



RENORBIO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE PHD3, HIF1- α e SOD1 EM
MODELO EXPERIMENTAL DE CÂNCER COLORRETAL
TABAGISTA E RESPOSTA A RADIOTERAPIA**

LEONARDO OLIVEIRA TRIVILIN

VITÓRIA-ES

2016

LEONARDO OLIVEIRA TRIVILIN

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE PHD3, HIF1- α e SOD1 EM
MODELO EXPERIMENTAL DE CÂNCER COLORRETAL
TABAGISTA E RESPOSTA A RADIOTERAPIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do Ponto Focal Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana
Madeira Álvares da Silva Conforti

VITÓRIA-ES

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

LEONARDO OLIVEIRA TRIVILIN

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE PHD3, HIF1- α e SOD1 EM
MODELO EXPERIMENTAL DE CÂNCER COLORRETAL
TABAGISTA E RESPOSTA A RADIOTERAPIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do Ponto Focal Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em: 19/05/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti
(Orientadora)

Prof.^a Dr.^a Flávia de Paula
(Examinadora Interna - RENORBIO-UFES)

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira
(Examinador Interno - RENORBIO-UFES)

Prof.^a Dr.^a Eloiza Helena Tajara da Silva
(Examinadora Externa - FAMERP)

Prof.^a Dr.^a Jankerle Neves Boeloni
(Examinadora Externa - UFES)

DEDICATÓRIA

Aos pacientes oncológicos e seus familiares.

Ao meu avô, Domingos Trivilin (*in memoriam*), pela
sua luta contra o câncer

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia RENORBIO – Rede Nordeste de Biotecnologia pela oportunidade de capacitação nessa importante área da ciência, na figura de seus professores membros e colaboradores,

À Universidade Federal do Espírito Santo e Departamento de Medicina Veterinária pela liberação das atividades acadêmicas e administrativas durante a realização deste doutoramento, e aos colegas de trabalho pelo suporte e absorção dos encargos acadêmicos,

Ao Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo pela concessão dos animais utilizados nesse experimento,

À minha orientadora Professora Doutora Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti pelos grandes ensinamentos profissionais e pessoais! Sou grato pela lapidação do meu conhecimento e pelos créditos depositados na realização desta tarefa.

Aos meus colaboradores, Suzanny Oliveira Mendes, Aline Ribeiro Borçoi, Diego Cassiano Camuzi, Ester Ribeiro Cunha e Anderson Barros Archanjo. Sem a enorme ajuda e dedicação de todos não teríamos os excelentes resultados desta pesquisa. Nossas aventuras científicas deveriam virar livro! *“We are the champions!”*

Ao Vinicius Elias pelo apoio incondicional, dando força nos momentos de desânimo e colocando a “mão na massa” quando solicitado, obrigado!

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia pelos ensinamentos e horas de descontração,

À banca examinadora pelos ensinamentos agregados e a disposição em melhorar este estudo,

À minha família pelo amor incondicional e suporte em todos os momentos dessa longa caminhada! Obrigado pela confiança e acreditar em mim!

Àqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo.

EPÍGRAFE

“O futuro dependerá daquilo que fazemos no presente.”
Mahatma Gandhi

RESUMO

O tabagismo é um fator de risco para o desenvolvimento de câncer colorretal e pode interferir na expressão de proteínas envolvidas na progressão tumoral, prognóstico e resposta terapêutica. Assim, objetivou-se estudar a expressão de PHD3, HIF1- α e SOD1, bem como resposta a radioterapia em modelo experimental para câncer colorretal tabagista. Utilizou-se 53 ratos Wistar, machos jovens, pesando em média 181,35g ($\pm 18,7$ g). Cinco animais foram mantidos como controle negativo DMH-/tabaco- (G0). Induziu-se carcinogênese colorretal com DMH durante cinco semanas, em 48 animais, que foram divididos em grupos experimentais contendo 12 animais cada: grupo DMH+ (G1), grupo DMH+/radioterapia (G2), grupo DMH+/tabaco+ (G3) e grupo DMH+/tabaco+/radioterapia (G4). A exposição dos grupos G3 e G4 à fumaça do cigarro ocorreu em câmara de inalação equipada com *puff* de fumaça, e correspondeu a 12 cigarros/dia divididos em dois turnos de exposição de 60 minutos cada, durante 143 dias. Na 21ª semana de experimento os animais dos grupos G2 e G4 foram submetidos à três sessões de radioterapia na dose de 700 cGy cada, totalizando 2500 cGy. Na 22ª semana, os animais foram eutanasiados para a retirada das lesões acima de 0,1 centímetro em sua maior porção, que foram fixadas, processadas histologicamente e coradas com Hematoxilina-eosina para diagnóstico. Selecionou-se as amostras classificadas como adenocarcinoma tubular (G1, G2, G3 e G4) e mucosa normal (G0) para a aplicação da técnica imunohistoquímica para as proteínas PHD3, HIF1- α , SOD1 e Caspase 3 clivada. A resposta à radioterapia foi obtida por meio do índice apoptótico das amostras pertencentes aos grupos G2 e G4. No grupo G1 encontrou-se lesões displásicas, benignas e malignas, inflamação moderada a severa e pleomorfismo moderado a severo. No grupo G3 encontrou-se lesões displásicas e malignas, inflamação branda a moderada e pleomorfismo brando a moderado. A PHD3 foi subexpressa nos grupos G1, G3 e G2, sendo mais expressa no grupo G4 ($p=0,0011$). A HIF1- α foi menos expressa no grupo G1 ($p=0,0005$) e após radioterapia aumentou sua expressão nesse grupo, em relação aos outros. A SOD1 foi mais expressa no grupo G1, e após radioterapia no grupo G4 ($p=0,005$). O índice apoptótico foi significativamente maior no grupo G4 ($p=0,0289$). Neoplasias malignas predominaram no modelo experimental de câncer colorretal exposto à fumaça do cigarro indicando sua utilização em estudos prognósticos e sobrevida de pacientes tabagistas, pelo uso de ferramentas moleculares, e que a subexpressão de PHD3, a superexpressão de HIF1- α e níveis de expressão de SOD1 abaixo daquele de neoplasia de animais não expostos, culminaram com melhor resposta radioterápica.

Palavras-chave: carcinogênese, neoplasia, tabaco, biomarcadores, cólon e reto

ABSTRACT

Smoking is a risk factor for colorectal cancer development and interferes on protein expression involved on tumoral progression, prognostic and therapeutic response. Thus, the objective was to study PHD3, HIF1- α and SOD-1 expression, as well as response to radiotherapy in experimental model for colorectal cancer exposed to cigarette smoke. It was used 53 young male rats Wistar, weighing on average 181,35g ($\pm 18,7$ g). Five animals were kept as negative control DMH-/tobacco- (G0). The induction of colorectal carcinogenesis with DMH during five weeks has been conducted on 48 animals, divided on experimental groups consisting of 12 animals each: DMH+ group (G1), DMH+/radiotherapy group (G2), DMH+/tobacco+ group (G3) and DMH+/tobacco+/radiotherapy group (G4). The exposure of G3 and G4 groups to cigarette smoke occurred in inhalation chamber equipped with smoke puff, and corresponded to 12 cigarettes/day divided into two exposure shifts of 60 minutes each, over 143 days. In the 21th experiment week, G2 and G4 animals underwent three radiotherapy sessions at a dose of 700 cGy each, totaling 2500 cGy. At 22 weeks, all animals were euthanized for removal of >0.1 cm injuries, processed histologically and stained with Hematoxylin-Eosin for diagnosis. It was selected samples classified as tubular adenocarcinoma (G1, G2, G3, G4) and normal mucosa for immunohistochemical technique for proteins PHD3, HIF1-a, SOD1 and cleaved caspase-3. The radiation response was obtained by apoptotic index of G2 and G4 groups. In G1 group were found dysplastic lesions, benign and malignant, moderate to severe inflammation and severe to moderate pleomorphism. In G3 were found dysplastic and malignant lesions, mild to moderate inflammation and mild to moderate pleomorphism. PHD3 protein suffered downregulation in G1, G3 and G4, more expressed in G2 ($p=0.0011$). HIF1- α protein was less expressed in G1 ($p=0.0005$) and increased its expression in this group after radiotherapy compared to others. SOD-1 was more expressed in G1, and after radiotherapy in G4 ($p=0.005$). The apoptotic index was significantly higher in G4 ($p = 0.0289$). Malignancies were predominant in exposed to cigarette smoke experimental model indicating its use in studies of smokers prognostic and survival, through use of molecular tools and, PHD3 downregulation, HIF-1 α upregulation and levels of SOD-1 lower than unexposed animals, led to better radiotherapy response.

