE, ABDALLA; 2013).

Foram avaliados os efeitos de onze compostos fenólicos extraídos da PVB sobre a estabilidade oxidativa de uma emulsão funcional. A emulsão consistiu em óleo de echium como fonte de ômega 3 ( $\omega$ -3 FA);  $\alpha$ -linolênico; ácido estearidônico; e ésteres de estero vegetal (PSE), sem ou com compostos fenólicos. Hidroperóxido, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), malondialdeído e os produtos de oxidação de fitosterol (POPs) foram avaliados como marcadores, e a capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) foi também testada. Os autores descobriram que o ácido sinápico e a rutina (200 ppm) obtidos da própolis mostraram a mesma atividade antioxidante que a tert-butil-hidroquinona (padrão antioxidante), e devem ser investigados como potenciais antioxidantes naturais a serem aplicados em emulsão funcional contendo  $\omega$ -3 FA e PSE (ESPINOSA *et al*; 2015).

Os estudos publicados até o presente sobre PVB e seus compostos isolados, mostram resultados promissores em relação às propriedades de eliminação de radicais livres e capacidade de agir como biomarcadores antioxidantes, tais como superóxido dismutase e catalase (FREIRES *et al*; 2016).

A seletividade é um parâmetro importante quando se avalia a eficácia anticancerígena de uma dada amostra. Na maioria dos casos, as amostras de PVB foram seletivas para as células tumorais ensaiadas. Além disso, a eficácia antitumoral da PVB era comparável a fármacos anticancerígenos clinicamente utilizados, como o 5-fluorouracil e o doxorrubicina, contra as linhas celulares testadas (LI *et al*; 2008).

Os principais mecanismos antiproliferativos da PVB (e própolis em geral) e seus compostos isolados incluem o bloqueio do ciclo celular, a indução da apoptose via caspase-3, a inibição da proliferação celular através de vias metabólicas, e inibição de desenvolvimento e angiogênese. Os achados relatados até agora sugerem que a PVB e alguns de seus constituintes atuam por meio de todos esses mecanismos e, portanto, poderiam ser bons candidatos para futuros desenvolvimento de fármacos anticancerígenos (FREIRES *et al*; 2016).

O câncer com seu acelerado ritmo vêm acompanhados de morbidades e mortalidades, e o tratamento corriqueiro tem sido a remoção do tumor, seguida pela quimioterapia, radioterapia ou imunoterapia. Mas a resistência a esses tratamentos convencionais tem levado a descobertas da medicina alternativa complementar (MAC) e ela tem surgido como uma estratégia de apoio. A própolis tem demonstrado eficácia em vários estudos realizados, onde

induz resposta antitumoral isoladamente ou em conjunto com outras drogas (PATEL, 2015).

Embora reconhecendo a inevitabilidade da terapia convencional, o papel das medicinas alternativas, como a própolis não deve ser rejeitado. Os mecanismos inibitórios da própolis são variados, pois atua em diferentes alvos do metabolismo do câncer. As vias cruciais têm sido reveladas na prevenção da progressão metastática; no bloqueio de localização nuclear de NF-kB com modulação da expressão do gene; na inativação da matriz da metaloproteinases (MMP); e na indução de supressores tumorais, na qualidade de inibidor da histona-desacetilase para a terapia epigenética (PATEL, 2015).

Mas, segundo Patel 2015, o uso da própolis de forma impactante requer estudos adicionais, com ênfase aumentada na dose-resposta e relação estrutura-função, como também é necessário que tenha um controle de qualidade padronizada e design impecável, indispensável para ensaios clínicos (PATEL, 2015).

Pesquisas mostram que 48,6% dos novos fármacos anticancerígenos são produtos naturais ou compostos derivados diretamente deles (NEWMAN; CRAGG; 2012). Estas conclusões apoiam a jornada bem-sucedida de descoberta de fármacos em fontes naturais e promove uma busca ativa de novos fármacos quimioterápicos, esses candidatos capazes de superar as deficiências (por exemplo, para células hospedeiras) de monodrogas sintéticas. O número crescente de publicações das propriedades antiproliferativas da PVB e seus constituintes revela seu potencial no desenvolvimento de agentes anticancerígenos (FREIRES *et al*; 2016).

Devido a uma composição química muito variada, a PVB exibe uma ampla gama de propriedades biológicas e tem um grande impacto contra uma série de doenças humanas com agentes antimicrobianos, anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena, dentre outros. Assim, pesquisas químicas e biológicas mostraram que alguns compostos da PVB têm alto potencial para se tornarem drogas alopáticas ou mesmo fitoterápicas. Por outro lado, os estudos sugerem que o extrato de PVB pode também ser usado como um poderoso e efetivo alimento funcional. A própolis já é conhecida como tal em muitos países com legislação avançada, como o Japão. Em ambos os cenários, (farmacêutico e funcional), a PVB parece agregar não somente benefícios à saúde da comunidade, mas também valor econômico internacional. Sendo assim, são necessários estudos aprofundados dos aspectos toxicológicos, bem como na eficácia clínica e segurança em seres humanos (FREIRES *et al*; 2016).

A seguir na tabela 1, estão algumas das ações farmacológicas da própolis vermelha observadas por vários pesquisadores:

**TABELA 1-** Ações farmacológicas dos componentes da própolis vermelha brasileira (PVB)

<b>Substância</b>	<b>Ações Farmacológicas</b>	<b>Autores/Ano</b>
Extrato alcoólico de própolis vermelha	Antifúngica	SIQUEIRA <i>et al.</i> , 2008; PIPPI, 2015; BEZERRA <i>et al.</i> , 2015
Extrato etanólico da própolis vermelha	Atividade citotóxica em células leucêmicas humanas	FRANCHI <i>et al.</i> , 2012
Extratos de própolis vermelha brasileira	Citotoxicidade contra células de câncer pancreático humano PANC-1	AWALE <i>et al.</i> , 2008
Extratos de própolis vermelha brasileira	Contra células tumorais tipo HeLa	ALENCAR <i>et al.</i> , 2007
Extratos de própolis vermelha brasileira	Inibir células tumorais Hep-2, HeLa e HEK-293	FROZZA <i>et al.</i> , 2013
Extratos de própolis vermelha brasileira	Atividade antibacteriana contra micro-organismos orais e também contra micro-organismos potencialmente envolvidos em infecções sistêmicas ou focais	FREIRES <i>et al.</i> ; 2016
Extratos de própolis vermelha brasileira	Cicatrização	BATISTA <i>et al.</i> , 2012; ALMEIDA <i>et al.</i> , 2013; SOUZA <i>et al.</i> , 2013
Extratos de própolis vermelha brasileira	Anti-inflamatória e cicatrizante	ALBUQUERQUE-JÚNIOR <i>et al.</i> , 2009; ALMEIDA <i>et al.</i> , 2013
Extratos de própolis vermelha brasileira	Inibição da ciclooxigenase, inibição de prostanoídes (especialmente PGE2) e pró-inflamatórios citocinas	MIRZOEVA, CALDER, 1996; HU, <i>et al.</i> 2005
Extratos de própolis vermelha brasileira	Redução na atividade iNOS	FRANCHIN, <i>et al.</i> , 2013; KIM <i>et al.</i> , 2008
Extratos de própolis vermelha brasileira	Redução da adesão leucocitária	ROSALEN <i>et al.</i> , 2014
Extratos de própolis vermelha brasileira	Reduzida atividade enzimática durante o processo de cicatrização e inibição de TNF- $\alpha$	TAKAHASHI, <i>et al.</i> , 2015
Extrato etanólico de própolis	Ccitotóxica para as células HeLa (adenocarcinoma cervical humano). E, inibe Hep-2 (carcinoma epidermóide laríngeo humano)	FROZZA <i>et al.</i> ; 2014
Extrato etanólico de própolis	Tratamento da obesidade	LIO <i>et al.</i> , 2010
Extrato etanólico de própolis	Função hipotensiva, efeitos renoprotetores e stress oxidativo	TELES <i>et al.</i> ; 2015
Extrato etanólico da própolis vermelha	Atividade anticolinesterásica	AGUIAR <i>et al.</i> , 2018
Extratos de própolis vermelha brasileira	Anticancerígeno - SF-295 (glioblastoma), OVCAR-8 (ovário) e HCT-116 (cólon)	MENDONÇA <i>et al.</i> 2015
Ácidos fenólicos e flavonóides	Ação antimicrobiana	SILVA <i>et al.</i> 2015
Flavonóides - quercetina e crisina e um ácido fenólico -ácido ferúlico; e 3,4,2',3'-tetraidroxicalcona e C-glicosídeo flavona	Antioxidante e antimicrobiana	SILVA <i>et al.</i> 2008; RIGHI <i>et al.</i> , 2011
Flavonóides e ácidos fenólicos - rutina, liquiritigenina, daidzeína, pinobanksina, quercetina, dalbergina, pinocembrina, biochanina A, formononetina, isoliquiritigenina, medicarpina, entre outros	Atividade antioxidante e anti-inflamatória	DAUGSCH <i>et al.</i> , 2008; AWALE <i>et al.</i> , 2008; SILVA <i>et al.</i> , 2008; FROZZA <i>et al.</i> , 2013; DALEPRANE <i>et al.</i> , 2011e 2012; AGUIAR <i>et al.</i> , 2018
Formononetina	Antitumoral inibindo a proliferação de células prostáticas cancerígenas	YE <i>et al.</i> , 2012 e CHEN <i>et al.</i> , 2013

	humanas e células cancerígenas mamárias de ratos	
Formononetina	Efeito modulador na carcinogênese dérmica quimicamente induzida	PINHEIRO <i>et al.</i> 2014
7-hidroxi-6-metoxiflavanona e mucronulato	Atividade antitumoral para melanomas e fibrossarcomas	LI <i>et al.</i> , 2008
Isoflavonas - dihidroxiisoflavona, homopterocarpina, medicarpina e 4',7-dimethoxi-2'	Anticancerígena, antibacteriana e antioxidante	ALENCAR <i>et al.</i> , 2007, CABRAL <i>et al.</i> , 2009
Neovestitol-vestitol	Ação antimicrobiana e Anti-inflamatória	DAUGSCH, 2007, BUENO-SILVA <i>et al.</i> , 2013; BUENO-SILVA <i>et al.</i> , 2013; e FREIRES <i>et al.</i> ; 2016; BUENO-SILVA <i>et al.</i> , 2013; ABREU, 2008; ROSALEN <i>et al.</i> , 2014; KAIDAMA, GACCHE, 2015
Polifenóis do extrato de própolis vermelha brasileira	Redução de lesões ateroscleróticas, modulando fatores angiogênicos e inflamatórios	DALEPRANE <i>et al.</i> , 2012; LIO <i>et al.</i> , 2012
Quercetina e luteolina	Efeito antiangiogênico e anticancerígenos	RAVISHANKAR <i>et al.</i> ; 2015; DALEPRANE <i>et al.</i> , 2011e 2012
Vestitol, neovestitol e isoliquiritigenina,	Atividade antioxidante e ação antimicrobiana	OLDONI <i>et al.</i> , 2011

Fonte: Próprio autor

### 1.5 Goma Arábica (GA) ou Goma Acácia

A goma acácia /arábica (GA) é uma secreção das árvores de acácia, das quais existem mais de 900 espécies espalhadas pelas áreas tropicais e subtropicais da região Saheliana (África), e é considerada a mais antiga e a mais conhecida entre as gomas naturais. As gomas são hidrocolóides vegetais naturais que podem ser classificadas como polissacarídeos aniônicos, não iônicos ou como sais de polissacarídeos. Porém, apenas duas espécies produzem seiva para a produção da goma: Senegal e Seyal. As árvores que produzem a goma acácia são espinhosas, têm cerca de seis metros de altura e produzem, em média, 300 gramas de goma por ano (ALI, ZIADA e BLUNDEN, 2009).

É constituída, principalmente por arabina, uma mistura complexa de sais de cálcio, magnésio e potássio do ácido arábico, e composta também de duas frações: a primeira composta de polissacarídeos, os quais apresentam pouco ou nenhum material nitrogenado (70% da composição da goma), e a segunda fração composta de moléculas de elevado peso molecular e proteínas integrantes da estrutura (ALI, ZIADA e BLUNDEN, 2009).

O primeiro relato de aplicação da goma arábica é dado a mais de 5.000 anos atrás pelo povo egípcio que utilizava a goma como agente de liga para cosméticos e para pigmentos utilizados nas pinturas de inscrições hieroglíficas (DIETRICH, 2015).

Nesses seus mais de 5.000 anos de história, a goma acácia já foi chamada por diversos

nomes como: goma egípcia por ter sido chamada assim por Teofrasto (filósofo da Grécia Antiga), goma turca por ter sido comercializada em portos controlados pelo Império Turco na Idade Média, goma indiana por ter sido comercializada na região de Bombay (nas Índias) e goma arábica, nome pelo qual ainda é chamada, por ter sido introduzida no continente europeu através de portos árabes (DIETRICH, 2015).

A goma arábica, ou goma acácia são frequentemente produzidas pelas plantas superiores como proteção depois de uma agressão, algumas plantas que crescem em ambientes semiáridos produzem exsudatos gomosos em grandes quantidades quando seu córtex é agredido e isso serve para vedar o corte e evitar a desidratação (ALI, ZIADA e BLUNDEN, 2009).

É amplamente utilizado em indústria farmacêutica e alimentícia como emulsionante e estabilizador (ALI, ZIADA e BLUNDEN, 2009). Durante séculos, tem sido usado como uma substância de higiene bucal por muitas comunidades no Oriente Médio e África do Norte (TYLER, BRADY e ROBBERS. 1977). Suas propriedades anti-inflamatórias também foram aproveitadas na medicina popular, onde foi usada internamente para tratar a inflamação de mucosa intestinal e externamente para cobrir a pele inflamada (GAMAL *et al.* 2003).

Em experimentos realizados, o tratamento com goma arábica demonstrou melhorar alguns efeitos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais em ratos com falência renal crônica induzido por adenina (ALI *et al.* 2010; ALI *et al.* 2011) e também para modular imunidade em camundongos (XUAN *et al.* 2010). Clinicamente, a goma arábica mostrou-se ser benéfico em pacientes com falência renal crônica (BLISS *et al.* 1996), e mais tarde, isso foi confirmado em pacientes com falência renal crônica no Sudão, onde foi usado para ajudar a diminuir as concentrações plasmáticas de ureia e creatinina e reduzir a necessidade de diálise de 3 para 2 vezes por semana (SULIMAN, HAMDOK, ELFAKI. 2000).

Os resultados de um estudo mostraram os efeitos benéficos da goma arábica, com evidências diretas de ação anti-inflamatória e capacidade antioxidante. Nesse trabalho a goma arábica foi capaz de diminuir os níveis elevados de várias citocinas pró-inflamatórias em plasma e rim de ratos que sofriam de falência renal crônica induzido por adenina. Além disso, poderia melhorar a perda de defesa antioxidante e diminuição da produção de superóxido induzida por adenina e rupturas de dupla cadeia de DNA, dois parâmetros de danos mostrados pela primeira vez neste modelo de falência renal crônica (BADRELDIN *et al.* 2013).

Estudos recentes forneceram mais evidências de que a goma arábica tem potentes efeitos antioxidantes nos seres humanos, como demonstrados pela sua habilidade de aumentar a capacidade total antioxidante e diminuir o estresse oxidativo em humanos. Nesse estudo foi

descoberto um novo efeito da goma arábica que pode ser utilizado em outras condições clínicas e doenças causadas por aumento da peroxidação lipídica e lesão tecidual. Assim, a ingestão de antioxidantes dietéticos na goma arábica pode ajudar a manter um adequado estado de defesa antioxidante e conseqüentemente, contribuem para a condução de danos na doença falciforme, conforme estudo de Kaddam *et al.*, 2017.

Os pacientes com anemia falciforme sofrem de estresse oxidativo devido à inflamação crônica e auto-oxidação da hemoglobina falciforme. O estresse oxidativo crônico contribui para disfunção endotelial, inflamação e dano de órgãos múltiplos na doença falciforme. Dessa forma, medicação antioxidante pode influenciar favoravelmente a doença. Goma arábica foi usada como um agente antioxidante e citoprotetor, protegendo contra toxicidades hepáticas, renais e cardíacas experimentais em ratos. Foi levantada a hipótese de que a ingestão regular de GA aumentaria a capacidade antioxidante e reduziria o estresse oxidativo. Num estudo em que foram recrutados 47 pacientes portadores de anemia falciforme, entre 5-42 anos de idade, estes receberam 30g / dia de goma arábica por 12 semanas. Os níveis de capacidade total de antioxidante, malondialdeído e peróxido de hidrogênio foram medidos por espectrofotométricos antes e após a ingestão de goma arábica (KADDAM *et al.* 2017).

Essas descobertas ainda não são universalmente aceitas e sua confirmação, validade, confiabilidade e modo de ação aguardam novos estudos (ALI, ZIADA e BLUNDEN, 2009).

## **1.6 L-Lisina**

Assim como qualquer outro aminoácido (AA) formador de proteína, a principal função de lisina na vida animal é servir como um dos 20 tipos de bloco de construção para a síntese de proteínas corporais e peptídeos, que são compostos orgânicos indispensáveis para praticamente todas as reações bioquímicas e atividades fisiológicas, incluindo apoio estrutural, em todas as células e tecidos vivos. Sem a lisina envolvida em sínteses de proteínas e peptídeos, células vivas ou animais vivos não poderiam existir (LIAO, WANG, REGMI. 2015).

As proteínas do corpo animal realizam diversas funções fisiológicas necessárias para a vida. Em um mamífero, diferentes proteínas e peptídeos são requisitados a todo instante, a população de proteínas dentro de uma célula tem um volume de renovação constante, onde proteínas antigas ou desnecessárias são degradadas e novas proteínas são sintetizadas de novo. A dinâmica de proteína dentro de uma célula ou tecido, no entanto, é programaticamente controlada pela composição genética animal, mas pode ser também regulada por vários

fatores ambientais incluindo nutrientes, tais como AAs (LIAO, WANG, REGMI. 2015).

*L*-lisina é um aminoácido essencial na nutrição humana e como o corpo não pode produzi-lo ele deve ser obtido através da alimentação ou suplementação (ROSE, HAINES e WARNER, 1954). Esse aminoácido foi primeiro isolado da caseína, uma fosfoproteína do leite, em 1889 pelo dentista alemão Heinrich Drechsel (DORLAND, 1965). Foi introduzido pela primeira vez no mercado americano como cloridrato de lisina em 1955 (FLODIN, 1997).

A lisina exerce muitas funções fisiológicas para animais monogástricos, ela pode afetar o metabolismo animal de nutrientes, a produção hormonal e a imunidade (WU, 2010; WU, 2013). Mais notavelmente, a lisina ligada a um peptídeo é um local potencial ativo de modificação pós-tradução e regulação epigenética da expressão gênica. A compreensão dessas funções fisiológicas da lisina dentro do animal é necessária para que os cientistas e os produtores de animais possam utilizar a lisina para a promoção da saúde e na produção (WU, 2010).

Em uma pesquisa, a lisina isoladamente não afetou a expressão do gene *G6Pase*, mas os níveis de RNAm de *G6Pase* foram 90% mais baixos em células tratadas com lisina em associação com insulina em comparação com células controle não tratadas (LANSARD *et al.* 2011).

É um precursor importante para a síntese de glutamato, que é o mais significativo neurotransmissor no sistema nervoso central de mamíferos, e a deficiência de lisina pode levar a alterações mentais e problemas físicos devido à redução da síntese de glutamato (PAPES *et al.*, 2001). Nos seres humanos, além do crescimento lento, os sinais ou sintomas de deficiência de lisina incluem fadiga, náuseas, tonturas, anorexia, irritabilidade, anemia, e transtornos reprodutivos (LIAO, WANG, REGMI. 2015).

Como citado anteriormente, a *L*-lisina tem várias funções essenciais para os seres vivos e desempenha um papel importante na absorção de cálcio, construção de proteínas musculares, recuperação de cirurgias ou lesões esportivas e a na produção de hormônios do corpo, enzimas e anticorpos (SINGH *et al.*,2011). A lisina é importante na produção de carnitina, um nutriente responsável pela conversão de ácidos graxos em energia, ajudando então a reduzir o colesterol. É um dos principais blocos de construção do músculo e por isso esse aminoácido é comumente usado por atletas para construção de massa magra e para a saúde geral de músculos e ossos (SINGH *et al.*,2011).

Alguns estudos sugerem que a *L*-lisina pode ser útil em diminuir as recorrências de pacientes infectados com Herpes Vírus. Ela parece ter uma relação antagônica com o aminoácido arginina que por sua vez, é necessário para a replicação do Herpes Vírus

(PAULING, 1993).

A *L*-lisina pode desempenhar um papel na manutenção de ossos e ajudar o corpo a absorver o cálcio, reduzindo a quantidade de cálcio que se perde na urina. De acordo com o Centro Médico da Universidade de Maryland, uma investigação laboratorial sugere que a *L*-lisina, usado em combinação com *L*-Arginina, estimula a atividade de células formadoras de ossos e aumenta a produção de colágeno. Isso pode contribuir para o aumento da força dos ossos. Portanto, a lisina pode estar associada ao combate contra a osteoporose (FINI *et al.*, 2001).

Outros pesquisadores mostraram certos efeitos benéficos no uso de *L*-lisina, mas ainda são necessários mais pesquisas, como exemplo podemos falar que a suplementação com doses adequadas de lisina previne o desenvolvimento da doença de Alzheimer e demência (RUBEY, 2010).

Além do cálcio, a *L*-lisina também ajuda na absorção de ferro e zinco, e sabe-se que esses minerais são importantes à saúde da pele e cabelos. De acordo com estudos, veganos com dieta pobre em lisina podem ter cabelos fracos e queda de cabelo como resultado da diminuição de absorção de ferro. A lisina sozinha não evita a perda de cabelo, mas em um estudo mostrou-se que mulheres com deficiência de ferro, recebendo suplemento com ferro e lisina puderam reduzir a perda de cabelo associada à deficiência de ferro em 50% dos casos (RUSHTON, 2002).

Em outra pesquisa, mostrou-se que conjugados de lisina foram promissores no tratamento de câncer, fazendo com que as células cancerosas destruíssem elas mesmas quando o fármaco era combinado com o uso de fototerapia, deixando células não cancerosas ilesas (SCIENCE DAILY, 2008; ROOMI *et al.*, 2006).

Estudos limitados sugerem que dietas com altas doses de lisina ou com suplementação de lisina pode ter efeito moderado na pressão sanguínea e na incidência de acidentes vasculares cerebrais (FLODIN, 1997).

Dornelas *et al.*, 2012, investigaram os efeitos da *L*-lisina em ratas wistar submetidas à carcinogênese química de bexiga. A *L*-lisina apresentou uma ação promotora da carcinogênese quando iniciada juntamente com o BBN (n-Butil-n-4-hidroxibutil nitrosamina). Com uma incidência de 100% de carcinomas em animais tratados com *L*-lisina. Em um estudo avaliando-se células específicas, eritrócitos de medula óssea e leucócitos sanguíneos, a *L*-lisina mostrou ser eficiente na proteção e / ou reversão da genotoxicidade por BBN (DORNELAS *et al* 2014).

*L*-lisina é essencial na formação de colágeno, que sustenta a pele, músculos e

articulações. O colágeno é, naturalmente, também necessário para a reparação de todo o tecido conjuntivo (ligamentos, cartilagem, articulações, pele, ossos e dentes) e desempenha um papel no crescimento e na reparação de muitos tecidos (FLAKOLL *et al.*, 2004).

Em pesquisas com animais, altas doses de lisina causaram cálculos biliares e níveis elevados de colesterol (KRITCHEVSKY *et al.*, 1984; LESZCZYNSKI, KUMMEROW, 1982). Não se tem relato de toxicidade com o uso de lisina, mas foram relatadas algumas reações adversas com dose superior a 10-15 g / dia podendo causar lesões gastrointestinais desconforto com sintomas de náuseas, vômitos e diarreia. A maioria das pessoas precisa 1 g de lisina por dia. A exigência pode ser maior para atletas e pessoas que estejam se recuperando de lesões graves, especialmente queimaduras. Para aumentar a liberação do hormônio do crescimento, é recomendada a lisina antes do sono, ou antes, do exercício (SUMINSKI, ROBERTSON, GOSS, 1997).

No entanto, um número significativo de estudos tem de ser realizados para determinar o mecanismo e a melhor dose de *L*-Lisina para todas essas condições patológicas citadas acima. Assim, ela segue como um bom candidato para estudos futuros e pode atuar como um alvo principal para a nova terapia de doenças acima mencionadas. (SINGH *et al.*, 2011).

## **1.7 Ensaio biológicos**

### **1.7.1 Testes de detecção de genotoxicidade**

Os agentes genotóxicos quando interagem quimicamente com o material genético, podem provocar alterações oxidativas ou mesmo lesões às moléculas de DNA (MÍDIO; MARTINS, 2000). Os danos celulares podem ser caracterizados como resultado de estímulos físicos ou químicos, de forma excessiva e/ou deficiente, que podem modificar de forma temporária ou definitiva a homeostase celular. Para a quantificação dos danos causados ao DNA são realizadas técnicas citogenéticas, por meio de procedimentos simples realizados a partir do cultivo de células (*in vitro*) ou por meio de amostras de animais (*in vivo*), através do teste cometa e do teste de micronúcleos (SAMPAIO *et al.*, 2012).

Naturalmente as células podem reparar lesões no DNA através de diferentes processos. Caso a reparação não ocorra de maneira satisfatória, estas podem ser eliminadas por processos de morte celular e/ou sequestradas por células do sistema de defesa ou pelo baço. O DNA quando danificado e não reparado, ocasiona mutações, que podem originar defeitos na transcrição e replicação da molécula, provocando fenótipos diversos (KORNHAUSER; WAMER; LAMBERT, 1991).

### 1.7.1.1 Ensaio cometa

O ensaio cometa é um dos métodos usados para avaliar danos primários no DNA, e se destaca pela sua capacidade de descobrir lesões pré-mutagênicas sendo muito utilizado para detecção de genotoxicidade (SHERER e STROHSHOEN, 2013). É muito utilizado também na avaliação das interações antioxidantes. O teste do cometa, também chamado de ensaio de células individualizadas em gel (SCG) ou eletroforese de microgel (MGE), é utilizado para avaliar lesões no DNA envolvendo aplicações de corrente elétrica nas células, e quando as células tem conteúdo nuclear lesionado, a corrente elétrica provoca um transporte dos fragmentos do DNA para fora dos núcleos (SANTOS *et al.*, 2009).

A migração deste fragmento do DNA partindo de um polo negativo para um polo positivo gera uma imagem semelhante a um cometa com uma cabeça e uma cauda, sempre em direção ao lado positivo originando assim o nome do ensaio (SPEIT; SCHUTZ; HOFFMAN, 2007; SAMPAIO *et al.*, 2012; SHERER e STROHSHOEN, 2013).

A maior vantagem do ensaio cometa é sua alta sensibilidade a vários tipos de danos no DNA (BÜCKER *et al.*, 2006), além de possuir custo relativamente baixo, ser um método rápido, preciso e possuir boa reprodutibilidade (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998). Algumas outras vantagens são a detecção de danos em células individuais, o baixo número de células necessário para a realização do ensaio e o fato de poder ser realizado com qualquer tipo de célula eucariótica (LEE; STEINERT, 2003).

São recomendadas para a realização de testes de ensaio cometa, a avaliação de danos em células do fígado, rins e sangue periférico. Por ser o fígado o principal órgão metabolizador de compostos absorvidos, este tem suas células mais expostas á compostos químicos, os quais podem levar a disfunções hepáticas, como danos celulares e até falência do órgão (ROTHFUSS *et al.* 2011). Além das células renais e hepáticas, o ensaio cometa em células do sangue periférico tem se mostrado também uma ferramenta eficaz para detecção de efeito genotóxico sistêmico (XU *et al.* 2008).

As múltiplas etapas da carcinogênese química induzida pelo DMH/AOM é um dos mais amplos modelos usados para estudo do câncer intestinal (RODRIGUES *et al.*, 2002). Esse tipo de câncer é geralmente formado a partir de células que sofreram danos permanentes e irreversíveis no DNA.

### 1.7.1.2 Ensaio do micronúcleo em reticulócitos (Medula óssea e Sangue periférico)

O teste do micronúcleo tornou-se viável e confiável na década de 70, pelo estudo de eritrócitos policromáticos da medula óssea em camundongos, que passou a ser um dos mais úteis indicadores de dano citogenético na medula óssea (HEDDLE, 1973).

Segundo os primeiros estudos, os micronúcleos eram estruturas presentes no citoplasma de células em divisão, que possuíam características cromatínicas semelhantes às do núcleo principal quando avaliados ao microscópio óptico (GATTÁS; LONGATTO; MAEDA, 1992). Tudo isso porque os micronúcleos resultam de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros, que estão presentes no citoplasma das células, sendo estes produtos de lesões causadas por agentes mutagênicos que atuam fazendo com que os cromossomos se atrasem durante a anáfase do ciclo celular (FENECH, 2000) e não sejam incorporados ao núcleo da célula filha durante a mitose, frequentemente, porque estes fragmentos não possuem um centrômero (HEDDLE, 1973).

O teste do Micronúcleo (MN) é feito em mamíferos, “*in vivo*” serve para encontrar substâncias mutagênicas que quebram os cromossomos (substâncias clastogênicas) ou mesmo que modifiquem a formação do fuso mitótico, modificando a distribuição equitativa dos cromossomos durante a divisão celular. Os MNs formam-se pela extrusão de cromossomos inteiros ou por seus fragmentos durante a divisão celular, sendo uma porção de cromatina resultante de mitoses aberrantes (REIS *et al.*, 2004).

Substâncias físicas e químicas podem induzir aberrações cromossômicas através de diferentes mecanismos, envolvendo danos clastogênicos e aneugênicos. O dano clastogênico é identificado pela indução da quebra cromossômica durante a divisão celular, enquanto o dano aneugênico se dá pela inativação da estrutura celular, levando as perdas cromossômicas por falhas na formação do fuso mitótico, que induzem a aneuploidia ou segregação cromossômica anormal. Esse teste detecta as instabilidades cromossômicas (FENECH, 2000), e pode ser executado em pouco tempo e sem grandes investimentos (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

Entre os testes citogênicos, o teste do Micronúcleo é o que permite uma maior confiabilidade em relação à perda do cromossomo e da sua ruptura (FENECH, 1998). É bastante utilizado para se avaliar nos eritrócitos a genotoxicidade de produtos químicos, pois neles os micronúcleos são facilmente visualizados. É um forte indicativo para a mensuração de aberrações cromossômicas (CAMPANA *et al.*, 2003).

