

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

DENISE DE ALBUQUERQUE ANDRADE

Ação da *Euphorbia tirucalli L.* na formação de
focos de cripta aberrante na mucosa cólica
induzida por azoximetano em ratos.

Fortaleza – Ceará
2007

DENISE DE ALBUQUERQUE ANDRADE

Ação da *Euphorbia tirucalli* L. na formação de
focos de cripta aberrante na mucosa cólica
induzida por azoximetano em ratos.

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues
Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Dornenfeld Escalante

Fortaleza – Ceará
2007

DENISE DE ALBUQUERQUE ANDRADE

Ação da *Euphorbia tirucalli* L. na formação de focos de cripta aberrante na mucosa cólica induzida por azoximetano em ratos.

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Cirurgia.

Aprovada em 29/10/2007

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. ^a Dra. Sthela Maria Murad Regadas
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Manuel Álvaro de Freitas Lins Neto
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Andrade, Denise de Albuquerque

Ação da *Euphorbia tirucalli* L. na formação de focos de cripta aberrante na mucosa cólica induzida por azoximetano em ratos / Denise de Albuquerque Andrade. – Fortaleza, 2007.

62f

Orientador: Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues.

Dissertação (Mestrado em Cirurgia). Universidade Federal do Ceará. Departamento de Cirurgia.

1. *Euphobiaceae* 2. Quimioprevenção 3. Azoximetano 4. Câncer colorretal. I Rodrigues, Lusmar Veras. II. Título

“Há quem diga que todas
as noites são de sonhos.
Mas há também quem garanta
que nem todas,
só as de verão.
No fundo, isso não tem importância.
O que interessa mesmo não é
a noite em si, são os sonhos.
Sonhos que o homem sonha sempre,
Em todos os lugares,
em todas as épocas do ano,
dormindo ou acordado.”

William Shakespeare

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos e amados pais GERMANO E DEURACI,

Com amor incondicional e dedicação me ensinaram o valor da honestidade, do trabalho e respeito, moldando-me o caráter e influenciando beneficentemente minha vida. Minha admiração é incontestável, obrigada por vosso amor.

Meu amado marido MARCUS WELBER,

Pelo amor, respeito, compreensão e pelo incentivo desde o tempo da graduação neste caminho acadêmico e científico.

À minha filha LETICIA,

Seja bem vinda, mesmo não tendo sido gerada junto com este trabalho, espero que junto com seu pai consigamos transmitir além dos valores primordiais que regem nossa vida, amor a Deus, honestidade e respeito, a importância da educação como fundamentação para a vida.

Aos meus irmãos GERMANO FILHO e GERSON,

Pelo amor e respeito.

In Memoriam, aos meus avós,

Sei que se sentiriam orgulhosos e felizes ao meu lado neste momento.

Aos meus sobrinhos GERMANO NETO, RAFAELA E ALICE,

Pela vibração e amor mesmo na minha ausência.

À minha sogra SRA. TEREZINHA e meus (minhas) cunhados (as), ROSSANA, CHRISTIANE SAYONARA, MANOEL, MOISÉS,

Pela amizade e apoio nesta trajetória.

AGRADECIMENTOS

Em especial,

A **DEUS**, pelo refúgio, saúde, proteção, sabedoria e paz, nesse momento de ausência do meu lar paterno, bem como, por todas as bênçãos que me foram concedidas.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor **PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS**, Professor Associado e Coordenador do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade em participar como mestranda no programa e apoio durante o curso.

Ao Professor Doutor **LUSMAR VERAS RODRIGUES**, Professor Adjunto, Chefe do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio como orientador, pela seriedade e exigência na condução dos trabalhos, pelo constante estímulo e ensinamentos oportunos para minha vida pessoal e profissional. Minha eterna gratidão.

Ao Professor Doutor **FRANCISCO SÉRGIO PINHEIRO REGADAS**, Professor Titular do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelos valiosos ensinamentos, profissionalismo e apoio durante a participação no programa de pós-graduação e na residência médica.

Ao Professor Doutor **RODRIGO DORNFELD ESCALANTE**, Professor Adjunto da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual do Ceará, pelo apoio como co-orientador, disponibilidade, compromisso e valiosas sugestões que foram decisivas nesta pesquisa. Muito obrigada.

Ao Professor Doutor **JOÃO ARAGÃO XIMENES FILHO**, pela contribuição na orientação e avaliação estatística dos dados obtidos no estudo, minha gratidão.

Aos Estudantes de Medicina **RAFAELA OLÍMPIO RIBEIRO, VICTOR JOSÉ TIMBÓ GONDIM E FÁBIO SANTIAGO RODRIGUES** dedicados colaboradores em todas as fases do experimento, com empenho e disciplina contribuindo para elaboração do estudo.

Ao Ilustríssimo Professor Doutor **FRANCISCO JOSÉ DE ABREU MATOS**, que além da orientação na decisão da planta em estudo, cedeu seu laboratório e Horto de Plantas Medicinais para realização das coletas e liofilização do látex. Sinto-me honrada em conhecê-lo.

Às Senhoras **MARIA LUCIENE VIERA 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, que com dedicação, amizade e permanente disponibilidade, incentivam e tornam menos áridos os caminhos trilhados pelos alunos da pós-graduação.

Ao Senhor **BENTO FRANCISCO DE OLIVEIRA**, técnico do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio e dedicação no tratamento dos animais utilizados no experimento.

Ao Senhor **FRANCISCO EVANIR GONÇALVES DE LIMA**, funcionário da Unidade de Farmacologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará pela colaboração com as substâncias e diluições empregadas na execução do experimento.

À Senhora **NORMA DE CARVALHO LINHARES**, bibliotecária da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela confecção da ficha catalográfica.

Às Senhoras **AMÉLIA MARIA RAMOS FREIRE, FRANCISCA SIMÕES CAVALCANTE** e amiga **MARIA LEOPOLDINA VERAS CAMELO**, muitíssimo obrigada pelo apoio durante o processo de elaboração do látex da planta, elaboração da exsicata e amizade recebendo-me de portas abertas no Horto de Plantas Medicinais Professor Francisco José de Abreu Matos no campus do Pici da Universidade Federal do Ceará.

Aos Amigos do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de medicina da Universidade Federal do Ceará, **CONCEIÇÃO APARECIDA DORNELAS, IDÁLIA MARIA BRASIL BURLAMAQUI, FLÁVIO ROBERTO DOS SANTOS E FRANCISCO VAGNALDO F. JAMACARU** que durante as dúvidas, dificuldades e incertezas no andamento do projeto, souberam dar apoio e indicar caminhos de forma sincera, tornando o trabalho menos árduo.

Aos **PROFESSORES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO** *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela qualidade e empenho com que ministraram as disciplinas.

Ao **HERBÁRIO PRISCO BEZERRA** do Departamento de Biologia, Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará pela determinação da exsicata da planta em estudo.

A **TODOS** que contribuíram de forma direta ou indireta, durante todas as etapas na elaboração, desenvolvimento e conclusão deste trabalho os meus agradecimentos sinceros, pois como amigos, me receberam de braços abertos neste lindo estado, tornando Fortaleza meu segundo lar. Obrigada.

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

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Delineamento do experimento: Grupo 01- <i>Euphorbia tirucalli</i> L. + Azoximetano (AOM); Grupo 02 – Azoximetano (AOM); Grupo 03 – <i>Euphorbia tirucalli</i> L; Grupo 04 – Solução Fisiológica 0,9%; Indução com Azoximetano AOM 12 mg/kg-↑;Eutanásia ↓	28
FIGURA 2 - Planta <i>Euphorbia tirucalli</i> L. do Horto de Plantas Medicinais Professor Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará, campus do Pici.....	30
FIGURA 3 - Excicata n. 38702 com classificação taxonômica de <i>Euphorbia tirucalli</i> L.	31
FIGURA 4 - Infusão por gavagem com cânula com protetor esférico	32
FIGURA 5 - Posicionamento do animal com posterior tricotomia para procedimento operatório.....	33
FIGURA 6 - Laparotomia com incisão xifo-púbica mediana.....	34
FIGURA 7 - Exposição do cólon aberto longitudinal em papel “craft”	34
FIGURA 8 - Peça envolta em papel “craft”, após ser dobrada em seu eixo de forma concêntrica	35
FIGURA 9 - Esquema de segmento cólico corado com azul de metileno 0,1 % de acordo com a localização cólica, localização foi determinada contando-se 05 cm a partir do ânus para região cecal e definidas como região distal, média e proximal.....	36
FIGURA 10 - Progressão temporal do peso nas 16 semanas do experimento. Valores da média dos grupos estudados: Grupo 01 (G1)- <i>Euphorbia tirucalli</i> L. + Azoximetano (AOM); Grupo 02 (G2) – Azoximetano (AOM); Grupo 03 (G3) – <i>Euphorbia tirucalli</i> L; Grupo 04 (G4) – Solução Fisiológica 0,9%.....	38
FIGURA 11 - Mutilação em cauda de animal do Grupo 03 (Et).....	39
FIGURA 12 - Média e desvio padrão do número de FCA em segmento distal nos grupos estudados: Grupo 01- <i>Euphorbia tirucalli</i> L. + Azoximetano (AOM) e Grupo 02 – Azoximetano (AOM).....	42

- FIGURA 13 - Média e desvio padrão do número de FCA em segmento médio nos grupos estudados: Grupo 01- *Euphorbia tirucalli* L. + Azoximetano (AOM) e Grupo 02 – Azoximetano (AOM). Diferença significativa do grupo 02 Teste T (não-pareado) ($P < 0,001$)* 43
- FIGURA 14 - Média e desvio padrão do número de FCA em segmento proximal nos grupos estudados: Grupo 01- *Euphorbia tirucalli* L. + Azoximetano (AOM) e Grupo 02 – Azoximetano (AOM). Diferença significativa do grupo 02 Teste T (não-pareado) ($P = 0,042$)* 44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Distribuição do peso em gramas nas 16 semanas do experimento. Valores da média dos grupos estudados: Grupo 01- <i>Euphorbia tirucalli</i> L. + Azoximetano (AOM); Grupo 02 – Azoximetano (AOM); Grupo 03 – <i>Euphorbia tirucalli</i> L.; Grupo 04 – Solução Fisiológica 0,9%	37
TABELA 2 - Distribuição de lesões de aspecto adenomatoso visualizados à macroscopia de acordo com localização cólica entre os grupos estudados: Grupo 01- <i>Euphorbia tirucalli</i> L. + Azoximetano (AOM); Grupo 02 – Azoximetano (AOM); Grupo 03 – <i>Euphorbia tirucalli</i> L.; Grupo 04 – Solução Fisiológica 0,9%	39
TABELA 3 - Distribuição da média e desvio padrão do número de FCA com análise da normalidade pelo teste K-S nos grupos estudados: Grupo 01- <i>Euphorbia tirucalli</i> L. + Azoximetano (AOM); Grupo 02 – Azoximetano (AOM); Grupo 03 – <i>Euphorbia tirucalli</i> L.; Grupo 04 – Solução Fisiológica 0,9%	40
TABELA 4 - Avaliação da multiplicidade dos focos de cripta foi realizada comparando o número de FCA com até 04 criptas em relação ao número de FCA com cinco ou mais criptas no Grupo 01- <i>Euphorbia tirucalli</i> L. + Azoximetano (AOM) e Grupo 02 - Azoximetano (AOM).	41
TABELA 5 - Distribuição da média e desvio padrão do número de FCA no segmento distal nos grupos estudados: Grupo 01- <i>Euphorbia tirucalli</i> L. + Azoximetano (AOM); Grupo 02 – Azoximetano (AOM); Grupo 03 – <i>Euphorbia tirucalli</i> L.; Grupo 04 – Solução Fisiológica 0,9%	41
TABELA 6 - Distribuição da média e desvio padrão do número de FCA no segmento médio nos grupos estudados: Grupo 01- <i>Euphorbia tirucalli</i> L. + Azoximetano (AOM); Grupo 02 – Azoximetano (AOM); Grupo 03 – <i>Euphorbia tirucalli</i> L.; Grupo 04 – Solução Fisiológica 0,9%	42
TABELA 7 - Distribuição da média e desvio padrão do número de FCA no segmento proximal nos grupos estudados: Grupo 01- <i>Euphorbia tirucalli</i> L. + Azoximetano (AOM); Grupo 02 – Azoximetano (AOM); Grupo 03 – <i>Euphorbia tirucalli</i> L.; Grupo 04 – Solução Fisiológica 0,9%	43

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS / SÍMBOLOS

- RCBP - Registros de Câncer de Base Populacional
- EUA – Estados Unidos da América
- CCR – Câncer Colorretal
- RCU – Retocolite Ulcerativa
- APC – Polipose Adenomatosa Cólica (“Adenomatous Polyposis Coli”)
- HNPCC - Câncer Colorretal Hereditário Não-Polipóide
- hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 e hMSH6 - Genes reparadores de defeitos de replicação de DNA (“mismatch repair genes”)
- FCA – Focos de Cripta Aberrante
- DMH – 1,2 dimetilhidrazina
- AOM – Azoximetano
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- RNA – Ácido ribonucléico
- MDF- Foco depletado de mucina (“Mucin Depleted Foci”)
- BCAC - Criptas com acúmulo de β -catenina (“ β -catenin-accumulated crypts”)
- “COX-2 inhibitors” - Inibidores de ciclo-oxigenase-2
- EGF - Fator de Crescimento Epitelial
- COX-2 - Ciclooxigenase-2
- CEPA/UFC - Comitê de Ética de Pesquisas em Animais da Universidade Federal do Ceará
- g – Gramas
- ° C – Graus Centígrados
- h - Hora
- ml - Mililitro
- Kg - Quilograma
- Et - *Euphorbia tirucalli* L.
- C – Celocoxibe
- G1 - GRUPO 01 Grupo estudo com ratos induzidos com azoximetano e tratados com extrato aquoso do látex da *Euphorbia tirucalli* L.