Keywords: carcinogenesis, cancer, tobacco, biomarkers, colorectal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diferentes vias genéticas na patogênese do câncer colorretal. Três vias paralelas distintas estão implicadas na patogênese CRC: instabilidade cromossômica, instabilidade de microssatélite e via do pólipó serrilhado. As alterações genéticas e epigenéticas sequenciais que ocorrem em cada percurso são simplificadas. (A) A via de instabilidade cromossômica é impulsionada por mutações que inativam genes supressores de tumor, tais como o gene da polipose adenomatosa coli (APC) e mutações de ativação em proto-oncogenes, tais como K-ras, etc, que levam ao aumento da expansão clonal das células. Subsequente perda de heterozigidade para o braço longo do cromossomo 18 (18q) e perda do supressor tumoral TP53 confere expansão às células com vantagens adicionais de crescimento que em última análise leva a cânceres invasivos. (B) A via de instabilidade de microssatélite é impulsionada pelo dano do gene de APC, e caracteriza-se por inativação de genes de reparo do DNA, tais como a *mutL homolog 1* (MLH1), etc. A inativação de genes do reparo do DNA na maior parte é causada por silenciamento epigenético através de hipermetilação do promotor. A falha desses genes conduz a mutações subsequentes em genes alvos específicos envolvidos na proliferação e diferenciação celular, tais como receptor II do fator de crescimento transformante β (TGF β RII); proteínas envolvidas na regulação da apoptose, como BAX e outros, levando a tumores invasivos com microssatélites instáveis. (C) A via do pólipó serrilhado é impulsionada por hipermetilação de genes e é caracterizada pela presença da mutação de BRAF que faz com que a sinalização MAPKs / ERK esteja aumentada, levando a um aumento da metilação subsequente de outros genes e danos nos genes supressores de tumor, tais como TP53, p16, etc, que levará ao câncer colorretal. FONTE: Adaptado de Mundade et al. (2014).24

Figura 2 - Lesões induzidas por 1,2-dimetilhidrazina na mucosa colorretal de ratos, na 21ª semana de experimento. Lesões polipoides são observadas de forma multifocal na mucosa do intestino grosso. A – Grupo DMH+ (G1). B – Grupo DMH+/tabaco+ (G3). 45

Figura 3 - Lesões em mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina pertencentes ao Grupo DMH+/tabaco+ (G3) na 21ª semana de experimento. A – Mucosa com displasia moderada das criptas, B – Adenocarcinoma tubular colorretal, C – Percentual de neoplasias malignas de acordo com o diagnóstico histopatológico, onde prevaleceu o adenocarcinoma tubular colorretal. A e B: HE.47

Figura 4 - Lesões em mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina pertencentes ao Grupo DMH+/tabaco+ (G3) na 21ª semana de experimento. A –Inflamação mononuclear com presença de numerosos eosinófilos em adenocarcinoma tubular (asterisco), B – Invasão linfática em amostra de adenocarcinoma de células em anel de cinete (setas), C – Adenocarcinoma tubular bem diferenciado, D – Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado, E – Adenocarcinoma tubular pouco diferenciado, F – Desmoplasia moderada (cabeça de seta) e *debris* glandulares (estrela). HE.....48

Figura 5 - Lesões em mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina pertencentes ao Grupo DMH+ (G1) na 21ª semana de experimento. A – Mucosa com displasia de alto grau das criptas, B – Adenoma tubular colorretal, C - Adenocarcinoma tubular colorretal, E – percentual de neoplasias malignas de acordo com o diagnóstico histopatológico, onde prevaleceu o adenocarcinoma tubular colorretal. A, B e C: HE.....49

Figura 6 - Fotomicrografia de neoplasia colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina pertencentes ao Grupo DMH+ (G1) na 21ª semana de experimento. A – Notar inflamação mononuclear com presença de neutrófilos e eosinófilos em adenocarcinoma tubular (asterisco), B – Invasão sanguínea em amostra de adenocarcinoma de células em anel em cinete (seta), C – Adenocarcinoma tubular bem diferenciado, D – Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado, E – Adenocarcinoma de células em anel em cinete exemplificando neoplasia pouco diferenciada, F – Desmoplasia moderada (cabeça de seta). HE50

Figura 7 – Análise da expressão de PHD3 em adenocarcinoma tubular de modelo experimental para câncer colorretal exposto e não exposto à fumaça do cigarro. Notar diferença no escore de expressão de PHD3 em controle negativo DMH-/tabaco- (G0) (A), adenocarcinoma tubular do grupo DMH+ (G1) (B) e grupo DMH+/tabaco+ (G3) (C). Em D, expressão em adenocarcinoma tubular do grupo DMH+/radioterapia (G2), e E, expressão em adenocarcinoma tubular no grupo DMH+/tabaco+/radioterapia (G4). F – Notar a diferença no escore de expressão da proteína PHD3 utilizando o anticorpo anti-PHD3 em G0, G1 e G3. O escore de expressão de PHD3 foi menor no grupo DMH+ (G1) em relação aos grupos controle negativo DMH-/tabaco- (G0) e grupo DMH+/tabaco+ (G3) ($p=0,0002$). G – Análise dos escores de expressão de PHD3 antes e após radioterapia. O escore de expressão de PHD3 foi significativamente

maior no grupo DMH+/tabaco+/radioterapia (G4) em relação ao grupo DMH+/radioterapia (G2) ($p=0,0011$) e em relação ao grupo DMH+/tabaco+ (G3) ($p=0,0001$). * - Significativo pelo teste Kruskal-Wallis (alfa=5%); ** e *** - Significativo pelo teste de Mann-Whitney (alfa=5%), mediana e erro padrão, IHQ.52

Figura 8 - Análise da expressão de HIF1- α em adenocarcinoma tubular de modelo experimental para câncer colorretal exposto e não exposto à fumaça do cigarro. Notar diferença no escore de expressão de HIF1- α no grupo controle negativo DMH-/tabaco- (G0) (A), adenocarcinoma tubular do grupo DMH+ (G1) (B) e grupo DMH+/tabaco+ (G3) (C). Em D, expressão em adenocarcinoma tubular do grupo DMH+/radioterapia (G2), e E expressão em adenocarcinoma tubular do grupo DMH+/tabaco+/radioterapia (G4). F – Notar a diferença no escore de expressão da proteína HIF1- α utilizando o anticorpo anti- HIF1- α em G0, G1 e G3. O escore de expressão de HIF1- α foi menor no grupo DMH+ (G1) em relação ao escore observado no grupo controle negativo DMH-/tabaco- (G0) e DMH+/tabaco+ (G3) ($p=0,0005$). G – Análise dos escores de expressão de HIF1- α antes e após radioterapia. O escore de expressão de HIF1- α foi significativamente maior no grupo DMH+/radioterapia (G2) em relação ao grupo DMH+ (G1) ($p=0,0398$). * - Significativo pelo teste Kruskal-Wallis (alfa=5%); ** - Significativo pelo teste de Mann-Whitney (alfa=5%), mediana e erro padrão, IHQ.53

Figura 9 - Análise da expressão de SOD1 em adenocarcinoma tubular de modelo experimental para câncer colorretal exposto e não exposto à fumaça do cigarro. O escore de expressão de SOD1 diferiu no grupo controle negativo DMH-/tabaco- (G0) (A), adenocarcinoma tubular do grupo DMH+ (G1) (B) e grupo DMH+/tabaco+ (G3) (C). Em D, expressão em adenocarcinoma tubular do grupo DMH+/radioterapia (G2), e E expressão em adenocarcinoma tubular do grupo DMH+/tabaco+/radioterapia (G4). F – Notar a diferença no escore de expressão da SOD1 utilizando o anticorpo anti-SOD1 no grupo controle negativo DMH-/tabaco- (G0), grupo DMH+ (G1) e grupo DMH+/tabaco+ (G3). SDO1 foi mais expressa no grupo DMH+ (G1) em relação aos grupos DMH-/tabaco- (G0) ($p=0,0168$) e grupo DMH+/tabaco+ (G3) ($p=0,0002$). G – Análise dos escores de expressão de SOD1 antes e após radioterapia. O escore de expressão de SOD1 foi significativamente maior no grupo DMH+/tabaco+/radioterapia (G4) em relação ao grupo DMH+/tabaco+ (G3) ($p=0,005$). * e ** - Significativo pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pela análise *pos hoc* pelo teste *t* de Student (alfa=5%); *** - Significativo pelo teste de Mann-Whitney (alfa=5%), mediana e erro padrão, IHQ.54