Nos testes *in vivo*, sugere-se que os micronúcleos sejam analisados em hemácias

jóvens, pois quando os eritroblastos expõem seus núcleos e se transformam em eritrócitos, os micronúcleos permanecem no citoplasma, onde são facilmente reconhecidos devido à sua morfologia arredondada e coloração própria (KRISHNA; HAYASHI, 2000). Entretanto, Hayashi e cols., 1990, descreveram a técnica de micronúcleo em sangue periférico utilizando a coloração laranja de acridina. Este corante ao se intercalar com moléculas de DNA e após ser submetido à radiação ultravioleta emite uma fluorescência de cor amarela. Já quando se liga ao RNA, sem a capacidade de se intercalar com o DNA, a fluorescência emitida é vermelha. Essas propriedades permitem a identificação dos reticulócitos, que são eritrócitos jovens ricos em RNA em nível citoplasmático, que se coram em vermelho pela presença desse ácido nucléico. Os micronúcleos que por sua vez possuem DNA em sua constituição coram-se em amarelo e se encontram no meio ou nas bordas das regiões coradas em vermelho.

Segundo Sato e Tomita, 2001, as vantagens apresentadas pelo teste do micronúcleo, são: (a) subjetividade reduzida na análise; (b) simplicidade; (c) rapidez; (d) uso de pequena amostra de sangue, permitindo determinar o melhor tempo de amostragem; (e) a classificação de reticulócitos, pela quantificação do material fluorescente vermelho; (f) os animais não precisam ser eutanasiados, podendo esse ensaio ser conduzido concomitantemente com estudos de toxicidade ou carcinogenicidade.

### **1.7.2 Estresse oxidativo**

O estresse oxidativo é definido como uma situação em que mais radicais livres são formados do que eliminados no organismo. As espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como os radicais livres hidroxil, superóxido e oxigênio singlete e a substância não radical peróxido de 16 hidrogênio são formadas naturalmente em organismos vivos, devido ao processo de respiração aeróbica (BARBOSA *et al.*, 2008).

Essas espécies, em quantidades baixas ou moderadas, têm importante função biológica, pois podem ativar diferentes sinalizadores e fatores de transcrição nuclear, induzindo resposta mitogênica e inflamatória, protegendo o organismo de infecções microbianas e regulando inúmeras cascatas enzimáticas (VICENTE *et al.*, 2011). No entanto, elas são muito reativas, e atacam biomoléculas diversas tais como ácidos nucléicos, proteínas, lipídios dentre outras (VAN DEN ENDE, PESHEV e DE GARA, 2011), causando alterações metabólicas como a peroxidação de lipídios, glicação de proteínas, inativação de enzimas e alterações de estruturas celulares, levando, então, a danos celulares (SILVA *et al.*, 2011). Acredita-se que várias doenças crônico-degenerativas são iniciadas pelas EROs, provocando

desregulação da homeostase e um estresse oxidativo crescente nas células. A homeostase das EROs no organismo depende do balanço entre sua produção e sua eliminação por antioxidantes (VAN DEN ENDE, PESHEV e DE GARA, 2011).

O azoximetano (AOM) atua como um agente químico indutor de câncer colorretal em pesquisas com ratos experimentais e o mecanismo de ação deste carcinógeno é o estresse oxidativo dependente (ANILKUMAR *et al.*, 2010; AL-NUMAIR *et al.*, 2011; WALY *et al.*, 2012). Há relatos de que o estresse oxidativo induz a formação de peróxidos lipídicos e outras espécies reativas de oxigênio que desempenham um papel importante na patogênese do câncer (BASKAR *et al.*, 2012; HAMED, ZAKHARY e MAXIMOUS., 2012).

### **1.7.2.1 Glutathione (GSH) – (Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione Redutase (GR))**

A glutathione peroxidase exerce função importante na detoxificação do peróxido de hidrogênio, isso principalmente quando este se encontra em menores concentrações. Está presente em geral no citosol e matriz mitocondrial, catalisa a reação de hidroperóxidos ou do peróxido de hidrogênio com a glutathione, causando a oxidação da mesma e redução (e conseqüentemente a neutralização) do radical livre em questão. A glutathione redutase, por sua vez, catalisa a redução da forma oxidada da glutathione em sua forma reduzida, que, onde por outro lado é utilizada na redução já citada acima. A coordenação da ação dessas duas enzimas gera o ciclo catalítico da glutathione, que é um importante mecanismo de defesa do organismo frente aos ROS (BARBOSA *et al.*, 2008).

### **1.7.2.2 TBARS**

No teste de peroxidação lipídica por formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), ocorre a reação entre o malondialdeído (MDA) e substâncias relacionadas e o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um complexo colorido, que pode ser medido espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 532 nm. Esse dosamento é um indicador da peroxidação lipídica ocorrida em tecidos vivos, e, portanto, pode ser utilizado para medir a capacidade antioxidante *in vivo*, utilizando tecidos animais como meio de reação (MOON e SHIBAMOTO, 2009). O teste é inespecífico, pois o ácido tiobarbitúrico não reage somente com malondialdeído, mas também com outros compostos, porém por sua facilidade de execução e baixo custo, o teste é frequentemente utilizado para a determinação

da atividade antioxidante in vivo (BARBOSA *et al.*, 2008).

### **1.7.3 Relação Reticulócitos/Hemácias**

Os reticulócitos são definidos como eritrócitos imaturos no estágio final de diferenciação celular e foram observados pela primeira vez por Wilhelm H. Erb em 1865, o qual notou grânulos em glóbulos vermelhos tratados com ácido pícrico ou acético (ERB, 1865).

A contagem de reticulócitos no sangue periférico fornece informações sobre a integridade funcional da medula óssea. Quadro de anemia em pacientes que apresentam reticulocitose, a eritropoiese na medula óssea mostra-se eficaz e responde às terapias específicas. Por outro lado, em pacientes com quadro de anemia que apresentam um número diminuído de reticulócitos na circulação, ou reticulocitopenia, a eritropoiese não é eficaz e pode estar associada a outros fatores. A contagem de reticulócitos promove o monitoramento da regeneração da atividade medular após quimioterapia ou transplante de medula óssea, como também serve pra avaliar a evolução desses pacientes (LEE *et al.*, 1999).

A contagem de reticulócitos está amplamente estabelecida e utilizada para monitorar a eritropoiese. A maioria das técnicas laboratoriais para contagem de reticulócitos é baseada na detecção de RNA (reticulina) no citoplasma dos reticulócitos. Consiste em um fator importante no diagnóstico, classificação e monitorização do tratamento das anemias, na confirmação da regeneração da medula óssea após quimioterapia ou transplante, e na monitorização da terapêutica com eritropoetina humana recombinante. Hoje em dia, os analisadores hematológicos fornecem inúmeros parâmetros que auxiliam no diagnóstico e monitoramento de várias patologias e condições clínicas (RILEY, BEN-EZRA e TIDWELL, 2001).

## 1.8 Justificativa e Relevância

O câncer é um problema de saúde pública global. Sua incidência no mundo cresceu 20% na última década, esperando-se para 2030 cerca de 27 milhões de novos casos e seu impacto comprometerá 80% da população dos países em desenvolvimento, bem mais do que os 20 milhões de casos novos estimados para 2025 (INCA, 2018).

Devido á grande incidência de novos casos de cânceres, o alvo de muitas pesquisas tem sido a descoberta de compostos naturais ou sintéticos que possam prevenir, retardar ou reverter o processo de carcinogênese. O uso de modelos animais tem se mostrado muito promissor para o estudo de hipóteses ligadas a fatores ambientais na etiologia e prevenção de diversos tipos de cânceres (ORSOLIC *et al.*, 2005).

Os estudos publicados até o presente sobre PVB e seus compostos isolados, mostram resultados promissores em relação às propriedades de eliminação de radicais livres e capacidade de agir como biomarcadores antioxidantes (FREIRES *et al.*; 2016). A própolis exerce varias atividades farmacológicas, dentre as mais estudadas está sua atividade antineoplásica, pesquisadores tem se empenhado em isolar compostos contidos em amostras de própolis de diversas procedências com o intuito de achar novas drogas para conter o avanço dos diversos tipos de neoplasias (PEREIRA. *et al.*, 2015; SFORCIN *et al.*, 2016). O potencial terapêutico da própolis tem sido pouco investigado na prevenção e tratamento de doenças infecciosas inflamatórias e neoplásicas, então precisamos caminhar neste sentido para aumentar o conhecimento sobre a eficácia deste produto.

A *L*-Lisina é um aminoácido essencial e de consumo cotidiano e necessário, em que pese o pouco conhecimento que se tem deste alimento, existem pesquisadores interessados em aumentar o teor de *L*- Lisina em alimentos que consumimos. Diante disto e de achados recentes de que esse aminoácido pode promover a carcinogênese de bexiga em ratos submetidos à carcinogênese química (DORNELAS *et al.*, 2012) e em meio a crescente incidência de câncer na população é importante investigar qual o impacto deste aminoácido nesta doença.

Por último usou-se a goma arábica, ou goma acácia com o objetivo de auxiliar na diluição da própolis vermelha conforme técnica da Shulka, Bhadauria e Jadon, 2005, pois a mesma foi diluída em goma arábica á 1%. E então, por isso foi utilizado um grupo controle. No entanto alguns estudos têm mostrado uma atividade antioxidante deste produto.

## **2 OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Avaliar os efeitos protetores e/ou promotores da própolis vermelha e *L*-lisina nas lesões pré-neoplásicas da carcinogênese colorretal induzida pelo azoximetano.

### **Objetivos específicos**

Avaliar os efeitos da própolis vermelha nas lesões pré-neoplásicas do cólon (FCAs e multiplicidades de FCAs) de ratas submetidas ao AOM.

Avaliar os efeitos da própolis vermelha e da *L*-lisina nas lesões pré-neoplásicas do cólon (FCAs e multiplicidades de FCAs ) de ratas submetidas ao AOM.

Avaliar a genotoxicidade e mutagênese (ensaio cometa alcalino e teste do micronúcleo em sangue periférico e medula óssea) de ratas que receberam AOM e foram tratados com própolis vermelha e *L*-lisina.

Avaliar o estresse oxidativo em sangue periférico através da dosagem de GSH e TBARS, dos animais que receberam AOM e foram tratados com própolis vermelha e *L*-lisina.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 Considerações éticas

A pesquisa foi realizada após a avaliação do Comitê de Ética de Pesquisas em Animais da Universidade Federal do Ceará (CEPA/UFC) e aprovado sob número de protocolo 17/2016 (Anexo A), de acordo com os preceitos da lei 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 26 de março de 2016.

#### 3.2 Amostra

Foram utilizados 48 (quarenta e oito) ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Mammalia rodentia*, *Muridae*), com 4 semanas de idade, pesando entre 40 e 60g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC), foram alojados no máximo 5 (cinco) animais por gaiola de polipropileno forradas com maravalha autoclavada (BIOTÉCNICAS), com tampa de arame galvanizadas. As 48 ratas wistar foram divididas em grupos e foram tratadas respectivamente: GI- água (5 ratas), GII- L-lisina (5 ratas), GIII- própolis vermelha (5 ratas), GIV- goma arábica 1% (5 ratas), GV- AOM+água (7 ratas), GVI- AOM+L-lisina (7 ratas), GVII- AOM+própolis vermelha (7 ratas) e GVIII- AOM+goma arábica 1% (7 ratas), durante 16 semanas.

Ficaram abrigados a 24°C em ciclo luz-escuro de 12 horas, com umidade relativa do ar em torno de 50%, com ventilação mantida por ventiladores axiais e com acesso a água e alimento padrão (NUVILAB CR-1 irradiada) (Anexo B) *ad libitum*.

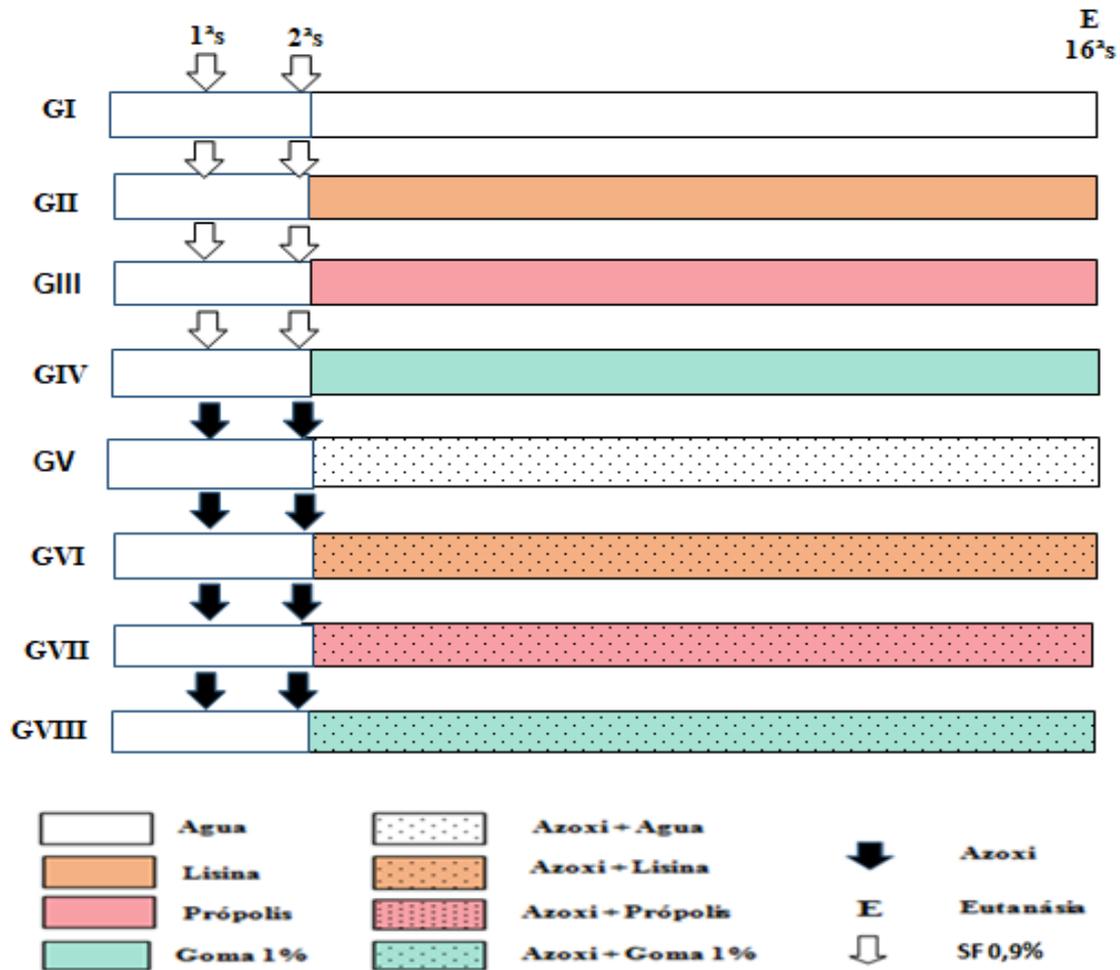
Antes do início da administração das substâncias os animais receberam vermífugos, Petzi plus<sup>®</sup> (2ml/kg), via gavagem e Ivomec<sup>®</sup> (2mg/kg), por via subcutânea.

#### 3.3 Modelo Experimental

Os 48 animais foram separados de acordo com a semelhança dos seus pesos em oito

grupos experimentais: I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII (Figura 3).

Figura 3- Desenho experimental.



Fonte: O próprio autor.

**Grupo I (GI):** Grupo controle, com 05 animais que receberam 1,0 ml água destilada via gavagem por 14 semanas. Receberam injeção de 1,0 ml de solução salina 0,9% estéril (SF), intraperitoneal (IP), 1 vez por semana por 2 semanas e continuaram recebendo a água e alimento *ad libitum* até os dias estabelecidos para a eutanásia. Os animais foram mortos na 16ª semana após o início do experimento.

**Grupo II (GII):** Grupo controle, com 05 animais que receberam *L* Lisina, 150 mg/kg/peso via gavagem por 14 semanas. Receberam injeção de 1,0 ml de solução salina 0,9% estéril (SF), intraperitoneal (IP), 1 vez por semana por 2 semanas e continuaram recebendo a água e alimento *ad libitum* até os dias estabelecidos para a eutanásia. Os animais foram mortos na 16ª semana após o início do experimento.

**Grupo III (GIII):** Grupo controle, com 05 animais que receberam própolis vermelha via gavagem na dosagem de 100 mg/5 ml/kg peso por 14 semanas. Receberam injeção de 1,0

ml de solução salina 0,9% estéril (SF), intraperitoneal (IP), 1 vez por semana por 2 semanas e continuaram recebendo a água e alimento *ad libitum* até os dias estabelecidos para a eutanásia. Os animais foram mortos na 16ª semana após o início do experimento.

**Grupo IV (GIV):** Grupo controle, com 05 animais que receberam via gavagem goma arábica a 1% na dose de 5 ml/kg/peso por 14 semanas. Receberam injeção de 1,0 ml de solução salina 0,9% estéril (SF), intraperitoneal (IP), 1 vez por semana por 2 semanas e continuaram recebendo a água e alimento *ad libitum* até os dias estabelecidos para a eutanásia. Os animais foram mortos na 16ª semana após o início do experimento.

**Grupo V (GV):** Grupo com 07 animais que receberam injeção de Azoximetano na dose de 15mg/kg/peso, intraperitoneal (IP), 1 vez por semana por 2 semanas e receberam via gavagem água (0,5 a 1,0ml/dia), por 14 semanas, e continuaram recebendo a água e alimento *ad libitum* até os dias estabelecidos para a eutanásia. Os animais foram mortos na 16ª semana após o início do experimento.

**Grupo VI (GVI):** Grupo com 07 animais que receberam injeção de azoximetano na dose de 15mg/kg/peso, intraperitoneal (IP), 1 vez por semana por 2 semanas e receberam via gavagem a *L* Lisina, 150 mg/kg/peso por 14 semanas, e continuaram recebendo a água e alimento *ad libitum* até os dias estabelecidos para a eutanásia. Os animais foram mortos na 16ª semana após o início do experimento.

**Grupo VII (GVII):** Grupo com 07 animais que receberam injeção de azoximetano na dose de 15mg/kg/peso, intraperitoneal (IP), 1 vez por semana por 2 semanas e receberam própolis vermelha via gavagem na dosagem de 100 mg/5 ml/kg peso por 14 semanas e continuaram recebendo a água e alimento *ad libitum* até os dias estabelecidos para a eutanásia. Os animais foram mortos na 16ª semana após o início do experimento.

**Grupo VIII (GVIII):** Grupo com 07 animais que receberam injeção de azoximetano na dose de 15mg/kg/peso, intraperitoneal (IP), 1 vez por semana por 2 semanas e receberam via gavagem goma arábica a 1% na dose de 5 ml/kg/peso por 14 semanas e continuaram recebendo a água e alimento *ad libitum* até os dias estabelecidos para a eutanásia. Os animais foram mortos na 16ª semana após o início do experimento.

Os animais foram pesados no dia da administração dos vermífugos e da administração do azoximetano, como também todas as semanas do experimento, antes de serem calculadas as doses das substâncias administradas, visto que estas eram de acordo com o peso médio dos animais/grupo. Foram pesados inclusive no dia da eutanásia para que fossem calculadas as doses dos anestésicos.

### 3.4 Carcinógeno

O Azoximethane<sup>®</sup> foi obtido da Sigma-aldrich Co., na apresentação de frasco ampola de 100mg e diluído em solução salina estéril (SF 0,9%) para se obter uma dose de 15mg/kg peso, sendo administrado por via intraperitoneal uma vez por semanas em duas semana consecutivas (Figura 4) (Anexo C).

**Figura 4** – Aplicação do Carcinógeno



Fonte: O próprio autor.

### 3.5 L-Lisina

O aminoácido *L*-lisina monohidrocloridrato ( $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$ ; CAS #657-27-2) proveniente da China (Anexo D) foi administrada em solução aquosa na dose de 150mg/kg de peso do animal. As doses diárias foram diluídas em água destilada no momento na administração.

### 3.6 Própolis Vermelha

A própolis *in natura* foi adquirida de fornecedor idôneo da cidade de Barra de Santo Antônio – Alagoas. A extração etanólica foi realizada no Laboratório de Biotransformações e Produtos Naturais (LBPN) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC sob orientação da Profa. Telma Leda Gomes de Lemos. O extrato etanólico de própolis vermelha

foi obtido por extração a frio em etanol 95%. Após evaporação quase completa do etanol, o extrato etanólico 'mãe' foi estocado a 4°C.

A diluição da própolis em goma arábica foi uma adaptação da técnica descrita por Shukla, Bhadauria e Jadon, 2004, foi preparado semanalmente a partir do extrato mãe anteriormente descrito, na dose de 100mg/5ml/kg peso (100mg de própolis para 5 ml de goma arábica a 1% por kg de peso do animal, ou seja, 20mg/ml). A diluição em solução aquosa de goma arábica a 1%, foi feita a quente em estufa (com temperatura de até 60°C), sob agitação mecânica manual periódica de 5 em 5 minutos, totalizando 30 minutos e mantida a 4 graus centígrados (Figura 5).

Como a própolis vermelha foi extraída em solução de goma arábica a 1%, estabeleceu-se um grupo controle, ao qual foi ministrada solução de goma arábica a 1% na dose de 5,0ml/kg peso. As doses de goma arábica foram preparadas semanalmente, conforme variação do peso dos animais.

**Figura 5** – Própolis diluída em goma arábica a 1%.



Fonte: O próprio autor.

### 3.7 Pesagem dos animais, avaliação clínica e gavagem

Os animais foram pesados antes e ao final do experimento e a cada semana e avaliados clinicamente diariamente. A balança utilizada foi sempre a mesma (balança analítica FILIZOLA Beyond Technology MF – até 3kg). Foram pesados 17 vezes durante o experimento, no dia do recebimento pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), uma semana depois estes foram pesados novamente para a realização da primeira aplicação do carcinógeno, após outra semana para a aplicação da segunda dose do carcinógeno e todas as semanas seguintes para os cálculos das doses das substâncias administradas, como também para se fazer um comparativo do ganho de peso entre os grupos (Apêndice A). Ao final foram calculadas as variações da massa corporal conforme a fórmula a seguir:

Cálculo da variação da massa corporal (VMC)

- $P_i$ : peso no início do estudo
- $P_f$ : peso no final do estudo

$$VMC = \frac{(P_f - P_i)}{P_i} \cdot 100$$

Foi avaliado aspecto como mudança de peso, comportamento (reatividade, imobilidade), contrações involuntárias, padrão respiratório, características das fezes (constipação, diarreia), anorexia, piloereção, alopecia e ulcerações cutâneas e perianais.

As substâncias, água, *L*-lisina, própolis vermelha e goma arábica a 1%, foram administradas via gavagem após a segunda dose de azoximetano, no dia seguinte, em todos os animais, inclusive os grupos que não receberam o azoximetano.

A gavagem foi realizada com cânula de alumínio curva de 8cm de comprimento e protetor distal esférico (18G x 2”x 2,5mm) adaptada a seringa plástica de 5ml, evitando-se trauma em região esofágica, inserida na boca do animal, sendo esse antes imobilizado manualmente pelo dorso (Figura 6).

**Figura 6** – Administração das substâncias por gavagem



Fonte: O próprio autor.

### **3.8 Procedimento cirúrgico e Avaliação macroscópica**

Os animais foram deixados em jejum, apenas com água *ad. libitum* por 12h antes do ato cirúrgico. Estes foram anestesiados por injeção intraperitoneal com quetamina (80mg/kg peso) e xilazina (8mg/kg peso). Após terem sido anestesiados os animais foram submetidos à tricotomia abdominal, fixados pelas patas em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica com campos estéreis, seguido de laparotomia por incisão na linha média xifopubiana interessando a cavidade abdominal e retroperitônio. Logo foi colhido sangue da aorta abdominal (Figura 7), e foi realizada a retirada do cólon até o ceco (protolectomia).

**Figura 7** – Coleta de sangue da aorta abdominal



Fonte: O próprio autor.

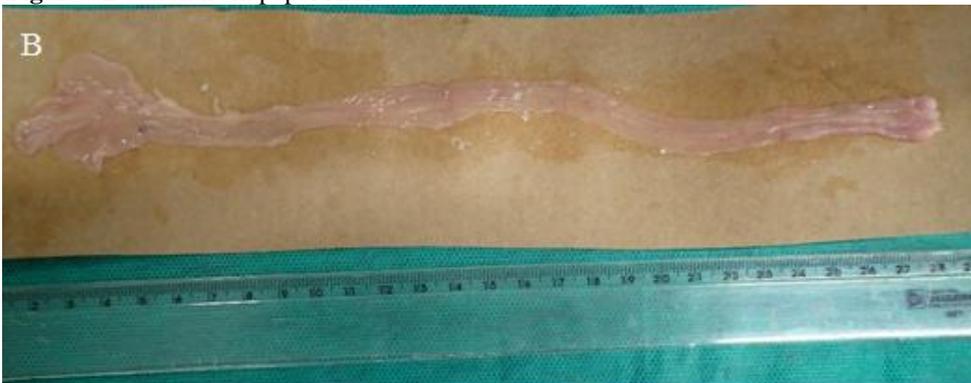
Após a retirada, o cólon foi aberto na borda anti-mesentérica, lavado e irrigado com solução salina de forma contínua. Em seguida, foram colocados cuidadosamente em papel kraft para fazer um rocambole (Figura 8 A, B e C), amarrado com um cordão e em seguida, imerso em formol tamponado a 10%.

**Figura 8A** – Cólon aberto limpo



Fonte: O próprio autor.

**Figura 8B** – Cólon em papel Kraft



Fonte: O próprio autor.

**Figura 8C** – Cólon disposto em rocambole



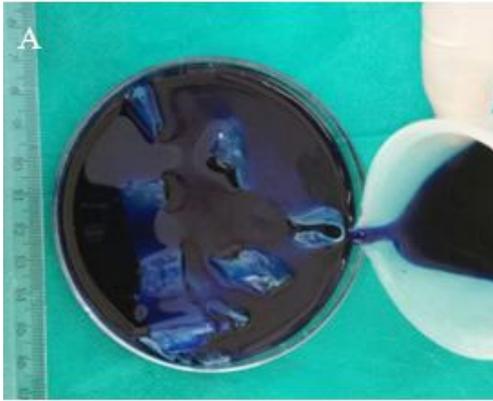
Fonte: O próprio autor.

Foi retirado também o fígado, os pulmões, o baço e os rins. Todos os órgãos foram pesados (Apêndice B) e avaliados quanto à presença de tumoração ou outra alteração, e dos intestinos também foi feita a medição. Posteriormente os órgãos foram clivados com o intuito de verificar se havia alterações macroscópicas nos mesmos.

### **3.9 Estudo de Criptas Aberrantes**

Após 24 horas de fixação, cada cólon foi corado com azul de metileno a 0,1% e PBS (solução fosfatada) por 1 minuto. E levado ao microscópio estereoscópico (Figura 9 A, B e C) para a quantificação de foco de criptas aberrantes (FCAs) (Apêndice C) (Figura 10) e do número de criptas por foco, ou seja, sua multiplicidade (BIRD, 1987; BURLAMAQUI *et al*, 2010) em toda sua extensão, por segmento de cólon (distal, médio e proximal). A mucosa cólica foi avaliada utilizando um microscópio estereoscópico (M90 VASCONCELLOS da DF VASCONCELOS S.A) com magnificação de 40x. Após a quantificação o cólon foi novamente envolto em papel Kraft, inserido em formol tamponado a 10% para posteriormente ser clivado. Todos foram clivados após avaliação das criptas.

**Figura 9A, B e C** – Cólon corando em azul de metileno 0,1% e ao microscópio estereoscópico



Fonte: O próprio autor.

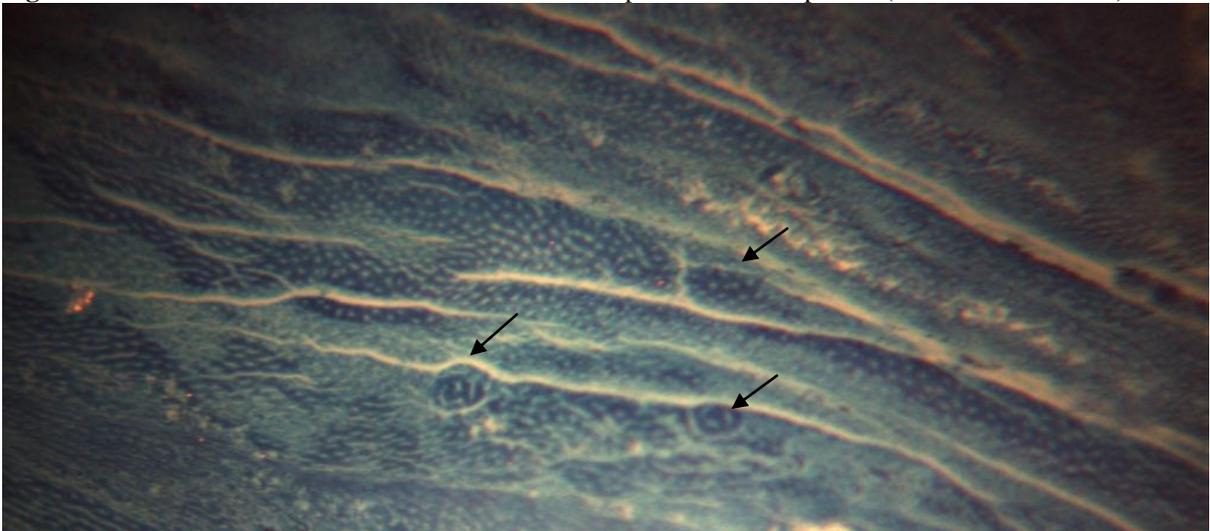


Fonte: O próprio autor.



Fonte: O próprio autor.

**Figura 10** – FCAs em setas ao microscópio estereoscópico (M90 Vasconcellos) 40x



Fonte: O próprio autor.