- G2 - GRUPO 02 Grupo estudo controle com ratos induzidos com azoximetano sem tratamento com extrato aquoso do látex da *Euphorbia tirucalli L.*
- G3 – GRUPO 03 Grupo estudo controle com ratos sem indução com azoximetano e tratados com extrato aquoso do látex da *Euphorbia tirucalli L.*
- G4 – GRUPO 04 Grupo estudo controle com ratos sem indução com azoximetano e sem tratamento com extrato aquoso do látex da *Euphorbia tirucalli L.*
- IP - Intraperitoneal
- TWEEN 80 - Polissorbato 80
- rpm – Rotações por minuto
- G - Gauche
- ” - Polegadas
- mm – Milímetros
- cm - Centímetros
- PBS - Solução tamponada fosfatada (“Phosphated Buffered Salina”)
- X - Vezes
- iNOS -Óxido Nítrico Sintetase induzido

RESUMO

Ação da *Euphorbia tirucalli* L. na formação de focos de cripta aberrante na mucosa cólica induzida por azoximetano em ratos. **DENISE DE ALBUQUERQUE ANDRADE. Pós-Graduação *Stricto Sensu*, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (Grau de Mestre em Cirurgia). Março, 2007. Orientador: Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues.**

A incidência e mortalidade por câncer colorretal apresentam tendência ao crescimento. O câncer colorretal é a quinta neoplasia mais incidente no Brasil. A etiologia está relacionada com hereditariedade e modificações no estilo de vida. A lesão pré-neoplásica mais precoce com presença de displasia é o foco de cripta aberrante, estando relacionada como lesão precursora de adenomas colorretais e câncer em humanos. Entender a natureza destas lesões contribui na pesquisa de agentes preventivos eficazes no câncer colorretal. O objetivo foi verificar o potencial quimiopreventivo da solução aquosa do látex de *Euphorbia tirucalli* L. quanto a formação de focos de cripta aberrante (FCA) em ratos induzidos com azoximetano (AOM). Foram usados 32 ratos da linhagem Wistar, machos, com peso médio estimado de 100g -200g (4 – 6 semanas). Foram distribuídos aleatoriamente em 04 grupos contendo 08 animais, denominados: GRUPO 01- grupo estudo com ratos induzidos com AOM e tratados com extrato aquoso do látex da *E. tirucalli* L..GRUPO 02 - grupo estudo controle com ratos induzidos com AOM sem tratamento com extrato aquoso do látex da *E. tirucalli* L..GRUPO 03 - grupo estudo controle sem indução com AOM e tratados com extrato aquoso do látex da *E. tirucalli* L.. GRUPO 04 - grupo estudo controle sem indução com AOM e sem tratamento com extrato aquoso do látex da *E. tirucalli* L..Os animais dos Grupos 01 e 02 receberam injeção de AOM 12 mg/kg, intraperitoneal (IP), uma vez por semana, por 02 semanas. Uma semana antes do início da administração do carcinógeno, foi administrado diariamente solução por gavagem, respectivamente, de extrato aquoso do látex da *E. tirucalli* L. 400mg/Kg e solução fisiológica a 0,9% em uma administração diária. Os Grupos 03 e 04 não foram induzidos com AOM e receberam solução por gavagem, respectivamente, de extrato aquoso do látex da *E. tirucalli* L. 400mg/Kg e solução fisiológica a 0,9%. Todos os grupos continuaram recebendo a solução por gavagem diária até o dia estabelecido para eutanásia. Foram mortos na 15ª semana, após a indução com carcinógeno ou administração IP de solução estéril para injeção. Os animais foram avaliados quanto ao peso, alteração clínica, presença de adenomas ou tumores cólicos, e quanto à presença de FCA e o número de criptas por cada foco (multiplicidade) de acordo com a localização cólica, definidas região distal, medial e proximal. Verificamos no presente estudo que o extrato aquoso da *E. tirucalli* L. (400mg/kg) apresentou uma diminuição significativa do número de FCA do grupo 01 em relação ao grupo 02 no segmento médio e proximal ($p < 0,05$). Houve uma predominância no estudo da presença de 03 a 05 criptas por FCA nos grupos induzidos com carcinógeno. Este estudo sugere que extrato aquoso de *E. tirucalli* L tem potencial quimiopreventivo em relação a carcinogênese cólica, inibindo a formação de FCA em ratos induzidos com AOM.

DESCRITORES: *Euphobiaceae*, Quimioprevenção, Azoximetano, Câncer colorretal.

ABSTRACT

Effects of *Euphorbia tirucalli* L. on the formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rats. **DENISE DE ALBUQUERQUE ANDRADE. Stricto Sensu Post-Graduation. Department of Surgery, Medical School, Federal University of Ceará (Degree of Master in Surgery). March, 2007. Advisor: Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues.**

Colorectal cancer is the fifth most frequently diagnosed malignancy in Brazil. The etiology may be related with inherited and life-style that can be modified. Aberrant crypt foci have been recognized as early preneoplastic lesions and being related with colorectal adenoma and precursors of cancer in humans. Understanding the nature of early appearing lesions efforts to find effective agents in colorectal cancer. The aim of this study was verify the potential chemopreventive of aqueous solution of the latex of *Euphorbia tirucalli* L. in aberrant crypt foci (ACF) in rats induced with azoxymethane (AOM). Thirty-two Wistar male rats were used, average weight 100g -200g (4 - 6 weeks). They were randomly divided into 04 groups of 08 animals each. Group 01 with rats induced with AOM and treated with aqueous extract of the latex of *E. tirucalli* L., group 02 with rats induced with AOM without treatment with aqueous extract of the latex of *E. tirucalli* L., group 03 with rats without AOM induction and treated with aqueous extract of the latex of *E. tirucalli* L. and group 04 with rats without induction with AOM and without treatment with aqueous extract of the latex of *E. tirucalli* L.. The animals of the groups 01 and 02 were injected intraperitoneally (IP), with AOM once a weekly for 02 weeks at a dose level of 12 mg/kg body weight. One week before the beginning of the administration of the carcinogen, it was administered solution daily by intragastric gavage, respectively, aqueous extract of latex of *E. tirucalli* L. 400mg/Kg and physiologic solution to 0,9%. The groups 03 and 04 were not induced with AOM and they received daily solution by gavage, respectively, aqueous extract of the latex of *E. tirucalli* L. 400mg/Kg and physiologic solution to 0,9%. All groups continued receiving daily solutions by intragastric gavage until the day established for euthanasia. All animals were sacrificed by diethyl ether inhalation 15th week, after AOM initiation or sterile solution injected IP. The animals were evaluated concerning to the weight, clinical alteration, presence of adenomas or colic tumors, and the presence of ACF and the number of crypts for each focus (multiplicity) in agreement with colic location, defined area distal, medial and proximal. We verified in the present study that the aqueous extract of *E. tirucalli* L. (400mg/kg) presented a significant decrease of the number of ACF group 01 in relation to the group 02 in the segments medium and proximal ($p < 0,05$). There was a predominance in the study of the presence of 03 - 05 crypts of ACF. This study suggests the aqueous extract of *E. tirucalli* L. has potential chemopreventive against colon carcinogenesis with inhibition of the formation of ACF in rats induced with AOM .

KEY-WORDS: *Euphorbiaceae* , Chemoprevention, Azoxymethane, Colon cancer

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS/ SIGLAS / SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVO.....	25
3 MATERIAL E MÉTODO.....	26
3.1 MATERIAL.....	26
3.2 MÉTODOS.....	26
4 RESULTADOS.....	37
4.1 AVALIAÇÃO DO PESO.....	37
4.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	38
4.3 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....	39
4.4 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA.....	40
4.4.1 INDUÇÃO DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES.....	40
4.4.1.1 CONTAGEM TOTAL DOS FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES.....	40
4.4.1.2 AVALIAÇÃO DA MULTIPLICIDADE DOS FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES ENTRE OS GRUPOS DE ESTUDO COM CARCINÓGENO.....	40
4.4.2 AVALIAÇÃO SEGMENTAR DA DISTRIBUIÇÃO DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES.....	41
4.4.2.1 SEGMENTO DISTAL.....	41
4.4.2.2 SEGMENTO MÉDIO.....	42
4.4.2.3 SEGMENTO PROXIMAL.....	43
5 DISCUSSÃO.....	45
6 CONCLUSÃO.....	51
7 REFERÊNCIAS.....	52
APÊNDICE	
A - PROTOCOLO CLÍNICO.....	60
B - PROTOCOLO DE FOCO DE CRIPTA ABERRANTE.....	61

1 INTRODUÇÃO

Em todo mundo a incidência e mortalidade por câncer têm apresentado uma tendência ao crescimento. Com o aumento da expectativa de vida do povo brasileiro, o perfil de mortalidade no país modificou, estima-se que em 2006 houve 472.050 novos casos de câncer, configurando as neoplasias como um problema de saúde pública (BRASIL, 2005).

O risco do aparecimento desta afecção aumenta a partir dos 50 anos de idade. A taxa de sobrevivência em 05 anos no caso de doença localizada é 90,5%, mas, para doença metastática esta taxa fica em torno de 10% (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2007). Mais de 90% dos tumores colônicos são adenocarcinomas, e a maior parte das lesões surge de pólipos adenomatosos. A transformação pólipo-câncer passa por uma seqüência de várias mutações genéticas. Este processo de transformação geralmente é lento e pode levar mais de 10 anos, desta forma, a história natural do câncer propicia condições ideais à sua prevenção e detecção precoces (ARAÚJO, 2001).

No Brasil, as neoplasias colorretais têm cada vez mais importância no perfil da morbidade e mortalidade. Com base nos Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP) estima-se que em 2006 foram diagnosticados 25.360 novos casos de câncer colorretal (CCR), sendo 11.390 casos em homens e 13.970 em mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 12 casos novos a cada 100 mil homens e 15 para cada 100 mil mulheres. Ao analisar a ocorrência de casos de câncer de colorretal este se encontra na quinta neoplasia mais incidente (BRASIL, 2005). Na análise da série de dados de mortalidade para o período compreendido entre 1991 a 2001, observou-se um aumento do número de óbitos de 69% em homens e 67% em mulheres para 100.000 habitantes (BRASIL, 2003).

Nos EUA, estima-se que em 2007 haverá 1.444.920 novos casos de câncer e que 559.680 pessoas morrerão por esta afecção. O CCR é a terceira neoplasia mais comum, em 2007 153.760 norte-americanos serão diagnosticados com CCR e aproximadamente 52.180 morrerão pela afecção (JEMAL, 2003; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2007).

A incidência de CCR varia de uma população para outra, mas é particularmente elevada nos países Ocidentais. Mesmo assim, existem diferenças entre países quando se compara população urbana com a rural, nos Estados Unidos, por exemplo, em relação aos imigrantes, o câncer é menos comum nos japoneses que nos americanos, contudo, os imigrantes japoneses apresentam taxas mais altas de CCR quando comparados aos japoneses que vivem em sua terra natal (CORMAN, 2002). No Brasil, a distribuição de casos novos de CCR é bem heterogênea entre as regiões. As regiões Sul e Sudeste apresentam maiores taxas,

enquanto que as regiões Norte e Nordeste apresentam taxas mais baixas e a região Centro-Oeste apresenta padrão de incidência intermediário (BRASIL, 2005).

A etiologia do CCR ainda é desconhecida, o aumento na incidência e mortalidade pode estar relacionado com envelhecimento das populações e modificações no estilo de vida, tanto em relação a maior presença do sedentarismo como utilização de dietas industrializadas, porém o seu surgimento está associado a alguns fatores etiológicos que se incluem:

- a) Fatores dietéticos: ingestão de fibras insolúveis parece proteger contra CCR, bem como, alguns estudos sugerem que o cálcio também tem efeito protetor (NURKITT, 1971; STEMMERMANN, 1990). Gordura saturada correspondendo a mais de 20% das calorias ingeridas resulta em um elevado risco para câncer, e ingestão elevada de açúcar refinado predispõe ao aparecimento de adenomas (MACQUART-MOULIN, 1987).
- b) Tabagismo: foi demonstrado um aumento na incidência de carcinoma após uma exposição ao tabaco por mais de 35 anos (GIOVANNUCCI, 1994);
- c) Radioterapia: a irradiação pélvica está associada a elevação do risco de câncer retal (LEVITT, 1990);
- d) Doença inflamatória intestinal: pacientes com retocolite ulcerativa (RCU) têm o risco aumentado para CCR, está relacionado com o tempo da doença e extensão do comprometimento da afecção. Após 10 anos de doença com comprometimento universal dos colos, o risco de câncer está entre 0,5 e 1% (SOLOMON, 1998). Mesmo em pacientes com doença localizada apenas no colo esquerdo, após três ou quatro décadas alcançam níveis semelhantes de possibilidade em desenvolverem CCR (GYDE, 1998). Nos pacientes com doença de Crohn, o risco é menor para desenvolver CCR em relação aos pacientes com RCU, mas ocorre em índices maiores que na população em geral. Nesses pacientes é difícil estabelecer o risco de CCR, mas encontra-se na literatura um risco relativo de 5,6, e as mesmas considerações devem ser realizadas em termos de acompanhamento para os mesmos (SOLOMON, 1998; EADEN, 2004).
- e) Adenomas: Pólipos adenomatosos têm sido identificados com maior frequência, após a introdução de métodos para prevenção (teste de pesquisa de sangue oculto nas fezes, sigmoidoscopia, enema opaco e colonoscopia). A maioria dos CCR surge de pólipos adenomatosos pré-existentes (MUTO, 1975). E a retirada destes reduzem a incidência e mortalidade do CCR (WINAWER, 1993). O tamanho do pólipo, sua extensão para

componente viloso são considerados fatores de risco independentes, mas associados a um alto grau de displasia (O'BRIEN, 1990).