Figura 10 – Análise do índice apoptótico após tratamento radioterápico em adenocarcinoma tubular de modelo experimental para câncer colorretal induzido com 1,2-dimetilhidrazina. A – Fotomicrografia de adenocarcinoma tubular pertencente ao grupo DMH+/radioterapia (G2), evidenciando células imunopositivas para o anticorpo anti-caspase3 clivada em quantidade representativa do índice apoptótico encontrado para esse grupo. B – Fotomicrografia de adenocarcinoma tubular pertencente ao grupo DMH+/tabaco+/radioterapia (G4), evidenciando células imunopositivas para o anticorpo anti-caspase3 clivada em quantidade representativa do índice apoptótico encontrado. C – Comparativo da distribuição de cada amostra analisada em cada grupo estudado. O índice apoptótico mostrou-se mais variável no grupo G2 que no grupo G4 ($p = 0,0289$), pelo teste de Mann-Whitney, $\alpha = 0,05$, IHQ.....55

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1– Descritivo em número e percentual das características histopatológicas de adenocarcinoma tubular colorretal de ratos induzidos a carcinogênese pertencentes aos grupos DMH+/tabaco+ (G3) e Grupo DMH+ (G1), | 46 |
|---|----|

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2-OG – 2-oxoglutarato

AHR – receptor do hidrocarboneto de arilo

AMO – azoximetano

AP-1 – proteína ativadora 1

APC – *adenomatous polyposis coli*

ARNT – proteína translocadora do receptor nuclear Ah

bHLH – *basic helix-loop-helix protein*

BML – síndrome de Bloom, *recQ helicase like*

CCR – câncer colorretal

CHECK2 – *checkpoint kinase 2*

DMH – 1,2-dimetilhidrazina

DNA – ácido desoxirribonucleico

EPO- eritropoietina

FCA – focos de criptas aberrantes

g – gramas

HIF – fator induzível por hipóxia

HIF1 – fator induzível por hipóxia 1

HIF1- α – fator induzível por hipóxia 1 alfa

HIF1- β – fator induzível por hipóxia 1 beta

HNPCC – câncer colorretal hereditário não polipoide

Hsp40/70 – proteína de choque térmico 40/70

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

IGRF – receptor de fator de crescimento semelhante a insulina

K-ras – *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

LDHA – lactado desidrogenase A

MAM – metilazoximetanol

MGO – metilglioxal

MicroCT – microtomografia computadorizada

MicroPET – tomografia de emissão de pósitron

MLH1 - *MutL homolog 1 (E. coli)*

MPO – mieloperoxidase cólica

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

MSH2 - *MutS homolog 2 (E. coli)*

NDRG3 – *N-myc downstream-regulated gene 3 protein*

NF- κ B – fator nuclear kappa potencializador de cadeia leve de células B ativadas

O₂ – oxigênio molecular

PAF – polipose adenomatosa familiar

PDH – piruvato desidrogenase

PK1 – piruvato desidrogenase *kinase 1*

PER – proteína do período circadiano

PHD – proteína prolil hidroxilase

PHD1 – proteína prolil hidroxilase contendo domínio 1

PHD2 – proteína prolil hidroxilase contendo domínio 3

PHD3 – proteína prolil hidroxilase contendo domínio 3

PHD4 – proteína prolil hidroxilase contendo domínio 4

PMS1 – PMS1 homólogo 1, componente de incompatibilidade do sistema de reparo

PMS2 – PMS2 homólogo 2, componente de incompatibilidade do sistema de reparo

pVHL – proteína von Hippel Lindau

ROS – espécies reativas de oxigênio

SIM – proteína *single-minded*

SOD – enzima superóxido dismutase

SOD1 – enzima superóxido dismutase 1

TGF- β – Fator de crescimento transformante beta

TRIS – tris hidroximetilaminometano

VEGF-A – fator A de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

| | | |
|----|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 18 |
| 2. | REVISÃO DE LITERATURA | 20 |
| | 2.1 <i>Aspectos Gerais do Câncer Colorretal</i> | 20 |
| | 2.1.1 <i>Sobrevida e Prognóstico</i> | 21 |
| | 2.1.2 <i>Etiopatogênese</i> | 22 |
| | 2.2 <i>Tabagismo e Câncer colorretal</i> | 27 |
| | 2.3 <i>Modelos experimentais de carcinogênese colorretal utilizando 1,2-dimetilhidrazina</i> | 28 |
| | 2.4 <i>PHDs, HIF1 e SOD1 e seu papel no câncer</i> | 32 |
| | 2.4.1 <i>Prolil-4-hidroxilases (PHD1, PHD2, PHD3 e PHD4)</i> | 32 |
| | 2.4.2 <i>Fator Induzível por Hipóxia (HIF)</i> | 35 |
| | 2.4.3 <i>Superóxido Dismutase (SOD)</i> | 37 |
| 3. | OBJETIVOS | 40 |
| | 3.1 <i>Objetivo Geral</i> | 40 |
| | 3.2 <i>Objetivos Específicos</i> | 40 |
| 4. | MATERIAL E MÉTODOS | 41 |
| | 4.1 <i>Aspectos Éticos</i> | 41 |
| | 4.2 <i>Delineamento Experimental</i> | 41 |
| | 4.3 <i>Imunohistoquímica</i> | 42 |
| | 4.4 <i>Resposta à radioterapia pelo índice apoptótico</i> | 44 |
| | 4.5 <i>Estatística</i> | 44 |
| 5. | RESULTADOS | 45 |
| | 5.1 <i>Desenvolvimento de lesões em mucosa colorretal de modelo experimental</i> ... | 45 |
| | 5.1.1 <i>Avaliação do número e características histopatológicas de lesões em mucosa colorretal de modelo experimental para câncer colorretal, exposto (G3) e não exposto (G1) à fumaça do cigarro</i> | 45 |
| | 5.1.2 <i>Avaliação das características microscópicas quanto à malignidade</i> | 46 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.2 | <i>Análise da expressão de HIF-1α, PHD3 e SOD1</i> | 50 |
| 5.2.1 | Análise da expressão de PHD3 em adenocarcinoma tubular de modelo experimental para câncer colorretal, antes e após tratamento radioterápico | 51 |
| 5.2.2 | Análise da expressão da HIF1- α em adenocarcinoma tubular de modelo experimental para câncer colorretal, antes e após tratamento radioterápico | 52 |
| 5.2.3 | Análise da expressão de SOD1 em adenocarcinoma tubular de modelo experimental para câncer colorretal, antes e após tratamento radioterápico | 53 |
| 5.3 | <i>Análise da Caspase 3 clivada na resposta à radioterapia</i> | 55 |
| 6. | DISCUSSÃO | 56 |
| 6.1 | <i>Desenvolvimento de lesões em mucosa colorretal de modelo experimental</i> | 56 |
| 6.2 | <i>Análise da expressão de HIF-1α, PHD3 e SOD1</i> | 59 |
| 6.3 | <i>Resposta à radioterapia pelo índice apoptótico</i> | 65 |
| 7. | CONCLUSÕES | 67 |
| 8. | REFERÊNCIAS | 68 |

1. INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é a neoplasia do sistema digestivo mais frequentemente observada (WANG et al., 2010). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, estima-se, para 2016, no Brasil, 16.660 casos novos de câncer colorretal em homens e 17.620 em mulheres. Esta neoplasia maligna é a mais frequente para ambos os sexos, com um risco estimado de 16,84 novos casos a cada 100 mil homens e 17,10 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2015).

Existem três vias moleculares principais responsáveis pela progressão do câncer colorretal. A primeira diz respeito à instabilidade cromossômica, envolvida em rearranjos cromossômicos que contribuem para a aneuploidia tumoral, sendo esta via a responsável pela maioria dos casos de câncer colorretal esporádico (LENGAUER et al., 1998). A segunda via molecular compreende a instabilidade de microssatélites pela metilação das ilhas CpG do promotor dos genes de reparo de mau-pareamento do DNA (ex.: MLH1), via presente na maioria dos casos hereditários e em cerca de 15% dos casos esporádicos (CUNNINGHAM et al., 1998). Por último, existe uma via recentemente descoberta, denominada via dos pólipos serrilhados que envolve mecanismos moleculares diferentes da sequencia já conhecida no desenvolvimento do adenoma-carcinoma (NOFFSINGER, 2009).

Como relatado por Roynette et al. (2004), fatores ambientais também estão envolvidos, com uma alta frequência, nos casos de desenvolvimento de câncer colorretal. Além disso, Cunningham et al. (2010) relataram que a dieta rica em carne vermelha e gordura animal e pobre em fibras, bem como excesso de álcool, a obesidade e o sedentarismo, a doença inflamatória crônica intestinal e o hábito tabagista, também são incluídos como fatores de risco.

O tabagismo aumenta o risco de o indivíduo desenvolver várias doenças crônicas em relação aos indivíduos não fumantes (INCA, 2008). Além disso, também é fator de risco para o desenvolvimento de câncer no sistema gastrointestinal, incluindo cavidade oral, esôfago, estômago, íleo e cólon (CHEN et al., 2001; GIOVANNUCCI, 2001; WHO, 2015).