### 3.10 Ensaios biológicos

#### 3.10.1 Testes de avaliação da genotoxicidade

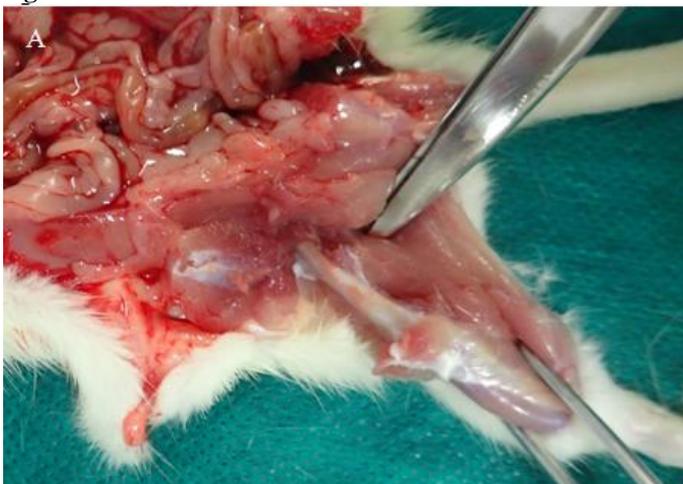
Do sangue colhido na aorta abdominal foi realizado o teste do cometa alcalino e micronúcleos em sangue periférico e fígado. Foi coletado 3ml de sangue de cada animal logo após a incisão abdominal (Figura 7). Em seguida foi retirado também uma pequena porção do fígado para estudos posteriores.

Um fragmento do fígado foi macerado em pbs gelado (4°C) e posteriormente filtrado. As células para os ensaios (cometa alcalino e micronúcleos) foram obtidas da suspensão após a filtração.

Para o ensaio de micronúcleo em células de medula óssea os fêmures foram retirados, limpos e as epífises proximais foram seccionadas. A medula óssea foi retirada fazendo uso de seringas de 1 mL previamente preenchida com 0,5 mL de soro fetal bovino. Posteriormente, a agulha foi firmemente inserida na abertura do fêmur e o soro fetal bovino foi injetado de modo a deslocar a medula para dentro de um tubo de centrífuga contendo 3 mL de soro fetal bovino (Figura 11 A e B).

Após a coleta as amostras foram transportadas para o laboratório em recipientes com gelo e processadas dentro de 2h após esse procedimento.

**Figura 11A** - Retirada do fêmur



Fonte: O próprio autor.

**Figura 11B** - Extração da medula óssea.



Fonte: O próprio autor.

### **3.10.1.1 Cometa Alcalino (Sangue periférico e Fígado)**

Neste estudo a análise de dano ao DNA pelo método do cometa alcalino foi conduzida como descrito por Singh *et al.*, (1988) com mínimas modificações (COLLINS, 2004; HARTMANN, SPEIT, 1997).

As lâminas foram previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (0,5%) a uma temperatura de 60°C em solução de PBS livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , mantidos a temperatura ambiente até a solidificação da agarose de baixo ponto de fusão. Sangue periférico (análise de leucócitos) e hepatócitos foram utilizados para tal teste. Utilizados 10  $\mu\text{l}$  de sangue ou 5  $\mu\text{L}$  de suspensão de hepatócitos e foram embebidos em uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37°C e adicionadas às lâminas pré-cobertas com agarose de ponto de fusão normal. Posteriormente, as lâminas foram cobertas com lamínulas para uniformizar a distribuição do material na lâmina e mantidas a 4°C para solidificação da agarose. Para cada amostra foram confeccionadas e analisadas quatro lâminas.

Após solidificação da agarose a lamínula foi delicadamente removida e as lâminas imersas na solução de lise (5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% N-Lauroyl sarcosine; a pH 10,0; 1% Triton X 100; 10% DMSO), protegida da luz, e deixada à baixa temperatura (4°C) por no mínimo 1 h.

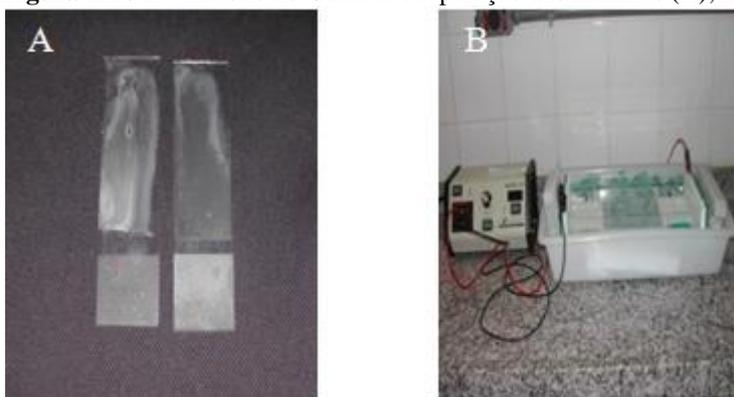
Modificações do ensaio do cometa alcalino foram realizadas de modo a permitir análises de possíveis lesões oxidativas no DNA apenas em hepatócitos. Para isso, logo após o procedimento de lise celular, as lâminas foram incubadas com uma endonuclease capaz de

reconhecer bases nitrogenadas (purínicas) danificadas no DNA. A endonuclease utilizada foi a Formamidopirimidina DNA-glicosilase (FPG), uma enzima de reparação de excisão de bases que reconhece e remove uma grande variedade de purinas oxidadas no DNA.

Sucintamente, após a lise celular, as lâminas foram lavadas por 3 vezes com solução tampão (40 mM HEPES, 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/mL BSA, pH 8,0). Após a lavagem, as lâminas foram secadas em ambiente abrigado de luz e em seguida incubadas com as enzimas FPG (70  $\mu$ L, 35°C, 30 min) de acordo com as recomendações do fabricante (New England Biolabs Inc., EUA).

As lâminas foram removidas da solução de lise e neutralizadas por 15 min. na solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5). Em seguida, foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese e cobertas com a solução de eletroforese a 4°C (1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA; 300 mM NaOH; pH > 13) até cobertura total. As lâminas foram incubadas por 20 min para permitir o relaxamento do DNA e a expressão do dano antes da eletroforese. A eletroforese foi conduzida a baixa temperatura, 4°C por 20 min., usando 25 V e corrente de 300 mA. Todos esses passos foram conduzidos na ausência de luminosidade (a luz causa danos ao DNA). Após eletroforese as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas numa solução tampão (0,4 M Tris, pH 7,5) durante 5 min, para neutralizar a alcalinidade (Figura 12 A e B). Após a corrida em eletroforese as lâminas foram fixadas com etanol a 100%.

**Figura 1A e B** - Método do Cometa: Preparação das Lâminas (A); Eletroforese(B).



Fonte: O próprio autor.

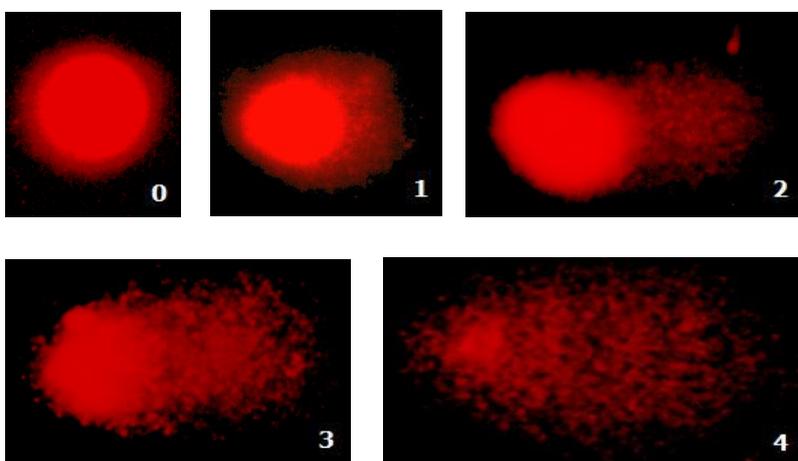
Após a fixação das lâminas em etanol 100%, aplicou-se 30 $\mu$ L da solução de Brometo de Etídio (20 $\mu$ g/mL) e cobriu-se com lamínula para análise em microscópio de fluorescência (Zeiss) equipado com um filtro de excitação de 515–560 nm, um filtro de barreira de 590 nm e objetiva de 40x. A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa, indicando o grau de quebra do

DNA (Figura 13). Diretrizes e recomendações internacionais para o ensaio do cometa consideram que o escore visual dos cometas é um método de avaliação bem validado, apresentando uma alta correlação com as análises de imagens computadorizadas. Foram contados 100 cometas (100 cometas para cada replicata), que foram classificados de acordo com a porcentagem de DNA na cauda do cometa. O índice de dano (ID), sendo uma medida sensível de dano baseada na migração do DNA, variou de 0 (Sem dano: 100 células x 0) a 400 (Com dano máximo: 100 células x 4) (COLLINS, DUSINSKA e FRANKLIN., 1997).

O índice de dano (ID) foi obtido pela seguinte fórmula:  $ID = \sum_{i=0}^4 n_i \times i$ , onde  $n_i$  é o número de células com nível de dano  $i$  (0, 1, 2, 3 ou 4).

**Figura 23** - Tipos de cometas: Representação dos cometas corados com brometo de etídio e visualizados no microscópio de fluorescência.

- 0 = sem danos (<5%);
- 1 = baixo nível de danos (5 – 20%);
- 2 = médio nível de danos (20 – 40%);
- 3 = elevado nível de danos (40 – 95%);
- 4 = dano total (95%).



Fonte: Modificada de Speit, Hartmann, 1999.

### 3.10.1.2 Micronúcleos em Reticulócitos (sangue periférico e fígado)

O teste de micronúcleo foi realizado utilizando-se a técnica de coloração com laranja de acridina para análise da frequência de micronúcleos em reticulócitos de sangue periférico e em suspensão de hepatócitos, conforme Hayashi et al., 1990. O corante laranja de acridina foi

dissolvido em água destilada na concentração de 1mg/mL, efetuando-se esfregaço com 10 µL dessa solução em lâminas pré-aquecidas a  $\pm 70^{\circ}\text{C}$ . As lâminas foram estocadas em caixas escuras à temperatura ambiente por pelo menos 24 horas. 50 µL de sangue foi colocada no centro da lâmina, previamente preparada com o corante laranja de acridina e coberta com lamínula. As lâminas foram então guardadas no freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), no escuro, por pelos menos 10 horas. As preparações celulares foram examinadas com o auxílio de um microscópio de fluorescência com filtro de excitação azul (488 nm) e filtro de emissão (barreira) amarelo (575 nm), usando a objetiva de imersão.

### **3.10.1.3 Micronúcleos em Células da Medula Óssea**

Após a obtenção do material medular, já descrito anteriormente, este foi centrifugado (1000 rpm por 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi homogeneizado. Uma gota da suspensão de células foi transferida para uma lâmina limpa e seca, sendo, em seguida, realizado o esfregaço. Foram preparadas duas lâminas para cada animal, correspondente aos subgrupos tratados. Após a confecção das lâminas, o material foi corado pelo método de Leishman (Schimid, 1975).

A análise foi realizada utilizando microscópio óptico binocular, com objetivas de 20X e 40X. Os critérios adotados de identificação dos micronúcleos foram os descritos por Schmid (1976) e Heddle *et al.* (1983). Um total de 1000 eritrócitos policromáticos (EPC) foi analisado, através da leitura de duas lâminas por animal (HEDDLE *et al.*, 1983). Para avaliar a citotoxicidade do tratamento, a razão entre EPC e eritrócitos normocromáticos (ENC) foi determinada através da análise de 1000 eritrócitos (EPC ou ENC) por animal (KRISHNA & HAYASHI, 2000).

### **3.10.2 Estresse oxidativo**

Devido a possibilidade de o azoximetano desenvolver carcinogênese química colorretal e no fígado (ROTHFUSS *et al.* 2011; BURLAMAQUI *et al.*, 2013), e o processo fisiopatológico da carcinogênese básica ser o estresse oxidativo, foram realizados os testes de dosagem da concentração de glutathiona (GSH) e dosagem da concentração das substâncias reagentes do ácido tiobarbitúrico (TBARS).

### **3.10.2.1 Dosagem da concentração de glutathiona (GSH)**

Para a avaliação da concentração de glutathiona, foi colhido 3ml de sangue das ratas anestesiadas, o sangue foi centrifugado e congelado em nitrogênio líquido a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Foi utilizado o método de Sedlak e Lindsay (1968), que se baseia na reação de 2-ácido nitrobenzóico com o tiol livre, originando um dissulfeto misto + ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A medida do produto de formação da reação foi feita em espectrofotômetro de Beckman, por leitura da absorbância a 412 nm.

### **3.10.2.2 Dosagem da concentração das substâncias reagentes do ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

A avaliação de peroxidação lipídica foi através da realização da reação com ácido tiobarbitúrico (TBA) (BERNHEIM; BERNHEIM; WILBUR, 1948). Para a realização dessa análise foi colhido 3ml de sangue durante o procedimento cirúrgico e depois foi levado para ser centrifugado, onde o plasma foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **3.10.2.3 Relação Reticulócitos/Hemácias**

Os reticulócitos são hemácias imaturas não-nucleadas que permanecem no sangue periférico durante 24 a 48 horas enquanto maturam. Elas geralmente se apresentam como hemácias maiores que as maturadas. Neste teste, os reticulócitos em uma amostra de sangue total são contados e expressos em porcentagem da contagem total de hemácias.

Foi contado um número fixo de células vermelhas e avaliado quantos são hemácias e quantos são eritrócitos, isso para se fazer a relação reticulócitos/hemácias.

## **3.11 Análise estatística**

Variáveis contínuas e discretas foram primeiro analisados pelo teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade da distribuição. Como tais critérios foram encontrados na maioria das análises, a média e desvio padrão foram calculados por estatística descritiva, e testes paramétricos foram aplicados para análise estatística. Portanto, comparações entre os

quatro grupos (água, *L*-lisina, própolis e goma arábica), expostos ou não ao azoximetano, foram realizadas utilizando análise de variância de sentido único (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey's de múltiplas comparações para comparar todos os pares de grupos.

Em adição, para cada tratamento, o teste *t* não pareado foi empregado para comparar o efeito da exposição ou não do azoximetano. Na totalidade das análises, testes bicaudais foram aplicados e o nível de significância foi calculado como 0,05 (5%). O software GraphPad Prism version 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA) foi utilizado para realização de todos os procedimentos estatísticos, assim como para a realização dos gráficos.

Para a análise do peso dos órgãos dos animais foram comparados por meio dos testes ANOVA, seguidos do pós-teste de Bonferroni.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Avaliação clínica**

Foram observadas esporadicamente roncos e dispneia nos animais que regrediam espontaneamente, porém não foram observados outros sinais clínicos patológicos.

### **4.2 Avaliação da mortalidade dos animais**

Houve a morte de um animal do grupo V, e de outro do grupo VI, mas não foi realizado necrópsia para uma análise das respectivas mortes devido ao avançado estado de destruição que estes foram encontrados, provocados pelos outros animais das respectivas gaiolas.

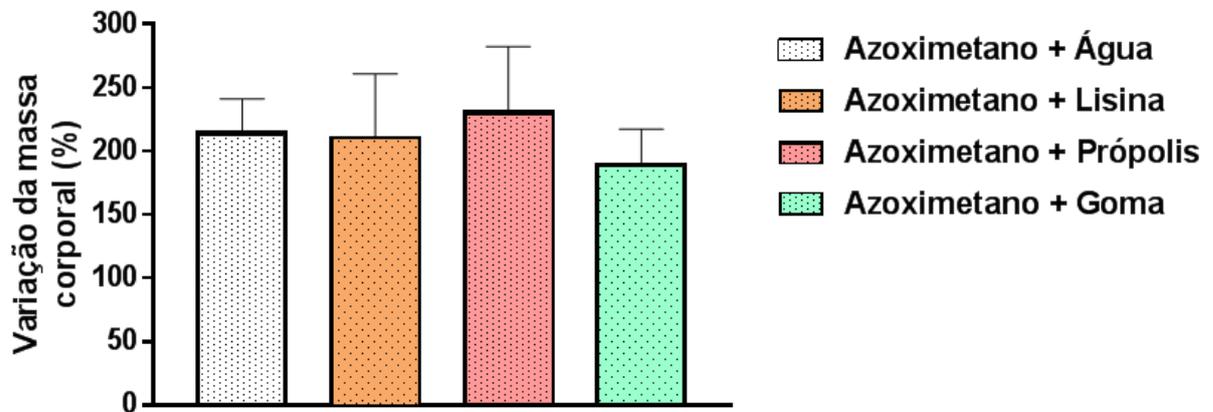
### **4.3 Avaliação das Doses das substâncias administradas**

A dose média total não mostrou grande variação entre os grupos, essas eram calculadas sempre de acordo com o peso médio dos animais/grupo (Apêndice D).

### **4.4 Avaliação da variação da massa corporal**

Na avaliação da variação da massa corporal, comparações entre os quatro grupos que foram submetidos ao AOM foram feitas pela análise de variância (ANOVA) para um fator de classificação, associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (ANOVA:  $F = 1,2089$ ;  $p = 0,3298$ ) no ganho percentual de massa corporal nos animais dos grupos Azoximetano+Água ( $214,51 \pm 26,67\%$ ), Azoximetano+Lisina ( $210,41 \pm 50,58\%$ ), Azoximetano+Própolis ( $231,09 \pm 51,29\%$ ) e Azoximetano+Goma ( $189,76 \pm 27,70\%$ ) (Figura 14).

**FIGURA 14** – Variação da massa corporal, expressa em termos percentuais, que segundo os dados correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas nos grupos submetidos ao AOM.

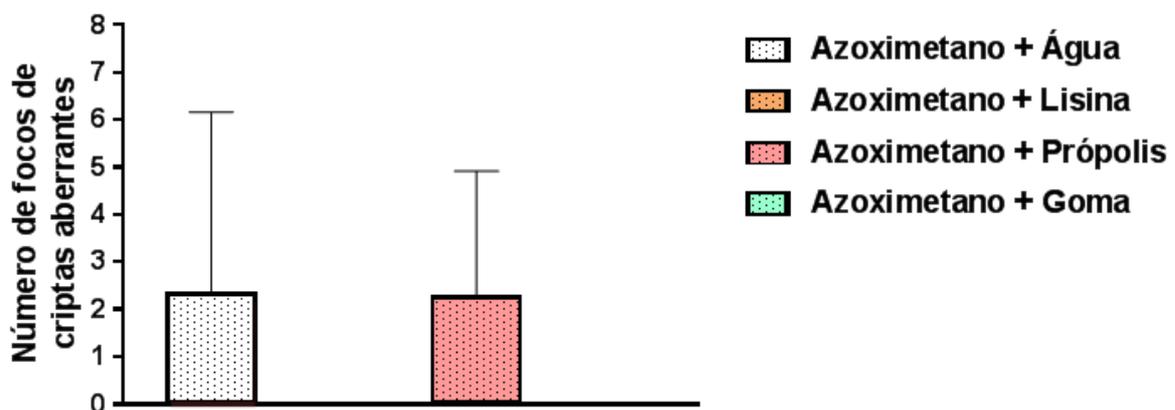


#### 4.5 Estudo dos Focos de Cripta Aberrante (FCAs)

##### 4.5.1 Número total de FCAs em segmento proximal

Avaliando o número total de FCAs no segmento proximal, quando realizadas comparações entre os quatro grupos que foram submetidos ao AOM, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os quatro grupos em relação ao número de focos de criptas aberrantes (ANOVA:  $F = 2,2124$ ;  $p = 0,1152$ ) (ANOVA, associado à Tukey) (Figura 15).

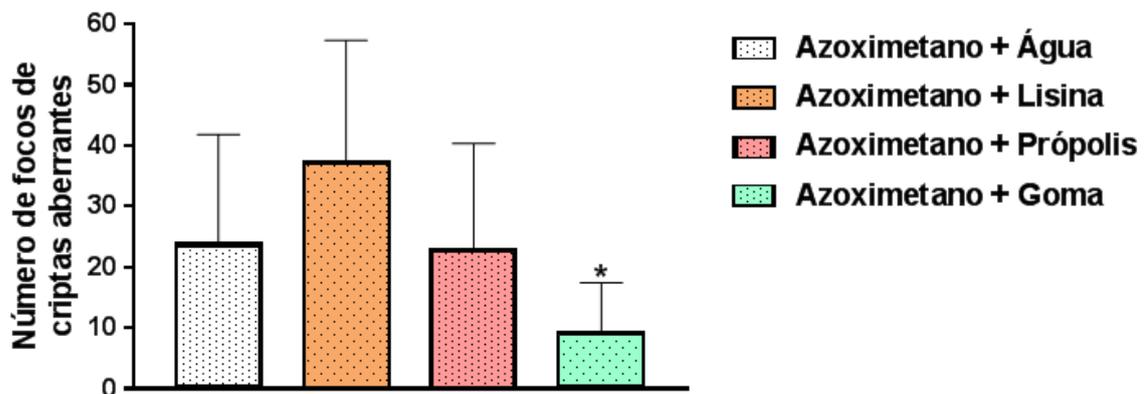
**Figura 15** - Número de focos de criptas aberrantes (FCA) verificados nos grupos submetidos ao AOM, considerando o segmento colônico proximal. Os dados correspondem à média e desvio padrão.



#### 4.5.2 Número total de FCAs em segmento médio

Avaliando o número total de FCAs no segmento médio, quando feito às comparações entre os quatro grupos que foram submetidos ao AOM, constatou-se que o número de FCA observado no grupo Azoximetano+Goma foi significativamente menor ( $*p=0,0274$ ) que o verificado no grupo que recebeu Azoximetano+Lisina (ANOVA, associado à Tukey) (Figura 16).

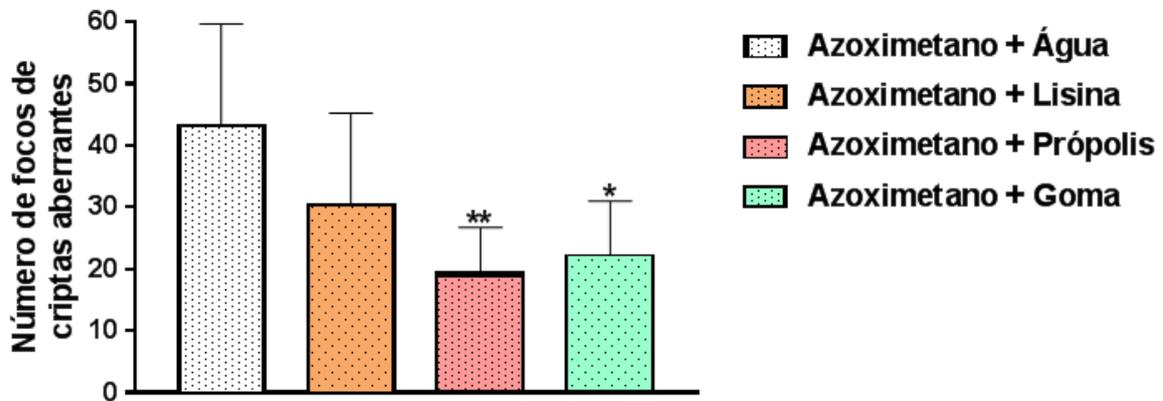
**Figura 16** - Número de focos de criptas aberrantes (FCA) verificados nos grupos submetidos ao AOM, considerando o segmento colônico médio, os dados correspondem à média e desvio padrão.



#### 4.5.3 Número total de FCAs em segmento distal

Avaliando o número total de FCAs no segmento distal, constatou-se que o número de FCA observado nos grupos Azoximetano+Própolis ( $**p=0,0096$ ) e Azoximetano+Goma ( $*p=0,0250$ ) foi significativamente menor que o verificado no grupo Azoximetano+Água, nas comparações entre os quatro grupos submetidos ao AOM (ANOVA, associado à Tukey) (Figura 17).

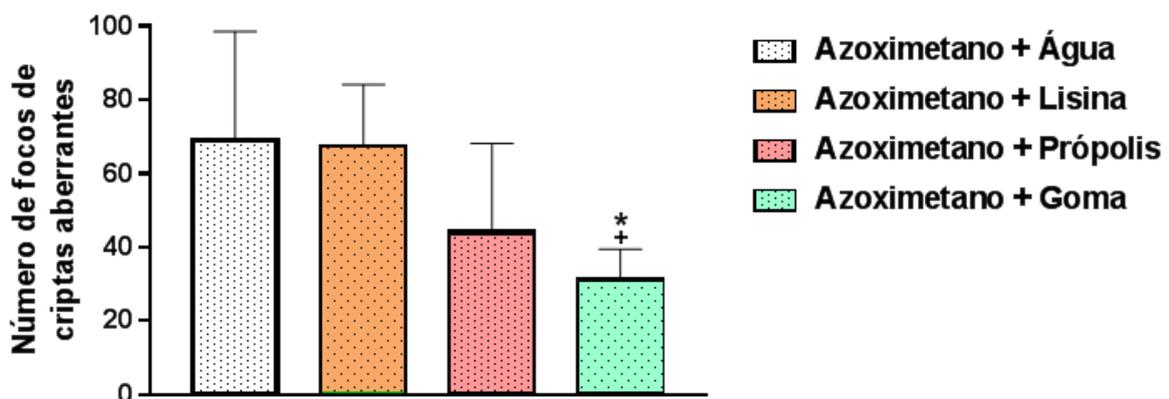
**Figura 17** - Número de focos de criptas aberrantes (FCA) verificados nos grupos submetidos ao AOM, considerando o segmento colônico distal. Os dados correspondem à média e desvio padrão.



#### 4.5.4 Número total de FCAs em todo o cólon

Avaliando o número total de FCAs em todo o segmento colônico, constatou-se que o número de FCA observado no grupo Azoximetano+Goma foi significativamente menor que o verificado nos grupos Azoximetano+Água ( $*p=0,0166$ ) e Azoximetano+Lisina ( $+p=0,0237$ ). Observou-se um número de FCAs reduzido expressivamente no grupo Azoximetano+Própolis, entretanto não houve significância estatística nas comparações entre os quatro grupos submetidos ao AOM (ANOVA, associado à Tukey) (Figura 18) (Tabela 1).

**Figura 18** - Número de focos de criptas aberrantes (FCA) verificados nos grupos submetidos ao AOM, considerando toda extensão do cólon, os dados correspondem à média e desvio padrão.



Consolidando a estatística da média e desvio padrão entre os grupos submetidos ao AOM, temos o número de FCAs verificados nos diversos segmentos, como também em todo o segmento colônico (Tabela 2).

**TABELA 2** – Número de focos de criptas aberrantes verificados nos grupos submetidos ao AOM, considerando os segmentos colônicos proximal, médio e distal, assim como o cólon inteiro. Os dados correspondem à análise da média e desvio padrão.

Segmento do cólon	Azoximetano + Água (média ± DP)	Azoximetano + Lisina (média ± DP)	Azoximetano + Própolis (média ± DP)	Azoximetano + Goma (média ± DP)	Significância (ANOVA)
Proximal	2,33 ± 3,83	0,00 ± 0,00	2,29 ± 2,63	0,00 ± 0,00	$p = 0,1152$
Médio	23,83 ± 18,00	37,17 ± 20,13	22,71 ± 17,63	9,29 ± 8,12 <sup>c</sup>	$p = 0,0462$
Distal	43,17 ± 16,46	30,33 ± 14,90	19,29 ± 7,46 <sup>a</sup>	22,14 ± 8,88 <sup>b</sup>	$p = 0,0093$
Cólon inteiro	69,33 ± 29,21	67,50 ± 16,72	44,29 ± 23,89	31,43 ± 8,02 <sup>b,c</sup>	$p = 0,0077$

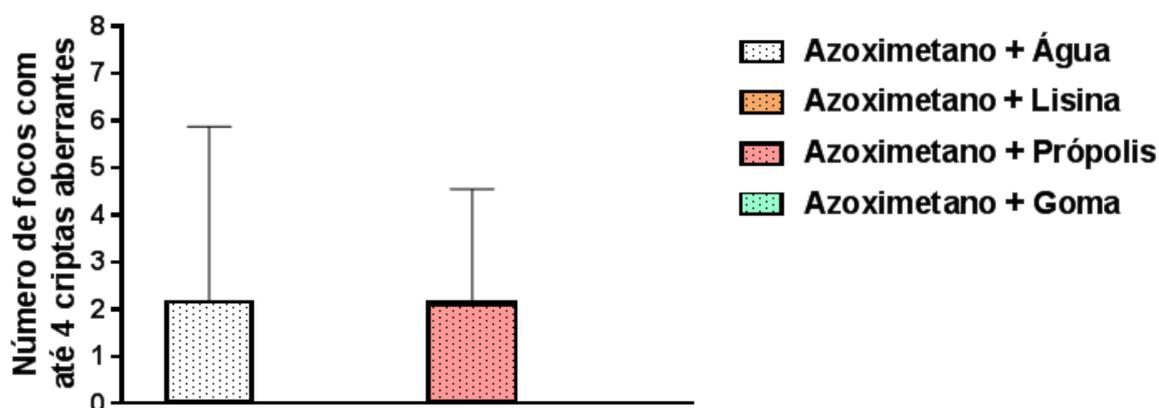
DP: desvio padrão; ANOVA: análise de variância; as letras <sup>a</sup>( $p < 0,01$ ) e <sup>b</sup>( $p < 0,05$ ) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo Azoximetano+Água, enquanto a letra <sup>c</sup>( $p < 0,05$ ) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Azoximetano+Lisina (teste de Tukey).

#### 4.6 Multiplicidade dos Focos de Criptas Aberrantes: até 4 criptas

##### 4.6.1 Multiplicidade dos FCAs em segmento proximal: até 4 criptas

Na avaliação da multiplicidade de FCAs em segmento proximal de até 4 criptas, comparando os quatro grupos submetidos ao AOM, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (ANOVA:  $F = 2,1327$ ;  $p = 0,1250$ ) (ANOVA, associado à Tukey) (Figura 19).

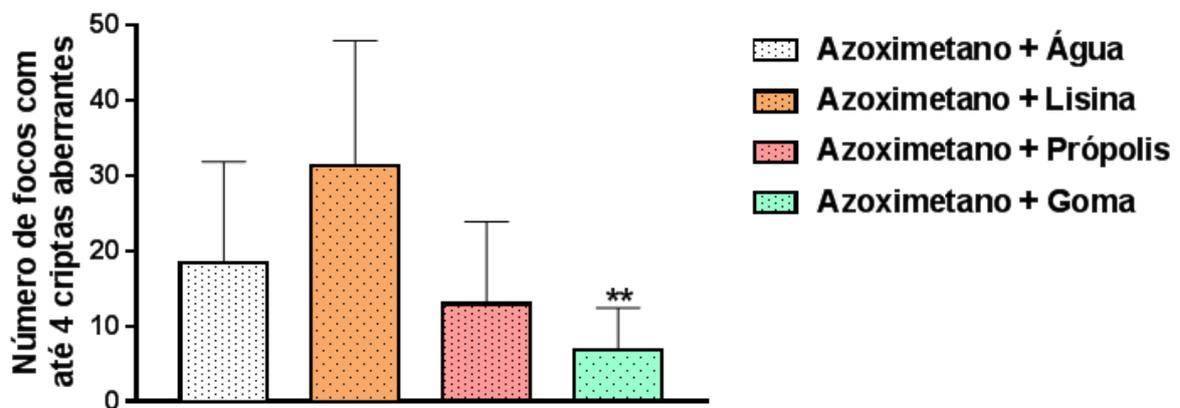
**Figura 19** - Número de focos de criptas aberrantes (FCA) com até 4 criptas verificados nos grupos submetidos ao AOM, considerando o segmento colônico proximal. Os dados correspondem à média e desvio padrão.