Dentre os modelos propostos para carcinogênese colorretal, a progressão histológica da mucosa normal para adenomas de fase precoce foi sugerido no modelo de Fearon e Vogelstein (1990). Estes autores demonstraram que o surgimento de tumores colorretais é o resultado de um acúmulo seqüencial de quatro a cinco mutações distintas correspondendo a um estágio diferente na seqüência adenoma-carcinoma. Neste modelo ocorrem mutações do gene APC (“adenomatous polyposis coli”), ativação da proteína k-ras e mutação das proteínas DCC e p53 (FEARON, 1990). Um outro modelo descrito são os encontrados em pacientes portadores de câncer colorretal hereditário não-polipóide (HNPCC) estes apresentam mutações nos genes reparadores de defeitos de replicação de DNA (“mismatch repair genes”), conhecidos como hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 e hMSH6, existem evidências que além dos pacientes portadores de HNPCC, que cerca de 15% dos carcinomas colorretais esporádicos sejam formados a partir deste mesmo caminho (ROSSI, 1999). Além das duas vias descritas para explicar a carcinogênese colorretal, alguns autores descrevem a existência de que alguns carcinomas colorretais desenvolvem-se a partir de áreas de mucosa desprovidas de alterações macroscópicas prévias compatíveis com adenomas, conhecido como carcinoma “de novo”, essas áreas foram estudadas e identificou-se mucosa colorretal com discreta elevação acompanhado de coloração avermelhada e ocasionalmente contendo uma depressão central compatível histologicamente com adenoma tubular que apresentam atipias significativas denominados adenomas planos, atribui-se a existência de uma transmissão familiar como síndrome do adenoma plano hereditário, embora índice de malignização elevado, existem ainda controvérsias a respeito de sua real incidência, assim como de sua importância na carcinogênese colorretal, embora evidências sugere mutações relacionadas ao gene APC em portadores desta síndrome, estas não são capazes de explicar esse processo de carcinogênese “de novo” em bases de biologia molecular (MUTO, 1985; LYNCH, 1988).

A associação adenoma-câncer é reforçada por evidências indiretas, pois é descrito que a distribuição geográfica e topográfica dos adenocarcinomas é semelhante ao dos adenomas; um terço dos espécimes tumorais inclui seis vezes mais adenomas quando comparado com grupos controle sem câncer; focos residuais de adenoma são usualmente encontrados em adenocarcinomas (ADACHI, 1991).

A carcinogênese é um processo complexo de múltiplos passos, envolvendo eventos celular, molecular e morfológico. Todo processo pode ser dividido em três estágios: iniciação, promoção e progressão. Iniciação envolve a exposição das células normais a agentes

carcinogênicos de natureza química, viral ou física, que resulta em mudanças no genoma levando a um crescimento seletivo das células. Promoção envolve expansão clonal de células iniciadas, que geralmente é associado com modificações morfológicas ou fenotípicas. Progressão envolve por sua vez mudanças genéticas e fenotípicas associadas com malignização e metástases (BIRD, 1995). A expansão clonal de uma população de células é geralmente denominada lesão pré-neoplásica (BIRD, 2000).

As lesões pré-neoplásicas com seus vários graus de displasia representam um passo obrigatório na carcinogênese do colo, e muito esforço tem sido dedicado para identificação e caracterização dos processos displásicos em humanos e modelos animais experimentais (FEMIA, 2004).

A lesão pré-neoplásica mais precoce com presença de displasia é o foco de cripta aberrante (FCA), esta alteração está relacionada como lesão precursora de adenomas colorretais e câncer em humanos (CUMMINGS; RONCUCCI, 2000; TAKAYAMA, 2001; ADLER, 2002).

Entender a natureza do surgimento destas lesões precoces na carcinogênese colorretal deve contribuir para esclarecimento dos mecanismos subjacentes na neoplasia cólica e nos esforços em encontrar agentes preventivos eficazes (MORI, 2005). O uso de modelos animais apresenta-se como oportunidade para o estudo biológico do processo da doença e para teste de hipóteses ligada a fatores ambientais na etiologia e prevenção do CCR. O conceito de prevenção é retardar, regredir ou eliminar lesões pré-cancerígenas, baseando-se neste fato, o estudo dos estágios de crescimento de lesões pré-cancerígenas torna-se possível pela identificação de FCA em colo de roedores induzidos com carcinógenos (BIRD, 2000).

FCA foram inicialmente descritas por Bird (1987) em experimentos com colo de roedores corados em azul de metileno e tratados com carcinógenos específicos. FCA são definidos como criptas que apresentam: aberturas luminiais alteradas; exibem espessamento epitelial e são mais largas que as criptas adjacentes. São características da cripta aberrante: serem induzidas por agente carcinogênico específico de modo dose-dependente; cada FCA evolui de uma cripta alterada; exibem características pré-neoplásicas (displasia, padrão proliferativo anormal, mutação *K-ras*); tamanho e multiplicidade das criptas aumentam com o tempo; características como crescimento e número predizem o desfecho tumoral e quantifica os riscos, além de FCA estar presente nos indivíduos com alto risco para desenvolvimento de câncer (BIRD, 2000).

Os FCA ocorrem em todas as espécies de roedores testadas com carcinógenos, como hamsters, ratos e camundongos (BIRD, 2000). Contudo, o desenvolvimento espontâneo de

FCA em baixa frequência em ratos é também descrito na literatura (TANAKAMARU, 2001; FURUKAWA, 2002).

A 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e o azoximetano (AOM) são agentes carcinogênicos que induzem câncer cólico em roedores através de processo com múltiplos passos caracterizado pela formação seqüencial de lesões histopatológicas similares àquelas observadas na carcinogênese espontânea em humanos (CADERNI, 2003). O azoximetano é um metabólito da 1,2-dimetilhidrazina. A DMH foi estudada como substância carcinógena em vários experimentos em ratos e camundongos, principalmente em administração subcutânea. Esta substância quando dada na dosagem e forma de administração apropriada produz em ratos uma alta incidência de adenomas e adenocarcinomas do colo e com menor extensão para intestino delgado. A DMH é facilmente absorvida e após metilação transforma-se em formaldeído e pode ser oxidada por vários passos transformando-se em metilazoximetanol. Liga-se covalentemente com as proteínas, DNA e RNA em muitos tecidos de mamíferos. O colo dos ratos é o órgão-alvo para a toxicidade da DMH, onde produz criptas aberrantes. Esta substância requer bioativação para tornar-se mutagênica e alquilar o DNA em várias espécies *in vivo* e *in vitro* (SOHN, 1991; PAPANIKOLAOU, 1998; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2005). O AOM é ativado metabolicamente no fígado, sendo levado ao cólon pela corrente sanguínea ou via biliar como glucoronídeo conjugado. Após ativação, o DNA é metilado principalmente nas posições N^7 - e O^6 - da guanina (SHAFFHILL, 1985). O AOM é geralmente preferido em relação ao DMH por ser mais potente, baseado na sua molaridade e pelo realce na estabilidade química das soluções (PAPANIKOLAOU, 1998).

A planta medicinal utilizada em medicamentos é um xenobiótico, isto é, um produto estranho ao organismo humano, nele introduzido com finalidades terapêuticas. Como todo corpo estranho, os produtos de sua biotransformação são potencialmente tóxicos e assim devem ser encarados até a comprovação dos fatos. Portanto, o uso popular, e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. A autorização oficial do seu uso medicamentoso deve ser fundamentada em evidências experimentais comprobatórias de que o risco a que se expõem aqueles que a utilizam é suplantado pelos benefícios que possam advir (ALVES, 2000).

Numerosos produtos à base de plantas utilizados na forma de tinturas, tabletes, infusões e cápsulas são empregados de forma empírica no tratamento do câncer, baseados na medicina popular e difundidos através de entidades religiosas ou outras entidades (RAM, 2001; CATALUÑA, 2002).

A efetividade dos agentes químicos preventivos para células cancerígenas, com baixa toxicidade proveniente de plantas medicinais e tradicionalmente utilizadas pela população tem sido motivo para várias pesquisas. Na literatura, espécies de *Euphorbia sp.* têm sido verificadas em relação a sua eficácia como agente anti-viral, anti-inflamatória e antitumoral (BANI, 2000; RAM, 2001; BETANCUR-GALVIS; CATALUÑA, 2002).

A *Euphorbia tirucalli L.*, popularmente conhecida como Avelós, é nativa da África e Ásia, onde seu látex é usado pela cultura popular para tratamento de reumatismo, nevralgias, asma e afecções gástricas. A utilização empírica para câncer no Brasil foi descrita na cidade de Porto Alegre, e difundida de forma direta ou indiretamente por líderes ou entidades religiosas locais. Os constituintes do látex desta planta são os diterpenos originados do tigliano (ésteres de forbol) e dos tipos de ingenano (ésteres de ingenol). A utilização da *Euphorbia tirucalli L.* para tratamento de câncer não apresenta bases científicas e até o momento, sabe-se que os ésteres de forbol estão envolvidos na habilidade de desenvolver tumores. Exemplos destes são as substâncias: 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato e o 4-deoxiforbol que induzem o linfoma de Burkitt e o carcinoma de nasofaringe, que são endêmicos onde a espécie é distribuída na natureza (FÜRSTENBERGER, 1986; CATALUÑA, 2002).

A quimioprevenção consiste no uso de substâncias químicas que promovem a rediferenciação celular e, se possível a apoptose de clones de células neoplásicas, é uma nova modalidade de intervenção. Uma grande área de pesquisa atual é o uso de inibidores de ciclooxigenase-2 (“COX-2 inhibitors”) para a prevenção de câncer colorretal. Como o EGF (Fator de Crescimento Epitelial) tem como um de seus efeitos aumentar a produção de ciclooxigenase-2 (COX-2), esta intervenção de bloqueio da COX-2 está sendo pesquisada em câncer de pulmão, de mama e de próstata, dentre outros. O início deste processo partiu do princípio de populações que faziam uso continuado de ácido acetil salicílico para problemas cardio-vasculares e cerebrais, apresentavam menor incidência de câncer colorretal e, em menor proporção, de outros tipos de neoplasia (YAMAGUCHI, 2000).

Recentemente, identificaram-se novos marcadores biológicos específicos para carcinogênese cólica, em roedores tratados com AOM ou DMH, denominados: “mucin depleted foci” (MDF) ou foco depletado de mucina, caracterizada pela formação de criptas com ausência ou escassez na produção de muco, segundo alguns autores esta lesão mostra claramente características displásicas nos cortes histológicos (CADERNI, 2003; FEMIA, 2004) e “ β -catenin-accumulated crypts” (BCAC) ou criptas com acúmulo de β -catenina, o acúmulo desta proteína no núcleo e/ou citoplasma além de abrigar mutações genéticas

freqüentes indica-o como tendo um importante papel na carcinogênese (YAMADA, 2000; 2001; HIROSE, 2003; HATA; MORI, 2004).

Na supressão da formação de FCA, que representa a lesão pré-neoplásica relacionada com a carcinogênese em roedores, os modelos animais empregados no estudo da carcinogênese cólica tem sido útil na elucidação dos mecanismos e para fornecer direcionamento na aproximação de agentes preventivos no tratamento de seres humanos. Várias drogas quimiopreventivas têm sido utilizadas, inclusive inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2), como extratos de plantas ou seus constituintes ativos (BROWN, 2000; CORPET, 2002; MORIOKA, 2004; FRANK; MARTÍNEZ-FERRER; TAKAHASHI, 2006).

Visto que as pesquisas não têm consenso com relação à atividade antitumoral da *Euphorbia tirucalli* L. e com seu uso disseminado pela população de forma empírica incentivado por entidades religiosas, no presente trabalho, deseja-se verificar se o extrato aquoso de *Euphorbia tirucalli* L., tem atividade supressora de FCA em ratos induzidos com azoximetano.

2 OBJETIVO

Verificar o potencial quimiopreventivo da solução aquosa do látex de *Euphorbia tirucalli* L. quanto à formação de focos de cripta aberrante em ratos induzidos com azoximetano.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 MATERIAL

A pesquisa foi realizada após avaliação do Comitê de Ética de Pesquisas em Animais da Universidade Federal do Ceará (CEPA/UFC) sob número de protocolo 27/05 e de acordo com as Normas Internacionais para Pesquisa Biomédica em Animais (Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciências Médicas, 1990) e de acordo com a Lei Federal nº. 6.638 que estabelece normas para prática didático-científica da vivisseção de animais, de 8 de maio de 1979.

- AMOSTRA

Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Mammalia Rodentia*, *Muridae*) da linhagem Wistar, machos, adultos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Com peso médio de 100g – 200g e com 4 a 6 semanas de vida. Os animais foram mantidos no laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará em número de quatro por gaiola de polipropileno com tampa de arame galvanizado com zinco, forradas com maravalhas. Permaneceram alojados com umidade relativa do ar em torno de 50 %, e temperatura média de 25° C, iluminação com turno 12h claro/escuro e ventilação mantida através de ventiladores axiais. Receberam água e ração *ad libitum*. Durante o período de 15 dias de adaptação, todos os animais foram previamente tratados com anti-helmíntico de uso veterinário 1ml/Kg de peso do animal (Basken®- Pamoato de Pirantel e Pamoato de Oxantel).