A fumaça do cigarro contém mais de 7000 substâncias químicas, dessas, 72 foram identificadas como cancerígenas pela Agência Internacional de Investigação do Câncer (HECHT, 2012), muitas das quais podem contribuir para os efeitos reforçadores do tabaco. Dentre estas substâncias, encontram-se presentes vários metais pesados, que atuam indiretamente sobre o DNA, estando relacionado à alteração na regulação da expressão gênica de vários genes (CHEN et al., 2001; CRUZ et al., 2004; HUANG e BUNN, 2003; SALNIKOW et al., 2000).

Uma vez que o tabagismo é um fator de risco para o CCR e ainda pode interferir na expressão de proteínas importantes envolvidas na progressão tumoral, prognóstico e resposta terapêutica, importantes para estudos pré-clínicos, e que serão responsáveis por desencadear uma série de alterações fenotípicas e metabólicas no microambiente tumoral, procuramos estudar as alterações na expressão de PHD3, HIF1- α e SOD1 e suas influências no tratamento radioterápico em modelo experimental de câncer colorretal tabagista, bem como avaliar a influência do hábito tabagista no desenvolvimento do CCR.

Esta pesquisa abriu discussão para os efeitos que a exposição ao tabaco possui sobre a expressão de proteínas de grande valor prognóstico, e interessante, para uma parcela da população que desenvolve o câncer colorretal e possui hábito tabagista, bem como seu comportamento terapêutico, principalmente para os casos em que a radioterapia é solicitada, pois os resultados encontrados mostraram que existe uma modulação na expressão proteica mediante exposição à fumaça do cigarro, e que a mesma culminou com melhor resposta à radioterapia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos Gerais do Câncer Colorretal

O câncer colorretal é a neoplasia do sistema digestivo mais frequentemente observada (WANG et al., 2010). Pelo fato de necessitar de tratamento longo especializado e oneroso, e causar morbidade e mortalidade, esta neoplasia possui alto impacto econômico e social (BRAMBILLA et al., 2012; SIEGEL et al., 2014).

Segundo informações publicadas na Estimativa GLOBOCAN (IARC, 2012), o câncer colorretal (CCR) é uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade no mundo, com uma incidência anual maior que 1,3 milhões de casos, sendo o terceiro mais comum em homens (746.000 casos) e o segundo em mulheres (614.000 casos). Cerca de 55% dos casos ocorrem nas regiões mais desenvolvidas, variando geograficamente, sendo que as taxas mais altas de estimativa estariam na Austrália/Nova Zelândia para homens e mulheres, e o menor na África Ocidental. As regiões menos desenvolvidas no mundo apresentam em torno de 52% do total de 694.000 mortes causadas por esta neoplasia sendo que a taxa de mortalidade é de seis vezes para o sexo masculino e quatro vezes para o sexo feminino. A maior estimativa de mortalidade em ambos os sexos é observada na Europa Central e Oriental, e a menor na África Ocidental (WHO, 2015).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, estima-se, para 2016, no Brasil, 16.660 casos novos de câncer colorretal em homens e 17.620 em mulheres. Esta neoplasia maligna é a mais frequente em ambos os sexos, com um risco estimado de 16,84 novos casos a cada 100 mil homens e 17,10 para cada 100 mil mulheres. Na região Sudeste do país, o CCR é o segundo mais frequente em ambos os sexos (22/100.000 homens e 23/100.000 mulheres) (INCA, 2015).

Como visto, a incidência do CCR é diferente entre as regiões do mundo, e ocorre o mesmo no Brasil. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer colorretal em homens é o segundo mais frequente na Região Sudeste (24,27/100 mil) e terceiro nas Regiões Sul (22,35/100 mil) e Centro-Oeste (14,16/100 mil). E nas Regiões Nordeste (7,05/100 mil) e Norte (5,34/100 mil), ocupa a quarta posição. Para as mulheres, é o segundo mais frequente nas Regiões Sudeste (22,66/100 mil) e Sul (23,27/100 mil). Nas Regiões Centro-Oeste (16,93/ 100 mil), Nordeste (8,77/100 mil) e Norte (5,89/100 mil), é o terceiro mais frequente (INCA, 2015).

A incidência de câncer colorretal é observada com maior frequência em indivíduos com idade acima de 40 anos, prevalecendo os maiores índices em

indivíduos com idade acima de 60 anos e pertencentes ao sexo feminino (FIGUEIREDO et al., 2014)

2.1.1 Sobrevida e Prognóstico

O Diagnóstico e a remoção precoce das lesões pré-malignas vêm reduzindo a taxa de mortalidade dos indivíduos com CCR, confirmadas por estudos de triagem em populações de risco geral, por meio do teste de sangue oculto nas fezes. Além disso, o diagnóstico precoce demonstrou resultados promissores em estudos randomizados no Reino Unido e nos Estados Unidos onde se observaram reduções significativas, tanto na incidência quanto na mortalidade da doença (ATKIN et al., 2010; SCHOEN et al., 2012).

A mortalidade e a sobrevida dos pacientes acometidos com CCR são altamente dependentes do estágio da doença. Em geral, quanto mais cedo diagnosticada, maior a sobrevida. Deste modo, países com alta expectativa de vida e com bom acesso aos serviços de saúde apresentam melhores taxas de sobrevida. Sendo assim, a sobrevida média global em cinco anos aumentou em 22 países, e ficou em torno de 60% na maioria dos países desenvolvidos durante o período de 2005 a 2009 (INCA, 2015).

Vários aspectos anatomopatológicos do CCR como profundidade da parede intestinal acometida pelo tumor, número de linfonodos que contém metástase e metástase em órgãos distantes, podem interferir na sobrevivência dos portadores, sendo esses, relacionados a um pior prognóstico (PEREIRA et al., 2006; CAMPOS et al., 2011). Ademais, outros fatores adicionais também podem influenciar no prognóstico como: idade, sexo e sítio anatómico da neoplasia (FARHOUD et al., 2002; LE VOYER et al., 2003; ROSSI et al., 2010).

Fahroud et al. (2002) relataram que a sobrevida de pacientes com neoplasias localizadas no cólon varia entre 74 e 77,5%, ao passo que pacientes com lesões retais foi de 62 a 66%. Recentemente, Figueiredo et al. (2014) ressaltaram, após avaliação de sobrevida de pacientes com câncer colorretal acompanhados entre janeiro de 2007 e janeiro de 2013, que a sobrevida no pós-operatório foi de 83,21% para 12 meses de acompanhamento, 76,56% para 24 meses de acompanhamento e 63,47% para 36 meses de acompanhamento, frisando que a infiltração tumoral na parede intestinal e o número de linfonodos acometidos com metástase influenciaram negativamente o tempo de vida de pacientes com CCR. Portanto, a observação das características clínicas e anatomopatológicas torna-se fundamental no estabelecimento de estratégias de triagem e prevenção.

A maioria dos casos de câncer colorretal é curável se detectado precocemente (INCA, 2015). O tratamento mais utilizado atualmente é a ressecção cirúrgica, entretanto, dependendo do tamanho, localização e extensão do tumor, intervenções de quimioterapia ou radioterapia são necessárias (INCA, 2016).

2.1.2 Etiopatogênese

O câncer colorretal (CCR) é resultado de uma progressão ordenada desde estágios iniciais benignos, a partir de uma mucosa normal de cólon ou reto, até o surgimento de lesões malignas ocasionadas por alterações genéticas distintas e cumulativas em genes supressores de tumor e oncogenes. Sendo assim, o grande desenvolvimento da biologia molecular vem permitindo a melhor compreensão dos mecanismos genéticos e moleculares envolvidos no desenvolvimento do CCR (FEARON; VOGELSTEIN, 1990).

Existem três vias moleculares principais responsáveis pela progressão do câncer colorretal. A primeira diz respeito à instabilidade cromossômica, envolvida em rearranjos cromossômicos que contribuem para a aneuploidia tumoral, sendo esta via a responsável pela maioria dos casos de câncer colorretal esporádico (LENGAUER et al., 1998). Nesta via, uma mutação chave inicial ocorre no gene supressor tumoral APC, que resulta em câncer colorretal esporádico e também polipose adenomatosa familiar (SHIH et al., 2001; SIEBER et al., 2002). O gene supressor de tumor APC está envolvido na via de sinalização APC/ β -catenina/Tcf, e sua inativação promove o aumento da via de sinalização wnt, pela incapacidade de degradação de β -catenina, culminando com o aumento da proliferação, diferenciação, migração e adesão de células colorretais (SPARKS et al., 1998).

Inserida na via de instabilidade cromossômica encontram-se também, as mutações do gene K-ras (mais de 90% acontecem no códon 12 e 13 do gene), que permitem um estado ativado permanente da célula e conseqüentemente o escape da apoptose, com vantagem no crescimento tumoral (MALUMBRES; BARBACID, 2003). Mutações no códon 13 do gene K-ras estão envolvidas na transição adenoma-carcinoma, ao passo que mutações no códon 12 estão relacionadas à predisposição das células tumorais à invasão local e metástases (GUERRERO et al., 2000).