#### 4.6.2 Multiplicidade dos FCAs em segmento médio: até 4 criptas

Na avaliação da multiplicidade de FCAs em segmento médio de até 4 criptas, comparando os quatro grupos submetidos ao AOM, constatou-se que o número de FCA observado no grupo Azoximetano+Goma foi significativamente menor (\*\* $p=0,0075$ ) que o verificado no grupo Azoximetano+Lisina (ANOVA, associado à Tukey) (Figura 20).

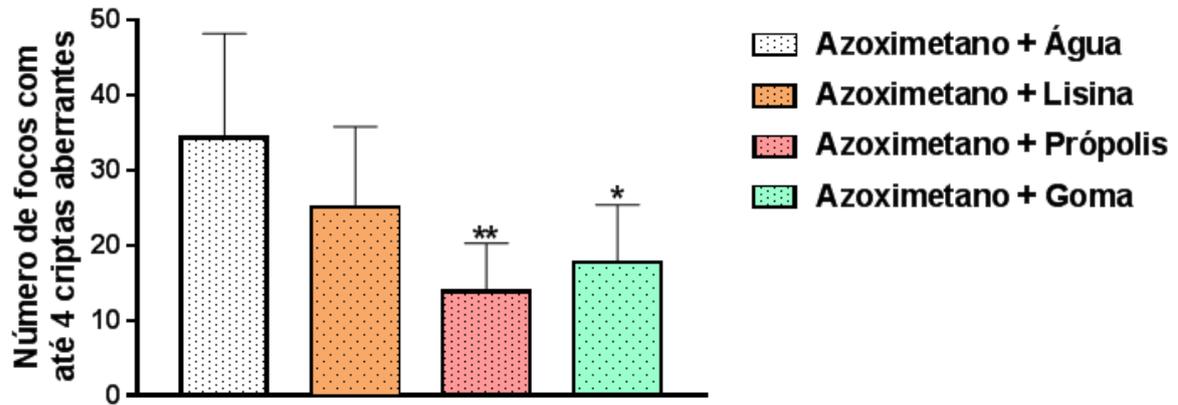
**Figura 20** - Número de focos de criptas aberrantes (FCA) com até 4 criptas verificados nos grupos submetidos ao AOM, considerando o segmento colônico médio. Os dados correspondem à média e desvio padrão.



#### 4.6.3 Multiplicidade dos FCAs em segmento distal: até 4 criptas

Na avaliação da multiplicidade de FCAs em segmento distal de até 4 criptas, comparando os quatro grupos submetidos ao AOM, constatou-se que o número de FCA observado nos grupos Azoximetano+Própolis (\*\* $p=0,0060$ ) e Azoximetano+Goma ( $p=0,0295$ ) foi significativamente menor que o verificado no grupo Azoximetano+Água (ANOVA, associado à Tukey) (Figura 21).

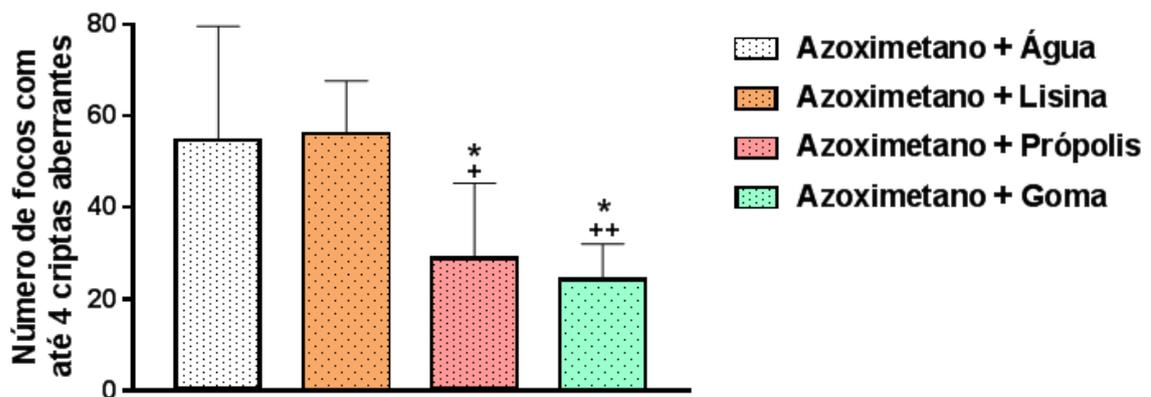
**Figura 21** - Número de focos de criptas aberrantes (FCA) com até 4 criptas verificados nos grupos submetidos ao AOM, considerando o segmento colônico distal. Os dados correspondem à média e desvio padrão.



#### 4.6.4 Multiplicidade dos FCAs em todo o cólon: até 4 criptas

Na avaliação da multiplicidade de FCAs em todo o segmento colônico de até 4 criptas, comparando os quatro grupos submetidos ao AOM, constatou-se que o número de FCA observado no grupo Azoximetano+Própolis foi significativamente menor que o verificado nos grupos Azoximetano+Água ( $*p=0,0394$ ) e Azoximetano+Lisina ( $+p=0,0285$ ). Analogamente, o número de FCA observado no grupo Azoximetano+Goma foi significativamente menor que o verificado nos grupos Azoximetano+Água ( $*p=0,0127$ ) e Azoximetano+Lisina ( $++p=0,0090$ ) (ANOVA, associado à Tukey) (Figura 22).

**Figura 22** - Número de focos de criptas aberrantes (FCA) com até 4 criptas verificados nos grupos submetidos ao AOM, considerando toda extensão do cólon. Os dados correspondem à média e desvio padrão.



Consolidando a estatística da média e desvio padrão entre os grupos submetidos ao AOM, temos o número de FCAs de até 4 criptas verificados nos diversos segmentos, como também em todo o segmento colônico (Tabela 3).

**TABELA 3** – Número de focos de criptas aberrantes com até 4 criptas verificados nos grupos submetidos ao AOM, considerando os segmentos colônicos proximal, médio e distal, assim como o cólon inteiro. Os dados correspondem à análise da média e desvio padrão.

Segmento do cólon	Azoximetano + Água (média ± DP)	Azoximetano + Lisina (média ± DP)	Azoximetano + Própolis (média ± DP)	Azoximetano + Goma (média ± DP)	Significância (ANOVA)
Proximal	2,17 ± 3,71	0,00 ± 0,00	2,14 ± 2,41	0,00 ± 0,00	$p = 0,1250$
Médio	18,33 ± 13,53	31,17 ± 16,74	13,00 ± 10,91	6,71 ± 5,71 <sup>c</sup>	$p = 0,0111$
Distal	34,33 ± 13,87	25,00 ± 10,81	13,86 ± 6,41 <sup>a</sup>	17,71 ± 7,70 <sup>b</sup>	$p = 0,0065$
Cólon inteiro	54,83 ± 24,79	56,17 ± 11,51	29,00 ± 16,29 <sup>b,d</sup>	24,43 ± 7,66 <sup>b,c</sup>	$p = 0,0018$

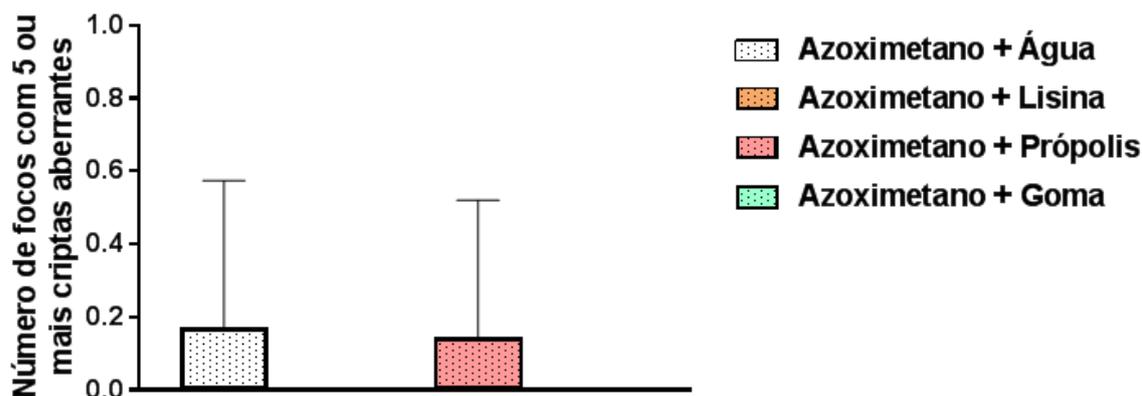
DP: desvio padrão; ANOVA: análise de variância; as letras <sup>a</sup>( $P < 0,01$ ) e <sup>b</sup>( $P < 0,05$ ) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo Azoximetano+Água, enquanto as letras <sup>c</sup>( $p < 0,01$ ) e <sup>d</sup>( $p < 0,05$ ) indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo Azoximetano+Lisina (teste de Tukey).

## 4.7 Multiplicidade dos Focos de Criptas Aberrantes: 5 ou mais criptas

### 4.7.1 Multiplicidade dos FCAs em segmento proximal: 5 ou mais criptas

Na avaliação da multiplicidade de FCAs no segmento proximal de 5 ou mais criptas, comparando os quatro grupos submetidos ao AOM, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os quatro grupos em relação ao número de focos com 5 ou mais criptas aberrantes (ANOVA:  $F = 0,6753$ ;  $p = 0,5764$ ) (ANOVA, associado à Tukey) (Figura 23).

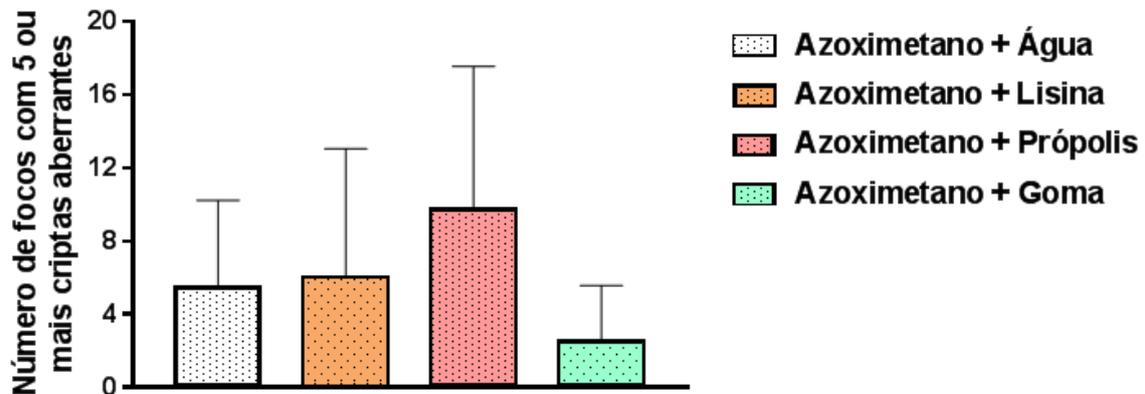
**Figura 23** - Número de focos de criptas aberrantes (FCA) com 5 ou mais criptas verificados nos grupos submetidos ao AOM, considerando o segmento colônico proximal. Os dados correspondem à média e desvio padrão.



#### 4.7.2 Multiplicidade dos FCAs em segmento médio: 5 ou mais criptas

Na avaliação da multiplicidade de FCAs no segmento médio de 5 ou mais criptas, comparando os quatro grupos submetidos ao AOM, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os quatro grupos em relação ao número de focos com 5 ou mais criptas aberrantes (ANOVA:  $F = 1,6939$ ;  $p = 0,1974$ ) (ANOVA, associado à Tukey) (Figura 24).

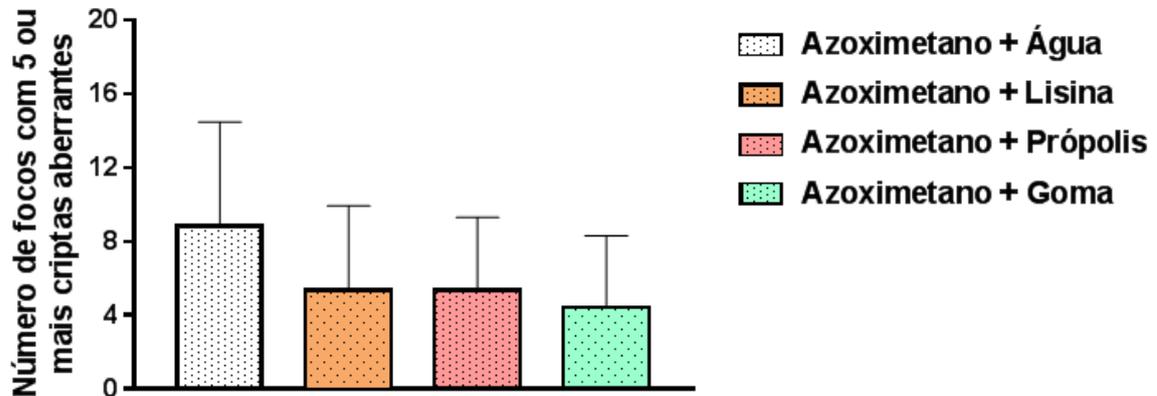
**Figura 24** - Número de focos de criptas aberrantes (FCA) com 5 ou mais criptas verificados nos grupos submetidos ao AOM, considerando o segmento colônico médio. Os dados correspondem à média e desvio padrão.



#### 4.7.3 Multiplicidade dos FCAs em segmento distal: 5 ou mais criptas

Na avaliação da multiplicidade de FCAs no segmento distal de 5 ou mais criptas, comparando os quatro grupos submetidos ao AOM, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os quatro grupos em relação ao número de focos com 5 ou mais criptas aberrantes (ANOVA:  $F = 1,1614$ ;  $p = 0,3469$ ) (ANOVA, associado à Tukey) (Figura 25).

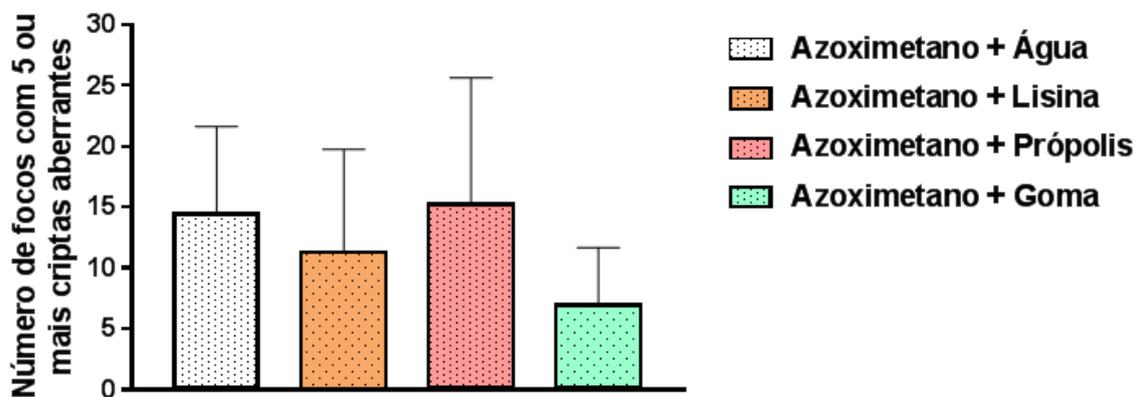
**Figura 25** - Número de focos de criptas aberrantes (FCA) com 5 ou mais criptas verificados nos grupos submetidos ao AOM, considerando o segmento colônico distal. Os dados correspondem à média e desvio padrão.



#### 4.7.4 Multiplicidade dos FCAs em todo o cólon: 5 ou mais criptas

Na avaliação da multiplicidade de FCAs em todo o segmento colônico de 5 ou mais criptas, comparando os quatro grupos submetidos ao AOM, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os quatro grupos em relação ao número de focos com 5 ou mais criptas aberrantes (ANOVA:  $F = 1,5378$ ;  $p = 0,2328$ ) (ANOVA, associado à Tukey) (Figura 26).

**Figura 26** - Número de focos de criptas aberrantes (FCA) com 5 ou mais criptas verificados nos grupos submetidos ao AOM, considerando toda extensão do cólon. Os dados correspondem à média e desvio padrão.



Consolidando a estatística da média e desvio padrão entre os grupos submetidos ao AOM, temos o número de FCAs de 5 ou mais criptas verificados nos diversos segmentos, como também em todo o segmento colônico (Tabela 4).

**TABELA 4** – Número de focos de criptas aberrantes com 5 ou mais criptas verificados nos grupos submetidos ao AOM, considerando os segmentos colônicos proximal, médio e distal, assim como o cólon inteiro. Os dados correspondem à análise da média e desvio padrão.

Segmento do cólon	Azoximetano + Água (média ± DP)	Azoximetano + Lisina (média ± DP)	Azoximetano + Própolis (média ± DP)	Azoximetano + Goma (média ± DP)	Significância (ANOVA)
Proximal	0,17 ± 0,41	0,00 ± 0,00	0,14 ± 0,38	0,00 ± 0,00	$p = 0,5764$
Médio	5,50 ± 4,72	6,00 ± 7,04	9,71 ± 7,83	2,57 ± 2,99	$p = 0,1974$
Distal	8,83 ± 5,64	5,33 ± 4,59	5,43 ± 3,87	4,43 ± 3,87	$p = 0,3469$
Cólon inteiro	14,50 ± 7,15	11,33 ± 8,43	15,29 ± 10,36	7,00 ± 4,69	$p = 0,2328$

DP: desvio padrão; ANOVA: análise de variância.

## 4.8 Ensaio biológicos

### 4.8.1 Avaliação da Genotoxicidade

#### 4.8.1.1 Cometa Alcalino em sangue periférico

Na avaliação do Cometa Alcalino em sangue periférico, comparações entre os grupos tratados com Água, Lisina, Própolis e Goma, expostos ou não ao Azoximetano, foram feitas pela ANOVA, associado à Tukey. Para cada tratamento, o teste  $t$  para dados não emparelhados foi usado para comparar o efeito da exposição ou não ao azoximetano (Tabela 5). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

**TABELA 5** – Avaliação da genotoxicidade por meio do ensaio do cometa alcalino no sangue periférico nos grupos tratados com Água, Lisina, Própolis e Goma, expostos ou não ao Azoximetano. Os dados correspondem à análise das medições, sendo expressos em unidades arbitrarias.

Exposição ao azoximetano	Água (média ± DP)	Lisina (média ± DP)	Própolis (média ± DP)	Goma (média ± DP)	Significância (ANOVA)
Não	7,80 ± 3,11	6,20 ± 2,28	8,60 ± 3,65	7,60 ± 2,07	$p = 0,6162$
Sim	9,67 ± 2,94	9,83 ± 2,32	9,86 ± 1,35	9,14 ± 2,41	$p = 0,9325$
Significância (teste $t$ )	$p = 0,3342$	$p = 0,0284$	$p = 0,4161$	$p = 0,2750$	

DP: desvio padrão; ANOVA: análise de variância.

#### 4.8.1.2 Micronúcleo em Reticulócitos de sangue periférico

Na avaliação de Micronúcleos em Reticulócitos de sangue periférico, comparações entre os grupos tratados com Água, Lisina, Própolis e Goma, expostos ou não ao Azoximetano, foram feitas pela ANOVA, associado à Tukey. Para cada tratamento, o teste *t* para dados não emparelhados foi usado para comparar o efeito da exposição ou não ao azoximetano (Tabela 5). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

**TABELA 6** – Avaliação da genotoxicidade por meio do teste do micronúcleo em reticulócitos no sangue periférico nos grupos tratados com Água, Lisina, Própolis e Goma, expostos ou não ao Azoximetano. Os dados correspondem à análise das medições efetuadas, sendo expressos como número de reticulócitos micronucleados por 1000 reticulócitos.

Exposição ao azoximetano	Água (média ± DP)	Lisina (média ± DP)	Própolis (média ± DP)	Goma (média ± DP)	Significância (ANOVA)
Não	1,20 ± 0,45	1,40 ± 0,55	1,60 ± 0,89	1,40 ± 0,55	<i>p</i> = 0,8014
Sim	1,67 ± 0,82	1,5 ± 0,55	1,71 ± 0,76	1,86 ± 1,07	<i>p</i> = 0,8929
Significância (teste <i>t</i> )	<i>p</i> = 0,2848	<i>p</i> = 0,7699	<i>p</i> = 0,8154	<i>p</i> = 0,4048	

DP: desvio padrão; ANOVA: análise de variância.

#### 4.8.1.3 Micronúcleo em Medula Óssea

Na avaliação de Micronúcleos em Medula Óssea, comparações entre os grupos tratados com Água, Lisina, Própolis e Goma, expostos ou não ao Azoximetano, foram feitas pela ANOVA, associado à Tukey. Para cada tratamento, o teste *t* para dados não emparelhados foi usado para comparar o efeito da exposição ou não ao azoximetano (Tabela 7). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

**TABELA 7** – Avaliação da genotoxicidade por meio do teste do micronúcleo na medula óssea nos grupos tratados com Água, Lisina, Própolis e Goma, expostos ou não ao Azoximetano. Os dados correspondem à análise das medições efetuadas, sendo expressos como número de eritrócitos policromáticos micronucleados por 2000 eritrócitos policromáticos.

Exposição ao azoximetano	Água (média ± DP)	Lisina (média ± DP)	Própolis (média ± DP)	Goma (média ± DP)	Significância (ANOVA)
Não	1,40 ± 1,14	1,00 ± 0,71	0,60 ± 0,55	0,80 ± 0,45	$p = 0,4121$
Sim	2,83 ± 1,47	3,33 ± 1,63	1,49 ± 1,27	2,57 ± 1,62	$p = 0,1578$
Significância (teste <i>t</i> )	$p = 0,1099$	$p = \mathbf{0,0162}$	$p = 0,2054$	$p = \mathbf{0,0404}$	

DP: desvio padrão; ANOVA: análise de variância.

## 4.8.2 Avaliação do Estresse Oxidativo

### 4.8.2.1 Glutaciona no Sangue periférico

Na avaliação de Glutaciona em sangue periférico, comparações entre os grupos tratados com Água, Lisina, Própolis e Goma, expostos ou não ao Azoximetano, foram feitas pela ANOVA, associado à Tukey. Para cada tratamento, o teste *t* para dados não emparelhados foi usado para comparar o efeito da exposição ou não ao azoximetano (Tabela 8). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

**TABELA 8** – Avaliação da glutaciona no sangue nos grupos tratados com Água, Lisina, Própolis e Goma, expostos ou não ao Azoximetano. Os dados correspondem à análise das medições efetuadas, sendo expressos em unidades arbitrárias.

Exposição ao azoximetano	Água (média ± DP)	Lisina (média ± DP)	Própolis (média ± DP)	Goma (média ± DP)	Significância (ANOVA)
Não	43,09 ± 3,032	38,11 ± 3,721	41,09 ± 4,714	37,09 ± 4,545	$p = 0,1165$
Sim	41,75 ± 2,83	37,89 ± 2,371	41,46 ± 3,294	39,79 ± 3,489	$p = 0,1310$
Significância (teste <i>t</i> )	$p = 0,4679$	$p = 0,9075$	$p = 0,8732$	$p = 0,2687$	

DP: desvio padrão; ANOVA: análise de variância.

### 4.8.2.2 TBARS em sangue periférico

Na avaliação do TBARS em sangue periférico, comparações entre os grupos tratados

com Água, Lisina, Própolis e Goma, expostos ou não ao Azoximetano, foram feitas pela ANOVA, associado à Tukey. Para cada tratamento, o teste *t* para dados não emparelhados foi usado para comparar o efeito da exposição ou não ao azoximetano (Tabela 9). Houve diferença estatística significativa entre os grupos AOM+própolis vermelha em relação ao grupo AOM+água.

**TABELA 9** – Avaliação de TBARS no sangue nos grupos tratados com Água, Lisina, Própolis e Goma, expostos ou não ao Azoximetano.

Exposição ao azoximetano	Água (média ± DP)	Lisina (média ± DP)	Própolis (média ± DP)	Goma (média ± DP)	Significância (ANOVA)
Não	12,60 ± 2,79	9,60 ± 2,97	12,00 ± 2,55	10,60 ± 3,21	$p = 0,3772$
Sim	32,17 ± 7,99	31,67 ± 3,20	22,00 ± 5,10 <sup>a,b</sup>	32,71 ± 4,99	$p = 0,0043$
Significância (teste <i>t</i> )	$p = 0,0006$	$p < 0,0001$	$p = 0,0025$	$p < 0,0001$	

DP: desvio padrão; ANOVA: análise de variância; a letra <sup>a</sup>( $P < 0,05$ ) denota diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos Azoximetano+Água e Azoximetano+Lisina, enquanto a letra <sup>b</sup>( $P < 0,01$ ) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Azoximetano+Goma (teste de Tukey).

#### 4.8.2.3 Relação entre Reticulócitos/Hemácias no Sangue periférico

Na avaliação da Relação entre Reticulócitos/Hemácias no sangue periférico, os dados correspondem à análise das medições efetuadas, sendo expressos em unidades arbitrárias. Comparações entre os grupos tratados com Água, Lisina, Própolis e Goma, expostos ou não ao Azoximetano, foram feitas pela ANOVA, associado à Tukey. Para cada tratamento, o teste *t* para dados não emparelhados foi usado para comparar o efeito da exposição ou não ao azoximetano (Tabela 10). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

**TABELA 10** – Relação reticulócitos/hemácias no sangue periférico verificada nos grupos tratados com Água, Lisina, Própolis e Goma, expostos ou não ao Azoximetano.

Exposição ao azoximetano	Água (média ± DP)	Lisina (média ± DP)	Própolis (média ± DP)	Goma (média ± DP)	Significância (ANOVA)
Não	47,20 ± 3,83	46,40 ± 5,32	52,00 ± 2,55	48,60 ± 5,98	$p = 0,2698$
Sim	39,33 ± 3,72	40,83 ± 3,97	43,00 ± 3,74	39,71 ± 3,45	$p = 0,2904$
Significância (teste <i>t</i> )	$p = 0,0074$	$p = 0,0778$	$p = 0,0009$	$p = 0,0084$	

DP: desvio padrão; ANOVA: análise de variância.

#### **4.9 Avaliação do peso dos órgãos**

Na análise realizada, comparando-se o peso dos órgãos dos grupos entre si, em relação aos fígados observou-se diferença estatística entre os grupos GIII e GIV ( $p \leq 0,01$ ), GII e GVI ( $p \leq 0,05$ ) e GI e GII ( $p \leq 0,05$ ). Já em relação aos baços observou-se diferença estatística entre os grupos GI e GVII ( $p < 0,01$ ). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nos pulmões, intestinos e rins (ANOVA associado ao teste de comparações múltiplas de Bonferrone) (Apêndice E e F).

## 5 DISCUSSÃO

A falta de seletividade nos tratamentos oncooterápicos muitas vezes atingem também as células normais de rápida proliferação como as células do tecido hematopoiético, germinativo, folículo piloso e do epitélio gastrintestinal. Desta forma é importante a busca constante de novas estratégias terapêuticas.

O Brasil por possuir a maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, com seu enorme litoral, e sua variada flora, não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais, (PINTO *et al.*, 2002). Atualmente, grande parte dos medicamentos encontrados no mercado é derivada direta ou indiretamente de vegetais, micro-organismos, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres (BRANDÃO *et al.*, 2010).

Muitos agentes foram testados em laboratórios buscando verificar sua eficácia na prevenção e tratamento de diversas neoplasias. Para estudos da carcinogênese colônica observa-se na literatura uma diversidade muito grande em relação à escolha das espécies animais, o método de indução da neoplasia do cólon e o período de exposição a supostos quimioprotetores. Uma das primeiras dúvidas sobre modelos experimentais é a decisão sobre o uso de ratos ou camundongos. O rato tem maior vantagem em relação ao seu tamanho que por ser maior que os camundongos têm-se mais facilidade na manipulação de seu cólon, entretanto os custos são maiores. Alguns trabalhos utilizam tanto ratos como camundongos knock-outs genéticos para redução do tempo de experimento. Pesquisadores tem se baseado na semelhança histopatológica dos métodos de indução de FCAs por dimetilhidrazina ou azoximetano (GUPTA, PRETLOW, SCHOEN, 2007; RAJU, 2008).

Fatores importantes que devem ser observados são as diferenças na anatomia, fisiologia e fenômenos biológicos que influenciam no desenvolvimento. Eles devem ser levados em consideração quando são analisados os resultados de qualquer pesquisa em ratos em que a idade é um fator crucial, principalmente quando os estudos efetuados pretendem fazer comparações com a vida humana. Alguns autores realizaram pesquisas experimentais em ratos e concluíram existir correspondência de 30 dias de vida do homem para cada dia de vida do rato (GITTES, 1986; KLEE *et al.*, 1990; IANDOLI *et al.*, 2000). Se comparados aos seres humanos, os ratos têm infância breve e acelerada. Desenvolvem-se muito rápido durante a infância e tornam-se sexualmente maduros com cerca de seis semanas de idade (ANDREOLLO *et al.*, 2012). Os ratos utilizados em nosso estudo tinham em média quatro semanas de vida (30 dias) no início do experimento, o que corresponderia aproximadamente a 13 anos em humanos (início da puberdade) e ao final do experimento, após quatro meses, em

torno de 23 anos também em humanos, ou seja, já seriam adultos jovens, em consonância com o proposto por Andreollo *et al.*, 2012.

A escolha de animais do mesmo sexo, feminino, nesse estudo, possibilitou resultados uniformes com menor número de animais, além de permitir a comparação com conclusões de outros estudos da literatura. Festing, 1979 e Moon e Fricks em 1977, demonstraram uma menor ocorrência de tumores induzidos por DMH em linhagem de ratos fêmeas em relação aos machos, levando em conta o aspecto hormonal de animais do sexo feminino. No entanto, têm-se demonstrado em humanos, concentrações significantes de receptores estrogênicos em quase todos os cânceres do aparelho digestivo (TOKUNAKA *et al* 1986; WOBBS, BEECH e KOENDERS, 1984; YAMAMOTO, NAKAJO e TAHARA, 1990). A mucosa gastrintestinal possui receptores estrogênicos e isso sugere que hormônios esteroides tenham um papel no crescimento e progressão de tumores nesse tecido. Estrogênio e seus receptores interagem com outras moléculas tais como receptores do fator de crescimento epidérmico e poliaminas, e por causa disso podem ter essa influência (DI LEO *et al*, 1992).