3.2 MÉTODOS

- DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos contendo 08 animais cada, identificados e pesados previamente, e foram denominados:

GRUPO 01 - G1 - Grupo estudo com ratos induzidos com azoximetano e tratados com extrato aquoso do látex da *Euphorbia tirucalli* L. – Os animais receberam injeção de azoximetano 12 mg/kg, intraperitoneal (IP), uma vez por semana, por 02 semanas. Uma semana antes do início da administração do carcinógeno, foi administrado em dose única diária solução por gavagem, de extrato aquoso do látex da *Euphorbia tirucalli* L. 400mg/Kg. Continuaram recebendo a solução por gavagem diária até o dia estabelecido para eutanásia. Os animais foram mortos na 15ª semana, após a indução com carcinógeno.

(GRUPO 02 – (G2) - Grupo estudo controle com ratos induzidos com azoximetano sem tratamento com extrato aquoso do látex da *Euphorbia tirucalli* L. – Os animais receberam injeção de azoximetano 12 mg/kg, intraperitoneal, uma vez por semana, por 02 semanas. Uma semana antes do início da administração do carcinógeno, foi administrado em dose única diária por gavagem, solução salina a 0,9% 02 ml. Continuaram recebendo a solução por gavagem diária até o dia estabelecido para eutanásia. Os animais foram mortos na 15ª semana, após a indução com carcinógeno.

GRUPO 03 – (G3) - Grupo estudo controle com ratos sem indução com azoximetano e tratados com extrato aquoso do látex da *Euphorbia tirucalli* L. – Uma semana antes do início da administração intraperitoneal de solução estéril para injeção, foi administrado em dose única diária solução por gavagem, de extrato aquoso do látex da *Euphorbia tirucalli* L. 400mg/Kg. Continuaram recebendo a solução por gavagem diária até o dia estabelecido para eutanásia. Os animais foram mortos na 15ª semana, após a administração com solução estéril por injeção.

GRUPO 04 – (G4) Grupo controle com ratos sem indução com azoximetano e sem tratamento com extrato aquoso do látex da *Euphorbia tirucalli* L. – Os animais receberam água e ração *ad libitum*. Foi administrado em dose única diária solução por gavagem, 2 ml de Solução Fisiológica 0,9% (SF). Continuaram recebendo a solução por gavagem diária até o dia estabelecido para eutanásia. Os animais foram mortos na 15ª semana, correlacionando-se com início da administração do carcinógeno com grupo 01.

PROCEDÊNCIA DO CARCINÓGENO

O Azoximetano (Sigma-Aldrich Co.) foi obtido através do contato com empresa fornecedora. O mesmo veio na apresentação de frasco-ampola 100mg. Sendo este diluído em água para injeção estéril para manter uma concentração de 12mg/Kg do animal, sendo administrado por via intraperitoneal uma vez por semana por duas semanas (Fig. 1).

PROCEDÊNCIA DO MATERIAL BOTÂNICO ESTUDADO

O material utilizado na elaboração deste trabalho procedeu do Horto de Plantas Medicinais Professor Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará, campus do Pici (Fig. 2), e a planta identificada no Herbário Prisco Bezerra no Departamento de Biologia na Universidade Federal do Ceará sob número de excicata 38702 com classificação taxonômica de *Euphorbia tirucalli* L. (Fig. 3).

As coletas foram realizadas no período de agosto de 2005 a fevereiro de 2006. Durante as coletas o vegetal manteve suas características de coloração verde-clara, caule filiforme não se observando em nenhum momento florescência neste período.

O látex foi coletado através de ranhuras oblíquas no caule com profundidade máxima de 0,5 cm com lâmina de bisturi número 24 e o gotejamento do látex amparado em vidro limpo e seco.

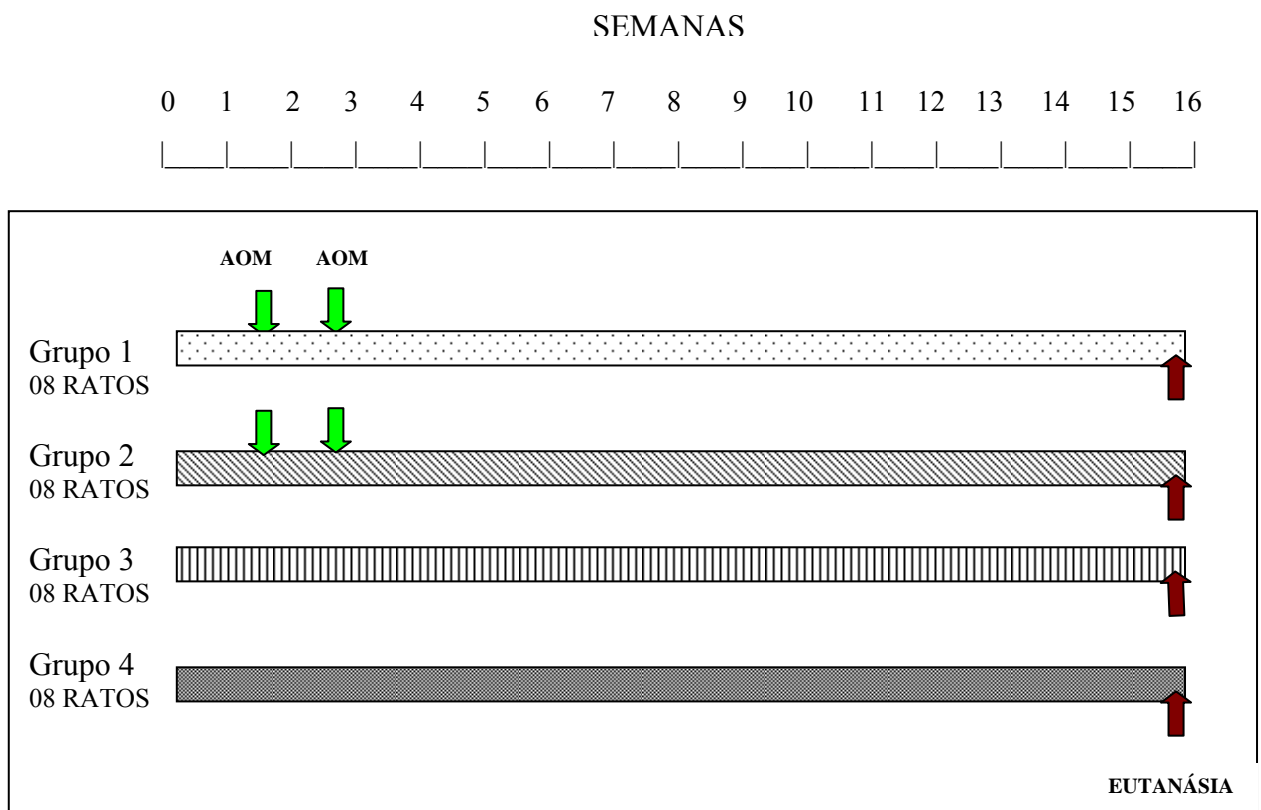


Figura 1 – Delineamento do experimento: Grupo 01- *Euphorbia tirucalli* L. + Azoximetano (AOM); Grupo 02 – Azoximetano (AOM); Grupo 03 – *Euphorbia tirucalli* L; Grupo 04 – Solução Fisiológica 0,9%; Indução com Azoximetano (AOM) 12 mg/kg ↓ ; Eutanásia – ↑ .

OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DO LÁTEX DA *Euphorbia tirucalli* L.

Ao látex foi adicionada água destilada na proporção 1:1 e utilizado procedimento de filtração com gazes, no intuito de separar o látex do extrato hidrofílico da planta. A filtração foi realizada por meio de gazes estéreis sob ar ambiente.

O extrato aquoso foi acondicionado em freezer a -20°C e depois de congelado submetido à liofilização (Savant modelo VLP200). O material liofilizado foi pesado em balança analítica (Mettler P3), com precisão decimilésima.

Para administração aos animais, o material liofilizado foi pesado mantendo uma concentração de 400mg/kg do animal em questão e diluído com água destilada e adicionado 0,2ml de TWEEN 80 P.S. (Polissorbato 80 - Vetec®) para ajudar na homogeneização e posteriormente centrifugado por cinco minutos com rotação de 3000 rpm e o sobrenadante aspirado e administrado por gavagem ao animal.

PESAGEM DOS ANIMAIS

Todos os animais foram pesados pelo mesmo examinador e utilizando a mesma balança (balança analítica Ohaus AS 2600): no início do experimento, semanalmente e no dia determinado para a eutanásia.



Figura 2 – Planta *Euphorbia tirucalli* L. do Horto de Plantas Medicinais Professor Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará, campus do Pici



Figura 3- Excicata com classificação taxonômica de *Euphorbia tirucalli* L.

GAVAGEM

Utilizou-se para gavagem oral cânula curva com 8 cm e protetor distal esférico (18G x 2" x 2,25 mm) adaptada a seringa plástica de 05 ml, para evitar trauma em região esofágica, inserida na boca do animal, este sendo contido manualmente pela apreensão do dorso (Fig. 4).



Figura 04 – Infusão por gavagem com cânula com protetor esférico

AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os animais foram avaliados do ponto de vista clínico diariamente. Foi observado se houve mudanças espontâneas no comportamento (reatividade, imobilidade), contrações involuntárias, piloereção, ptose, respiração.

PROCEDIMENTO OPERATÓRIO

Os animais permaneceram 12 h recebendo somente água mineral *ad libitum*, até o início do ato operatório.

Foram anestesiados com vapor de éter dietílico em recipiente fechado e posicionados em decúbito dorsal sobre prancha de madeira e imobilizados por fixação dos membros superiores e inferiores com ligas de borracha (Fig. 5). Então, submetidos à laparotomia por incisão mediana xifo-pubiana com exposição da cavidade abdominal (Fig. 6). Posteriormente, realizou-se exposição do reto e colo para realização da proctocolectomia. Após, os animais foram mortos por secção da aorta abdominal com conseqüente choque hipovolêmico. A peça foi aberta na borda anti-mesocólica, lavada com soro fisiológico e distendida sobre superfície plana para avaliação macroscópica.



Figura 5- Posição do animal com tricotomia da parede abdominal para procedimento operatório

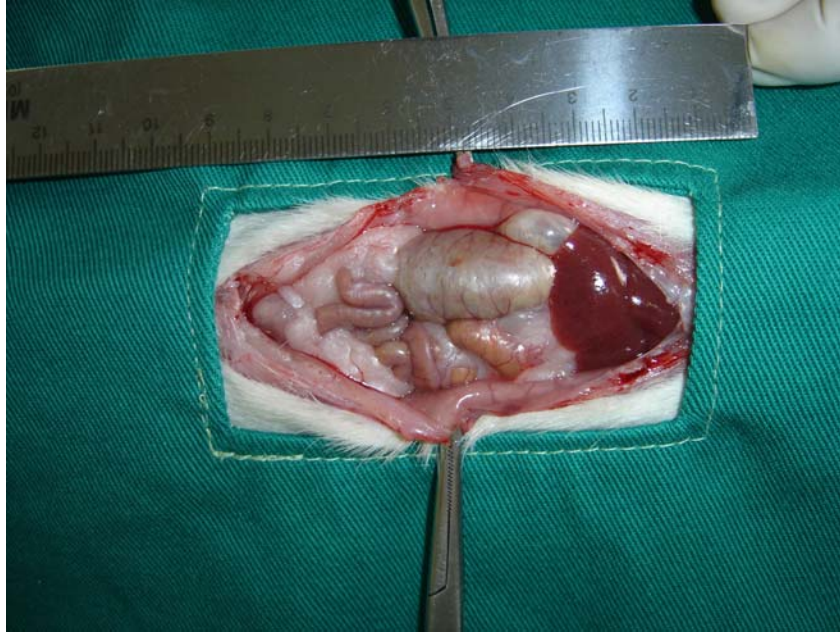


Figura 6 – Laparotomia com incisão mediana xifo-púbica.

AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Após a remoção do colo, este foi aberto longitudinalmente na borda antimesocólica e lavado com soro fisiológico. O mesmo foi cuidadosamente estendido em papel tipo “craft”, tendo sido avaliada a presença de adenomas ou tumores cólicos (Fig. 7).

Posteriormente, o colo foi dobrado cuidadosamente em seu eixo de forma concêntrica, no intuito de reduzir a presença de pregas na mucosa cólica, o que interferiria na visualização das criptas. O material foi submerso em solução de formalina a 10% para fixação (Fig. 8).



Figura 7 – Exposição longitudinal do cólon aberto em papel “craft”



Figura 8 – Peça envolta em papel “craft”, após ser dobrada em seu eixo de forma concêntrica.

AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

Os focos de cripta aberrante foram quantificados de acordo com Bird (1987), que os definiu como criptas que apresentam: aberturas luminais alteradas; exibem espessamento epitelial e são mais largas que as criptas adjacentes. A peça foi corada com azul de metileno a 0,1% em PBS (solução tamponada fosfatada) por 2 min previamente à contagem. A mucosa cólica foi avaliada por dois examinadores utilizando-se do microscópio de luz com magnificação de 40X. O número de focos de cripta aberrante e o número de criptas por cada foco (multiplicidade) foram avaliados de forma contínua de acordo com a localização cólica, esta localização foi determinada contando-se 05 cm a partir do ânus para região cecal e definidas como região distal, média e proximal à medida que se aproxima da região cecal (Fig. 9). O segmento cólico retirado foi dobrado e acondicionado sempre pelo mesmo examinador.