Também pertencente a via de instabilidade cromossômica, o gene p53 quando mutado estimula a alta atividade proliferativa pela perda do controle do ciclo celular e apoptose, e caracteriza-se por uma importante etapa na carcinogênese colorretal (OIKAWA et al., 2005). P53 também interage com cicloxigenase 2 (COX-2) que desempenha um papel na promoção da inflamação e a proliferação de células em CCR (SWAMY et al., 2003).

Outras vias envolvidas na instabilidade cromossômica incluem: a perda da heterozigose do cromossomo 18q (associado a um prognóstico negativo e elevado potencial metastático) (KERN et al. 1989; LANZA et al., 1998), via de sinalização fosfatidilinositol-3-quinase (podem estimular o crescimento celular e a produção de ácidos graxos) (SAMUELS; VELCULESCU, 2004; DEMING et al., 2013), hipometilação de LINE-1 (BABA et al., 2010a), alterações de componentes do cinetócoro, cuja superexpressão foi encontrada em muitos cânceres colorretais (TOMONAGA et al., 2005), HIF1 e HIF2 (BABA et al., 2010b) e finalmente a catepsina B (CHAN et al., 2010).

A segunda via molecular compreende a instabilidade de microssatélites pela metilação das ilhas CpG do o promotor dos genes de reparo de mau-pareamento do DNA, via presente na maioria dos casos hereditários e em cerca de 15% dos casos esporádicos (CUNNINGHAM et al., 1998). Essa via é a evidência de que o reparo do DNA não está funcionando corretamente e células, onde essa situação é observada, tendem a acumular mutações nas regiões de microssatélites de genes de codificação do DNA, levando ao surgimento de CCR (GEIERSBACH; SAMOWITZ, 2011).}

Como visto, a inativação dos genes de reparo podem ocorrer devido metilação aberrante nas ilhas CpG do gene MLH1 e é responsável pela maioria dos casos de CCR. Assim, os defeitos no sistema de reparo do DNA permitem que os CCR por instabilidade de microssatélite, possam adquirir mutações em genes importantes, como por exemplo, o gene APC (ARMAGHANY et al., 2012).

Existe outra via recentemente descoberta, denominada via dos pólipos serrilhados que envolvem mecanismos moleculares diferentes da sequência já conhecida no desenvolvimento do adenoma-carcinoma (NOFFSINGER, 2009). Caracteriza-se pela hipermetilação aberrante nas ilhas CpG localizadas nas regiões promotoras de genes da regulação do ciclo celular, apoptose, angiogênese, reparação do DNA, invasão e adesão, que causam perda da expressão desses genes e é encontrada em cerca de 20 a 30% dos CCR (OGINO et al., 2006). Essa via é realçada pela presença de BRAF (proteína quinase B-Raf) mutada e pelo silenciamento epigenético (JASS et al., 2002).

Mutação pontual no gene BRAF (V600E) promove a ativação constitutiva desta quinase e sua insensibilidade para os mecanismos de *feedback* negativo, levando a sinalização de MAPK/ERK reforçada (RUSTGI, 2013), atingindo o DNA e desencadeando a proliferação celular descontrolada, evasão da resposta imune, angiogênese dada por HIF1- α e VEGF, invasão tecidual e metástases (pela regulação positiva de proteínas envolvidas na migração, sinalização de integrina e contratilidade celular), bem como resistência à apoptose (ASCIERTO et al., 2012).

As mutações em BRAF e K-ras são importantes e a mutação em K-ras foi encontrada nos CCR da via serrilhada com baixa metilação (CIMP-) e isso também é frequentemente associada a mutações no gene de reparo do DNA metilguanina metiltransferase (MGMT) e com a perda da função do PIK3CA (PETKO et al., 2005; OGINO et al., 2007; SHIMA et al., 2011).

As alterações genéticas que ocorrem nessa via não são totalmente esclarecidas e existe grande variabilidade de mudanças moleculares descritas. No entanto, a Figura 1 resume os principais achados dessas três vias (MUNDADE et al., 2014).

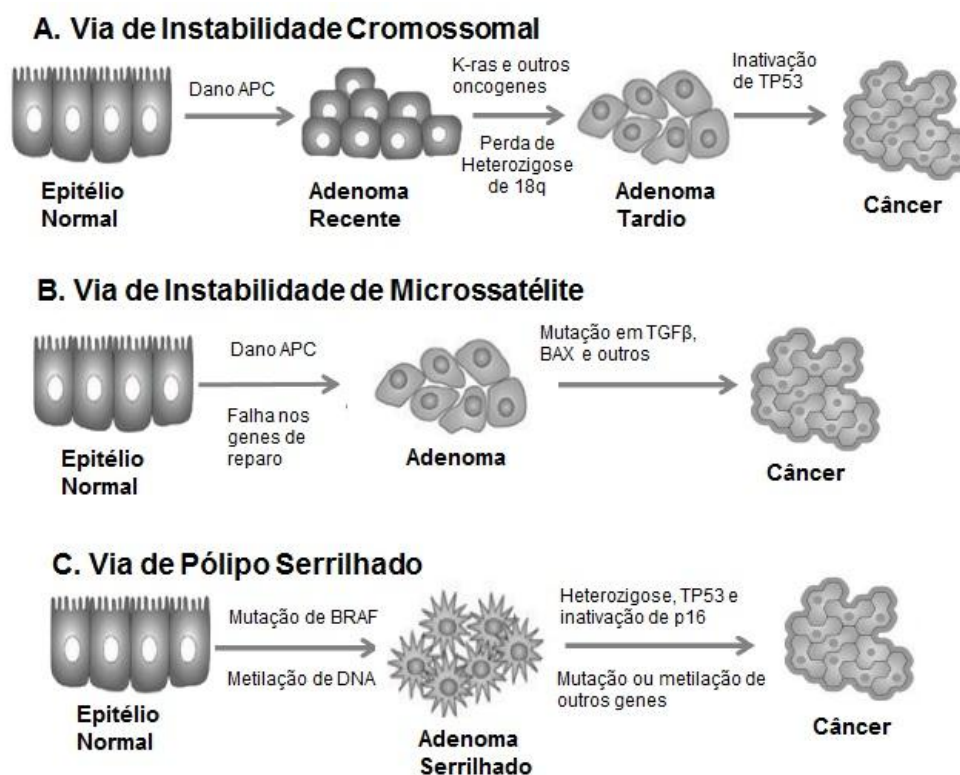


Figura 1 – Diferentes vias genéticas na patogênese do câncer colorretal. Três vias paralelas distintas estão implicadas na patogênese CRC: instabilidade cromossômica, instabilidade de microssatélite e via do pólipo serrilhado. As alterações genéticas e epigenéticas sequenciais que ocorrem em cada percurso são simplificadas. (A) A via de instabilidade cromossômica é impulsionada por mutações que inativam genes supressores de tumor, tais como o gene da polipose adenomatosa coli (APC) e mutações de ativação em proto-oncogenes, tais como K-ras, etc, que levam ao aumento da expansão clonal das células. Subsequente perda de heterozigidade para o braço longo do cromossomo 18 (18q) e perda do supressor tumoral TP53 confere expansão às células com vantagens adicionais de crescimento que em última análise leva a cânceres invasivos. (B) A via de instabilidade de microssatélite é impulsionada pelo dano do gene de APC, e caracteriza-se por inativação de genes de reparo do DNA, tais como a *mutL homolog 1* (MLH1), etc. A inativação de genes do reparo do DNA na maior parte é causada por silenciamento epigenético através de hipermetilação do promotor. A falha desses genes conduz a mutações subsequentes em genes alvos específicos envolvidos na proliferação e diferenciação celular, tais como receptor II do fator de crescimento transformante β (TGF β RII); proteínas envolvidas na regulação da apoptose, como BAX e outros, levando a tumores invasivos com microssatélites instáveis. (C) A via do pólipo serrilhado é impulsionada por hipermetilação de genes e é caracterizada pela presença da mutação de BRAF que faz com que a sinalização MAPKs / ERK esteja aumentada, levando a um aumento da metilação subsequente de outros genes e danos nos genes supressores de tumor, tais como TP53, p16, etc, que levará ao câncer colorretal. FONTE: Adaptado de Mundade et al. (2014).

Ainda existem outras vias na patogênese do câncer colorretal, e uma delas é a via do microRNA. Estes são RNAs não codificantes que regulam a expressão de proteínas por meio da inibição da tradução do mRNA, principalmente de genes relacionados à diferenciação celular, desenvolvimento, proliferação e apoptose. Existem inúmeros microRNAs envolvidos no desenvolvimento do câncer colorretal que podem ser regulados positivamente quanto negativamente no CCR, agindo como oncogenes e genes supressores de tumor (BANDRES et al, 2006).