Avaliando-se os achados do presente estudo, percebe-se que não houve diferença significativa na variação da massa corporal dos animais em todos os grupos (I,II,III,IV,V,VI,VII e VIII), durante as 16 semanas do experimento. O azoximetano na dose administrada não interferiu na ingesta alimentar dos animais e nem as substâncias administradas nada alteraram em relação ao aumento de peso destes. Importante ressaltar aqui que a dose administrada nas ratas foi para causar lesões pré-neoplásicas por isso não chegou a provocar nos animais alterações olfativas, ou mesmo no paladar, fatores comuns, que podem culminar em anorexia e conseqüentemente caquexia, complicações comuns em muitos tipos de cânceres, principalmente quando esses se encontram em estágios avançados.

Esses achados estão de acordo com outros estudos que mostraram também não haver diferença estatística significativa no peso corporal de ratos submetidos ao AOM (GHAFAR *et al*, 2012; ZHONG *et al*, 2012; LAHOUAR *et al*, 2014).

Os achados de microscopia estereoscópica foram as criptas aberrantes clássicas e os focos de criptas aberrantes com até 4 criptas e com 5+ criptas aberrantes por foco (multiplicidade). Não foram identificados pólipos à visão estereoscópica.

Não foram encontradas criptas aberrantes nos animais dos grupos que não receberam azoximetano (GI, GII, GIII e GIV).

Na avaliação do número total de FCAs em segmento médio, observou-se que o número de FCAs no grupo Azoximetano+Goma foi significativamente menor (\* $p=0,0274$ ) que o verificado no grupo que recebeu Azoximetano+L-Lisina, entretanto esse resultado não nos

serve para interpretação clínica experimental. Em segmento distal, constatou-se que o número de FCAs observado nos grupos Azoximetano+Própolis (\*\* $p=0,0096$ ) e Azoximetano+Goma (\* $p=0,0250$ ) foi significativamente menor que o verificado no grupo Azoximetano+Água. Isso sugere que a própolis vermelha e a goma a 1% exerceram ação protetora, e que essa ação foi principalmente em segmento distal. Pode ser que a atividade antioxidante tão festejada da própolis vermelha e goma (MENDONÇA *et al.* 2015; TROMMER e NEUBERT, 2005) estejam contribuindo para este resultado.

Analisando-se o número total de FCAs, em todo o cólon, constatou-se que o número de FCAs observado no grupo Azoximetano+Goma foi significativamente menor que o verificado nos grupos Azoximetano+Água (\* $p=0,0166$ ). Percebe-se que a própolis vermelha e a goma arábica, agiram reduzindo a quantidade total do número de FCAs, apesar de não ter havido uma redução de significância estatística no grupo de Azoximetano+Própolis vermelha.

Não se justifica o fato da goma mostrar um resultado mais expressivo, já que o grupo experimental que recebeu Azoximetano+Própolis vermelha recebeu também solução de goma arábica a 1%, onde a própolis foi diluída. Entretanto, é importante lembrar que a própolis vermelha utilizada não foi tipificada apesar de ter sido avaliado sua capacidade de captação de radicais livres (AGUIAR *et al.*, 2018). Sendo um produto natural de composição complexa, inclui componentes vegetais e animais, não detalhados aqui, os quais podem ter apresentado atividade inibitória sistêmica dos efeitos benéficos causados pela a goma arábica, ou seja, apresentar alguma atividade que possa inibir o efeito da goma. Sabe-se que muitas substâncias antioxidantes podem se tornar pro oxidantes dependendo da quantidade a ser administrada e/ou absorvida. Interferência na absorção? Interferência na ação?

É importante mencionar que pesquisas anteriores mostraram que os FCAs não são igualmente distribuídos entre o cólon proximal, médio ou distal, e a maior parte desenvolve-se no cólon médio e distal (PARK, GOODLAD; WRIGHT, 1997; GHIRARDI *et al.*, 1999). A maioria dos tumores de cólon no modelo de rato com DMH / AOM são localizados no cólon distal, sendo menos frequentes no cólon proximal (PERSE; CERAR, 2011). Isso pode ser explicado por causa da deficiência nos mecanismos de reparo do DNA nesse segmento (LORIEN; NEWELL; HEDDLE, 2004). Nosso estudo encontra-se em conformidade com a literatura, pois a maioria dos FCAs foi encontrada no cólon distal e as diversas substâncias utilizadas (própolis vermelha, *L*-lisina e goma a 1%) não interferiram na distribuição dos FCAs nos diversos segmentos.

Segundo a literatura, Alencar e colaboradores, 2007, demonstraram que o extrato hidroetanólico de própolis vermelha na concentração de 90 µg/mL apresentou 57% de

atividade de inibição para radicais livres. Semelhantes resultados foram encontrados por Cabral *et al.* (2009) que observaram com a mesma concentração que o extrato foi capaz de inibir 50,5% dos radicais DPPH (1,1-Difenil-2-picrilhidrazil). Esses estudos também mostraram a presença de importantes componentes bioativos na própolis vermelha, tais como o ácido ferúlico, a daidizeína, a quercetina e a formononetina. Foi mostrado também ação anticancerígena e antioxidante por Alencar *et al.*, 2007, Oldoni *et al.*, 2011 e Pinheiro *et al.* 2014.

Mendonça *et al.*, 2015, estabeleceram o perfil químico da própolis vermelha brasileira e ratificaram sua propriedade antioxidante, como também mostraram sua influência em uma substancial diminuição na percentagem de sobrevivência celular de células tumorais humanas, como SF-295 (glioblastoma), OVCAR-8 (ovário) e HCT-116 (côlon). Com intensa atividade citotóxica para essas células, foi concluído que essa substância natural serve como um potencial fármaco anticancerígeno (MENDONÇA *et al.* 2015).

A ação farmacológica de componentes desse tipo de própolis, como a formononetina, têm sido demonstrada em estudos *in vitro* e *in vivo*, que possui ação antitumoral inibindo a proliferação de células prostáticas cancerígenas de origem humana (YE *et al.*, 2012) e células cancerígenas mamárias de ratos (CHEN *et al.*, 2013).

Alguns investigadores relataram inibição do estresse oxidativo *in vitro* (TROMMER e NEUBERT, 2005) e *in vivo* (EL DIN *et al.* 2003) da goma arábica. Em nosso estudo, talvez essa ação antioxidante tenha ocorrido em relação à redução de FCAs em grupos que receberam a própolis vermelha e goma arábica.

Trommer e Neubert, 2005, fizeram um estudo com oito compostos polissacarídeos diferentes (incluindo GA) para avaliar seus efeitos na redução da peroxidação, de antioxidantes e lipídios *in vitro*. Verificaram que GA protegeu contra a peroxidação lipídica na pele de forma dose dependente. El Din e colaboradores, 2003, mostraram em um estudo sobre a hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos, que, a goma arábica foi eficaz na proteção contra hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno, e que essa proteção pode envolver a redução do estresse oxidativo.

A goma arábica (GA), exudatos comestíveis, secos e gomosos da árvore *Acácia senegal*, foi utilizada como um agente antioxidante e citoprotetor, protegendo contra toxicidades hepáticas, renais e cardíacas experimentais em ratos (KADDAM *et al.* 2017).

Os focos de criptas aberrantes com maior número de criptas aberrantes são um achado que indica risco maior para desenvolvimento de tumores colônicos (PRETLOW *et al.* 1992). Os FCAs com 5+ criptas têm um risco maior de permanecerem e inclusive aumentarem de

tamanho pela multiplicidade e apresentam maiores chances de se transformar em tumores (SHIVAPURKAR *et al.*, 1994).

No estudo da multiplicidade dos FCAs em segmento proximal: até 4 criptas, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os quatro grupos que receberam carcinógeno em relação ao número de focos com até 4 criptas. Na multiplicidade dos FCAs em segmento médio: até 4 criptas, constatou-se que o número de FCAs observado no grupo Azoximetano+Goma foi significativamente menor (\*\* $p=0,0075$ ) que o verificado no grupo Azoximetano+Lisina, esse resultado do ponto de vista clínico experimental não nos interessa. Em relação à multiplicidade dos FCAs em segmento distal: até 4 criptas, o número de FCAs observado nos grupos Azoximetano+Própolis (\*\* $p=0,0060$ ) e Azoximetano+Goma ( $p=0,0295$ ) foi significativamente menor que o verificado no grupo Azoximetano+Água. Parece que a ação de proteção da própolis vermelha, assim como da goma são verificados também quanto a multiplicidade até 4 criptas.

Ao ser avaliado a multiplicidade dos FCAs em todo o cólon: até 4 criptas, constatou-se que o número de FCAs observado no grupo Azoximetano+Própolis foi significativamente menor que o verificado nos grupos Azoximetano+Água ( $p=0,0394$ ). Analogamente, o número de FCAs observado no grupo Azoximetano+Goma foi significativamente menor que o verificado nos grupos Azoximetano+Água ( $p=0,0127$ ). O que se observa na realidade é que quando computamos todos os FCAs anteriormente não existia diferença estatística significativa no grupo que recebeu AOM+Própolis, em relação ao que recebeu AOM+Água, contrariamente quando excluímos os FCAs com 5 ou mais criptas, voltamos a ter significância estatística do grupo que recebeu AOM+Própolis vermelha em relação ao controle, AOM+Água. Na verdade o que estava interferindo na significância estatística dessa substância eram os FCAs com 5 ou mais criptas. O que está envolvido nessa ação não se sabe, mas constatamos que aqui também obtivemos uma nítida ação de proteção tanto da própolis quanto da goma.

Continuando a avaliação da multiplicidade, observou-se que na multiplicidade dos FCAs com 5 ou mais criptas em segmento proximal, médio, distal, como também em todo o cólon, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os quatro grupos que receberam AOM. Essa condição de multiplicidade não nos permite concluir sobre a ação das substâncias. A multiplicidade de FCAs de 5 ou mais criptas não pôde ser explicado nesse aspecto com as condições experimentais de tempo e dose ao que os animais foram submetidos.

Sabe-se que a hiperplasia das criptas pode preceder o câncer de cólon, mas a primeira etapa no desenvolvimento do câncer, nos modelos experimentais, é o aparecimento de criptas displásicas ou de focos de displasia na mucosa colônica (PRETLOW *et al.* 1992). Nossos achados estão em conformidade com a literatura, pois mostraram que a maioria dos FCAs está situada em cólon distal, e que também estes são FCAs com 5+ criptas por foco, ou seja, com multiplicidade maior de criptas aberrantes.

Em síntese, quando se analisou o número de focos de criptas aberrantes e a multiplicidade destas nos diversos segmentos em grupos submetidos à carcinogênese, observou-se a predominância no segmento médio e distal e as substâncias administradas não interferiram de forma significativa na localização destas lesões, como também na multiplicidade desses FCAs.

Em nosso estudo a *L*-lisina não influenciou no número, distribuição e multiplicidade de criptas ou de focos de criptas aberrantes em animais que receberam carcinógeno e *L*-lisina, portanto, não ocorreu ação promotora da carcinogênese de cólon.

A genotoxicidade é um aspecto da genética que estuda as alterações na base genética da vida, e sendo assim, está sendo bastante pesquisadas devido a suas relações com malformações, doenças congênitas, doenças genéticas (mutagênese) e degenerativas, envelhecimento celular, câncer, dentre outras (ERDTMANN, SILVA e HENRIQUES, 2003).

Cada célula do corpo humano mantém certa homeostase entre substâncias químicas oxidantes e antioxidantes que são corriqueiras no metabolismo normal, transdução de sinais e regulação das funções celulares. O estresse oxidativo pode ser caracterizado como um distúrbio no equilíbrio entre elementos oxidantes e antioxidantes (POLI *et al.* 2004). Sabe-se que as células neoplásicas estão submetidas a níveis mais altos de estresse oxidativos do que células não neoplásicas (PERVAIZ, CLEMENT. 2004).

Todos os carcinógenos químicos iniciadores são eletrofílicos e possuem átomos deficientes em elétrons e altamente reativos que podem reagir com sítios nucleofílicos, que danificam o DNA diretamente, provocando mutação e eventualmente o câncer (WILLIAMS *et al.*, 2001).

O azoximetano (AOM) atua como um agente químico indutor de câncer colorretal em ratos em pesquisas experimentais e o mecanismo de ação deste carcinógeno é o estresse oxidativo dependente (ANILKUMAR *et al.*, 2010; Al-NUMAIR *et al.*, 2011; WALY *et al.*, 2012). Há relatos de que o estresse oxidativo induz a formação de peróxidos lipídicos e outras espécies reativas de oxigênio que desempenham um papel importante na patogênese do câncer (BASKAR *et al.*, 2012; HAMED, ZAKHARY e MAXIMOUS., 2012).

Os ensaios do cometa e do micronúcleo, utilizados para estimar lesões genômicas e o dano citogenético, respectivamente, induzido por agentes químicos ou físicos, demonstraram que em nosso estudo, as substâncias na dose administrada, não tiveram ação genotóxica e nem mutagênica não induzindo lesões no DNA de células do sangue periférico (leucócitos), visto que a frequência de células lesionadas e/ou micronucleadas não teve significância estatística.

No ensaio cometa em sangue periférico as alterações genotóxicas não foram expressivas, apesar de serem observados sinais de genotoxicidade nos animais que receberam carcinógeno, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos que receberam AOM, mas se observou danos de genotoxicidade com significância estatística apenas no grupo Azoximetano+L-lisina em relação ao seu controle, ou seja, o grupo que recebeu apenas L-lisina ( $p=0,0284$ ). Estes resultados podem estar inseridos no contexto de fagocitose esplênica das células com alguma genotoxicidade como observados por Ishi *et al*, 2011.

Os compostos quimiopreventivos (também chamados antimutagênicos) atuam em geral na desmutagênese e bioantimutagênese (WATERS *et al.*, 1990), e pode atuar diretamente no composto indutor de danos, principalmente por quelação ou inativação enzimática, ou mesmo trabalhando nas enzimas de reparação, favorecendo a correção dos danos causados no DNA pelo agente cancerígeno (KADA, INOUE e NAMIKI., 1982; KADA e SHIMOI, 1987). A redução das células micronucleadas circulantes também pode ocorrer por fagocitose esplênica (BAZO *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2005; ISHII *et al*, 2011).

Publicação recente sobre câncer bucal justifica que os danos no DNA ou micronúcleos em células da mucosa bucal ou do sangue periférico reflete uma exposição recente a agentes agressivos (físicos, químicos e/ou ambientais) e geralmente são usados como medidor dessa exposição (SABINO, TIRAPELLI e FONSECA, 2015).

Ao avaliar os efeitos genotóxicos do AOM em medula óssea, na comparação entre os grupos submetidos ao AOM não ocorreu significância estatística. O que se observou foram danos de genotoxicidade nos grupos Azoximetano+L-lisina e Azoximetano+Goma, e seus respectivos controles L-Lisina ( $p= 0,0162$ ) e Goma ( $p= 0,0404$ ).

Em alguns carcinógenos conhecidos pode ocorrer um baixo nível de ativação metabólica na medula óssea, onde o teste de micronúcleo pode ser ineficiente em detectar os efeitos dessas substâncias sobre os cromossomos de indivíduos expostos. Grande parte dessas substâncias tem capacidade de induzir micronúcleos só quando aplicadas em doses extremamente altas, ou perto da dose letal. Nesse caso é comum que muitos mutagênicos não sejam detectados, pelo fato do teste em medula óssea não ser sensível o bastante (AGOSTINI,

1993). Em nosso estudo, porém, mesmo com a dose administrada do carcinógeno, suficiente para provocar apenas lesões pré-neoplásicas, o teste sinalizou para isso.

A escolha de se fazer uma integração do ensaio cometa e teste do micronúcleo foi aplicada com êxito na avaliação de substâncias reconhecidamente genotóxicas por Bowen *et al*, 2011. Essa interação foi também sugerida no 5<sup>o</sup> *International Workshop on Genotoxicity Testing* (IWGT), com a intenção de aprimorar os ensaios de genotoxicidade *in vivo*, combinando ensaio cometa com o teste de micronúcleo em um mesmo animal, de modo a reduzir o número de animais em estudo, como também a quantidade da substância em teste (ROTHFUSS *et al*, 2011).

Foram realizados três outros ensaios paralelos para se avaliar genotoxicidade de hepatócitos: ensaio cometa alcalino sem e com enzima (Fpg) e micronúcleo.

No teste do cometa alcalino em hepatócitos, detectou-se genotoxicidade em todos os grupos que receberam AOM. Na comparação entre os grupos observou-se redução da genotoxicidade hepática com significância estatística no grupo que recebeu AOM + Própolis vermelha em relação ao que recebeu AOM + Água ( $p < 0,001$  - ANOVA associado ao teste Tukey) (Apêndice G).

Em teste mais específico o do cometa alcalino com enzima Formamidopirimidina DNA glicosilase (Fpg), que tem a propriedade de aumentar a sua sensibilidade detectando lesões específicas, reconhece nucleotídeos abásicos (que perderam suas bases nitrogenadas), geralmente por um aumento do estresse oxidativo, ou seja, averiguando oxidação de nucleotídeos. Neste ensaio, foi detectado que não apenas a própolis vermelha ( $p < 0,0001$ ), mas que também a *L*-lisina ( $p < 0,005$ ) protegeu da ação de genotoxicidade hepática do AOM quando comparado com o controle AOM + Água (Apêndice H).

Por fim na avaliação do fígado, em ensaio de micronúcleo em hepatócitos, a própolis se mostrou também efetiva na proteção da mutagenicidade pelo AOM ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo que recebeu AOM + Água (Apêndice I).

No presente estudo, os ratos submetidos ao AOM apresentaram danos aos hepatócitos, sugerindo genotoxicidade hepática, mas a própolis vermelha brasileira parece diminuir o estresse oxidativo reduzindo a hepatotoxicidade (genotoxicidade) em um modelo de câncer de cólon. Este efeito observado pode ser atribuído ao seu rico conteúdo de compostos fenólicos.

As células estáveis constituem o parênquima da maioria dos tecidos sólidos, como fígado. Apesar de o fígado ter grande capacidade de regeneração após lesão ou perda de massa tecidual, este órgão possui células quiescentes que em seu estado normal possuem baixa atividade replicativa (FAUSTO. 2004).

Pesquisas indicam que a AOM é um potente carcinogênico para o fígado e mesmo em baixas doses induz hepatotoxicidade (BÉMEUR, DESJARDINS e BUTTERWORTH, 2010; MEGARAJ *et al.*, 2014). Estudos demonstraram que AOM induz lesões crônicas em fígado de murinos (LAHOUAR *et al.*, 2014). Outros estudos mostraram que esse carcinógeno induziu danos hepáticos, sendo observada elevação dos níveis circulantes de aminotransferases e bilirrubina total (GÜROCAK *et al.*, 2013). Foi relatado também, que o AOM inicia estresse oxidativo hepático e modifica as atividades de enzimas antioxidantes (BURLAMAQUI *et al.*, 2013).

Também no fígado, foi mostrado efeito antioxidante protetor da própolis em lesões hepáticas de varias durações e isquemia hepática aguda (DROGOVOZ *et al.* 1994). A formononetina pode reduzir a disseminação da inflamação no organismo a partir da diminuição na formação de radicais livres, impedindo assim a peroxidação lipídica. Essa substância é uma das isoflavonas e um dos componentes majoritários da própolis vermelha brasileira, utilizada em nosso experimento, possuindo ação anti-inflamatória e antioxidante (DAUGSCH *et al.*, 2008).

Em nossos achados, tanto a própolis vermelha (cometa alcalino no fígado com e sem enzima Fpg) quanto a *L*-Lisina (cometa alcalino no fígado com enzima Fpg) protegeram os hepatócitos da genotoxicidade observados através do estudo de mutagênese. Dornelas *et al* observaram os efeitos protetores da *L*-Lisina e Própolis verde em 2014, quando avaliaram a genotoxicidade da própolis verde e da *L*-lisina, bem como seus efeitos sobre o possível dano celular nos eritroblastos (medula óssea) e leucócitos (sangue periférico) causados pelo carcinógeno BBN (n - butil - n - 4 - hidroxibutil nitrosamina) em ratos submetido a carcinogênese da bexiga observaram que os ratos que receberam apenas BBN e água, apresentaram maior dano de DNA em leucócitos periféricos (ECA) e o maior número de micronúcleos em eritrócitos da medula óssea (MN) em relação a todos os outros grupos que receberam BBN e lisina e /ou própolis. Concluíram então, que tanto a própolis verde quanto a *L*-lisina foram eficazes na proteção contra a genotoxicidade em medula óssea e sangue periférico, além de não serem genotóxicos na direção das células avaliadas, nas doses e tempos administrados (40 semanas) e de acordo com os dois testes utilizados.

O estresse oxidativo, ponto importante a ser avaliado, devido ao metabolismo do azoximetano foi analisado através dos testes da dosagem da glutathiona e TBARS no sangue periférico. A glutathiona não mostrou alteração significativa, demonstrando que ela não vinha sendo utilizada no momento prévio a eutanásia, e seus níveis permaneceram estáveis.

Ao se analisar os grupos através do ensaio TBARs observou-se que há peroxidação lipídica em todos os grupos que receberam carcinógeno em comparação aos grupos que não receberam. Houve significância estatística com redução da peroxidação lipídica no grupo tratado com própolis vermelha em relação aos grupos Azoximetano+Água e Azoximetano+L-Lisina, como também em relação ao grupo Azoximetano+Goma, o que sugere que a própolis vermelha teve uma ação protetora no estresse oxidativo. Esse estresse oxidativo entraria na formação de criptas aberrantes no cólon, como também na genotoxicidade hepática e a própolis vermelha reduziu esse estresse oxidativo. Pode ser também que esse estresse oxidativo possa estar relacionado com algum comprometimento na toxicidade pulmonar já descrita na literatura (CHAN, COOK, STANNERS, 2006). Por outro lado, a glutathiona parece não está sendo gasta com esse estresse oxidativo.

Cabral *et al.*, (2009) demonstraram que a própolis vermelha possui alta atividade antioxidante e antibacteriana e que algumas subfrações são mais ativas biologicamente que o extrato bruto.

O estresse oxidativo está intrinsecamente envolvido em várias alterações metabólicas e inflamatórias, o efeito pró-oxidante está relacionado á varias doenças, como doença cardiovascular, doenças neuro-degenerativas, doenças autoimunes e cânceres, ora como sua causa, ora como sua consequência (VELLOSA *et al.* 2013).

Reticulócitos são eritrócitos (ou hemácias) imaturos. Como as hemácias, os reticulócitos não apresentam núcleo, e são chamados assim por possuírem uma malha reticular de RNA ribossômico que só é visível ao microscópio quando corada com azul de cresil brilhante. Pode-se concluir que o reticulócito expressa à produção medular de novas hemácias (ADAMSON, *et al.* 2001).

Quanto á relação reticulócitos/hemácias, nos grupos que receberam água, L-lisina, própolis vermelha e goma sem carcinógeno, comparados com quando expostos ao AOM, ela mostrou que houve redução no número de reticulócitos, portanto, menor renovação de células lesadas, especificamente naqueles que receberam água, própolis vermelha e goma, sendo maior a significância no grupo que recebeu própolis vermelha. Mas na comparação entre os grupos que receberam AOM não ocorreu significância estatística. Ocorreu um prejuízo na formação dos reticulócitos, mas sem diferença estatística entre os grupos. Parece que a ação a nível medular e funcional discreta se deve provavelmente ao azoximetano.

Estudos apontam que a genotoxicidade pode estar relacionada com a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) que provocam estresse oxidativo grave dentro das células

através de alterações nas macromoléculas celulares, incluindo lipídios oxidados, proteínas e DNA (BOLTON *et al.* 2000).

A homeostase do epitélio colorretal é devido ao equilíbrio entre proliferação celular e morte celular. O CCR se dá através do crescimento anormal das células colônicas com proliferação excessiva (YAMAGUCHI, BHALLA, WANG. 2003). O estresse oxidativo tem função importante no mecanismo molecular de desenvolvimento e progressão de neoplasia de cólon (SERIL *et al.* 2003). Alguns estudos revelaram que uma dieta rica em fotoquímicos está associada à diminuição do risco de câncer. Os muitos compostos químicos que estão presentes em produtos dietéticos naturais foram aprovados como antioxidantes e entidades quimiopreventivas (BAGCHI *et al.*, 2000; MURTHY *et al.*, 2009).

De acordo com Lahouar *et al.*, 2014, o metabolismo do AOM produz extrema reação com o radical hidroxílico que induz o estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio (ROS) resultantes da peroxidação lipídica induzem a danos proteicos, a fragmentação do DNA, mutações genéticas e perda da integridade de membrana (ANILAKUMAR *et al.*, 2010).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ocorreu uma ação protetora da própolis vermelha em algumas avaliações do número de FCAs em animais que receberam AOM, como também na genotoxicidade em hepatócitos. Quanto ao estresse oxidativo ocorreu peroxidação lipídica (TBARS) e a própolis vermelha reduziu o estresse oxidativo em análise de TBARS.

A *L*-lisina não interferiu no número de lesões preneoplásicas e nem na genotoxicidade em grupos submetidos ao AOM. A *L*-lisina não exerceu efeito protetor e nem promotor do câncer colorretal induzido pela AOM.

Como achado interessante, a goma arábica reduziu significativamente o número total de FCAs em algumas avaliações, assim teve uma ação protetora contra a carcinogênese colorretal.

Espera-se que os estudos com a própolis vermelha como agente quimioprotetor possam avançar, e com isso promover achados importantes e conclusivos que possam levar ao tratamento de muitos tipos de cânceres, em especial no câncer colorretal, que muito acomete cidadãos do mundo inteiro.

## 7 CONCLUSÃO

A própolis vermelha reduziu as lesões pré-neoplásicas em cólon distal considerando o número total de FCAs, e em cólon distal e em todo o cólon considerando número de FCA até 4 criptas.

A *L*-lisina, não exerceu efeito protetor e nem promotor da carcinogênese colorretal induzida pelo azoximetano, em lesões pré-neoplásicas.

A própolis vermelha e a *L*-lisina não demonstraram ação protetora para a genotoxicidade e mutagênese em sangue periférico e em medula óssea nas doses e tempos administrados.

O estresse oxidativo avaliado pelo TBARs estava aumentado em todos os animais que receberam AOM, e a própolis vermelha apresentou redução do estresse oxidativo.

A goma arábica exerceu proteção das lesões pré-neoplásicas em cólon distal e em todo o cólon, considerando o número total de FCAs e número de FCAs até 4 criptas.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, A. P. L. **Estudo comparativo da atividade antiinflamatória e antifúngica de extratos de própolis vermelha e verde**. 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Fortaleza. 2008.
- ADAMSON J.W., *et al.* Anemia and polycythemia, in: **Harrison's Principles of Internal Medicine**. (15th Edition). McGraw Hill (New York), 2001.
- AGOSTINI, J.M.S. O teste de micronúcleo: seu uso no homem. **Biotemas**. v. 6, n.2, p. 1-19.1993.
- AGUIAR, G. R. *et al.* . Estudo químico e avaliação biológica da própolis vermelha de alagoas. **Rev. Virtual de Quím**, 2018.
- AHN, M.R. *et al.* Antioxidant activity and constituents of própolis collected in various areas of Korea. **J Agric Food Chem** v. 52, p. 7286-7292, 2004.
- ANILAKUMAR, K.R., *et al.* Effect of Aloe vera gel extract on antioxidant enzymes and azoxymethane-induced oxidative stress in rats. **Indian J Exp Biol**. v. 48,p. 837-42. 2010.
- ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. C. *et al.* Effect of bovine type-I collagen-based films containing red própolis on dermal wound healing in rodent model. **Int. J. of Morphol**. v.27, n.4, p. 1105-1110. 2009.
- ALENCAR, S.M. *et al.* Composição química de *Baccharis dracunculifolia*. **Ciência Rural** v.35. p. 909-915. 2005.
- ALENCAR, S.M. *et al.* Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **J Ethnopharmacol.** v. 113, n.2, p. 278-283. 2007.
- ALI, B.H., ZIADA A., BLUNDEN G. Biological effects of gum arabic: a review of some recent research. **Food Chem Toxicol**. v. 47, p. 1–8. 2009.
- ALI, B.H. *et al.* Effects of Gum Arabic in rats with adenine-induced chronic renal failure. **Exp Biol Med (Maywood)**. v. 235, p. 373–382. 2010.
- ALI, B.H. *et al.* Motor and behavioral changes in rats with adenine-induced chronic renal failure: influence of acacia gum treatment. **Exp Biol Med (Maywood)**. v. 236, p.107–112. 2011.
- ALI, B.H., *et al.* Effect of Acacia gum on blood pressure in rats with adenine-induced chronic renal failure. **Phytomedicine**. v.18, p.176–1180. 2011.
- ALMEIDA, E. B. *et al.* The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing C. **J Ethnopharmacol.**; v.147, p.419-425. 2013.
- Al-NUMAIR, K.S., *et al.* Dietary folate protects against azoxymethane-induced aberrant crypt foci development and oxidative stress in rat colon. **Exp Bio Md. (Maywood)**v. 236, p.1005-

11. 2011.

ANILKUMAR, K.R., *et al.* Effect of aloe vera gel extract on antioxidant enzymes and azoxymethane induced oxidative stress in rats. **Indian J Exp Biol.** v.48, p. 837-42. 2010.

ALRAWI, S.J. *et al.* Aberrant Crypt Foci. **Anticancer Res**, v.26, p.107–119. 2006.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2016 - Resolução - RDC No -24, de 14 de junho de 2011 (atualizada até A RDC 97 de 01 DE agosto de 2016). Brasília, 4p. 2016.

ANDREOLLO, N. A. *et al.* Idade dos ratos versus idade humana: Qual é a relação? **ABCD Arq Bras Cir Dig.** v.25, n.1; p.49-51. 2012.

AWALE, S. *et al.* Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic & Med Chem**; v.16; p.181-189. 2008.

BADRELDIN, H. A., *et al.* Effect of Gum Arabic on Oxidative Stress and Inflammation in Adenine-Induced Chronic Renal Failure in Rats. **PLOS ONE.** v. 8. 2013.