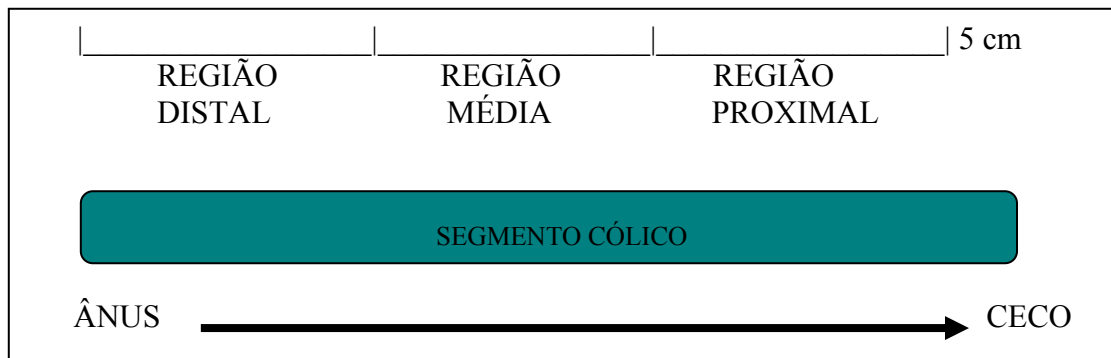


Figura 9 – Esquema de segmento cólico corado com azul de metileno 0,1 % de acordo com a localização cólica, localização foi determinada contando-se 05 cm a partir do ânus para região cecal e definidas como região distal, média e proximal.

AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados nos diferentes grupos utilizando ANOVA e Teste-T (independente). Diferenças estatisticamente significantes foram consideradas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Foi realizado estudo comparativo entre os grupos estudados em relação ao peso, avaliação clínica e avaliação macroscópica e microscópica (quantificação de focos de cripta aberrante e sua multiplicidade) (Fig.10 -14).

4.1 AVALIAÇÃO DO PESO

Durante as 16 semanas do experimento, não observamos diferença significativa entre os grupos estudados. A distribuição da média dos pesos durante o experimento encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição do peso em gramas nas 16 semanas do experimento. Valores da média dos grupos estudados: Grupo 01- *Euphorbia tirucalli* L. + Azoximetano (AOM); Grupo 02 – Azoximetano (AOM); Grupo 03 – *Euphorbia tirucalli* L.; Grupo 04 – Solução Fisiológica 0,9% .

GRUPO/ SEMANAS	G1	G2	G3	G4
1^a	139,62	162,25	221,50	192,50
2^a	153,12	176,37	227,37	204,00
3^a	148,75	171,37	215,00	206,62
4^a	147,62	208,25	231,25	233,28
5^a	187,85	207,50	199,37	229,28
6^a	203,57	220,00	206,87	237,85
7^a	225,00	234,37	239,37	247,14
8^a	242,85	255,00	261,87	258,50
9^a	255,00	268,75	276,25	272,50
10^a	270,71	283,75	291,87	290,00
11^a	250,71	274,37	279,37	273,75
12^a	257,85	281,25	287,50	281,25
13^a	272,85	284,37	297,50	313,75
14^a	279,85	290,62	305,00	321,25
15^a	285,00	296,87	311,25	327,50
16^a	291,42	303,12	317,50	333,75

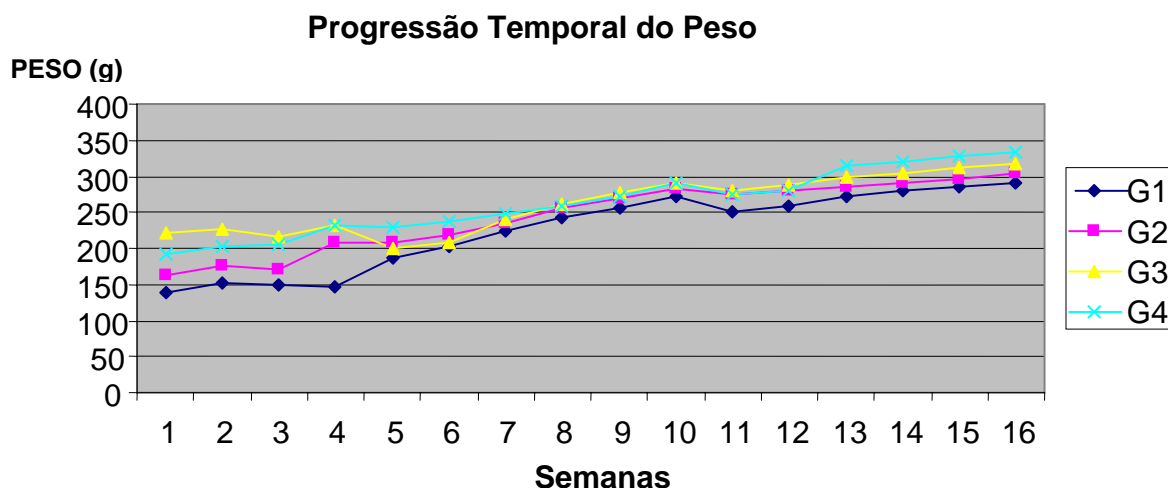


Figura 10 – Progressão temporal do peso nas 16 semanas do experimento. Valores da média dos grupos estudados: Grupo 01 (G1)- *Euphorbia tirucalli* L. + Azoximetano (AOM); Grupo 02 (G2) – Azoximetano (AOM); Grupo 03 (G3) – *Euphorbia tirucalli* L; Grupo 04 (G4) – Solução Fisiológica 0,9%.

4.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA

No grupo 03, grupo estudo controle com ratos sem indução com azoximetano e tratados com extrato aquoso do látex da *Euphorbia tirucalli* L., observou-se agressividade acompanhada de canibalismo com presença de mutilação em caudas, resolvido com isolamento dos animais, mantendo um animal por caixa (Fig. 11).

Não foram observadas nos outros animais mudanças espontâneas no comportamento (reatividade, imobilidade), contrações involuntárias, piloereção, ptose ou alterações na respiração.

Durante experimento, houve morte de 02 animais, um no grupo 01 e outro no grupo 04. Não houve como avaliar a causa óbito no animal do grupo 04 devido o grau avançado de destruição causada pelos outros animais da gaiola. O animal do grupo 01 morreu por inoculação do extrato aquoso de *Euphorbia tirucalli* L. de forma acidental em via respiratória.



Figura 11– Mutilação na cauda de animal do Grupo 03 - *Euphorbia tirucalli L.*

4.3 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Após a remoção do colo, este foi aberto longitudinal na borda antimesocólica e lavado com soro fisiológico, o mesmo foi cuidadosamente estendido em papel tipo “craft” observando quanto a presença de lesões com aspecto adenomatoso (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição de lesões de aspecto adenomatoso vistos à macroscopia de acordo com localização cólica entre os grupos estudados: Grupo 01- *Euphorbia tirucalli L.* + Azoximetano (AOM); Grupo 02 – Azoximetano (AOM); Grupo 03 – *Euphorbia tirucalli L.*; Grupo 04 – Solução Fisiológica 0,9%.

GRUPOS	ADENOMAS		
	DISTAL	MEDIA	PROXIMAL
G1	-	-	-
G2	03	01	-
G3	-	-	-
G4	01	-	-

4.4 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

4.4.1 INDUÇÃO DE FOCOS DE CRIPTA ABERRANTE

4.4.1.1 CONTAGEM TOTAL DOS FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES

Foram observados focos de criptas aberrantes em animais de todos os grupos. Os resultados da média e desvio padrão dos grupos além da análise de normalidade pelo teste K-S estão dispostos na tabela 3.

A análise estatística entre os grupos sem o uso de azoximetano (Grupo 3 e Grupo 4) não mostra diferença estatística conforme teste de Mann-Whitney ($P=0,1281$). Assim, não sugere que haja fator pró-carcinógeno com uso do extrato aquoso da planta estudada (fig.).

Quando avaliado o comportamento do uso do extrato aquoso da *Euphorbia tirucalli* L. em animais submetidos à indução de FCA por azoximetano (Grupo 01 e Grupo 02), observa-se redução da indução dos FCA diante do uso do extrato da planta ($P= 0,0037$) conforme teste T não-pareado com correção de Welch para amostras com variância (fig.).

Tabela 3 - Distribuição da média e desvio padrão do número total de FCA além da análise de normalidade pelo teste K-S nos grupos estudados: Grupo 01- *Euphorbia tirucalli* L. + Azoximetano (AOM); Grupo 02 - Azoximetano (AOM); Grupo 03 - *Euphorbia tirucalli* L; Grupo 04 - Solução Fisiológica 0,9%.

GRUPOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	TESTE K-S
G1	8,43	±5,32	Sim
G2	17,57	±12,07	Sim
G3	1,29	±1,39	Sim
G4	0,65	±0,86	Não

4.4.1.2 AVALIAÇÃO DA MULTIPLICIDADE DOS FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES ENTRE OS GRUPOS DE ESTUDO COM CARCINÓGENO

A avaliação da multiplicidade dos focos de cripta foi realizada comparando o número de FCA com até 04 criptas em relação ao número de FCA com cinco ou mais criptas nos grupos G1 e G2. Os dados gerais estão dispostos na tabela 4 e análise estatística

realizada através do teste qui-quadrado que demonstra redução da multiplicidade dos FCA no grupo 01 em relação ao grupo 02 ($P < 0,0001$).

Tabela 4 - Avaliação da multiplicidade dos focos de cripta foi realizada comparando o número de FCA com até 04 criptas em relação ao número de FCA com cinco ou mais criptas no Grupo 01- *Euphorbia tirucalli* L. + Azoximetano (AOM) e Grupo 02 - Azoximetano (AOM).

NÚMERO DE CRIPTAS POR FOCO	G1	G2	TOTAL
Até 04 criptas	154	201	355
05 ou mais Criptas	18	168	186
Total	172*	369	541

Teste qui-quadrado que demonstra redução significativa da multiplicidade dos FCA no grupo 01 em relação ao grupo 02 ($P < 0,0001$)*.

4.4.2 AVALIAÇÃO SEGMENTAR DA DISTRIBUIÇÃO DOS FCA

4.4.2.1 SEGMENTO DISTAL

Observamos no segmento distal que a distribuição da média e desvio padrão do número de focos de cripta aberrante não apresentou diferença significativa entre os grupos 01 e 02 ao aplicar-se o teste T (não-pareado).

Tabela 5 - Distribuição da média e desvio padrão do número de FCA no segmento distal nos grupos estudados: Grupo 01- *Euphorbia tirucalli* L. + Azoximetano (AOM); Grupo 02 - Azoximetano (AOM); Grupo 03 – *Euphorbia tirucalli* L; Grupo 04 – Solução Fisiológica 0,9%.

GRUPOS	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
G1	7	14,00	±3,74
G2	5	30,00	±17,42
G3	8	1,87	±1,72
G4	4	1,00	±0,81

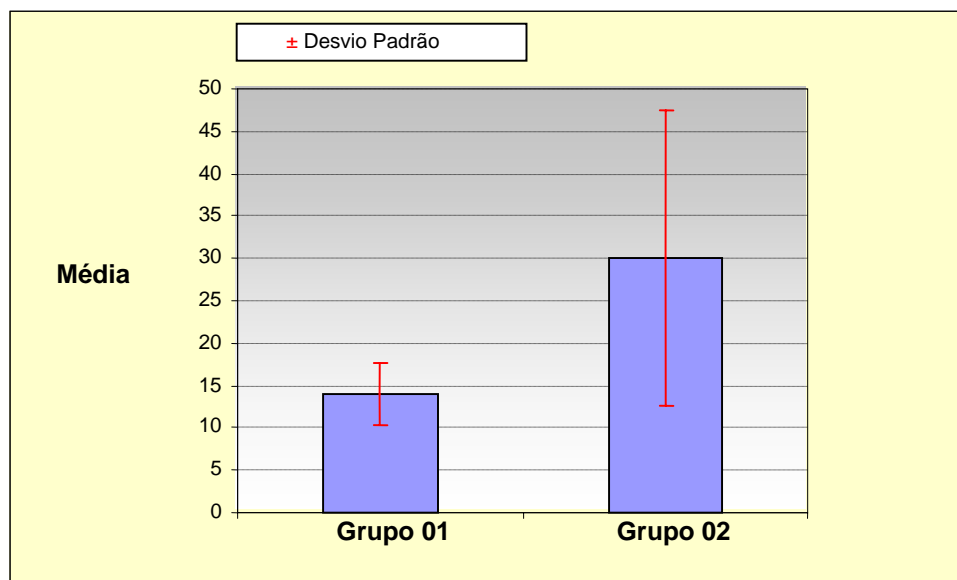


Figura 12 – Média e desvio padrão do número de FCA em segmento distal nos grupos estudados: Grupo 01- *Euphorbia tirucalli* L. + Azoximetano (AOM) e Grupo 02 – Azoximetano (AOM).

4.4.2.2 SEGMENTO MÉDIO

No segmento médio a distribuição da média e desvio padrão do número de focos de cripta aberrante apresentou diferença significativa quando comparado o grupo 01 com grupo 02 ao aplicar-se o teste T (não-pareado) com $P < 0,001$ (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição da média e desvio padrão do número de FCA no segmento médio nos grupos estudados: Grupo 01- *Euphorbia tirucalli* L. + Azoximetano (AOM); Grupo 02 – Azoximetano (AOM); Grupo 03 – *Euphorbia tirucalli* L; Grupo 04 – Solução Fisiológica 0,9%.

GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
G1*	7	6,85	±4,56
G2	8	18,87	±3,90
G3	8	1,50	±1,19
G4	7	0,71	±0,95

* Diferença significativa do grupo 02 Teste T (não-pareado) ($P < 0,001$)

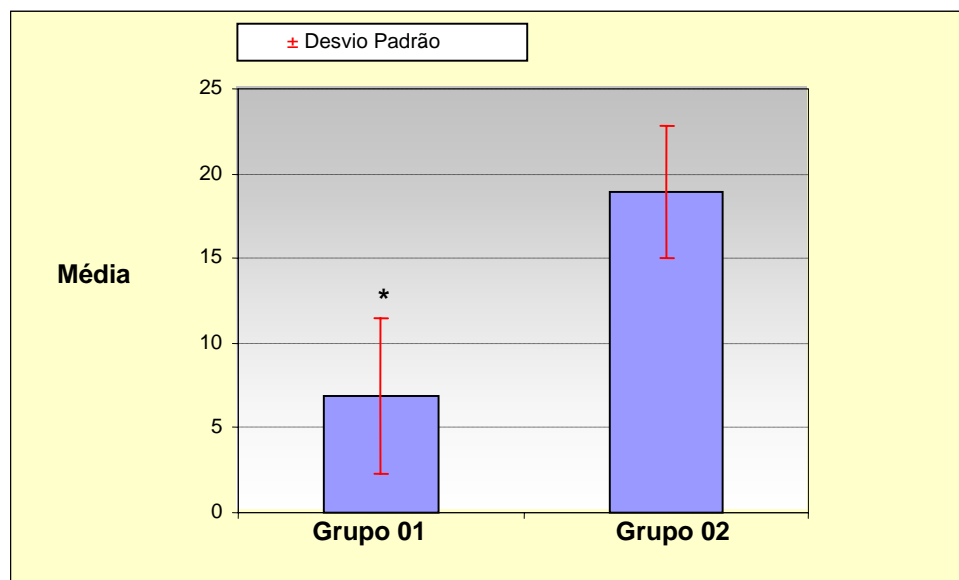


Figura 13 – Média e desvio padrão do número de FCA em segmento médio nos grupos estudados: Grupo 01- *Euphorbia tirucalli* L. + Azoximetano (AOM) e Grupo 02 – Azoximetano (AOM). Diferença significativa do grupo 02 Teste T (não-pareado) ($P < 0,001$)*.

4.4.2.3 SEGMENTO PROXIMAL

No segmento proximal a distribuição da média e desvio padrão do número de focos de cripta aberrante apresentou diferença significativa quando comparado o grupo 01 em relação ao grupo 02 ao aplicar-se o teste T (não-pareado) com $P=0,042$.

Tabela 7 – Distribuição da média e desvio padrão do número de FCA no segmento proximal nos grupos estudados: Grupo 01- *Euphorbia tirucalli* L. + Azoximetano (AOM); Grupo 02 – Azoximetano (AOM); Grupo 03 – *Euphorbia tirucalli* L; Grupo 04 – Solução Fisiológica 0,9%.

GRUPOS	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
G1*	7	4,42	±1,39
G2	8	8,50	±4,59
G3	8	0,50	±0,92
G4	7	0,28	±0,75

* Diferença significativa do grupo 02 Teste T (não-pareado) ($P=0,042$)

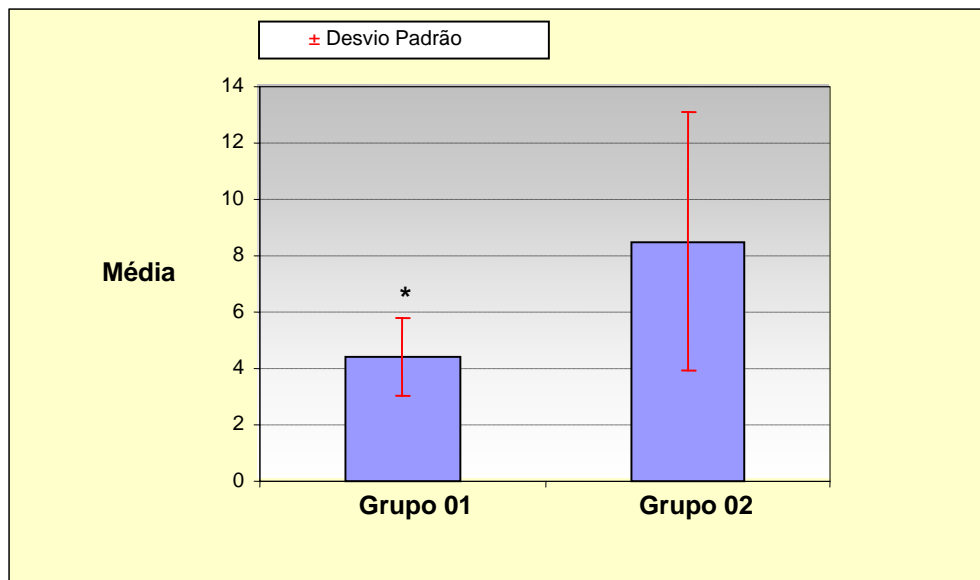


Figura 14 – Média e desvio padrão do número de FCA em segmento proximal nos grupos estudados: Grupo 01- *Euphorbia tirucalli* L. + Azoximetano (AOM) e Grupo 02 – Azoximetano (AOM). Diferença significativa do grupo 02 Teste T (não-pareado) ($P=0,042$)*.

5 DISCUSSÃO

A incidência e mortalidade por câncer têm apresentado uma tendência ao crescimento mundialmente, configurando as neoplasias como um problema de saúde pública. A alta prevalência de CCR em países industrializados ocidentais, acompanhado do aumento na sua incidência e mortalidade, pode estar relacionado com envelhecimento das populações e modificações no estilo de vida, tanto em relação a maior presença do sedentarismo como utilização de dietas industrializadas e gorduras saturadas (BURKITT, 1971; MACQUART-MOULIN, 1987; STEMMERMANN, 1990; WINJNANDS, 2004).

Atualmente há um grande interesse na proteção e terapêutica de certos componentes químicos existentes em plantas em algumas doenças crônicas. Essas substâncias conhecidas como componentes bioativos são disponíveis largamente na natureza. A melhor descrição destes componentes bioativos está no poder antioxidante, como a vitamina E, componentes fenólicos, flavonóides e carotenóides (BOATENG, 2006).

Fearon e Vogelstein (1990), propuseram a seqüência adenoma-carcinoma que consiste em modelo de carcinogênese em que ocorre progressão histológica da mucosa normal para adenomas de fase precoce em humanos e que estes contêm epitélio displásico e surgem de mutações do gene APC (“adenomatous polyposis coli”), seguida de ativação da proteína k-ras e mutação das proteínas DCC e p53 (FEARON, 1990). Segundo Winawer (1999), os fatores ambientais e susceptibilidade hereditária podem ser os principais agentes nesta seqüência de eventos.

A carcinogênese é um processo complexo de múltiplos passos, envolvendo eventos celular, molecular e morfológico, neste ocorre discretas mudanças na mucosa normal para um epitélio hiperproliferativo, evoluindo para uma transformação neoplásica (BIRD, 1995; VOGELSTEIN, 1988; 2000; BOATENG, 2006). Todo o processo pode ser dividido em três estágios: iniciação, promoção e progressão. A formação de lesões pré-neoplásicas com seus vários graus de displasia representam um passo obrigatório na carcinogênese do colo, e muito esforço tem sido dedicado para identificação e caracterização dos processos displásicos em humanos e em modelos animais experimentais, principalmente na pesquisa de agentes preventivos (FEMIA; TAKAHASHI, 2004; MORI, 2005).

O foco de cripta aberrante (FCA) tem sido implicado por autores como a lesão pré-neoplásica mais precoce com presença de displasia, esta alteração está relacionada como lesão precursora de adenomas colorretais e câncer em humanos (BIRD, 1995; CUMMINGS; RONCUCCI, 2000; TAKAYAMA, 2001; ADLER, 2002).

Inicialmente descritas por Bird (1987), em experimentos com colo de roedores corados em azul de metileno e tratados com carcinógenos específicos, os FCA são definidos como criptas que apresentam: aberturas luminiais alteradas; exibem espessamento epitelial e são mais largas que as criptas adjacentes. Apresentam como características serem induzidas por agente carcinogênico específico de modo dose-dependente; cada FCA evolui de uma cripta alterada; exibem características pré-neoplásicas (displasia, padrão proliferativo anormal, mutação *K-ras*); tamanho e multiplicidade das criptas aumentam com o tempo; características como crescimento e número predizem o desfecho tumoral e quantifica os riscos, além de FCA estar presente nos indivíduos com alto risco para desenvolvimento de câncer (BIRD, 2000).

Entender a natureza do surgimento destas lesões precoces na carcinogênese colorretal deve contribuir para esclarecimento dos mecanismos subjacentes na neoplasia cólica e nos esforços em encontrar biomarcadores e agentes preventivos eficazes (HIROSE, 2003; MORI, 2005).

O uso de modelos animais apresenta-se como oportunidade para o estudo biológico da doença e para teste de hipóteses ligada a fatores ambientais na etiologia e prevenção do CCR. O rato foi escolhido para este estudo, pois é de baixo custo apresenta tamanho reduzido é de fácil aquisição, manutenção e apresenta elevada resistência à infecção e ao trauma (FESTING, 1979; ANDRADE, 2002). Várias pesquisas que envolveram formação de FCA por carcinógenos químicos utilizaram este animal, que se mostrou adequado aos estudos (BIRD, 1987, 1995, 2000; CADERNI, 1995; BROWN, MAGNUSON, 2000; CORPET, 2002; HIROSE, 2003; MORI, 2005; MARTÍNEZ-FERRER, 2006). Os FCA ocorrem em todas as espécies de roedores testadas com carcinógenos, como hamsters, ratos e camundongos (BIRD, 2000). Contudo, o desenvolvimento espontâneo de FCA em baixa frequência em ratos é também descrito na literatura (TANAKAMARU, 2001; FURUKAWA, 2002).

De fato, desde que FCA foram utilizados como preditor em animais induzidos com carcinógenos, diferentes métodos tem sido adotados para definir as características dos FCA correlacionadas com a carcinogênese. Alguns estudos correlacionam com o número de FCA, outros com a multiplicidade de criptas, ou com aumento na morfologia (CADERNI, 1995; MAGNUSON, 2000).

A escolha do modelo de formação de cripta aberrante por azoximetano foi pela sua simplicidade, reprodutibilidade e fácil aplicação aos animais de pequeno porte, sendo amplamente utilizado na literatura (BIRD, 1987, 1995, 2000; CADERNI, 1995; BROWN, MAGNUSON, 2000; CORPET, 2002; HIROSE, 2003; MORI, 2005; MARTÍNEZ-FERRER, 2006). Nesse modelo, os FCA são produzidos pela ativação do AOM pelo fígado, sendo carregado ao cólon pela corrente sanguínea ou via biliar como glucoronídeo conjugado. Levando a metilação do DNA, principalmente nas posições N^7 - e O^6 - da guanina (SHAFFHILL, 1985). Em lesões induzidas por AOM, mutações K-ras são frequentes de modo semelhante ao câncer em humanos, enquanto mutações *Apc* e *p53* são raramente observadas (CADERNI, 1997; BIRD, 2000).

Nesse estudo, foi utilizado azoximetano na dose 12 mg/kg, administrado por via intraperitoneal, com intervalo de uma semana entre as administrações. A dosagem de 12 mg/kg teve com base a literatura, verificou-se que os protocolos utilizavam entre 10 – 20 mg/kg do carcinógeno apresentando para estudo efetiva produção de FCA (BIRD, 1987; MAGNUSON, 2000; FURIHATA, 2002; HIROSE, 2003; BUNPO, 2004; BOATENG, 2006). A utilização de duas administrações baseia-se em Bird (1995) que suscitou um questionamento sobre o efeito de uma ou múltiplas administrações na indução da carcinogênese cólica e no aspecto dos FCA. Verificou que para um melhor entendimento dos mecanismos da carcinogênese múltiplas exposições do cólon realçam a incidência de tumores e sua multiplicidade.

Para elucidar a natureza destes eventos, Bird (1995) realizou estudo utilizando ratos Sprague-Dawley que foram expostos a uma, duas e quatro injeções de AOM (10 mg/kg/semana/subcutâneo), e mortos na 6^a, 14^a e 28^a semana após a primeira indução. Demonstrou que existem disparidades regionais no cólon em relação à aparência e características dos FCA e tumores, que a dinâmica do processo da doença como o número e

crescimento de FCA são afetados significativamente pela frequência da exposição do carcinógeno e o tempo do experimento.

O tempo do experimento utilizado neste estudo em 16 semanas baseia-se na premissa de que a maioria dos protocolos utiliza avaliação em curto prazo. Caderni (1995) justifica esta opção devido à facilidade de realização, o desenvolvimento rápido das lesões de FCA (2 a 4 semanas após indução com carcinógeno) e a relativa diminuição do número de animais envolvidos nos testes de modulação de efeitos químicos e/ou dietéticos para carcinogênese .

A *Euphorbia tirucalli* L. pertence ao grupo das Angiospermas, encerra a classe *Magnolidae* (dicotiledônea), que se subdivide na subclasse *Rosidae*, está agrupada na ordem das *Euphorbiales*, família *Euphorbiaceae* (BARROSO, 1986).

O vegetal escolhido como objeto deste estudo se apresenta como arbusto grande de característica semi-lenhosa, originário da África. Apresenta altura de 3 a 7 metros, contendo inúmeros ramos verdes, suculentos, cilíndricos e lactescentes. Praticamente não possui folhas. Suas flores são pequenas e raras. No extrato aquoso da *Euphorbia tirucalli* L. constata-se a presença de compostos triterpenóides, saponinas, flavonóides, taninos e compostos fenólicos. Atribui-se a atividade antitumoral aos componentes flavonóides e compostos triterpenóides, contudo com mecanismos ainda não elucidados (FÜRSTENBERGER, 1986; ALVES, 2000).