O processo inflamatório crônico também é um componente crítico na iniciação e promoção do câncer colorretal, pois existe forte associação entre a doença inflamatória do intestino e o desenvolvimento de neoplasia neste segmento intestinal, uma vez que ocorre reforço na estimulação do crescimento celular e sistema anti-apoptótico, aumentando danos ao DNA por espécies reativas de oxigênio azotos mutagênicos, bem como pela produção de fatores de crescimento angiogênicos e linfangênicos, e alterações dos sistemas de membranas para facilitar adesão celular e invasão (COUSSENS; WERB, 2002).

Dando suporte ao papel da inflamação na patogênese do CCR, avaliou-se a citocina pró-inflamatória TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), a interleucina 6 (IL-6), a proteína C reativa (PCR) e o fator transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3). Níveis elevados de TNF- α promovem o crescimento tumoral, proliferação e metástase. A IL-6 é responsável pela estimulação da transcrição de STAT3. Essa por sua vez, estimula a proliferação celular, diferenciação, apoptose e promove metástase por meio da indução da expressão de genes como VEGFR2 (receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2), Bcl-2, CyclinD1, MMP2-9, ICAM-1 e COX-2 (MA et al., 2004; CORVINUS et al., 2005; TERZIC et al., 2010).

De forma geral, o desenvolvimento neoplásico apresenta três etapas distintas, a saber: a iniciação, promoção e progressão (RUSSO, 2007; PITOT, 2007). Em relação ao CCR, a etapa de iniciação é irreversível que envolve a ação de agentes carcinogênicos químicos ou físicos diretamente no DNA. No que diz respeito à etapa de promoção, ocorre um acúmulo de células pré-malignas em alta taxa de mitose. Quanto à progressão, é nesta etapa que se verifica o crescimento do tumor e o potencial invasivo e metastático da lesão neoplásica (ALMEIDA, 2005).

As mutações que originam o CCR podem ter origem de fatores tanto genéticos, como ambientais. Os fatores ambientais representam cerca de 80% dos casos, enquanto 20% dos casos de desenvolvimento da doença estão envolvidos em fatores genéticos (ROYNETTE et al., 2004).

As formas hereditárias nos casos familiares envolvem a polipose adenomatosa familiar (PAF), a polipose familiar juvenil e a síndrome de Peutz-Jegher, e a não polipose (câncer colorretal hereditário não polipose – HNPCC, ou síndrome de Lynch (THORSON et al., 1999).

A PAF é uma doença autossômica dominante, resultado de uma mutação no gene *Adenomatous polyposis coli* (APC), e é caracterizada pelo surgimento precoce de múltiplos adenomas ou pólipos no cólon e apresentam grande risco de tornarem-se malignos precocemente (JORDE et al., 2000). O portador da mutação no gene APC tem quase 100% de probabilidade de desenvolver câncer do cólon (GRODEN et al., 1991).

A polipose juvenil é uma síndrome autossômica dominante rara e pode ser desencadeada por mutações no gene SMAD4/DPC4 que codifica um sinalizador intermediário do fator de crescimento TGF- β (HAMILTON; AALTONEN, 2000). É caracterizada pelo aparecimento de 10 ou mais pólipos juvenis (lesões hamartomatosas focais do epitélio mucoso e da lâmina própria no trato gastrointestinal, principalmente no cólon. A manifestação ocorre geralmente entre quatro e 14 anos de idade (MANGO et al., 1994).

A síndrome de Peutz-Jegher é uma doença rara e assim como os outros fatores genéticos hereditários, também é autossômica dominante. É caracterizada por pólipos principalmente intestinais, pigmentação escura geralmente ao redor dos lábios, mucosa oral, língua, nariz e às vezes também em volta dos olhos (HYER, 2001).

O HNPCC, também conhecido como Síndrome de Lynch, representa de 1 a 5% de todos os casos de câncer colorretal e é responsável por 20 a 30% dos casos de câncer de cólon hereditário (YU et al., 2003). É uma doença autossômica dominante, cinco vezes mais frequente que a PAF, apresenta um pequeno número de pólipos e penetrância de 80% a 90% (LYNCH et al., 1996), e é resultado de mutações nos genes MSH2, MLH1, PMS1 e PMS2 (JORDE et al., 2000).

Como relatado por Roynette em 2004, fatores ambientais também estão envolvidos, com uma alta frequência, nos casos de desenvolvimento de câncer colorretal. Cerca de 75% dos fatores de risco estão relacionados a fumo, obesidade, sedentarismo, envelhecimento, bem como hábitos dietéticos (alto consumo de carnes vermelhas e gorduras), excesso de álcool e doença inflamatória crônica intestinal (DRAY et al., 2003; CUNNINGHAM, 2010). Ainda, alguns fatores aumentam o risco de desenvolvimento da doença, como histórico familiar de CCR, idade acima de 50 anos, já ter desenvolvido outro tipo de câncer (ovário, útero ou mama) e baixo consumo de cálcio (INCA, 2015).

Os alimentos consumidos podem influir na modificação da mucosa do órgão devido aos efeitos danosos dos ácidos biliares secundários, causar danos diretos ao DNA celular por produtos da peroxidação lipídica, mudar o metabolismo da flora bacteriana e diminuir a proteção devido à ingestão inadequada de antioxidantes (LESER; SOARES, 2001). Ainda, a mucosa pode ser danificada por uma alimentação inadequada, aumentando assim, a vulnerabilidade a agentes carcinógenos (SCOTT-STUMP; MAHAN, 2002).

Ainda sobre fatores ambientais, estudos prévios mostraram que tabagistas desenvolvem câncer colorretal com mais frequência do que indivíduos não tabagistas, e que o número de maços fumados por ano está fortemente relacionado à formação de pólipos adenomatosos (MARTINEZ et al., 1995; NEWCOMB et al., 1995; TERRY et al., 2001). Um estudo de metanálise demonstrou que existe um risco elevado de desenvolvimento do câncer colorretal quanto ao hábito tabagista, e que homens fumantes especialmente os que consomem mais do que 30 maços de cigarro por ano, ou 20 cigarros por dia, são os que apresentam o maior risco (TSOI et al., 2009).

2.2 Tabagismo e Câncer colorretal

O tabagismo aumenta o risco de o indivíduo desenvolver várias doenças crônicas em relação aos indivíduos não fumantes (INCA, 2008). Além disso, o tabagismo também é um fator de risco para o desenvolvimento de câncer no sistema gastrointestinal, incluindo cavidade oral, esôfago, estômago, íleo e cólon (CHEN et al., 2001; GIOVANNUCCI, 2001; WHO, 2015).

O tabagismo é considerado pela *World Health Organization* (WHO, 2015) como a principal causa de morte evitável em todo o mundo, e estima-se que um terço da população mundial adulta, representada por mais de um bilhão de pessoas, sejam tabagistas. O tabaco é responsável por uma morte a cada seis segundos, e mundialmente, uma em cada dez mortes em adultos é pelo tabaco, totalizando 5,4 milhões de mortes por ano (WHO, 2015).

De acordo com Gross et al. (2013) a relação entre o tabagismo e o câncer colorretal é recente. De modo que a ação do tabaco em câncer colorretal se dá em longo prazo, pois se estima que o hábito tabagista durante pelo menos 20 anos esteja relacionado significativamente ao surgimento de pequenos pólipos, e quando esta exposição ultrapassa 20 anos relaciona-se ao surgimento de pólipos grandes e superior a 35 anos favorece o aparecimento de carcinoma colorretal (GIOVANNUCCI, 2001).

A fumaça do cigarro contém mais de 7000 substâncias químicas, muitas das quais podem contribuir para os efeitos reforçadores do tabaco (HECHT, 2012). Dentre estas substâncias, encontram-se presentes vários metais pesados, incluindo o Níquel, um metal considerado como agente carcinogênico reconhecido pelo IARC (*International Agency for Research on Cancer*) e também considerado como co-carcinogênico, por atuar indiretamente sobre o DNA, estando relacionado à alteração na regulação da expressão gênica de vários genes (SALNIKOW et al., 2000; CHEN et al., 2001; CRUZ et al., 2004), por modificações de histonas em regiões promotoras como metilação, desacetilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação (GOLEBIEWSKI e KASPRZAK, 2005). Além disso, o níquel ainda pode substituir o núcleo metálico de algumas proteínas, e levar à ineficiência do sistema de reparo de bases metiladas e *cross-link* de fita simples e dupla de DNA (SALNIKOW e ZHITKOVICH, 2008; CHEN et al., 2009).