BAGCHI, D. *et al.* Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. **Toxicology.** v.148: p.187–197. 2000.

BANKOVA, V., CASTRO S.L., MARCUCCI, M.C., Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie.** v. 31; p. 3–15. 2000.

BALLESTER, V., RASHTAK, S., BOARDMAN, L. Clinical and molecular features of young-onset colorectal cancer. **World J Gastroenterol.** v.5, n.22, p.1736-1744, 2016.

BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. **Nutrire: Rev da Soc Bras de Aliment e Nutrição.** v. 33, n. 2, p. 111-128. 2008.

BARBOSA, M. H. *et al.* Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paul Enferm.** v. 22, n.3; p. 318-22. 2009.

BASKAR, R., *et al.* Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. **Int J Med Sci**, v. 9, p. 193-9. 2012.

BAZO, A.P., *et al.* Protective action of propolis on the rat colo carcinogenesis. **Teratog. Carcinog. Mutagen.** 22: 183-19. 2002.

BATISTA, L. L. V. *et al.* Estudo comparativo do uso tópico de própolis verde e vermelha na reparação de feridas em ratos. **Rev. Col. Bras. Cir**; v.39, n.6, p. 515-520. 2012.

BELPAEME, K.; COOREMAN, M.; KIRSCH-VOLDERS M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutat Res.**, v. 415, n. 3, p. 167-84, 1998.

BÉMEUR, C., DESJARDINS P., BUTTERWORTH R.F. Antioxidant and anti-inflammatory effects of mild hypothermia in the attenuation of liver injury due to azoxymethane toxicity in the mouse. **Metab Brain Dis**, v.25, p.23-9. 2010.

- BERNHEIM, F.; BERNHEIM M. L. C.; WILBUR K. M. J. The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products on certain lipids. **J. Biol. Chem.** v. 174, p. 257-264. 1948.
- BEZERRA, K. K. S. *et al.* Vaginal Yeasts and the Antifungal Action of Red Propolis Extract. **Internatl Arch of Med.**Section: Microbiology ISSN: 1755-7682 ,v. 8 , n. 154. iMedPub Journals . Disponível em: <http://journals.imed.pub> . Acesso em 25/10/2016. 2015.
- BIRD, R. P. Observations and quantification of aberrant crypts in the murine colo treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Lett.** v. 37, n. 2, p. 147-151, 1987.
- BIRD, R.P.; MCLELLAN, E.A.; BRUCE, W.R. Aberrant crypts, putative precancerous lesions, in the study of the role of diet in the a etiology of colon cancer. **Cancer Surv.** v.8, p.189–200. 1989.
- BIRD, R.P. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Cancer Lett.** v.93, n.1, p.55-71. 1995.
- BIRD, R. P., “Aberrant crypt foci system to study cancer preventive agents in the colon,” in *Methods in Molecular Medicine: Tumor Marker Protocols*, M. Hanausek and Z. Walaszek, Eds., p. 465–474, **Humana Press**, Totowa, NJ, USA, 1998.
- BIRD, R.P. & GOOD, C.K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Toxicol Lett.** v.15, n.112-113, p. 395-402. 2000.
- BLISS, D.Z., *et al.* Supplementation with gum arabic fiber increases fecal nitrogen excretion and lowers serum urea nitrogen concentration in chronic renal failure patients consuming a low-protein diet. **Am J Clin Nutr.** v. 63, p. 392–398. 1996.
- BOLTON, J.L. *et al.* Role of quinones in toxicology. **Chem Res Toxicol.**, v.13, n.3, p.135-60, 2000.
- BÜCKER, A. , CARVALHO W. , ALVES-GOMES J. A.. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazonica.** v. 36, n.3, p.357 – 364. 2006.
- BUENO-SILVA, B. *et al.* Anti-Inflammatory and Antimicrobial Evaluation of Neovestitol and Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis. **J. Agric. Food Chem;** v.61, n.19, p.4546-4550. 2013.
- BUENO-SILVA, B., *et at.* Effect of neovestitol-vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm in vitro and development of dental caries in vivo, **Biofouling** . v.29. p. 1233 e 1242. 2013.
- BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee própolis (própolis). **Food Chem Toxicol** . v.36: p.347-363. 1998.
- BURLAMAQUI, I.M. *et al.* Optimization of visibility and quantification of aberrant crypt foci in colonic mucosa in Wistar rats. **Acta Cir Bras.** v.25, n.2, p.148-52. 2010.

- BURLAMAQUI, I.M., *et al.* Hepatic repercussions of azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis. **Rev Col Bras Cir.** v. 40, p.137-41. 2013.
- BRANDÃO, H. N. *et al.* Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quim. Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-69, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jan. Seção 1, p. 18. 2001.
- CABRAL, I.S.R. *et al.* Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Quim. Nova.** XY, p.1-5. 2009.
- CADERNI, G. *et al.* P. Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: correlation with carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 63, p.2388-2392. May 2003.
- CAMPANA, M. A. *et al.* Micronuclei induction in *Rana Catesbeiana* tadpoles by the Pyrethroid insecticide lambda-Cyhalothrin. **Genetics and Molec Biology.** , v. 26, n.1, p. 99-103. 2003.
- CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia.** v. 73, n.1, S1–S6. 2002.
- CASTRO, M.L.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.. Própolis do sudeste e nordeste do brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Quim. Nova**, v. 30, n.7, p.1512-1516. 2007.
- CIDRE, D C M. “Análise Computacional de Imagens de Focos de Criptas Aberrantes”. 2012. 84f. Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica. Universidade do Porto. 2012.
- CHANG, W. W. L., “Histogenesis of colon cancer in experimental animals,” **Scandinavian J Gastroenterol**, v. 19, p. 27–43, 1984.
- CHAN, A. O. O. *et al.* CpG Island Methylation in Aberrant Crypt Foci of the Colorectum. **Am. J. Pathol.**, v.160, p.1823–1830. 2002.
- CHAN, C. H., COOK, D., e STANNERS, C. P. Increased colon tumor susceptibility in azoxymethane treated CEABAC transgenic mice. **Carcinogenesis.** v. 27, n.9.; p.1909–1916. 2006.
- CHENG, L.; LAI, M. D. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. **World J Gastroenterol.**, v. 9, p. 2642–9. 2003.
- CHEN, J. *et al.* Diversity and Taxonomy of Endophytic Xylariaceous Fungi from Medicinal Plants of *Dendrobium* (Orchidaceae). **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.
- CHO, N. *et al.* Aberrant Crypt Foci in the Adenoma Prevention with Celecoxib Trial. **Cancer Prev. Res.**, v.1, p.21–31. 2008.

- COLLINS, A.R; DUSINSKA, M.; FRANKLIN, M. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications. **Environ. Mol. Mutagen.** v. 30. p. 139–146. 1997.
- COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair. **Mol. Biotechnol.** v. 26, p. 249-261. 2004.
- COTTI, G. C. C. *et al.* Genética do câncer colorretal. **Rev Med (São Paulo)**. v.2/4, n.79, p. 45-64, 2000.
- CUNHA, I.B.S. *et al.* Factors that influence the yield and composition of Brazilian própolis extracts. **J Braz Chem Soc.** 15: 964-970. 2004.
- DA SILVA, F. C. *et al.* Update on hereditary colorectal cancer. **Anticancer Res.**, v.9, n.36, p.4399-4405. 2016.
- DASHWOOD, R. H., Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an “A to Z” guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. **Mutat Res.** n. 511, p.89-112. 2002.
- DAUGSCH, A. **A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas.** 2007.144f. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP. 2007.
- DAUGSCH, A. *et al.* Brazilian red propolis - chemical composition and botanical origin. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 5, n. 4, p. 435-441. 2008.
- DALEPRANE, J. B. *et al.* Suppression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  contributes to the antiangiogenic activity of red propolis polyphenols in human endothelial cells. **The J Nutrition**, v.142, p. 441-7. 2011.
- DALEPRANE.J.B. *et al.* Anti-atherogenic and antiangiogenic activities of polyphenols from própolis. **J Nutritional Biochem**; v. 23, n.6, p. 557-566. 2012.
- DALEPRANE J.B., ABDALLA D.S., Emerging roles of Propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions, **Evid Based Complement Alternat Med** Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/175135>. Acesso em : 21/09/2016.2013.
- DELGADO-ZAMARREÑO. M. M. *et al.* Pressurized liquid extraction as a sample preparation method for the analysis of isoflavones in pulses. **Analytical and Bioanalyt Chem.** v. 404, n. 2, p. 361-366, 2012.
- DI LEO, A.; LINSALATA, M.; CAVALLINI, A.; MESSA, C.; RUSSO, F. Sex steroid hormone receptors, epiderm growth factor receptor, and polyamines in human colorectal cancer. **Dis. Colon Rectum.** v.35, p.305-9. 1992.
- DIETRICH J. Dossiê Gomas. Globalfood Sistemas, Ingredientes e Tecnologia para Alimentos Ltda. **FOOD INGREDIENTS BRASIL N° 32** –Disponível em: [www.revista-fi.com](http://www.revista-fi.com) ; Acesso em: 02/10/2017. 2015.

DORLAND'S Illustrated Medical Dictionary, 24th ed. Philadelphia, PA: **W. B. Saunders Company**, 1965.

DORNELAS, [A. C.](#) *et al.*; Chemoprevention with green propolis green propolis extracted in *L*-lysine *versus* carcinogenesis promotion with *L*-lysine in N-Butyl-N-[4-hydroxybutyl] nitrosamine (BBN) induced rat bladder cancer. **Acta Cir. Bras.** v. 27, n. 8, p. 529 – 536 . 2012.

DORNELAS C. A., *et al.* . [Potential chemoprotective effects of green propolis, L-lysine and celecoxib on bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes of Wistar rats subjected to bladder chemical carcinogenesis.](#) **Acta Cir Bras.** v. 29, n.7, p. 423-8. 2014.

DROGOVOZ, S. M. *et al.* Examining the hepatoprotective properties of pediatric propolis dosage form in animals of various age groups. **Experim and Clinical Pharm.** v.57, p.39±42. 1994.

EL DIN, G., *et al.* Protective effect of arabic gum against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **Pharmacol. Res.** v.48, p. 631–635. 2003.

ERDTMANN, B., SILVA J., HENRIQUES J. A. P. A genotoxicidade nossa de todos os dias. **Genética Toxicol.** Porto Alegre: Alcance. 2003.

EDDY, D.M. Screening for colorectal cancer. **Ann Intern Med.** v.113, n.5. p.373-84. 1990.

EFFERTH, T. “Signal transduction pathways of the epidermal growth factor receptor in colorectal cancer and their inhibition by small molecules”. **Curr Med Chem**, v.19, n. 33, p.5735-5744. 2012.

ERB, W. H. Entwicklungsgeschichte der rothen blutkörperchen. **Virchows Archiv.** v. 34, p. 138. 1865

ESPINOSA, R.R. *et al.* Antioxidant activity of phenolic compounds added to a functional emulsion containing omega-3 fatty acids and plant sterol esters, **Food Chem.** v.182 . p. 95 e 104. 2015.

FEARON, E.R., VOGELSTEIN B. [A genetic model for colorectal tumorigenesis.](#) **Cell.** Jun v.1;61, n.5: p. 759-67. 1990.

FAUSTO, N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells and stem cells. (A review of the cellular and molecular mechanisms of liver regeneration). **Hepatology.** v.39: p.1477, 2004.

FENECH, M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes –a biomarker for DNA damage in human populations. **Mutat Res.** v. 404, p. 155-165. 1998.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat Res.**, v.455, p.81-95, 2000.

FEMIA, A. M. and CADERNI G., “Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products,” **Planta Med**, v. 74, n. 13, p. 1602– 1607. 2008.

- FEMIA, A. M. *et al.* Correspondence between flat aberrant crypt foci and mucin-depleted foci in rodent colon carcinogenesis. **Anticancer Res.** v. 28, n. 6 A, p. 3771–3775, 2008.
- FESTING, M.F.W. Inbred strains in biomedical research. **Macmillan Press**, New York, p.483. 1979.
- FINI, M. *et al.* Effect of L-lysine and L-arginine on primary osteoblast cultures from normal and osteopenic rats, **Biomed. Pharmacother.**, v.55, n.4, p.213-220. 2001.
- FLAKOLL, P., *et al.* Effect of beta-hydroxy-beta-methyl butyrate, arginine, and lysine supplementation on strength, functionality, body composition, and protein metabolism in elderly women. **Nutrition.** v. 20, n.5, p. 445-451. 2004.
- FONTANA, J.D. *et al.* Própolis: chemical microheterogeneity and bioactivity: therapeutic uses of this bee-product. In: Spencer JFT, Ragout De Spencer AL. **Environ microbiol: methods and protocols.** Totowa: Humana Press; p. 203-218. (Methods in Biotechnology, 16). 2004.
- FLODIN, N.W. The metabolic roles, pharmacology, and toxicology of lysine. **J Am. Coll. Nutr.**, v.16 , n.1, p. 7- 211. 1997.
- FRANCHI, G. C. JR. *et al.* Comparison of effects of the ethanolic extracts of Brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. **Evid Based Complement Alternat Med.** p.1-6. 2012.
- FRANCHIN, M. *et al.* Bioactive fraction of e o própolis from *Melipona scutellaris* decreases neutrophils migration in the inflammatory process: involvement of nitric oxide pathway. **Evid Based Complement Alternat Med.** Disponível em: <http://dx.doi.org> , Acesso em : 12/08/2016. 2013.
- FREIRES, I. A., ALENCAR S. M. , ROSALEN P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European J Medicinal Chem.** v.110 , p. 267 e 279. Journal homepage: Disponível em: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>. 2016.
- FROZZA, C. O. S. *et al.* Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food Chem Toxicol.** v.52, p.137- 142. 2013.
- FROZZA C.O.S. *et al.* Proteomic analysis identifies differentially expressed proteins after red própolis treatment in Hep-2 cells, **Food Chem. Toxicol.** v.63, p. 195 e 204. 2014.
- GHAFFAR, S.A.A. *et al.* Kenaf seed supercritical fluid extract reduces aberrant crypt foci formation in azoxymethane-induced rats. **Experim and Toxicolc Pathol.** v.64; p. 247-251. 2012.
- GATTÁS, G. J. F.; LONGATTO, F. A.; MAEDA; M.Y.S. Identificação de micronúcleos (MN) em células de cólon uterino de pacientes assintomáticas: correlação dos métodos de Papanicolau e Feulgen-fast-green. **Folha Med.**, v.104, p.57-9, 1992.

- GAMAL EL-DIN, A.M. *et al.* Protective effect of arabic gum against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **Pharmacol Res.** v. 48, p. 631–635. 2003.
- GARCIA, R.C. *et al.* Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre a *Pasteurella multocida* in vitro e em coelhos. **Acta Scientiarum: Animal Sci.** v. 26, n.1, p.69-44. 2004.
- GHIRARDI, M. *et al.* Azoxymethane-induced aberrant crypt foci and colorectal tumors in F344 rats: sequential analysis of growth, **European Surgical Res**, v. 31, n. 3, p. 272–280. 1999.
- GHISALBERTI, E.L. Própolis: a review. **Bee World**, v.60, p.59-84. 1979.
- GITTES, R.F. Carcinogenesis in ureterosigmoidostomy. **Urol Clin. North Am.** v.13, n.2: p. 201-05. 1986.
- GOMES, C.I.M.R. *et al.* Estudo sobre a acurácia da colonoscopia na detecção do câncer colorretal. **Rev Méd Minas Gerais.** v.23, n. 3: p.307-10. 2013.
- GUPTA, A.K.; PRETLOW, T.P.; SCHOEN, R.E. Aberrant crypt foci: What we know and what we need to know. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, v.5, p.526–533. 2007.
- GUPTA, A.K.; SCHOEN, R.E. Aberrant crypt foci: Are they intermediate endpoints of colon carcinogenesis in humans? **Curr. Opin. Gastroenterol.** v.25, p.59–65. 2009.
- GÜROCAK, S. *et al.* Preventive effects of resveratrol against azoxymethane induced damage in rat liver. **Asian Pac J Cancer Prev.** v.14, p.2367-70. 2013.
- GREENSPAN, E.J. *et al.* Microsatellite instability in aberrant crypt foci from patients without concurrent colon cancer. **Carcinogenesis**, v.28, p.769–776. 2007.
- HAMED, E.A., ZAKHARY M.M., MAXIMOUS D.W. Apoptosis, angiogenesis, inflammation, and oxidative stress: basic interactions in patients with early and metastatic breast cancer. **J Cancer Res Clin Oncol.** v.138, p.999-1009. 2012.
- HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicology Letters.** v. 90, p. 183-188. 1997.
- HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, J. R. M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange coated slides. **Mutat Res.**, v. 245, p.245-249, 1990.
- HEDDLE, J, A.A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutat. Res.**,v.18, n.2, p. 187-190, 1973.
- HEDDLE, J.A.A., *et al.* The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. **Mutat. Res.** v. 124, p. 61-118. 1983.
- HEINEN, C.D. *et al.* Microsatellite Instability in Aberrant Crypt Foci from Human Colons. **Cancer Res.**, v.56, p.5339–5341. 1996.

- HU, F. *et al.* Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models, **J. Ethnopharmacol.** v.100, p.276 e 283. 2005.
- IANDOLI, J. D *et al.* End-to-end esophagogastric anastomosis comparative study, between a single layer and submucosa-mucosa invagination technics: in rats. **Acta Cir Bras.** v.15, n.1: 14-22. 2000.
- INCA- Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Estimativa/2018- incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>. Acesso em 03/02/2018. 2018.
- IOIRISH, N.; **As Abelhas: Farmacêuticas com Asas**, Editora Mir: Moscou, p. 228. 1982.
- ISHII, P.L., *et al.* Evaluation of *Agaricus blazei* in vivo for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. **Regul. Toxicol. Pharmacol.** v.59: p.412-422. 2011.
- KADA, T., INOUE T. and NAMIKI N. Environmental desmutagens and antimutagens. In: **Environ Mutag and Plant Biol** (Klekowski EJ, ed.). Praeger, New York, 137-151. 1982.
- KADA, T. and SHIMOI K. Desmutagens and bio-antimutagens - their modes of action. **BioEssays.** v.7: p. 113-116. 1987.
- KADDAM *et al.* Gum Arabic as novel anti-oxidant agent in sickle cell anemia, phase II trial **BMC Hematol.** v. 17, p.4. 2017.
- KAIDAMA, W.M., GACCHE, R.N., Anti-inflammatory activity of quercetin in acute and chronic phases of inflammation in Guinea Pigs. Anti-inflammatory activity of quercetin in acute and chronic phases of inflammation in guinea pigs, **Adv. J. Phytomedicine Clin. Ther.** v.3, p.129 e 136. 2015.
- KIM, J.Y. *et al.* Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF-kappaB in RAW 264.7 macrophages, **European J Pharm.**v.584, p. 175 e 184. 2008.
- KLEE, L.W. *et al.* Long term effects of gastrocystoplasty in rats. **J Urol.** v.144, n.5:p.1283-7. 1990.
- KORNHAUSER, A.; WAMER, W. G.; LAMBERT, L. L. Light- induced dermal toxicity: Effects on the cellular and the molecular level. In: MARZULLI, F. N.; MAIBACH, H. I. (Eds). **Dermatotoxicol.** 4 th edition. New York: Hemisphere, p. 527- 569. 1983.
- KRITCHEVSK, Y. D., WEBER M.M., KLURFELD D.M. Gallstone formation in hamsters: Influence of specific amino acids. **Nutr Rep. Intern.**, v. 29, p. 117-121. 1984.
- KRISHNA, G, HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutat Res.** Nov. v.20; p.455, n.1-2:155-66. 2000
- KUMAR, S. *et al.* Cytotoxic activities of xanthochymol and isoxanthochymol substantiated by LC-MS/MS. **Planta Med;** 73, n.14: 1452-6. 2007.

- LAHOUAR, L. *et al.* Attenuation of histopathological alterations of colon, liver and lung by dietary fibre of barley Rihane in azoxymethane-treated rats. **Food Chem.** v.15, p.271–276. 2014.
- LANCE, P.; HAMILTON, S.R. Sporadic aberrant crypt foci are not a surrogate endpoint for colorectal adenoma prevention. **Cancer Prev. Res.** (Phila Pa), v.1, p.4–8. 2008.
- LANSARD, M. *et al.* L-Leucine, L-Methionine, and L-Lysine Are Involved in the Regulation of Intermediary Metabolism-Related Gene Expression in Rainbow Trout Hepatocytes. **J. Nutr.** v.141: p. 75–80. 2011.
- LEE, G. R. *et al.* **Wintrobe's Clinical Hematol.** 10. ed. Baltimore: Lippincott William's & Wilkins, 1999.
- LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutat Res.** v. 544, n.1, p. 43-64. 2003.
- LESZCZYNSKI, D.E., KUMMEROW, F.A. Excess dietary lysine induces hypercholesterolemia in chickens. **Experientia.** v.38, p.266-267. 1982.
- LI, F. *et al.* Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. **Bioorg Med Chem.** v.16, p. 5434-5440. 2008.
- LIAO, S. F., WANG T. and REGMI N. Lysine nutrition in swine and the related monogastric animals: muscle protein biosynthesis and beyond. **SpringerPlus** . v. 4: p.147. 2015.
- LIMA, R. O. A. *et al.* Modifying Effect of Propolis on Dimethylhydrazine-Induced DNA Damage But Not Colonic Aberrant Crypt Foci in Rats. **Environ and Molec Mutagenesis.** v.45:p.8-16 .2005.
- LIO, A. *et al.* Ethanolic extracts of Brazilian red propolis increase ABCA1 expression and promote cholesterol efflux from THP-1 macrophages. **Phytomedicine**, v. 15, p. 383-8. 2012.
- LORIEN, E; NEWELL, J.; HEDDLE, A. The potent colon carcinogen, 1,2 dimetilyhydrazine induces mutations primarily in the colon. **Genetic Toxic and Environ Mutagenesis.** v. 564, p.1-7. 2004.
- LOTTI, C. *et al.* Chemical constituents of red Mexican própolis. **J Agric Food Chem** v.58, p.2209-2213. 2010.
- LUIZ, R. C. **Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade de extratos aquosos e orgânicos do Agaricus blazei Murill (Cogumelo do Sol) linhagem AB97/11, in vitro.** 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Instituto Agronômico do Paraná, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2002.
- LUSTOSA, S. R. *et al.* Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Rev Bras de Farmacognosia.** v18, p.447-454. 2008.

- LUO, L. *et al.* Loss of heterozygosity in human aberrant crypt foci (ACF), a putative precursor of colon cancer. **Carcinogenesis**, v.27, p.1153–1159. 2006.
- LU, Q. *et al.* “Dark Aberrant Crypt Foci with activated Wnt pathway are related to tumorigenesis in the colon of AOM-treated rat,” **J Exp Clin Cancer Res**. v. 27, n. 1. 2008.
- MAYWORM, M. A. S. *et al.* Does Propolis Contain Tannins **Evid Based Complement Alternat Med**; v.4. 2014.
- MARLEY, A R, NAN, H. Epidemiology of colorectal cancer. **Int J Mol Epidemiol Genet**. v.3, n.7, , p.105-114. 2016.
- MARCUCCI, M. C. Propolis, chemical composition, biological properties and therapeutic ctivity. **Apidologie**, Paris, v. 26, p. 83-99, 1995.
- MARCUCCI M.C. *et al.* Phenolic compounds from Brazilian própolis with pharmacological activities. **J Ethnopharm**. v.74: p.105-112. 2001.
- MATSUNO, T. O efeito terapêutico da própolis. 1ª ed., São Paulo, **Nair Tazue Itice**, 1997.
- MCLELLAN, E.A.; BIRD, R.P. Aberrant Crypts: Potential Preneoplastic Lesions in the Murine Colon. **Cancer Res**.v. 48, p.6187–6192. 1988.
- MCLELLAN E. A., MEDLINE A., and BIRD R. P., “Sequential analyses of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions, **Cancer Res**. v. 51, n. 19, p. 5270–5274. 1991.
- MEGARAJ, V. *et al.* Role of hepatic and intestinal p450 enzymes in the metabolic activation of the colon carcinogen azoxymethane in mice. **Chem Res Toxicol**. v. 21, p.656-62. 2014.
- MENDONÇA, C.F. *et al.* Manifestação incomum do câncer colorretal-Relato de caso. **Rev Bras Coloproct**. n.28, v.1, p.99-103. 2008.
- MENDONÇA, I.C *et al.* Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complement Altern Med**.. v.15, p.57. 2015.
- MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicol de Alim**. São Paulo: Varela. p.295. 2000.
- MIRZOEVA, O.K., CALDER P.C., The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**.. v.55, p. 441 e 449. 1996.
- MOON, R.C.; FRICKS, C.M. Influence of gonadal hormones and age on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. **Câncer**. v.40, p,2502-8. 1977.
- MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **J Agric Food Chem**.. vol. 57, n. 5, p. 1655–1666. 2009.
- MOREIRA, L. Update on colorectal cancer precursor lesions. **Gastroenterol Hepatol**, v. 1, p.80-5. 2012.

- MORI, H. *et al.* Aberrant crypt foci and beta-catenin accumulated crypts; significance and roles for colorectal carcinogenesis. **Mutation Res.** v. 566 , p.191–208. 2004.
- MURAD, J.M. *et al.* Effects of própolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Ethnopharm.** v. 79, p. 331-334. 2002.
- MURTHY, N., MUKHERJEE S., RAY G., RAY A. Dietary factors and cancer chemoprevention: An overview of obesity-related malignancies. **J Postgrad Med..** v. 55: p.45. 2009.
- NEWMAN, D.J., CRAGG G.M., Natural products as sources of new drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.** v. 75, p. 311e 335. 2012.
- NOGUEIRA-NETO P. *A criação de abelhas indígenas sem ferrão.* São Paulo, **Ed. Nogueira pis**, 446p. 1997.
- OCHIAI, M. *et al.* Differential staining of dysplastic aberrant crypt foci in the colon facilitates prediction of carcinogenic potentials of chemicals in rats, **Cancer Lett.** v. 220, n. 1, p. 67–74. 2005.
- OLDONI, T. L.C. *et al.* Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separat and Purification Techn.** v.77, p.208–213. 2011.
- OLIVEIRA, S. G. D. *et al.* An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. **J Ethnopharm;** v.140, p.428-437. 2012.
- ORLANDO, F.A. *et al.* Aberrant crypt foci as precursors in colorectal cancer progression. **J. Surg. Oncol.** v. 98, p.207–213. 2008.
- ORSOLIC, N., KOSALEC I, Basic I Synergistic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of própolis against Ehrlich ascites tumour. **Biol Pharm Bull.** v .28,p. 694-700. 2005.
- PADMAVATHI, R., SENTHILNATHAN P., SAKTHISEKARAN D. Therapeutic effect of própolis and paclitaxel on hepatic phase I and II enzymes and marker enzymes in dimethylbez(a)anthracene-induced breast cancer in female rats. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol** v.143, p. 349-354. 2006.
- PAPES, F. *et al.* The essential amino acid lysine acts as precursor of glutamate in the mammalian central nervous system. **FEBS Lett.** v. 488; p. 34–38. 2001.
- PATEL, SEEMA. Emerging Adjuvant Therapy for Cancer: Propolis and its Constituents. **J of Diet Supplem**, EarlyOnline:1–24. Informa Healthcare USA.Bioinformatics and Medical Informatics Research Center, San Diego State University, CA, 2015
- PARK, H. S., GOODLAD R. A., and WRIGHT N. A., “The incidence of aberrant crypt foci and colonic carcinoma in dimethylhydrazine-treated rats varies in a site-specific manner and depends on tumor histology,” **Cancer Res..** v. 57, n. 20, p. 4507–4510. 1997.

- PARK, Y. K, ALENCAR S. M, AGUIAR, C. L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **J Agric Food Chem.** v.50, p. 2502-2506. 2002.
- PAULING, L. Third case report on lysine-ascorbate amelioration of angina pectoris. **J Orthomol Med.**, v.8 p.137-138. 1993.
- PAULSEN, J.E. et al. "Flat dysplastic aberrant crypt foci are related to tumorigenesis in the colon of azoxymethane-treated rat, **Cancer Res.** v. 65, Jan 1, p. 121–129. 2005.
- PEDRONI, M. *et al.* Microsatellite Instability and Mismatch-Repair Protein Expression in Hereditary and Sporadic Colorectal Carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.61, p. 896–899. 2001.
- PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.; AQUINO NETO, F.R. de. Própolis: 100 anos de pesquisas e suas perspectivas futuras. **Quím. Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.
- PEREIRA, S. D. *et al.* Histórico e principais usos da própolis apícola. **ACSA – Agropec Cient no Semi-Árido.** 1808-6845 Revisão Bibliográfica.v. 11, n. 2, p. 01-21, abr – jun , 2015.
- PERSE, M., MLINARIC V., and CERAR A. Aberrant crypt foci as biomarkers predictive of colorectal carcinoma. **Slovenian Med J.** v. 79, n. 6, p. 499–506. 2010.
- PERSE, M.; A. CERAR. "Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats." **J Biomed Biotechnol.** 473964. 2011.
- PERVAIZ, S, CLEMENT, M. V. Tumor intracellular redox status and drugs resistance-serendipity or a casual relationship?. **Curr. Pharm. Desing.**v. 10; p.1969-1977. 2004.
- PINHEIRO, K. S. *et al.* Modulatory activity of brazilian red propolis on chemically induced dermal carcinogenesis. **Acta Cir. Bras.** v.29, p.11-117. 2014.
- PINTO, A. C. *et al.* Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, n. Supl. 1, p. 45-61, 2002.
- PIPPI, B., *et al.* In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on Candida spp, **J. Appl. Microbiol.** v. 118 , p.839 e 850. 2015.
- PRETLOW, T.P. *et al.* Aberrant Crypts: Putative Preneoplastic Foci in Human Colonic Mucosa. **Cancer Res.** v.51, p.1564–1567. 1991.
- PRETLOW, T.P. *et al.* Aberrant crypts correlate with tu.mor incidence in F344 rats treated with azoxymethane and phytate.**Carcinogenesis.** v.13. p. 1509-1512. 1992.
- POLI, G., *et al.* Oxidative stress and cell signalling. Review. **Curr Med Chem.** May; v.11, n.9, p. 1163-82. 2004.
- RAJU, J. Azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci: Relevance in studying chemoprevention of colon cancer. **World J. Gastroenterol.**, v.14, p.6632–6635. 2008.