Os ésteres de forbol são derivados de diterpenos tetracíclicos e parecem estar restritos às famílias *Euphorbiaceae* e *Thymelaceae*. Estes compostos são frequentemente estudados devido às suas atividades promotoras de tumor e inflamatórias. Os mecanismos moleculares que regem a atividade promotora de tumor dos ésteres de forbol são diferentes dos mecanismos que desencadeiam a atividade inflamatória. A atividade promotora de tumor parece estar associada à habilidade que os ésteres de forbol apresentam de substituir o diacilglicerol na ativação da proteína quinase C, e também devido às capacidades de estimular a síntese de proteínas, de RNA e de DNA, comportando-se como agentes mitogênicos e estimulando o crescimento celular, mesmo em doses muito baixas. Já na atividade inflamatória, os ésteres de forbol mobilizam fosfolipídeos, liberam ácido araquidônico e causam a secreção de prostaglandinas, levando a uma resposta inflamatória dos tecidos (EVANS & EDWARDS, 1987). Cataluña (1999)

descreveu a presença de ésteres de forbol (12-O-tetradecanol phorbol-13-acetato e 4-deoxyphorbol) como promotores no desenvolvimento de linfoma de Burkitt e carcinoma de nasofaringe. Sendo estas afecções endêmicas nos locais em que *Euphorbia tirucalli* L está distribuída no meio ambiente.

O’Pessoa (1992) em testes *in vivo* da atividade antitumoral com extrato hidroalcoólico em carcinoma de Ehrlich (sólido) nas doses de 1 e 2 mg/Kg , apresentou inibição significativa do crescimento tumoral respectivamente em 58 e 60% , embora não tenha sido encontrada uma atividade citotóxica significativa, sugerindo uma atividade antitumoral indireta.

Alves (2000) não observou redução no volume de tumores sólidos de Walker 256 nas dosagens intraperitoneais de 100 mg/kg e 400 mg/ kg de extrato aquoso de *Euphorbia tirucalli* L., mas observou na concentração de 1000 mg/Kg o extrato induziu ou estimulou o crescimento desses tumores.

Rezende (2004) evidenciou o potencial antimutagênico do látex de *Euphorbia tirucalli* preparado nas concentrações 0,1% e 0,2% pelo tratamento de conídios dormentes, no sistema metionina, em *Aspergillus nidulans*. Observando que novas pesquisas podem ser realizadas no intuito de extrair e purificar a molécula responsável pela atividade antimutagênica da planta.

No presente estudo, apesar de não existir um estudo específico na literatura que se propusesse como parâmetro de realização e discussão, outros protocolos utilizando drogas quimiopreventivas (inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2), extratos de plantas ou seus constituintes ativos) direcionados na supressão da formação de FCA, serviram para o delineamento da pesquisa (BROWN, 2000; CORPET, 2002; MORIOKA, 2004; FRANK; MARTÍNEZ-FERRER; TAKAHASHI, 2006).

Rao (2002) observou em modelos animais de câncer cólico induzidos por AOM um aumento da atividade de Óxido Nítrico Sintetase induzido (iNOS) e COX-2 (ciclooxigenase-2) em mucosa cólica de ratos F344. E demonstrou que há importante supressão destes (iNOS e COX-2) nos animais que foram tratados com inibidores seletivos de iNOS.

Takahashi (1997, 2000) também demonstrou que a expressão iNOS é alta em câncer de cólon em humanos, e em marcadamente elevada em câncer cólico de ratos induzidos com AOM, também é encontrado na maioria dos adenomas e em FCA displásicos.

Takahashi (2004) sugeriu modelo de carcinogênese induzida por AOM, envolvendo alteração na expressão de proteínas e em mutação genéticas. Segundo o autor o AOM induz mutações K-ras contribuindo para induzir alterações hiperplásicas, enquanto mutações na β -catenina parecem estar envolvidas em lesões displásicas. O gene K-ras modificado altera a regulação de ciclina-D1 e COX-2 realçando a expressão de iNOS na presença do estímulo inflamatório. A superexpressão de COX-2 produz excesso de prostaglandinas levando a um decréscimo na apoptose e aumento na proliferação celular.

Apesar de resultados controversos na literatura sobre a atividade anti-neoplásica e/ou atividade promotora dos extratos de *Euphorbia tirucalli* L.. Verificamos no presente estudo que o extrato aquoso da *Euphorbia tirucalli* L. apresentou na concentração de 400mg/kg uma diminuição significativa do número de FCA no segmento médio e proximal ($p < 0,05$).

Houve uma predominância no estudo da presença de 03 a 05 criptas por FCA em todos os segmentos, nos grupos induzidos com carcinógeno. No segmento médio houve diferença significativa do grupo 01 em relação ao grupo 02 em número de criptas por focos ($P < 0,05$). No grupo 04 (SF) houve formação espontânea de algumas criptas aberrantes. Contudo, é descrito na literatura o desenvolvimento espontâneo de FCA em baixa frequência em ratos (TANAKAMARU, 2001; FURUKAWA, 2002).

Os mecanismos da atividade inibitória do extrato aquoso de *Euphorbia tirucalli* L, ainda merecem elucidações. Sabe-se que a *Centella asiatica* possui componente triterpênico (saponinas) semelhante a *E. tirucalli*. L, Bunpo (2004) evidenciou efeito inibitório da *Centella asiática* em FCA induzidas por AOM. O autor observou que o extrato *C. asiática* suprimiu a proliferação celular nas regiões média e basal das criptas, favorecendo indução a apoptose nas criptas cólicas, indicando que a modificação da proliferação celular e o favorecimento da indução da apoptose estão associadas com a inibição da formação dos FCA.

Este estudo sugere a possível utilização do extrato aquoso de *Euphorbia tirucalli* L. como agente quimiopreventivo em relação ao desenvolvimento de focos de cripta aberrante, mas os mecanismos da atividade inibitória ainda merecem elucidações. Novos estudos são necessários para esclarecimento do papel inibitório da *Euphorbia tirucalli* L. na presença de FCA induzidos por AOM.

6 CONCLUSÃO

- O uso do extrato aquoso de *Euphorbia tirucalli* L. na dose de 400mg /kg foi capaz de inibir a formação de focos de cripta aberrante nos segmentos médio e proximal do cólon em ratos induzidos com azoximetano.

7 REFERÊNCIAS

ADACHI, M.; RYAN, P.; COLLOPY, B.; FINK, R.; MACKAY, J.; WOODS, R.; OKINAGA, K.; MUTO, T.; MORIAKA, Y. Adenoma-carcinoma sequence of the large bowel. **Aust. N. Z. J. Surg.**, v. 61, n. 6, p. 409-414, 1991.

ADLER, D.G.; GOSTOUT, C.J.; SORBI, D.; BURGART, L.J.; WANG, L.; HARMSSEN, W.S. Endoscopic identification and quantification of aberrant crypt foci in the human colon. **Gastrointest. Endosc.**, v. 56, n. 5, p. 657-662, Nov. 2002.

ALVES, C.S.B. Estudo da atividade antitumoral da *Euphorbia tirucalli* L. (aveloz): abordagens fitoquímica e farmacológica. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília, 2000.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts & figures 2007. Atlanta. American Cancer Society, 2007. Disponível em <<http://www.cancer.org/download/STT/CAFF2007PWSecured.pdf>>. Acesso em 06 de fevereiro de 2007.

ANDRADE, A. Animais de laboratório: criação e experimentação. Organizado por Antenor Andrade, Sérgio Correia Pinto e Rosilene Santos de Oliveira. – Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. 388 p.

ARAÚJO, S.E.A.A.; ALVES, P.R.A.; HABR-GAMA, A. Role of colonoscopy in colorectal cancer. **Rev. Hosp. Clin. Méd. S. Paulo**, v. 56, n.1, p. 25-35, 2001.

BANI, S.; KAUL, A.; JAGGI, B.S.; SURI, K.A.; SURI, O.P.; SHARMA, O.P. Anti-inflammatory activity of the hydrosoluble fraction of *Euphorbia royleana* latex. **Fitoterapia**, v.71, p. 655-662, 2000.

BARROSO, G.M. Sistemática das angiospermas do Brasil. Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 1986, v.1, 377 p.

BETANCUR-GALVIS, L.A.; MORALES, G.E.; FORERO, J.E.; ROLDAN, J. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the *Euphorbia* genus. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 4, p. 541-546, 2002.

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

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

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, Mar. 2000.

BOATENG, J.; VERGHESE, M.; CHAWAN, C.B.; SHACKELFORD, L.; WALKER, L.T.; KHATIWADA, J.; WILLIAMS, D.S. Red palm oil suppresses the formation of azoxymethane (AOM) induced aberrant crypt foci (ACF) in Fisher 344 male rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, p. 1667-1673, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde – Instituto Nacional do Câncer – Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil 2003. Rio de Janeiro, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, INCA, 2005. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2006>>. Acesso em 06 de fevereiro de 2007.

BROWN, W.A.; SKINNER, S.A.; MALCONTENTI-WILSON, C.; MISAJON, A.; DE JONG, T.; VOGIAGIS, D.; O'BRIEN, P.E. Non-steroidal anti-inflammatory drugs with different cyclooxygenase inhibitory profiles that prevent aberrant crypt foci formation but vary in acute gastrototoxicity in a rat model. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 15, n. 12, p. 1386-1392, Dec. 2000.

BUNPO, P.; KATAOKA, K.; ARIMUCHI, H.; NAKAYAMA, H.; KUWAHARA, T.; BANDO, Y.; IZUMI, K.; VINITKETHUMNUEN, U.; OHNISHI, Y. Inhibitory effects of *Centella asiatica* on azoxymethane-induced aberrant crypt focus formation and carcinogenesis in the intestines of F344 rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 42, p. 1987-1997, 2004.

CADERNI, G.; GIANNINI, A.; LANCIONI, L.; LUCERI, C.; BIGGERI, A.; DOLARA, P. Characterisation of aberrant crypt foci in carcinogen-treated rats: association with intestinal carcinogenesis. **Br. J. Cancer**, v.71, p.763-769, 1995.

CADERNI, G.; FILIPPO, D.; LUCERI, C.; FAZI, M.; DOLARA, P.; BAZZICALUPO, M. Apc mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors induced by azoxymethane in rats. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.**, v. 38, n. 3122, p. 467 – 472, 1997.

CADERNI, G.; FEMIA, A.P.; GIANNINI, A.; FAVUZZA, A.; LUCERI, C.; SALVADORI, M.; DOLARA, 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.

CATALUÑA, P.; RATES, S.M.K. The traditional use of the latex from *Euphorbia tirucalli linnaeus* (euphorbiaceae) in the treatment of cancer in south Brazil. **Acta Hort.**, v. 501, p.289-296, 1999.

CORMAN, M.L.; ALLISON, S.I.; KUEHNE, J.P. Handbook of colon & rectal surgery. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2002, 391 p.

CORPET, D.E.; TACHE, S. Most effective colon cancer chemopreventive agents in rats: a systematic review of aberrant crypt foci and tumor data, ranked by potency. **Nutr. Cancer**, v. 43, n. 1, p. 1-21, 2002.

CRUZ, G.M.G. Coloproctologia: Propedêutica Geral – Volume I. Rio de Janeiro, Livraria e Editora Revinter, 2000, 1444 p.

CUMMINGS, O.W. Pathology of the adenoma-carcinoma sequence: from aberrant crypt focus to invasive carcinoma. **Semin. Gastrointest. Dis.**, v. 11, n. 4, p. 229-237, Oct. 2000.

EADEN, J. Colorectal carcinoma and inflammatory bowel disease [In Process Citation]. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 20 (Suppl 4), p. 24-30, 2004.

EVANS, F. J. & EDWARDS, M. C. Activity correlations in the phorbol ester series. In Jury, S.L.; Reynolds, T.; Cutler, D. F.; Evans, F.J. The Euphorbiales chemistry, taxonomy & economic botany. London, Academic Press, 1987, 397 p.

EISEN, G.M. Evidence-based approach to screening and surveillance for colorectal cancer. **Evidence-based Gastroenterol.** v. 2, n.1, p. 44-49, 2001.

EKBOM, A.; HELMICK, C.; ZACK, M. Ulcerative colitis and colorectal cancer a population-based study. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, p. 1228-1233, 1990.

FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, vol. 61, n. 5, p.759-767, 1990.

FEMIA, A.P.; DOLARA, P.; CADERNI, G. Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoxymethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 2, p. 277-281, 2004.

FESTING, M.F.W. Suitability of the rat for different investigations. In: Laboratory animals, mouse and rat. Bethesda, **Fed. Am. Soc. Exp. Biol.**, v.1, p. 237-238, 1979.

FRANK, J.A.; XIAO, R.; YU, S.; FERGUSON, M.; HENNINGS, L.J.; SIMPSON, P.M.; RONIS, M.J.J.; FANG, N.; BADGER, T.M.; SIMMEN, F.A. Effect of Shiitake mushroom dose on colon tumorigenesis in azoxymethane-treated male Sprague-Dawley rats. **Nutr. Res.**, v. 26, p. 138-145, 2006.

FURIHATA, T.; KAWAMATA, H.; KUBOTA, K.; FUJIMORI, T. Evaluation of the malignant potential of aberrant crypt foci by immunohistochemical staining for β -catenin inflammation-induced rat colon carcinogenesis. **Int. J. Mol. Med.**, vol. 9, p. 353-358, 2002.

FÜRSTENBERGER, G.; HECKER, E. On the active principles of the *Euphorbiaceae*, XII. Highly unsaturated irritant diterpene esters from *Euphorbia tirucalli* originating from Madagascar. **J. Nat. Prod.**, v. 49, n. 3, p. 386-397, May- Jun 1986.

FURUKAWA, F.; NISHIKAWA, A.; KITAHORI, Y.; TANAKAMARU, Z.; HIROSE, M. Spontaneous development of aberrant crypt foci in F344 rats. **J. Exp. Clin. Cancer Res**, v. 21, p. 197- 201, 2002.

GIOVANNUCCI, E.; RIMM, E.B.; STAMPFER, M.J. A prospective study of cigarette smoking and risk of colorectal adenoma and colorectal cancer in US men. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 86, p. 183-191, 1994.