Estudos mostrando a influência dos componentes do tabaco sobre o intestino grosso foram desenvolvidos e explicam suas ações sobre esse órgão, principalmente, sobre a inflamação e sua contribuição na carcinogênese colorretal (VERSCHUERE et al., 2012). Ademais, um modelo experimental de colite usando dextran sulfato de sódio mostrou que a exposição à fumaça do cigarro promove a formação de adenomas e adenocarcinomas associados à inflamação em cólon de camundongos (LIU et al., 2003).

2.3 Modelos experimentais de carcinogênese colorretal utilizando 1,2-dimetilhidrazina

Nas últimas décadas muitos modelos murinos foram estabelecidos e são úteis na investigação da iniciação, expansão e progressão de cânceres do trato gastrointestinal (SUMAN et al., 2012). Área de interesse crescente, diversos estudos procuraram avaliar os fatores envolvidos na indução e progressão do câncer colorretal (TAKETO; EDELMANN, 2009). Considerando que os acontecimentos genéticos e ambientais que ocorrem durante a carcinogênese colorretal são complexos, além da incerteza de depender da extrapolação de dados a partir de culturas de células, os modelos animais tornam-se relevantes por apresentarem características moleculares do câncer colorretal (SUMAN et al., 2012).

O câncer de cólon induzido por substância cancerígena contribui de maneira significativa no entendimento sobre sua patogênese, além de partilhar muitas semelhanças com neoplasmas humano (TAKETO; EDELMANN, 2009). Pelo fato da

indução do tumor ser rápida, reprodutível, e ainda possibilitar o estudo da sequência adenoma-carcinoma, os roedores são amplamente utilizados como modelos experimentais de carcinogênese colorretal (BALMAIN; HARRIS, 2000). A substância 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e seu metabólito azoximetano (AMO) são conhecidos agentes cancerígenos e utilizados para induzir e promover o câncer colorretal em camundongos e ratos (CORPET; PIERRE, 2005; PERŠE; CERAR, 2005).

Os dados da carcinogênese colorretal experimental em roedores são antigos e acredita-se que cheguem a mais de 80 anos de estudos (KREBS, 1928) citado por Rosenberg et al. (2009). O modelo mais utilizado de câncer colorretal esporádico leva em consideração o organotropismo das substâncias cancerígenas pelo cólon, como é o caso do DMH e AMO, que foram identificados a partir de um estudo em que a hidrazina, possível substância cancerígena para células do cólon, foram isoladas da amêndoa de *Cycas circinalis* L. (LAQUEUR et al., 1963) e chamada posteriormente de cicasina, uma forma de metilazoximetanol (MAM), em estudo com ratos que desenvolveram adenocarcinomas do cólon (LAQUEUR, 1964).

Dois tipos de agentes químicos são utilizados para a carcinogênese colorretal: os agentes diretos (não necessitam metabolização) e agentes indiretos (ativados por reações enzimáticas na forma ativa) (TANAKA, 2009). O 1,2 dimetilhidrazina (DMH) é um precursor metabólico da metilazoximetanol (MAN) e o agente mais utilizado para carcinogênese em ratos, cuja absorção pelas células do cólon é três vezes maior e sua ação pode ser obtida por meio de uma única injeção ou injeções seriadas semanalmente (OLIVEIRA et al., 2001; GOIS et al., 2012).

Sendo um agente de metilação, o tratamento repetitivo com DMH foi capaz de produzir neoplasmas de cólon em roedores, os quais exibiram características patológicas associadas com a doença humana (HAASE et al., 1973; MARTIN et al., 1973), fornecendo um modelo experimental reprodutível para o estudo de neoplasia colorretal esporádica (não familiar) (LAMONT; O'GORMAN, 1978). Relatos científicos reportaram que o DMH e AMO são capazes de induzir tumores em quase 100% dos ratos expostos as mesmas (SHIRAI et al., 1983; ELSAYED; SHAMSUDDIN, 2000; VECERIC; CERAR, 2004). No entanto, quando comparados AOM e DMH, este foi mais eficiente em induzir câncer colorretal em ratos Wistar (JUCÁ et al., 2014).

A aplicação de DMH ou AMO pode ocorrer pela via intraperitoneal ou subcutânea e o desenvolvimento de tumores ocorre em tempo variado, porém, a carcinogênese colorretal é induzida a partir de duas aplicações de DMH, em torno de 150mg/Kg, ou de AMO, na dose de 15mg/Kg, com uma semana de intervalo (PERŠE; CERAR, 2011). A incidência tumoral pode ser modulada pela quantidade de agente carcinogênico e o número de administrações, sendo que doses crescentes de

carcinógenos culminam com menor período de latência e maior incidência tumoral (MASKENS; DUJARDIN-LOITS, 1981; SHIRAI et al., 1983). Assim, os tumores são distribuídos em todas as porções do cólon, porém, a maioria das lesões é encontrada na porção distal, e em torno de 16 semanas lesões são observadas no cólon distal, ao passo que às 22 semanas são observadas no cólon proximal (SHIRAI et al., 1983; McGARRITY et al., 1988; PARK et al., 1997; VECERIC; CERAR, 2004).

Nos modelos de indução de câncer colorretal com DMH ou AMO, a idade é um fator de suscetibilidade (MAGNUSON et al., 2000), além do sexo, pois diferentes resultados são observados sobre a dependência do mesmo e ratas foram menos suscetíveis ao desenvolvimento de câncer colorretal que ratos machos (BRESKVAR; CERAR, 1997; BISSAHOYO et al., 2005). No entanto, a linhagem dos animais utilizados também influencia na suscetibilidade para o desenvolvimento do câncer, dessa forma, ratos machos com 6 a 10 semanas de idade e das cepas F344, Sprague-Dawley e Wistar são mais comumente utilizados (ENDO et al., 2001; BISSAHOYO et al., 2005; PERŠE; CERAR, 2005; FEMIA; CADERNI, 2008; PERŠE; CERAR, 2011).

Quanto às limitações, pesquisadores devem considerá-las no momento de desenhar o modelo experimental para aplicações e estudos (SOHN et al., 2001; PERŠE; CERAR, 2007). Muitas vezes, o modelo experimental usando DMH/AMO é criticado pelo fato de seres humanos não serem expostos à essas substâncias com tanta frequência, porém, tabaco, componentes naturais de cogumelos, constituintes de herbicidas, combustível de foguete e algumas drogas possuem derivados de hidrazina (GAMBERINI et al., 1998).

Desta forma, dentro do conceito de modelo animal define-se “um organismo vivo em que a biologia ou comportamento normativo possa ser estudado, ou em que um processo patológico, espontâneo ou induzido, possa ser investigado, e em que o fenômeno em um ou mais aspectos assemelha-se ao mesmo fenômeno em humanos ou outras espécies animais” (HAU, 2003).

Atualmente, vários modelos animais estão disponíveis para demonstrar as diversas faces do câncer colorretal, bem como realizar estudos de estimativa de risco (SUMAN et al., 2012). Porém, como qualquer outro modelo experimental, o modelo animal de câncer colorretal induzido por DMH/AMO são influenciados por situações, que incluem a ativação metabólica da substância 1,2 dimetilhidrazina, bem como o potencial metastático de adenocarcinomas colorretais (PERŠE; CERAR, 2011). Neste sentido, por exemplo, a administração concomitante de DMH/AMO e álcool inibe a carcinogênese colorretal devido supressão da ativação dos carcinógenos no fígado (NOGUERA AGUILAR; CUADRADO GARCÍA, 2007; PERŠE; CERAR, 2007). Outro interferente, principalmente na incidência tumoral, inclui o período de latência e a

quantidade de carcinógeno administrado, assim, a utilização de modelos animais para estudar a doença em humanos tem suas próprias limitações (SUMAN et al., 2012).

Como biomarcadores intermediários da carcinogênese colorretal, os focos de criptas aberrantes (FCA) e o número de tumores do cólon são utilizados para verificar estudos de curta ou longa duração, sendo que, os estudos de curta duração variam de 8 a 12 semanas após a aplicação do agente indutor, e os de longa duração são acompanhados por 40 semanas ou mais (FIALA; STATHOPOULOS, 1984; ENDO et al., 2001; PERŠE; CERAR, 2011).

O DMH/AMO induz mutações em genes que são igualmente encontrados mutados no câncer colorretal esporádico em humanos, e são alterações únicas de nucleotídeos em genes como o APC, β -catenina e K-ras, aparentemente muito frequentes no genoma desse modelo experimental (PERŠE; CERAR, 2011). No entanto, os modelos experimentais usando DMH/AMO apresentam mutações genéticas em β -catenina muito mais frequentes e que são semelhantes às alterações encontradas no câncer colorretal hereditário não-polipoide de seres humanos (JOHNSON; FLEET, 2013). A reparação demorada ou incompleta do DNA danificado aumenta a suscetibilidade específica das células do cólon ao DMH, que culmina no acúmulo de mutações em um pequeno número de células que darão origem ao câncer colorretal (SWENBERG et al., 1979).