- RAVISHANKAR, D. *et al.* Exploring quercetin and luteolin derivatives as antiangiogenic agents, **Eur. J. Med. Chem.** v.97 , p. 259 e 274. 2015.
- RADTKE, F.; CLEVERS, H. "Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin". **Science.** v.307, p.1904-1909. 2005.
- REIS, C.M.F., *et al.* Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. **Rev Bras Farmacogn.** v. 9/10: p.43-52. 2000.
- REIS, S. R. A. *et al.* Avaliação da presença de micronúcleo em células esfoliadas da língua de indivíduos dependentes químicos de etanol através dos métodos de Feulgen e Papanicolau. **Rev Odonto Ciência.** v. 19,n. 46, p. 367-371. 2004.
- RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. **Mutag Ambiental.** Editora Ulbra, Canoas: 1ª edição, p.173-200, 2003.
- RIGHI, A. A. *et al.* Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **J Sci Food Agric.** v. 91, p. 2363-2370. 2011.
- RILEY, R. S.; BEN-EZRA, J. M.; TIDWELL, A. Reticulocyte enumeration: past & present. **J Clin Lab Anal.** v. 32, n. 10, p. 599-608. 2001.
- RODRIGUES, M.A., *et al.* Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 35: p.351-355. 2002.
- ROOMI, M.W. *et al.* Antitumor effect of ascorbic acid, lysine, proline, arginine, and green tea extract on bladder cancer cell line T-24. **Int. J. Urol.** v.13, n.4, p. 415-419. 2006.
- ROSALEN, P.L. *et al.* Vestitol and neovestitol from Brazilian red propolis reduce leukocytes adhesion in the inflammatory process, in: **American Society of Pharmacognosy . Annual Meeting.** 14<sup>th</sup> Annual Oxford International Conference on the Science of Botany. Oxford, USA. 2014 Aug 2-6. *Planta Medica* 80. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1382570>. **PE6. 2014.** Acesso: 03/10/2016. 2014.
- ROSE W.C., HAINES W.J., WARNER D.T.. The amino acid requirements of man. V. The rôle of lysine, arginine, and tryptophan. **J Biol Chem.** Jan;206(1):421-30. 1954
- ROTHFUSS, A. *et al.* Improvement of in vivo genotoxicity assessment : combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. **Mutat Res.** Amsterdam, v. 723, n.2, p.108-120. 2011.
- RUBEY, R.N. Could lysine supplementation prevent Alzheimer's dementia? A novel hypothesis. **Neuropsychiatr. Dis. Treat.** v.6, p. 707-10. 2010.
- RUSHTON, D.H. Nutritional factors and hair loss. **Clin. Exp. Dermatol.** v.27, n.5, p.396-404. 2002.

- SABINO, B.; TIRAPELLI, B.; FONSECA, S.M. Biossegurança em enfermagem oncológica: uma revisão integrativa. São Paulo: **Rev Recien.** v. 5., n. 13, p. 29-43., 2015.
- SAMPAIO, J. et al. Estudo da genotoxicidade in vitro e in vivo após exposição aguda e subcrônica de extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. obtidos por infusão. **R. bras. Bioci.** v. 10, n. 4, p. 462-467. 2012.
- SANTOS, D.B. et al.; The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. **Mutat Res**, v. 681, p. 3–12. 2009.
- SATO, S. I.; TOMITA, I. Short- Term screenings method for prediction of carcinogenicity of chemical substances: Current status and problems of in vivo rodent micronucleus assay. **Health Scie.**, v.47, n.1, p.1-8, 2001.
- SCIENCE DAILY, **Chem Kill Cancer Cells With Light-activat Mol**, Retrieved -24-01-2008.
- SCHERER K., STROHSCHOEN A. A. G.. Padronização do teste cometa para análise de genotoxicidade como atividade de ensino para graduação na área da saúde. **Rev. Dest. Acad.** v. 5, n. 3. 2013.
- SCHIMID, W. The micronucleus test. **Mutat. Res.** v. 31, p.9-15. 1975.
- SCHIMID, W. In: Hollaender, A. Chemical Mutagens: principles and methods for their detection. **Plenum.** New York. v. 4, p. 31-43. 1976.
- SEDLAK J.; LINDSAY R. H. Estimation of total protein-bound, non-protein sulphhydryl group in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.** v. 25, p. 192-205. 1968.
- SERIL, D.N., LIAO J., YANG G.Y., YANG C.S. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: Studies in humans and animal models. **Carcinogenesis.** v. 24: p.353–362. 2003.
- SFORCIN, J.M. *et al.* Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **J Ethnopharmacol.**; v. 73, n.1/2, p. 243-9. 2000.
- SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **J Ethnopharmacol.** v.133, p. 253-260. 2011.
- SFORCIN, J. M. Review Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. **Phytother Res.** Res. 2016.
- SHIVAPURKAR, N. *et al.* Sequential analysis of k-ras mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors induced by azoxymethane in Fischer-344 rats on high-risk diet. **Carcinogenesis.** v.15, p.775-778. 1994.
- SHUKLA, S.; BHADAURIA, M.; JADON, A. Effect of propolis extract on acute carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. **Indian J Exp Biol.** v.42, n. 10, p. 993-997. 2004.
- SIEGEL, RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2016. **CA Cancer J Clin.** v.66, n.1, p.7–30. 2016.

- SIMÕES-AMBROSIO, L.M.C. *et al.* The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1102-1108. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2010.07.008>. PMID:20637843. Acesso em 11/11/2016. 2010
- SINGH, N.P., *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**. Mar; v.175, n.1, p.84-91. 1988.
- SINGH, M. *et al.* Medicinal Uses of L-Lysine: Past and Future. **Int. J. Res. Pharm. Sci.** v. 2, n.4. p. 637-642. 2011.
- SILVA, B. B. *et al.* Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **Evid Based Complement Alternat Med**. v.5, p. 313-316. 2008.
- SILVA, A, M. O. *et al.* Efeito do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos. **Rev. Nutr.** [online]. vol. 24, n.1, p. 12-130. 2011.
- SILVA, A. C. C. *et al.* O. Sensibilidade de Agentes Bacterianos Patogênicos Frente à Ação Antibacteriana da Própolis . **Rev Bras de Agrotecn.** Disponível em: <http://www.gvaa.com.br/revista/index.php/> . Acesso em 12/12/2016. REBAGRO REVISÃO BIBLIOGRÁFICA . 2015.
- SIQUEIRA, A.B.S. *et al.* Trichophyton species susceptibility to green and red própolis from Brazil. **Applied Microbiology**. v.48, p. 90-96. 2008.
- SOARES, AKA. *et al.* Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera offi cinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium offi cinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. **Rev Bras Farmacogn** . v.16, p. 447-454. 2006.
- SOUZA, I. C. L. *et al.* Effect of the maltodextrin-induced chemical reticulation on the physical properties and healing potential of collagen-based membranes containing Brazilian red propolis extract. **Glob. J. Med. Med. Sci.**. v.1, p. 044-054. 2013.
- SOUZA, W. F. DE. *et al.* Sinalização celular em câncer. **Cienc. Cult.** v.66, n.1, São Paulo. 2014
- SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods Mol Biol**. v. 113. p. 203-212, 1999.
- SPEIT, G.; SCHUTZ, P.; HOFFMAN, H. Genotoxic effects of exposure to radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF) in cultured mammalian cells are not independently reproducible. **Mutat Res**, v. 626, p. 42-47. 2007.
- STEVENS, R.G. *et al.* Commentre: "Sporadic aberrant crypt foci are not a surrogate endpoint for colorectal adenoma prevention" and "Aberrant crypt foci in the adenoma prevention with celecoxib trial". **Cancer Prev. Res.** (Phila Pa), v.1, p.215-216; author reply 216. 2008.

- STOPERA, S. A., MURPHY L. C., and BIRD R. P. Evidence for a ras gene mutation in azoxymethane-induced colonic aberrant crypts in Sprague-Dawley rats: earliest recognizable precursor lesions of experimental colon cancer. **Carcinogenesis**. v. 13, n. 11, p. 2081–2085. 1992.
- SULIMAN, S.M., HAMDOUK M.I., ELFAKI M.B. Gum Arabic fiber as a supplement to low protein diet in chronic renal failure patients. **Sudan Assoc of Physicians, 17th Conference**. Khartoum. 2000.
- SUMINSKI, R.R., ROBERTSON R.J. and GOSS F.L. Acute effect of amino acid ingestion and resistance exercise on plasma growth hormone concentration in young men. **Int J. Sport. Nutr.** v.7, n.1, p. 48-60. 1997.
- TAKAHASHI, M. *et al.* Altered expression of  $\beta$ -catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethane induced rat colon carcinogenesis, **Carcinogenesis**. v. 21, n. 7, p. 1319–1327. 2000.
- TAKAHASHI M. and WAKABAYASHI K., Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents, **Cancer Sci**. v. 95, n. 6, p.475–480, 2004.
- TAKAHASHI, A. *et al.* Evaluation of the effects of Quercetin on damaged salivary secretion, **PLoS ONE** 10. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/> . Acesso em: 10/02/2017. journal.pone. p. 0116008 e 0116008. 2015.
- TELES, F. *et al.* Brazilian Red Propolis attenuates hypertension and renal damage in 5/6 renal ablation model, **PLoS ONE** 10 e 0116535. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/> . Acesso em: 10/02/2017. journal.pone.0116535. 2015.
- TOKUNAKA, A .; NISHI, K.; MATSUKURA, R.; TANAKA, N.; ONDA, M.; SHIROTA, A .; ASANO, G.; HAYASHI, K. Estrogen and progesterone receptors in gastric cancer. **Cancer**. v. 57, p.1376-9. 1986.
- TROMMER, H., NEUBERT, R.H. The examination of polysaccharides as potential antioxidative compounds for topical administration using a lipid model system. **Int. J. Pharm.** v. 298, p.153–163. 2005.
- TYLER, V., BRADY L., ROBBERS J. Pharmacognosy. **Philadelphia: Lea & Febiger**. p. 64–68. 1977.
- URBAN, L.A.B.D. *et al.* Recommendations of Colégio Brasileiro de Radiologia e Diagnóstico por Imagem, Sociedade Brasileira de Mastologia, and Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia for imaging screening for breast cancer. **Radiol Bras**. v.45, n.6, p. 334-9. 2012.
- XU, J. *et al.* Lead induces oxidative stress, DNA damage and alteration of p53, Bax and Bcl-2 expressions in mice. **Food Chem Toxicol**.Oxford; New York, v. 46, n.5, p. 1488-1494. 2008.

- XUAN, N.T., *et al.* Stimulation of mouse dendritic cells by Gum Arabic. **Cell Physiol Biochem.** v. 25, p. 641–648. 2010.
- WALY, M.I., *et al.* Pomegranate (*Punica granatum*) peel extract efficacy as a dietary antioxidant against azoxymethane-induced colon cancer in rat. **Asian Pac J Cancer Prev**, v.13, p.4051-55. 2012.
- WATERS, M.D., *et al.* Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutat. Res.** v.238: p. 57-85. 1990.
- WANG, L. *et al.* hMLH1 and hMSH2 expression in human hepatocellular carcinoma. **Int. J. Oncol.**, v.19, p.567–570. 2001.
- WANG, W. C. *et al.* The therapeutic effect of fractionated radiation on DMBA-induced hamster buccal pouch squamous cell carcinomas. **Oral Oncol**, v. 44, p.1160-1166. 2008.
- WARGOVICH, M. J.; BROWN V. R.; MORRIS J.. Aberrant Crypt Foci: The Case for Inclusion as a Biomarker for Colon Cancer. **Cancers.** v.2, p.1705-1716. 2010.
- WASHINGTON, M. K.. *et al.* Reviews in Basic and Clinical Gastroenterology and Hepatology - Pathology of Rodent Models of Intestinal Cancer: Progress Report and Recommendations. **Gastroenterology.** v. 144, p. 705–717. 2013.
- WILLIAMS G.M. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. **Toxicology.** Sep n.14;166; v.1-2: p.3-10. 2001.
- WOBBES, T.; BEEEX, L.V.; KOENDERS, A .M. Estrogen and progestinic receptors in colonic cancer. **Dis. Colon Rectum.** v. 27, p.51-2. 1984.
- WU, G. Functional amino acids in growth, reproduction and health. **Adv Nutr** . v.1; p.31–37. 2010.
- WU, G. Functional amino acids in nutrition and health. **Amino Acids.** v. 45; p. 407–411. 2013.
- VAN DER ENDE, W.; PESHEV, D.; DE GARA, L. Disease prevention by natural antioxidants and prebiotics acting as ROS scavengers in the gastrointestinal tract. **Trends in Food Sci & Tech.** vol. 22, p. 689-697. 2011.
- VANHAELEN, M.; VANHAELEN-FASTRÉ, R. Propolis-origine, micrographie, composition chimique et activité thérapeutique. **J. Pharm. Belg.** v.34, 5; p.253- 259. 1979.
- VELLOSA, J. C. *et al.* Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v.34, n.3: p. 305-312. 2013.
- VICENTE, S. J. V., *et al.* Increase of the Activity of Phase II Antioxidant Enzymes in Rats after a Single Dose of Coffee. **J Agric Food Chem.** vol. 59, p. 10887-10892. 2011.
- YAMADA, Y. *et al.*, Frequent  $\beta$ -catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis, **Cancer Res.** v. 60, n. 13, p. 3323–3327. 2000.

YAMAGUCHI, H., BHALLA K., WANG H.G. Bax plays a pivotal role in thapsigargin-induced apoptosis of human colon cancer HCT116 cells by controlling Smac/Diablo and Omi/Htra2 release from mitochondria. **Cancer Res.** v. 63: p.1483–1489. 2003.

YAMAMOTO, N.; NAKAJO, S.; TAHARA, E. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in human gallbladder. **Acta Pathol. Jpn.** v. 40, p.14-21. 1990.

YE, Y. *et al.* Formononetin-induced apoptosis of human prostate cancer cells through ERK1/2 mitogen-activated protein kinase inactivation. **Horm Metab Res,** v. 44, n. 4, p. 263-7. 2012.

ZANDONÁ, B. *et al.* Prevalência de adenomas colorretais em pacientes com história familiar para câncer colorretal. **Rev bras Coloproct.** v.31, n.2, p. 147-154. 2011.

ZHANG, H. *et al.* Role of Matrix Metalloproteinases and Therapeutic Benefits of Their Inhibition in Spinal Cord Injury. **Neurotherapeutics.** v. 8, n. 2, p. 206–220, April. 2011.

ZHONG *et al.* Protective effects of epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives on azoxymethane-induced colonic carcinogenesis in mice. **J Funct Foods.** v. 4; p. 323-330. 2012.

## APÊNDICE A – TABELA DOS PESOS DOS ANIMAIS/GRUPO

Distribuição de peso em gramas com valores das médias dos grupos estudados: Grupo I- Água; Grupo II- *L*-Lisina; Grupo III- Própolis vermelha; Grupo IV- Goma arábica 1%; Grupo V- Azoximetano + Água; Grupo VI- Azoximetano + *L*-Lisina; Grupo VII- Azoximetano + Própolis vermelha; Grupo VIII- Azoximetano + Goma arábica 1% .

Grupo/ Semana	G I	G II	GIII	GIV	GV	GVI	GVII	GVIII
1	39,2	62,1	33,1	44,9	41,8	44,4	37,4	46,3
2	59	92,9	57,7	78,5	70,3	74,5	64,8	76,5
3	91,2	120,5	91,6	109,5	101,9	105,4	91,8	107,7
4	111,6	137,1	92,4	129,1	117,3	124,4	107,4	125,6
5	122,7	142	127,6	137,5	127,1	133,4	126,3	137,4
6	143,7	160,5	142	151,5	145,5	142,7	142,4	152,9
7	153,5	170,1	157,2	164,4	155,2	155,2	154,5	162,6
8	170,1	184,1	171,9	180,5	169,2	171,2	167,6	174,6
9	181,9	193,1	183,9	189,8	178,7	178,4	178,4	185,2
10	188,5	198,7	194	198,8	189,3	189,4	187,1	189,8
11	197,2	206	199,1	202,4	194,7	195,7	193,1	196,1
12	202,7	206,6	201,3	208,5	196,6	201,9	198,4	203
13	205,4	211,5	204	213	203,7	202,9	203,2	206,2
14	212,1	214,7	211,8	215,3	210,1	204,1	206,4	211,5
15	213,6	216,8	214	219,1	214,8	214,4	210,8	215
16	221,5	221	218,5	222,4	187,2	222,2	214,8	218,2
17	225,1	221,4	221,1	225,6	220,4	224,3	211,7	221,1

Fonte: O próprio autor.

**APÊNDICE B – TABELA DE PESOS DOS ÓRGÃOS DOS ANIMAIS (gramas)**

Grupo	Animal	Pulmão	Fígado	Rins	Intestino	Baço
GI	R1	1,46	6,17	1,87	3,20	0,92
	R2	1,54	5,65	1,96	3,10	1,32
	R3	1,27	6,22	1,91	4,61	1,11
	R4	1,43	7,04	1,93	3,19	1,90
	R5	1,63	7,03	2,20	3,48	1,12
GII	R1	1,54	5,52	1,90	3,59	0,87
	R2	1,24	5,33	1,76	2,78	0,83
	R3	1,55	7,19	2,48	3,31	0,37
	R4	1,54	5,30	2,23	3,24	1,05
	R5	1,39	5,13	1,88	3,07	1,01
GIII	R1	1,71	5,51	2,09	2,93	0,95
	R2	1,52	3,71	1,18	3,83	0,98
	R3	0,84	5,61	1,95	2,61	0,80
	R4	1,36	5,79	1,77	2,68	0,65
	R5	1,35	5,06	1,79	2,50	0,69
GIV	R1	1,60	6,49	2,35	2,88	0,98
	R2	1,38	6,24	1,80	3,07	0,63
	R3	1,67	7,86	2,28	3,81	0,93
	R4	2,16	7,12	2,25	3,64	0,97
	R5	1,49	6,51	1,25	3,32	0,77
GV	R1	1,90	6,48	2,06	3,14	1,26
	R2	1,33	6,04	2,06	3,57	1,18
	R3	1,35	6,38	1,82	3,28	0,72
	R4	1,25	5,77	1,89	3,58	0,82
	R5	1,30	6,23	1,95	3,75	1,17
	R6	1,71	6,70	1,97	3,25	1,30
GVI	R1	1,31	6,24	2,32	3,36	0,76
	R2	1,4	6,53	2,01	3,41	1,06
	R3	1,11	6,37	2,01	3,01	1,20
	R4	1,58	7,23	2,16	3,51	1,10
	R5	1,35	6,20	1,70	3,89	0,75
	R6	1,60	6,30	1,84	3,64	0,84
GVII	R1	1,31	5,07	1,62	3,05	0,54
	R2	1,29	6,43	2,08	3,82	0,68
	R3	1,46	6,64	1,95	3,37	0,74
	R4	1,28	5,58	1,63	3,10	0,71
	R5	1,62	6,57	1,85	2,87	0,69
	R6	1,61	5,60	1,77	3,05	0,64
	R7	1,62	5,70	1,84	2,88	0,75
GVIII	R1	1,41	6,22	2,04	4,00	0,90
	R2	1,28	6,86	1,92	3,37	1,01
	R3	1,44	5,53	1,85	3,45	0,91
	R4	1,38	6,15	1,75	3,24	0,77
	R5	1,33	5,74	1,61	3,74	0,71
	R6	1,48	6,29	1,90	3,60	0,89
	R7	1,41	6,65	1,97	3,86	0,79

**APÊNDICE C – TABELA DE ACOMPANHAMENTO DO NÚMERO TOTAL DOS  
FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES NOS ANIMAIS DE CADA GRUPO**

Azoximetano + Água

<b>Grupo v</b>	Cólonn Proximal					Colon Médio					Cólonn Distal					Total
Animais	1	2	3	4	+5	1	2	3	4	+5	1	2	3	4	+5	
R 1	7	2	0	0	0	0	11	20	11	12	14	4	10	9	5	105
R 2	4	0	0	0	1	0	2	4	4	0	12	5	3	0	1	36
R 3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	7	14	3	14	42
R 4	0	0	0	0	0	2	7	3	4	6	5	10	14	4	6	61
R 5	0	0	0	0	0	2	11	3	2	7	2	11	14	3	15	70
R 6	0	0	0	0	0	0	9	9	4	8	8	20	14	18	12	102
R 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
																416

Obs.: O R7 morreu durante o experimento.

Azoximetano + Lisina

<b>Grupo VI</b>	Colon Proximal					Colon Médio					Colon Distal					
Animais	1	2	3	4	+5	1	2	3	4	+5	1	2	3	4	+5	Total
R 1	0	0	0	0	0	13	18	6	9	3	5	4	8	5	5	76
R 2	0	0	0	0	0	9	24	1	15	3	3	5	2	2	0	64
R 3	0	0	0	0	0	11	11	6	12	18	9	10	8	1	9	95
R 4	0	0	0	0	0	2	0	4	0	0	1	18	11	14	12	62
R 5	0	0	0	0	0	5	12	9	0	11	0	11	11	3	1	63
R 6	0	0	0	0	0	6	11	0	3	1	0	6	4	9	5	45
R 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
																405

Obs.: O R7 morreu durante o experimento.





## APÊNDICE D – TABELA DAS DOSES DAS SUBSTÂNCIAS ADMINISTRADAS

Doses administradas baseados nos pesos em gramas, com valores das médias dos grupos estudados: Grupo I- Água; Grupo II- *L*-Lisina; Grupo III- Própolis vermelha; Grupo IV- Goma arábica 1%; Grupo V- Azoximetano + Água; Grupo VI- Azoximetano + *L*-Lisina; Grupo VII- Azoximetano + Própolis vermelha; Grupo VIII- Azoximetano + Goma arábica 1% .

Semana/Grupo	G I (ml)	G II (mg)	G III (mg)	G IV (ml)	G V (ml)	G VI (mg)	G VII (mg)	G VIII (ml)
1								
2								
3	0,5	18,1	9,2	0,5	0,5	15,8	9,2	0,5
4	0,5	20,6	9,2	0,6	0,5	18,7	10,7	0,6
5	0,5	21,9	12,8	0,7	0,5	20	12,6	0,7
6	0,5	24,1	14,2	0,8	0,5	21,4	14,2	0,8
7	0,5	25,5	15,7	0,8	0,5	23,3	15,4	0,8
8	0,5	28	17,2	0,9	0,5	26	16,8	0,9
9	0,5	29	18,4	0,9	0,5	27	17,8	0,9
10	0,5	30	19,4	1	0,5	28	18,7	0,9
11	0,5	30	19,9	1	0,5	29	19,3	1
12	0,5	31	20,1	1	0,5	30	19,8	1
13	0,5	32	20,4	1,1	0,5	30	20,3	1
14	1	32	21,2	1,1	1	31	20,6	1,1
15	1	32	21,4	1,1	1	32	21,1	1,1
16	1	33	21,8	1,1	1	33	21,5	1,1
Total	8,5	387,2	240,9	11,6	8,5	365,2	238	12,4

Fonte: O próprio autor.

**APÊNDICE E – AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DE PESOS DOS ÓRGÃOS DOS ANIMAIS**

		<b>GI</b>	<b>GII</b>	<b>GIII</b>	<b>GIV</b>	<b>GV</b>	<b>GVI</b>	<b>GVII</b>	<b>GVIII</b>	<b>p-Valor</b>
<b>Pulmão</b>	Média	1,46	1,45	1,35	1,66	1,47	1,39	1,45	1,39	0,415
	EPM	0,06	0,06	0,14	0,13	0,10	0,07	0,06	0,02	
<b>Fígado</b>	Média	6,42	5,6	5,13	6,84	6,26	6,47	5,94	6,20	
	EPM	0,60	0,84	0,84	0,65	0,33	0,38	0,60	0,46	<b>0,002</b>
	Média	0,26	0,37	0,37	0,29	0,13	0,15	0,22	0,17	
<b>Rins</b>	EPM	1,97	2,05	1,75	1,986	1,95	2,00	1,82	1,86	0,494
	Média	0,05	0,13	0,15	0,20	0,03	0,09	0,06	0,05	
<b>Intestino</b>	EPM	3,51	3,19	2,91	3,34	3,42	3,47	3,16	3,60	0,078
	Média	0,28	0,13	0,24	0,17	0,09	0,12	0,12	0,10	
<b>Baço</b>	EPM	1,27	0,82	0,82	0,85	1,07	0,95	0,67	0,85	<b>0,003</b>
	Média	0,16	0,12	0,12	0,06	0,09	0,07	0,02	0,03	

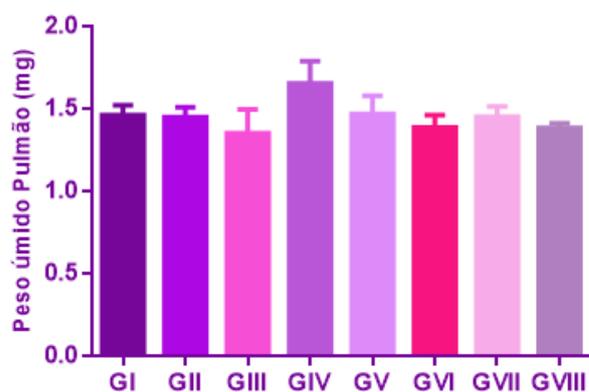
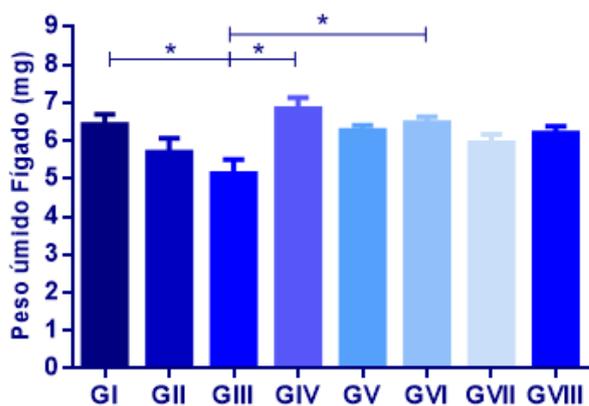
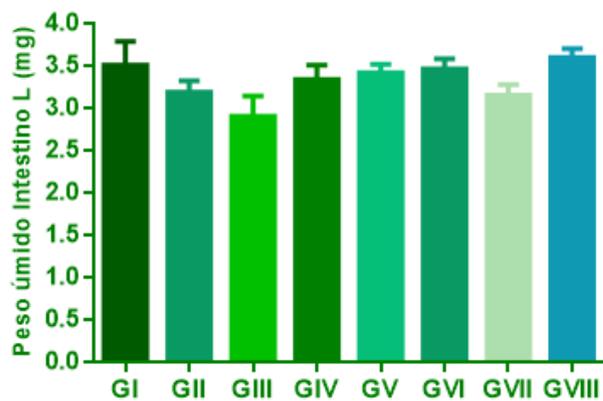
**APÊNDICES F – GRÁFICOS DOS PESOS DOS ÓRGÃOS****Gráfico 1- Peso dos Pulmões****Gráfico 2- Peso dos Fígados****Gráfico 3- Peso dos Intestinos**

Gráfico 4- Peso dos Baços

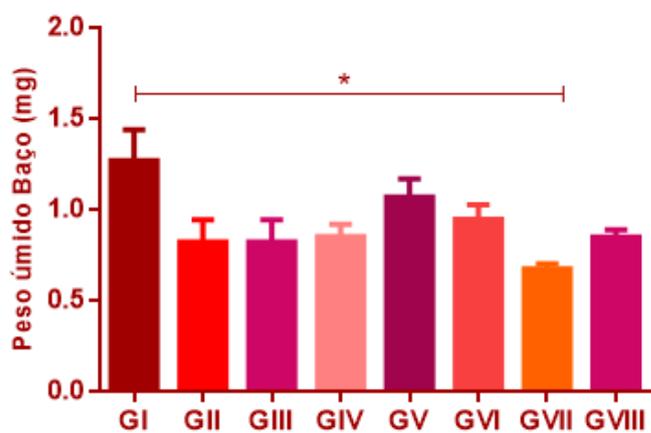
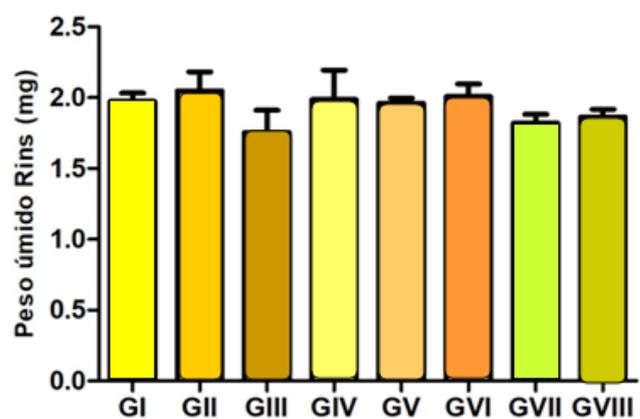


Gráfico 5- Peso dos Rins



## APÊNDICE G – ENSAIO COMETA ALCALINO EM HEPATÓCITOS

Avaliação da genotoxicidade por meio do ensaio do cometa alcalino em hepatócitos nos grupos tratados com Água, Lisina, Própolis e Goma, expostos ou não ao Azoximetano. Os dados correspondem à análise das medições efetuadas em 5 ratos dos grupos não expostos ao azoximetano, em 6 animais dos grupos Azoximetano+Água e Azoximetano+Lisina e em 7 ratos dos grupos Azoximetano+Própolis e Azoximetano+Goma, sendo expressos em unidades arbitrárias. Comparações entre os grupos tratados com Água, Lisina, Própolis e Goma, expostos ou não ao Azoximetano, foram feitas pela análise de variância (ANOVA) para um fator de classificação, associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey. Para cada tratamento, o teste *t* para dados não emparelhados foi usado para comparar o efeito da exposição ou não ao azoximetano.

Exposição ao azoximetano	Água (média ± DP)	Lisina (média ± DP)	Própolis (média ± DP)	Goma (média ± DP)	Significância (ANOVA)
Não	7,80 ± 2,49	8,00 ± 2,45	7,00 ± 1,23	6,80 ± 2,49	P = 0,7908
Sim	29,17 ± 9,50	22,83 ± 3,31	15,29 ± 1,38 <sup>a</sup>	21,86 ± 3,34	<b>P = 0,0009</b>
Significância (teste <i>t</i> )	<b>P = 0,0009</b>	<b>P &lt; 0,0001</b>	<b>P &lt; 0,0001</b>	<b>P &lt; 0,0001</b>	

DP: desvio padrão; ANOVA: análise de variância; a letra <sup>a</sup>(P<0,001) denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Azoximetano+Água (teste de Tukey).