GREENSTEIN, A.J.; SLATER, G.; HEIMANN, T.M. Comparison of multiple synchronous colorectal cancers in ulcerative colitis, familial polyposis coli, and de novo cancer. **Ann. Surg.**, v. 203, p.123-128, 1986.

GYDE, S.N.; PRIOR, P.; ALLAN, R.N. Colorectal cancer in ulcerative colitis: a cohort study of primary referrals from three centers. **Gut**, v. 29, p. 206-217, 1998.

HAO, X.P.; PRETLOW, T.G.; RAO, J.S.; PRETLOW, T.P. β -catenin expression is altered in human colonic aberrant crypt foci. **Cancer Res.**, vol. 61, p. 8085-8088, Nov. 2001.

HATA, K.; YAMADA, Y.; KUNO, T.; HIROSE, Y.; HARA, A.; QIANG, S.H.; MORI, H. Tumor formation is correlated with expression of β -catenin-accumulated crypts in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. **Cancer Sci.**, v. 95, n. 4, p. 316-320, Apr. 2004.

HIROSE, Y.; KUNO, T.; YAMADA, Y.; SAKATA, K.; KATAYAMA, M.; YOSHIDA, K.; QIAO, Z.; HATA, K.; YOSHIMI, N.; MORI, H. Azoxymethane-induced beta-catenin-accumulated crypts in colonic mucosa of rodents as an intermediate biomarker for colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 1, p.107-111, 2003.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. 1,2-dimethylhydrazine. **IARC Summary & Evaluation**, v.71, p. 947, 1999. Disponível em <<http://www.inchem.org/documents/iarc/vol71/036-dimhydr.html>>. Acesso em 06 de fevereiro de 2005.

JEMAL, A.; MURRAY, T.; SAMUELS, A.; GHAFOR, A.; WARD, E.; THUN, M.J. Cancer statistics 2003. **CA Cancer J. Clin.**, v. 53, p. 5-26, 2003.

LEAHY, K.M.; ORNBERG, R.L.; WANG, Y.; ZWEIFEL, B.S.; KOKI, A.T.; MASFERRER, J.L. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells *in vivo*. **Cancer Res.**, vol. 62, p. 625-631, Feb. 2002.

LEVITT, M.D.; MILLAR, D.M. & STEWART, J.O. Rectal cancer after pelvic irradiation. **J. R. Soc. Med.**, v. 83, p. 152-154, 1990.

LYNCH, H.T.; SMYRK, T.; LANSPA, S.J. Flat adenoma in a colon cancer-prone kindred. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 80, p. 278-282, 1988.

MACQUART-MOULIN, G.; RIBOLI, E.; CORNÉE, J. Colorectal polyps and diet: a case-control study in Marseilles. **Int. J. Cancer**, v. 40, p. 179-181, 1987.

MAGNUSON, B.A.; SOUTH, E.H.; EXON, J.H.; DASHWOOD, R.H.; XU, M.; HENDRIX, K.; HUBELE, S. Increase susceptibility of adult rats to azoxymethane-induced aberrant crypt foci. **Cancer Lett.**, v. 161, p. 185-193, 2000.

MARTÍNEZ-FERRER, M.; VERGHESE, M.; WALKER, L.T.; SHACKELFORD, L.; CHAWAN, C.B.; JHALA, N. Lycopene reduces azoxymethane-induced colon tumors in Fisher 344 rats. **Nutr. Res.**, v. 26, p. 84-91, 2006.

MORI, H.; YAMADA, Y.; KUNO, T.; HIROSE, Y. Aberrant crypt foci and β -catenin accumulated crypts; significance and roles for colorectal carcinogenesis. **Mutat. Res.**, v. 566, p. 191-208, 2004.

MORI, H.; HATA, K.; YAMADA, Y.; KUNO, T.; HARA, A. Significance and role of early-lesions in experimental colorectal carcinogenesis. **Chemico-Biological Inter.**, v. 155, p. 1-9, 2005.

MORIOKA, T.; SUZUI, M.; NABANDITH, V.; INAMINE, M.; ANYIA, Y.; NAKAYAMA, T.; ICHIBA, T.; MORI, H.; YOSHIMI, N. The modifying effect of *Peucedanum japonicum*, a herb in Ryukyu Islands, on azoxymethane-induced colon preneoplastic lesions in male F344 rats. **Cancer Lett.**, v. 205, p. 133-141, 2004.

MUTO, M.; BUSSEY, J.H. & MORSON, B.C. The evolution of cancer of the colon and rectum. **Cancer**, v. 36, p. 2251-2270, 1975.

MUTO, T.; KAMIYA, J.; SAWADA, T. Small "flat adenoma" of the large bowel with special reference to its clinico-pathologic features. **Dis. Colon Rectum**, v. 28, p. 847-851, 1985.

NURKITT, D.P. Epidemiology of cancer of the colon and rectum. **Cancer**, v. 28, p. 3-13, 1971.

O'BRIEN, M.J.; WINAWER, S.J.; ZAUBER, A.G.; GOTTLIEB, L.S.; STERNBERG, S.S.; DIAZ, B.; DICKERSIN, G.R.; EWING, S.; GELLER, S.; KASIMIAN, D. The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. **Gastroenterology**, v. 98, n. 2, p. 371-379, 1990.

O'PESSOA, C. Testes *in vivo* e *in vitro* para avaliação da citotoxicidade e atividade antitumoral de plantas do Nordeste Brasileiro. Dissertação (Mestrado). Universidade do Ceará, Fortaleza, 1992.

PAPANIKOLAOU, A.; WANG, O.; DELKER, D.A.; ROSENBERG, D.W. Azoxymethane-induced colon tumors and aberrant crypt foci in mice of different genetic susceptibility. **Cancer Lett.**, v. 130, n. 1-2, p. 29-34, 1998.

RAM, V.J.; KUMARI, S. Natural products of plant origin as anticancer agents. **Drug News Perspect**, v. 14, n. 8, p. 465-482, Oct. 2001.

RAO, C.V.; INDRANIE, C.; SIMI, B.; MANNING, P.T.; CONNOR, J.R.; REDDY, B.S. Chemopreventive properties of a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor in colon carcinogenesis, administered alone or in combination with celocoxib, a selective cyclooxygenase inhibitor. **Cancer Res.**, v. 62, p. 165-170, 2002.

REZENDE, J.R.; RODRIGUES, S.B.; JABOR, I.A.S.; PAMPHILE, J.A.; ROCHA, C.L.M.S.C. Efeito antimutagênico do látex de *Euphorbia tirucalli* no sistema metionina em *Aspergillus nidulans*. **Acta Scientiarum. Biol. Sci.** v. 26, n. 4, p. 481-484, 2004.

RODRIGUES, M.A.M.; SILVA, L.A.G.; SALVADORI, D.M.F.; De CAMARGO, J.L.V.; MONTENEGRO, M.R. Aberrant crypt foci and colon câncer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **Braz. J. Méd. Biol. Res.**, v. 35, n.3, p.351-355, 2002.

RONCUCCI, L.; PEDRONI, M.; VACCINA, F.; BENATTI, P.; MARZONA, L.; DE POL, A. Aberrant crypt foci in colorectal carcinogenesis. Cell and crypt dynamics. **Cell Prolif.**, v. 33, n. 1, p. 1-18, Feb. 2000.

ROSSI, B.M. Genética e biologia molecular para o cirurgião/ Benedito Mauro Rossi, Mauro Pinho. – São Paulo: Lemar, 1999.

SAFFHILL, R.; MARTGISON, G.P.; O'CONNOR, P.J. Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 823, p. 111-145, 1985.

SENO, H.; OSHIMA, M.; ISHIKAMA, T.; OSHIMA, H.; TAKAKU, K.; CHIBA, T.; NARUMIYA, S.; TAKETO, M.M. Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E₂ receptor EP₂ – dependent angiogenesis in Apc^{Δ716} mouse intestinal polyps. **Cancer Res.**, vol. 62, p. 506-511, Jan. 2002.

SOHN, O.S.; ISHIZAKI, H.; YANG, C.S.; FIALA, E.S. Metabolism of azoxymethane, methylazoxymethanol and N- nitrosodimethylamine by cytochrome P450IIE1. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 127-131, 1991.

SOLOMON, M.J.; SCHNITZLER, M. Cancer and inflammatory bowel disease: bias, epidemiology, surveillance and treatment. **World J. Surg.**, v. 22, p. 352-358, 1998.

STEINBACH, G.; LYNCH, P.M.; PHILLIPS, R.P.; WALLACE, M.H.; HAWK, E.; GORDON, G.B.; WAKABAYASHI, N.; SAUNDERS, B.; SHEN, Y.; FUJIMURA, T., SU, L.K.; LEVIN, B. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. **N. Engl. J. Med.**, v. 342, p.1946-1952, 2000.

STEMMERMANN, G.N.; NOMURA, A. & CHYYOU, P.H. The influence of dairy and non-dairy calcium on subsite large bowel cancer risk. **Dis. Colon Rectum**, v. 22, p.190-194, 1990.

TAKAHASHI, M.; FUKUDA, K.; OHATA, T.; SUGIMURA, K.; WAKABAYASHI, K. Increase expression of inducible and endothelial constitutive nitric oxide synthases in rat colon tumors induced by azoxymethane. **Cancer Res.**, v. 57, p. 1233-1237, 1997.

TAKAHASHI, M.; MUTOH, M.; KAWAMORI, T.; SUGIMURA, K.; WAKABAYASHI, K. Altered expression of β -catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 1319-1327, 2000.

TAKAHASHI, M.; WAKABAYASHI, K. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. **Cancer Sci.**, v. 95, n. 6, p. 475-480, Jun. 2004.

TAKAHASHI, M.; MUTOH, M.; SHOJI, Y.; SATO, H.; KAMANAKA, Y.; NAKA, M.; MARUYAMA, T.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Suppressive effect of an inducible nitric oxide inhibitor, ONO-1714, on AOM-induced rat colon carcinogenesis. **Nitric Oxide**, v. 14, p. 130-136, 2006.

TAKAYAMA, T.; OHI, M.; HAYASHI, T.; MIYANISHI, K.; NOBUOKA, A.; NAKAJIMA, T.; SATOH, T.; TAKIMOTO, R.; KATO, J.; SAKAMAKI, S.; NIITSU, Y. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. **Gastroenterology**, v. 121, n. 3, p. 599-611, Sep. 2001.

TANAKA, T.; KOHNO, H.; YOSHITANI, S.; TAKASHIMA, S.; OKUMURA, A.; MURAKAMI, A.; HOSOKAWA, M. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and γ inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats. **Cancer Res.**, v. 61, p. 2424-2428, Mar. 2001.

TANAKAMARU, Z.; MORI, I.; NISHIKAWA, A.; FURUKAWA, F.; TAKAHASHI, M.; MORI, H. Essential similarities between spontaneous and MeIQx-promoted aberrant crypt foci in the F344 rat colon. **Cancer Lett.**, v. 172, p. 143-149, 2001.

TIWARI, S.; SINGH, P.; SINGH, A. Toxicity of *Euphorbia tirucalli* plant against freshwater target and non-target organisms. **Pak. J. Biol. Sci.**, v. 6, n. 16, p. 1423-1429, 2003.

VOGELSTEIN, B.; FEARON, E.R.; HAMILTON, S.; KERN, S.; PREISINGER, A. LEPPERT, M.; NAKAMURA, Y.; WHITE, R.; SMITS, A.; BOS, J. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **N. Engl. J. Med.**, v 319, p. 525-532, 1988.

WIJNANDS, M.V.M.; VAN ERK, M.J.; DOORNBOS, R.B.; KRUL, C.A.M.; WOUTERSEN, R.A. Do aberrant crypt foci have predictive value for the occurrence of colorectal tumours? Potential of gene expression profiling in tumours. **Food Chem. Toxicol.**, v. 42, p. 1629-1639, 2004.

WINAWER, S.J.; ZAUBER, A.G.; HO, M.N. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, p. 1977-1981, 1993.

WINAWER, S.J. Natural history of colorectal cancer. **Am. J. Méd**, v. 25, n. 106(1A), p.3S-6S, 1999.

YAMADA, Y.; YOSHIMI, N.; HIROSE, Y.; KAWABATA, K.; MATSUNAGA, K.; SHIMIZU, M.; MORI, H. Frequent β -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.**, vol. 60, p. 3323-3327, Jul. 2000.

YAMADA, Y.; YOSHIMI, N.; HIROSE, Y.; MATSUNAGA, K.; KATAYAMA, M.; SAKATA, K.; SHIMIZU, M.; KUNO, T.; MORI, H. Sequential analysis of morphological and biological properties of β -catenin-accumulated crypts, provable premalignant lesions independent of aberrant crypt foci in rat carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 61, p. 1874-1878, Mar. 2001.

YAMADA, Y.; MORI, H. Pre-cancerous lesions for colorectal cancers in rodents: a new concept. **Carcinogenesis**, vol. 24. p. 1015-1019, 2003.

YAMAGUCHI, N. H. Desenvolvimento de novos tratamentos para o câncer: da pesquisa básica ao seu uso clínico. **RSBC**, vol. 10, p. 06-16, 2000.

APÊNDICE A- PROTOCOLO CLÍNICO

GRUPO _____ RATO _____

SEMANAS/DATA	PESO (g)	ALTERAÇÕES CLÍNICAS
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		

ALTERAÇÕES CLÍNICAS: PILOEREÇÃO, MUDANÇAS ESPONTÂNEAS NO COMPORTAMENTO (REATIVIDADE, IMOBILIDADE), CONTRAÇÕES INVOLUNTÁRIAS, PTOSE, RESPIRAÇÃO, CANIBALISMO.