## APÊNDICE H – ENSAIO COMETA ALCALINO EM HEPATÓCITOS COM ENZIMA ENDONUCLEASE FORMAMIDOPIRIMIDINA DNA GLICOSILASE (FPG)

Avaliação da genotoxicidade por meio do ensaio do cometa alcalino em hepatócitos modificado, usando a endonuclease formamidopirimidina DNA glicosilase (FPG), nos grupos tratados com Água, Lisina, Própolis e Goma, expostos ou não ao Azoximetano. Os dados correspondem à análise das medições efetuadas em 5 ratos dos grupos não expostos ao azoximetano, em 6 animais dos grupos Azoximetano+Água e Azoximetano+Lisina e em 7 ratos dos grupos Azoximetano+Própolis e Azoximetano+Goma, sendo expressos em unidades arbitrárias. Comparações entre os grupos tratados com Água, Lisina, Própolis e Goma, expostos ou não ao Azoximetano, foram feitas pela análise de variância (ANOVA) para um fator de classificação, associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey. Para cada tratamento, o teste *t* para dados não emparelhados foi usado para comparar o efeito da exposição ou não ao azoximetano.

Exposição ao azoximetano	Água (média ± DP)	Lisina (média ± DP)	Própolis (média ± DP)	Goma (média ± DP)	Significância (ANOVA)
Não	7,20 ± 1,48	9,20 ± 1,92	9,40 ± 3,36	8,80 ± 2,78	P = 0,5116
Sim	42,83 ± 6,80	33,5 ± 5,54 <sup>d</sup>	19,71 ± 2,29 <sup>a,b,c</sup>	35,14 ± 6,26	<b>P &lt; 0,0001</b>
Significância (teste <i>t</i> )	<b>P &lt; 0,0001</b>	<b>P &lt; 0,0001</b>	<b>P &lt; 0,0001</b>	<b>P &lt; 0,0001</b>	

DP: desvio padrão; ANOVA: análise de variância; as letras <sup>a</sup>(P<0,0001), <sup>b</sup>(P<0,001) e <sup>c</sup>(P<0,001) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos Azoximetano+Água, Azoximetano+Lisina e Azoximetano+Goma, respectivamente, enquanto a letra <sup>d</sup>(P<0,05) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Azoximetano+Água (teste de Tukey).

## APÊNDICE I – TESTE DO MICRONÚCLEO EM HEPATÓCITOS

Avaliação da genotoxicidade por meio do teste do micronúcleo em hepatócitos nos grupos tratados com Água, Lisina, Própolis e Goma, expostos ou não ao Azoximetano. Os dados correspondem à análise das medições efetuadas em 5 ratos dos grupos não expostos ao azoximetano, em 6 animais dos grupos Azoximetano+Água e Azoximetano+Lisina e em 7 ratos dos grupos Azoximetano+Própolis e Azoximetano+Goma, sendo expressos como número de hepatócitos micronucleados por 2000 hepatócitos. Comparações entre os grupos tratados com Água, Lisina, Própolis e Goma, expostos ou não ao Azoximetano, foram feitas pela análise de variância (ANOVA) para um fator de classificação, associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey. Para cada tratamento, o teste *t* para dados não emparelhados foi usado para comparar o efeito da exposição ou não ao azoximetano.

Exposição ao azoximetano	Água (média ± DP)	Lisina (média ± DP)	Própolis (média ± DP)	Goma (média ± DP)	Significância (ANOVA)
Não	0,80 ± 0,84	0,80 ± 0,84	1,00 ± 0,00	0,80 ± 0,45	P = 0,9439
Sim	6,17 ± 2,04	5,17 ± 1,60	3,00 ± 1,00 <sup>a</sup>	6,00 ± 1,92	<b>P = 0,0076</b>
Significância (teste <i>t</i> )	<b>P = 0,0004</b>	<b>P = 0,0004</b>	<b>P = 0,0013</b>	<b>P = 0,0002</b>	

DP: desvio padrão; ANOVA: análise de variância; a letra <sup>a</sup>(P<0,05) denota diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos Azoximetano+Água e Azoximetano+Goma (teste de Tukey).

## ANEXO A – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA ANIMAL



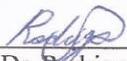
Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "EFEITOS DA L LISINA E PROPOLIS VERMELHA NA CARCINOGENÊSE CÓLICA", protocolo nº17/2016, sob responsabilidade do Profa. Dra. Conceição Aparecida Dornela, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 26 de março de 2016.

Vigência do projeto	01/2016 a 01/2017
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico Wistar
Nº de Animais	56
Peso/Idade	-
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 26 de março de 2016

  
 Prof. Dr. Rodrigo Siqueira  
 Coordenador do CEUA - UFC

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA  
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siga: 1520734

**ANEXO B – COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DA DIETA PADRÃO****RACÃO NUVILAB CR-1 IRRADIADA**

COMPOSIÇÃO BÁSICA DO PRODUTO: MILHO INTEGRAL MOÍDO, FARELO DE SOJA, FARELO DE TRIGO, CARBONATO DE CÁLCIO, FOSFATO BICÁLCICO, CLORETO DE SÓDIO, ÓLEO VEGETAL, VITAMINA A, VITAMINA D3, VITAMINA E, VITAMINA K3, VITAMINA B1, VITAMINA B2, VITAMINA B6, VITAMINA B12, NIACINA, PANTOTENATO D CÁLCIO, ÁCIDO FÓLICO, BIOTINA, CLORETO DE COLINA, SULFATO DE FERRO, MONÓXIDO DE MANGANÊS, ÓXIDO DE ZINCO, SULFATO DE COBRE, IODATO DE CÁLCIO, SELENITO DE SÓDIO, SULFATO DE COBALTO, LISINA, METIONINA, BHT.

NÍVEIS DE GARANTIA POR QUILOGRAMA DO PRODUTO: UMIDADE (MÁX): 125g/kg; PROTEÍNA BRUTA (MIN): 220g/kg; EXTRATO ETÉREO (MIN): 50g/kg; MATERIAL MINERAL (MÁX): 90g/kg; FIBRA BRUTA (MÁX): 70g/kg; CÁLCIO (MÍN-MÁX): 10-14 g/kg; e FÓSFORO; 6.000 mg/kg.

VITAMINAS: A (MIN) 13.000 UI/Kg; VITAMINA D3 (MIN) 2.000 UI/Kg, VITAMINA E (MIN) 34 UI/Kg; VITAMINA K3 (MIN) 3mg/Kg; VITAMINA B1 (MIN)5 mg/Kg; VITAMINA B2 (MIN) 6mg/Kg; VITAMINA B6 (MIN) 7 mg/Kg; VITAMINA B12 (MIN) 22 mcg/Kg; NIACINA (MIN) 60 mg/Kg; PANTOTENO DE CÁLCIO (MIN) 21 mg/Kg; ÁCIDO FÓLICO (MIN) 1mg/Kg; BIOTINA (MIN) 0,05mg/Kg; COLINA 1.900 mg/Kg; MINERAIS: SÓDIO (MIN) 2700 mg/Kg; FERRO (MIN) 50mg/Kg; MANGANÊS (MIN) 60mg/Kg; ZINCO (MIN) 60mg/Kg; COBRE (MIN) 10mg/Kg; IODO (MIN) 2MG/KG; SELÊNIO (MIN) 0,05mg/Kg; COBALTO (MIN) 1,5 mg/Kg, FLÚOR (MÁX) 60mg/Kg. AMINOÁCIDOS: LISINA (MIN) 12g/Kg, METIONINA (MIN) 4.000Mg/Kg, ADITIVOS BHT 100,00mg/Kg.

INDICAÇÃO : Ração irradiada para camundongos e ratos de laboratório

USO: Administração à vontade em comedouros suspensos

CONSERVAÇÃO : Conservar o produto em ambiente seco e arejado, sobre estrados, evitando luz e calor excessivos.

## ANEXO C – DECLARAÇÕES DE PERIGO E PRECAUÇÃO DO AZOXIMETANO

**SIGMA-ALDRICH**

sigma-aldrich.com

**FICHA DE INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DE PRODUTOS QUÍMICOS**

Versão 5.3

Data de revisão 23.07.2015

Data de impressão 31.05.2016

**1. IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO E DA EMPRESA****1.1 Identificadores do produto**

Nome do produto : Azoxymethane

Referência do Produto : A5486

Marca : Sigma

**1.2 Outros meios de identificação**

Dados não disponíveis

**1.3 Utilizações identificadas relevantes da substância ou mistura e utilizações desaconselhadas**

Só para utilização R&amp;D. Não para utilização farmacêutica, doméstica ou outras utilizações.

**1.4 Identificação do fornecedor da ficha de dados de segurança**Companhia : Sigma-Aldrich Brasil Ltda.  
Av. das Nações Unidas, 23.043  
04795-100 SÃO PAULO - SP  
BRAZIL

Telefone : +55 11 3732 3100

Número de Fax : +55 11 5522 9895

Email endereço : sigmabr@sial.com

**1.5 Número de telefone de emergência**

0800-720-8000

**2. IDENTIFICAÇÃO DE PERIGOS****2.1 Classificação GHS**

Líquidos inflamáveis (Categoria 3)

Toxicidade aguda, Oral (Categoria 2)

Irritação cutânea (Categoria 2)

Irritação ocular (Categoria 2A)

Carcinogenicidade (Categoria 1B)

Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição repetida, Oral (Categoria 2), Fígado, Sangue

Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição repetida, Inalação (Categoria 2), Sistema nervoso central

**2.2 Elementos da Etiqueta GHS, incluindo declarações de prevenção**

Pictograma



Palavra de advertência

Perigo

Frases de Perigo

H226

Líquido e vapor inflamáveis.

H300

Mortal por ingestão.

H315

Provoca irritação cutânea.

H319

Provoca irritação ocular grave.

H350

Pode provocar cancro.

H373

Pode afectar os órgãos (Fígado, Sangue) após exposição prolongada ou

Sigma - A5486 Azoxymethane

Página 1 de 8

Data de revisão 23.07.2015

H373	repetida por ingestão. Pode afectar os órgãos (Sistema nervoso central) após exposição prolongada ou repetida por inalação.
<b>Frases de Precaução</b>	
<b>Prevenção</b>	
P201	Pedir instruções específicas antes da utilização.
P210	Manter afastado do calor/faísca/chama aberta/ superfícies quentes. - Não fumar.
P260	Não respirar as poeiras/ fumos/ gases/ névoas/ vapores/ aerossóis.
P264	Lavar a pele cuidadosamente após manuseamento.
P280	Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/ protecção ocular/ protecção facial.
<b>Resposta</b>	
P301 + P310 + P330	EM CASO DE INGESTÃO: contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Enxaguar a boca.
P303 + P361 + P353	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche.
P308 + P313	EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.
P337 + P313	Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.
P370 + P378	Em caso de incêndio: para extinguir utilizar areia seca, um produto químico seco ou espuma resistente ao álcool.

Apenas para utilizadores profissionais.

### 2.3 Outros Perigos - nenhum(a)

## 3. COMPOSIÇÃO E INFORMAÇÕES SOBRE OS INGREDIENTES

### 3.1 Substâncias

Formula :  $C_2H_6N_2O$   
Peso molecular : 74.08 g/mol

Componente		Concentração
<b>Azoxy methane</b>		
No. CAS	25843-45-2	>= 90 - <= 100 %
<b>Acetic acid</b>		
No. CAS	64-19-7	>= 10 - < 20 %
No. CE	200-580-7	
No. de Index	607-002-00-6	
<b>Ethanol</b>		
No. CAS	64-17-5	>= 10 - < 20 %
No. CE	200-578-6	
No. de Index	603-002-00-5	
<b>Methylene chloride</b>		
No. CAS	75-09-2	>= 1 - < 5 %
No. CE	200-838-9	
No. de Index	602-004-00-3	

---

**4. MEDIDAS DE PRIMEIROS-SOCORROS****4.1 Descrição das medidas de primeiros socorros****Recomendação geral**

Consultar um médico. Mostrar esta ficha de segurança ao médico de serviço.

**Em caso de inalação**

Se for respirado, levar a pessoa para o ar fresco. Se não respirar, dar respiração artificial. Consultar um médico.

**Em caso de contacto com a pele**

Lavar com sabão e muita água. Transportar imediatamente paciente para um Hospital. Consultar um médico.

**Se entrar em contacto com os olhos**

Lavar cuidadosamente com muita água, durante pelo menos quinze minutos, e consultar o médico.

**Em caso de ingestão**

NÃO provoca vômito. Nunca dar nada pela boca a uma pessoa inconsciente. Enxaguar a boca com água. Consultar um médico.

**4.2 Sintomas e efeitos mais importantes, tanto agudos como retardados**

O diclorometano é metabolizado no organismo produzindo monóxido de carbono, que eleva e mantém os níveis da carboxiemoglobina no sangue, o que reduz a capacidade de condução do oxigênio do sangue., Actua como simples asfixiante deslocando o ar., efeitos anestésicos, Dificuldades respiratórias, Dor de cabeça, Vertigem, O contacto prolongado ou repetido com a pele pode provocar.: redução de gordura, Dermatites, O contacto com os olhos pode provocar.: Vermelhidão, Visão desfocada, Provoca lágrimas., Os efeitos devidos a ingestão podem incluir.: Desconforto gastrointestinal, Depressão do sistema nervoso central, Parestesia., Sonolência, Convulsões, Conjuntivite., Edema pulmonar. Os efeitos podem ser tardios., Respiração irregular., Doenças do estômago / intestinais, Náusea, Vômitos, Aumento dos níveis das enzimas hepáticas., Debilidade, A exposição prolongada ou em altos níveis pode resultar na absorção de quantidades nocivas de material., Dor abdominal

**4.3 Indicações sobre cuidados médicos urgentes e tratamentos especiais necessários**

Dados não disponíveis

---

**5. MEDIDAS DE COMBATE A INCÊNDIO****5.1 Meios de extinção****Meios adequados de extinção**

Utilizar água pulverizada, espuma resistente ao álcool, produto químico seco ou dióxido de carbono.

**5.2 Perigos especiais decorrentes da substância ou mistura**

Dados não disponíveis

**5.3 Recomendações para o pessoal de combate a incêndios**

Usar equipamento de respiração autónomo para combate a incêndios, se necessário.

**5.4 Outras informações**

Os jatos de água podem ser utilizados para arrefecer os contentores fechados.

---

**6. MEDIDAS DE CONTROLE PARA DERRAMAMENTO OU VAZAMENTO****6.1 Precauções individuais, equipamento de proteção e procedimentos de emergência**

Pôr uma protecção respiratória. Evitar a respiração do vapor/névoa/gas. Assegurar ventilação adequada. Cortar todas as fontes de ignição. Evacuar o pessoal para áreas de segurança. Atenção com a acumulação de vapores que pode formar concentrações explosivas. Os vapores podem-se acumular nas áreas baixas.

**6.2 Precauções a nível ambiental**

Prevenir dispersão ou derramamento, se seguro. Não permitir a entrada do produto no sistema de esgotos.

**6.3 Métodos e materiais de confinamento e limpeza**

Controlar e recuperar o líquido derramado com aspirador protegido electricamente ou varrer a seco e por o líquido dentro de contentores para a eliminação de acordo com as regulações locais (ver secção 13).

**6.4 Remissão para outras secções**

Para eliminação de resíduos ver secção 13.

**7. MANUSEIO E ARMAZENAMENTO****7.1 Precauções para um manuseamento seguro**

Evitar a exposição - obter instruções específicas antes da utilização. Evitar o contacto com a pele e os olhos. Evitar a inalação do vapor ou da névoa.

Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição - Não fumar. Tome medidas para impedir a formação de electricidade estática.

**7.2 Condições de armazenagem segura, incluindo eventuais incompatibilidades**

Armazenar em local fresco. Guardar o recipiente herméticamente fechado em lugar seco e bem ventilado. Os contentores abertos devem ser cuidadosamente fechados de novo e têm que ficar direitos para evitar a dispersão.

Temperatura recomendada de armazenagem -20 °C

**7.3 Utilizações finais específicas**

Dados não disponíveis

**8. CONTROLE DE EXPOSIÇÃO E PROTEÇÃO INDIVIDUAL****8.1 Parâmetros de controlo****Límites de exposição ocupacional**

Componente	No. CAS	Valor	Parâmetros de controlo	Bases
Acetic acid	64-19-7	LT	8 ppm 20 mg/m <sup>3</sup>	AGENTES QUÍMICOS CUJA INSALUBRIDADE É CARACTERIZADA POR LIMITE DE TOLERÂNCIA E INSPEÇÃO NO LOCAL DE TRABALHO
	Observações	Grau de insalubridade: médio		
Ethanol	64-17-5	LT	780 ppm 1,480 mg/m <sup>3</sup>	AGENTES QUÍMICOS CUJA INSALUBRIDADE É CARACTERIZADA POR LIMITE DE TOLERÂNCIA E INSPEÇÃO NO LOCAL DE TRABALHO
		Grau de insalubridade: mínimo		
Methylene chloride	75-09-2	LT	156 ppm 560 mg/m <sup>3</sup>	AGENTES QUÍMICOS CUJA INSALUBRIDADE É CARACTERIZADA POR LIMITE DE TOLERÂNCIA E INSPEÇÃO NO LOCAL DE TRABALHO
		Grau de insalubridade: máximo		

**Límites profissionais biológicas de exposição**

Componente	No. CAS	Parametros	Valor	Amostras biológicas	Bases
Methylene chloride	75-09-2	Carboxihemoglobina	3.5% NF	Sangue	NR 7 - Programa de controle medico de saúde ocupacional
	Observações	O indicador biológico possui significado clínico ou toxicológico próprio, mas, na prática, devido à sua curta meia-vida biológica, deve ser considerado como EE.			

## 8.2 Controlo da exposição

### Controlos técnicos adequados

Evitar o contacto com a pele, olhos e vestuário. Lavar as mãos antes de interrupções do trabalho, e imediatamente a seguir ao manuseamento do produto.

### Protecção individual

#### Protecção ocular/ facial

Mascaras de protecção e óculos de segurança. Use equipamento de protecção ocular testado e aprovado de acordo com as normas governamentais adequadas, tais como NIOSH (US) ou EN 166 (EU).

#### Protecção da pele

Manusear com luvas. As luvas devem ser inspeccionadas antes da utilização. Use uma técnica adequada para a remoção das luvas (sem tocar a superfície exterior da luva) para evitar o contacto da pele com o produto. Descarte as luvas contaminadas após o uso, em conformidade com as leis e boas práticas de laboratório. Lavar e secar as mãos.

As luvas de protecção seleccionadas devem satisfazer as especificações da Directiva da UE 89/689/CEE e a norma EN 374 derivada dela.

#### Protecção do corpo

Fato completo de protecção para produtos químicos, Tecido protector anti-estático retardador de chama. O tipo de equipamento de protecção deve ser escolhido de acordo com a concentração e a quantidade da substância perigosa no local de trabalho.

#### Protecção respiratória

Nos casos em que a avaliação de risco mostrar que os respiradores purificadores do ar são apropriados, use um respirador de cobertura facial total com cartuchos de combinação multi-objectivos (E.U.A.) ou do tipo ABEK (EN 14387) como apoio a controlos de engenharia. Se o respirador for o único meio de protecção, use um respirador de ar de cobertura facial total. Use respiradores e componentes testados e aprovados por normas governamentais apropriadas, tais como as NIOSH (E.U.A.) ou CEN (UE).

## 9. PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS

### 9.1 Informações sobre propriedades físicas e químicas de base

- |  |                                 |
|--|---------------------------------|
| a) Aspeto  | Forma: Líquido                  |
| b) Odor  | Dados não disponíveis           |
| c) Limite de Odor  | Dados não disponíveis           |
| d) pH  | Dados não disponíveis           |
| e) Ponto de fusão/ponto de congelamento                            | Dados não disponíveis           |
| f) Ponto de ebulição inicial e intervalo de ebulição               | 97 - 99 °C - lit.               |
| g) Ponto de fulgor   | 24 °C                           |
| h) Taxa de evaporação  | Dados não disponíveis           |
| i) Inflamabilidade (sólido, gás)                                   | Dados não disponíveis           |
| j) Limites de inflamabilidade superior / inferior ou explosividade | Dados não disponíveis           |
| k) Pressão de vapor  | Dados não disponíveis           |
| l) Densidade de vapor  | Dados não disponíveis           |
| m) Densidade relativa  | 0.991 g/cm <sup>3</sup> a 25 °C |

Sigma - A5486 Azoxymethane

Página 5 de 8  
Data de revisão 23.07.2015

n) Hidrossolubilidade	Dados não disponíveis
o) Coeficiente de partição n-octanol/água	Dados não disponíveis
p) Temperatura de auto-ignição	Dados não disponíveis
q) Temperatura de decomposição	Dados não disponíveis
r) Viscosidade	Dados não disponíveis

---

## 10. ESTABILIDADE E REATIVIDADE

### 10.1 Reatividade

Dados não disponíveis

### 10.2 Estabilidade química

Dados não disponíveis

### 10.3 Possibilidade de reações perigosas

Dados não disponíveis

### 10.4 Condições a evitar

Calor, chamas e faíscas.

### 10.5 Materiais incompatíveis

Agentes oxidantes fortes

### 10.6 Produtos de decomposição perigosos

Outros produtos de decomposição perigosos - Dados não disponíveis

---

## 11. INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS

### 11.1 Informações sobre os efeitos toxicológicos

#### Toxicidade aguda

##### Corrosão/irritação cutânea

Dados não disponíveis

##### Lesões oculares graves/irritação ocular

Dados não disponíveis

##### Sensibilização respiratória ou cutânea

Dados não disponíveis

##### Mutagenicidade em células germinativas

Dados não disponíveis

##### Carcinogenicidade

IARC: 2B - Grupo 2B: Possivelmente carcinogénico para os humanos (Methylene chloride)

##### Toxicidade à reprodução e lactação

Dados não disponíveis

##### Toxicidade sistêmica para órgãos-alvo específicos - exposição única

Dados não disponíveis

##### Toxicidade sistêmica para órgãos-alvo específicos - exposição repetida

Dados não disponíveis

##### Perigo de aspiração

Dados não disponíveis

##### Possíveis danos para a saúde

###### Inalação

Nocivo se for inalado. Causa uma irritação no aparelho respiratório.

###### Ingestão

Pode ser mortal se for engolido.

**Pele** Perigoso se for absorvido pela pele. Causa uma irritação da pele.  
**Olhos** Provoca irritação ocular grave.

#### Sinais e sintomas de exposição

O diclorometano é metabolizado no organismo produzindo monóxido de carbono, que eleva e mantém os níveis da carboxiemoglobina no sangue, o que reduz a capacidade de condução do oxigênio do sangue., Actua como simples asfixiante deslocando o ar., efeitos anestésicos, Dificuldades respiratórias, Dor de cabeça, Vertigem, O contacto prolongado ou repetido com a pele pode provocar., redução de gordura, Dermatites, O contacto com os olhos pode provocar., Vermelhidão, Visão desfocada, Provoca lágrimas., Os efeitos devidos a ingestão podem incluir., Desconforto gastrointestinal, Depressão do sistema nervoso central, Parestesia., Sonolência, Convulsões, Conjuntivite., Edema pulmonar. Os efeitos podem ser tardios., Respiração irregular., Doenças do estômago / intestinais, Náusea, Vômitos, Aumento dos níveis das enzimas hepáticas., Debilidade, A exposição prolongada ou em altos níveis pode resultar na absorção de quantidades nocivas de material., Dor abdominal

#### Informação adicional

RTECS: PA2975000

### 12. INFORMAÇÕES ECOLÓGICAS

- 12.1 Ecotoxicidade**  
Dados não disponíveis
- 12.2 Persistência e degradabilidade**  
Dados não disponíveis
- 12.3 Potencial biocumulativo**  
Dados não disponíveis
- 12.4 Mobilidade no solo**  
Dados não disponíveis
- 12.5 Resultados da avaliação PBT e mPmB**  
Dados não disponíveis
- 12.6 Outros efeitos adversos**  
Dados não disponíveis

### 13. CONSIDERAÇÕES SOBRE TRATAMENTO E DISPOSIÇÃO

#### 13.1 Métodos de tratamento de resíduos

##### Produto

Queimar em um incinerador químico equipado com pós-combustor e purificador de gases, mas tomar precauções adicionais ao colocar esse material em ignição, visto que é altamente inflamável. Propor a entrega de soluções excedentes e não recicláveis a uma empresa idónea de tratamento de resíduos.

##### Embalagens contaminadas

Eliminar como produto Não utilizado.

### 14. INFORMAÇÕES SOBRE TRANSPORTE

- 14.1 Número ONU**  
ADR/RID: 1992      DOT (US): 1992      IMDG: 1992      IATA: 1992      ANTT: 1992
- 14.2 Designação oficial de transporte da ONU**  
ADR/RID: LÍQUIDO INFLAMÁVEL, TÓXICO, N.S.A. (Ethanol, Azoxymethane, Methylene chloride)  
DOT (US): Flammable liquids, toxic, n.o.s. (Ethanol, Azoxymethane, Methylene chloride)  
IMDG: FLAMMABLE LIQUID, TOXIC, N.O.S. (Ethanol, Azoxymethane, Methylene chloride)  
IATA: Flammable liquid, toxic, n.o.s. (Ethanol, Azoxymethane, Methylene chloride)  
ANTT: LÍQUIDO INFLAMÁVEL, TÓXICO, N.E. (Ethanol, Azoxymethane, Methylene chloride)
- 14.3 Classes de perigo para efeitos de transporte**  
ADR/RID: 3 (6.1)      DOT (US): 3 (6.1)      IMDG: 3 (6.1)      IATA: 3 (6.1)      ANTT: 3 (6.1)

**14.4 Grupo de embalagem**  
ADR/RID: III      DOT (US): III      IMDG: III      IATA: III      ANTT: III

**14.5 Perigos para o ambiente**  
ADR/RID: não      DOT (US): não      IMDG Poluente marinho: não      IATA: não

**14.6 Precauções especiais para o utilizador**  
Dados não disponíveis

**14.7 Numero De Risco 36**

---

**15. REGULAMENTAÇÕES**

**15.1 Regulamentação/legislação específica para a substância ou mistura em matéria de saúde, segurança e ambiente**

Esta Ficha de Informações de Produtos Químicos foi preparada de acordo com a NBR 14725-4/2012 da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas)

---

**16. OUTRAS INFORMAÇÕES**

**Outras informações**

Direitos exclusivos, 2015, da Sigma-Aldrich Co. LLC. Permissão concedida para fazer número ilimitado de cópias em papel, somente para uso interno.

Acredita-se que as informações acima estejam correctas, embora não pretendam ser totalmente abrangentes, devendo ser usadas apenas como um guia. A informação contida neste documento esta baseada no presente estado do nosso conhecimento e é aplicável às precauções de segurança apropriadas para o produto. Não representa nenhuma garantia das propriedades do produto. A Corporação Sigma-Aldrich e as suas companhias afiliadas, não responderão por nenhum dano resultante do manuseio ou do contato com o produto acima. Consultar [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com) e/ou o verso da factura ou nota que acompanha o produto para tomar conhecimento dos termos adicionais e condições de venda.

## ANEXO D – CONTROLE DE QUALIDADE DA L-LISINA



## CERTIFICADO DE ANÁLISES DO CONTROLE DE QUALIDADE

Autorização de Funcionamento M.S.1.01284-7  
Aut.Especial de Funcionamento M.S.1.10238-0

Página 39/48  
Impressão: 07/06/2017 12:53  
NF. 137.333 de 07/06/2017

Insumo: L-LISINA HCL

Lote : 15116558-000387 Origem : China Fabric : 05/06/2015  
Lote Fab: 150605024 Procedência : China Validade : 04/06/2017  
Formula : C6 H14 N2 O2.HCl PM : 182,65 Frac : 367 22/01/2018  
DCB : 05350 CAS : 657-27-2

Ensaio	Especificação	Resultado	Referência
* DESCRIÇÃO	PÓ BRANCO, INODORO	CONFORME	USP - 38
* SOLUBILIDADE	FACILMENTE SOLÚVEL EM ÁGUA	CONFORME	USP - 38
* IDENTIFICAÇÃO	IV - O ESPECTRO DA AMOSTRA ESTÁ DE ACORDO COM O DO PADRÃO	CONFORME	USP - 38
* PERDA POR DESSECAÇÃO	MÁXIMO: 0,4% (3 HORAS/105°C)	0,31%	USP - 38
* ROTAÇÃO ESPECÍFICA	+20,4° A +21,4°	+20,52°	USP - 38
* METAIS PESADOS	MÁXIMO: 15 ppm	< 15 ppm	USP - 38
* RESÍDUO POR IGNIÇÃO	MÁXIMO: 0,1%	0,03%	USP - 38
* CONTEÚDO DE CLORETO	19,0% A 19,6%	19,43%	USP - 38
* COMPOSTOS RELACIONADOS (CCD)	IMPUREZA INDIVIDUAL: MÁXIMO 0,5%	NÃO DETECTADO	USP - 38
* COMPOSTOS RELACIONADOS (CCD)	IMPUREZA TOTAL: MÁXIMO 2,0%	NÃO DETECTADO	USP - 38
* SULFATO	MÁXIMO: 0,03%	< 0,03%	USP - 38
* FERRO	MÁXIMO: 30 ppm	< 30 ppm	USP - 38
* TEOR	98,5% - 101,5% (BASE ANIDRA)	100,64%	USP - 38
* DENSIDADE APARENTE	INFORMATIVO (SEM COMPACTAÇÃO)	0,60 g/mL	MET. GERAL FB V
* pH	5,0 - 6,5	5,99	FABRICANTE
NOMENCLATURA	L-LISINA HCL		

SEGURANÇA : ACONDICIONAR EM RECIPIENTES HERMÉTICOS, AO ABRIGO DO CALOR E UMIDADE

Obs: (\*) Os ensaios assinalados foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA, Cep: 44.030-477, Ribeirão Preto, SP, e os demais ensaios foram realizados conforme o Certificado de Análise do Fabricante.

DESCRIÇÃO	C 6511
PARA FARMACIA	602
DESCRIÇÃO	OL
SOLUBILIDADE	
CELO	FR 10
DATA	

Dra. Shirlei Conti Teruya de Sales  
Farmacêutica Responsável Técnica  
CRF-SP:65.711

Aprovado  
 Reprovado

SM EMPREENDIMENTOS FARMACEUTICOS LTDA

R. José Sertão Rodrigues Agosti, 1370  
Cep 06833-300 Centro Log. Embu - SP

Fone 11-4785-4600  
www.fagron.com.br