Junto às mutações genéticas observadas nos modelos de câncer colorretal induzidos com DMH/AMO são encontradas alterações celulares e moleculares que desempenham papel importante no desenvolvimento do câncer colorretal, relacionadas às vias Wnt, K-ras, TGF- β e processos inflamatórios (YAMADA et al., 2000; PERŠE; CERAR, 2011; JOHNSON; FLEET, 2013). Dentre a maioria dos modelos experimentais de câncer colorretal, as vias de sinalização Wnt, bem como TGF- β e a incompatibilidade de reparação, são alvos para a compreensão da iniciação e progressão do câncer colorretal, e também utilizadas para avaliar os diferentes agentes farmacêuticos e biológicos de prevenção e tratamento desse tipo de neoplasia (SUMAN et al., 2012).

Suman et al. (2012) ainda destacaram que o tamanho do rato como modelo experimental para câncer colorretal permite aos investigadores realizar procedimentos como endoscopia, microCT (tomografia computadorizada) e microPET (*Positron Emission Tomography*) no intuito de avaliar as intervenções terapêuticas sem sacrificar o animal. Além disso, o modelo experimental utilizando DMH/AMO é útil no estudo de interações gene-gene, bem como gene-ambiente, que influenciam de maneira significativa a patogênese do câncer colorretal (JOHNSON; FLEET, 2013).

Recentemente, para investigar os mecanismos potenciais e modalidades de tratamento e quimiopreventivos, tem sido utilizados ratos geneticamente modificados e modelos inflamatórios com câncer colorretal (WARD; TREUTING, 2014). Cabral e Barbosa (2014) mostraram em sua revisão, que modelos animais que analisaram o efeito do tabaco ao nível de mucosa intestinal saudável direcionam um consenso de que o fumo do tabaco e a exposição nicotínica não causam danos histológicos ou macroscópicos, nem inflamação na mucosa intestinal, tampouco qualquer impacto no marcador de infiltração linfocitária, a mieloperoxidase cólica (MPO), portanto, de forma geral, o tabaco apresenta efeito favorável no cólon, sendo a maioria deles de caráter tolerogênico.

Quanto a terapêutica, em especial a radioterapia, vários estudos avaliaram o efeito da mesma no cólon de roedores, seja para estudos de redução de complicações cirúrgicas (FRANCA et al., 2008), radioimunoterapia (KOPPE et al., 2003), radiosensibilização pré-operatória (FLATMARK et al., 2006), dentre outros.

Os requisitos para a utilização de ratos como modelo experimental de câncer colorretal são que o mesmo possua relevância para as vias moleculares envolvidas no desenvolvimento do câncer colorretal humano, ainda que existam correlações a fatores que afetam a frequência da doença, bem como seja suficiente realizar projetos com um número considerável estatisticamente de animais para testar agentes quimiopreventivos e terapêuticos. Nesse sentido, os modelos animais avançaram para a compreensão do câncer colorretal, principalmente iniciação e progressão tumoral, bem como no desenvolvimento de agentes e estratégias terapêuticas para reduzir a incidência e mortalidade da doença (SUMAN et al., 2012).

Em suma, o desenvolvimento de modelos animais *in vivo* que recapitula a história natural das neoplasias humanas e sua resposta clínica à terapêutica constitui um importante pré-requisito para a tradução rápida de conhecimentos adquiridos em investigações de tratamentos anticancerígenos e agentes de imagem que se mostraram promissores em modelos *in vitro* (CEKANOVA; RATHORE, 2014).

2.4 PHDs, HIF1 e SOD1 e seu papel no câncer

2.4.1 Prolil-4-hidroxilases (PHD1, PHD2, PHD3 e PHD4)

Prolil-4-hidroxilases (PHDs) são proteínas pertencentes à família das enzimas dioxigenases e, para sua função efetiva, são dependentes de Ferro II (Fe^{2+}), Oxigênio 2 (O_2) e 2-oxoglutarato (2-OG) como substratos para sua atividade catalítica (BRUICK; MCKNIGHT, 2001). Sua baixa afinidade com o oxigênio, que é cerca de 2 a 10 vezes

superior às concentrações fisiológicas de oxigênio, permitem que essas enzimas atuem como sensores de oxigênio (HIRSILA et al., 2003).

As PHDs estão envolvidas na resposta celular ao oxigênio por hidroxilação de resíduos prolinil conservados nas subunidades alpha do fator induzível por hipóxia (HIF1- α) (SCHOFIELD; RATCLIFFE, 2004; FONG; TAKEDA, 2008; KAELIN; RATCLIFFE, 2008). Em condições de baixa taxa de oxigênio, a atividade enzimática das PHDs é inibida, levando ao acúmulo de HIF, assim, a taxa de oxigênio intracelular permite que a atividade de hidroxilação da PHD seja estritamente modulada ao longo de toda função fisiológica (KAELIN; RATCLIFFE, 2008).

A família das PHDs é composta isoformas: PHD1 (Egln2), PHD2 (Egln1) e PHD3 (Egln3/SM-20). Estes três membros compartilham regiões conservadas como a porção COOH-terminal responsável pela atividade de hidroxilase, mas diferem significativamente na porção N terminal (EPSTEIN et al., 2001). Uma quarta enzima (P4H-TM) localizada no retículo endoplasmático, e mais intimamente relacionado com as prolinil hidroxilases procolégeno, que de todas as isoformas também pode hidroxilar HIF1- α *in vitro* (KOIVUNEN et al., 2007). Uma ligação à via de HIF é explicado pelos efeitos de siRNA de P4H-TM e P4H-TM sobre-expressão nos níveis de HIF1- α (indução e de redução, respectivamente), embora seja possível que estes efeitos sejam indiretos, e que o verdadeiro substrato ainda não tenham sido identificado (KAELIN; RATCLIFFE, 2008).

Seus substratos são bastante diversos e específicos para cada isoforma (KIM; YANG, 2015), e cada uma das isoformas exibe seu próprio tecido e linhagem celular padrão específica para sua expressão, bem como sua particular distribuição subcelular (METZEN et al., 2003).

A PHD1 está envolvida na proliferação celular através da degradação do regulador do ciclo celular – Ciclina D1 – em uma maneira dependente da atividade de hidroxilase. A subunidade maior da RNA polimerase II Rbp1 também tem sido mostrada por ser outro substrato da PHD1 (KODITZ et al., 2007). A PHD2 é considerada crítica na regulação da via da HIF, embora sua atividade de hidroxilase seja necessária para regular outras vias de sinalização incluindo a fosforilação da cofilina e a degradação da proteína NDRG3 (VOGEL et al., 2010; LEE et al., 2015), e sua ausência ou inatividade resulta no aumento da angiogênese e dos níveis de VEGF-A e Eritropoietina (EPO) (TAKEDA et al., 2006; TAKEDA et al., 2007; KATSCHINSKI, 2009).

Em outra via, a PHD3 desempenha papéis importantes no desenvolvimento neural, função do sistema imunológico, migração celular, apoptose e regulação da via de hipóxia (SEMENZA, 2012; PLACE et al., 2011). A actina não muscular também é

hidroxilada em seus resíduos de prolina por PHD3 e a inibição desta leva ao aumento da montagem de filamentos de F-actina (LUO et al., 2011). Distintamente de outras atividades hidroxilase, a PHD3 pode regular várias vias de sinalização (GARVALOV et al., 2014).

Estudos revelaram que a PHD3 é simultaneamente sensível à concentração de oxigênio, à perturbações do ciclo tricarboxílico (TCA), e ao estado *redox* dentro da célula. A sensibilidade das PHDs para estes parâmetros é mais notável num microambiente de grave distúrbio metabólico e estresse oxidativo, muitas vezes observado em um microambiente tumoral, inclusive em câncer colorretal (CHANDEL et al., 2000; DEHNE; BRUNE, 2009; PLACE; DOMANN, 2013).

Pesquisas recentes têm sugerido a PHD como um potencial supressor de tumor devido à sua função de regulação da via da HIF, e sua ausência relacionada à tumorigênese de câncer colorretal (XUE et al., 2010). No entanto, a concentração de oxigênio não é a única causa da função alterada de PHD3 durante a tumorigênese, a contribuição desta proteína para o fenótipo celular depende de várias condições, incluindo a abundância relativa das proteínas PHD3 em um tecido específico (JOKILEHTO; JAAKKOLA, 2010). Com as alterações na expressão das proteínas PHD3, haverá uma alteração da taxa de hidroxilação da HIF1- α (APPELHOFF et al., 2004; SOILLEUX et al., 2005).

A expressão da PHD3 é induzida em condições de hipóxia (BOCK et al., 2005; ROHDE et al., 2008), característica observada em uma série de tumores sólidos, incluindo o câncer colorretal (SEMENZA, 2012). No entanto, Xue et al. (2010) demonstraram que a expressão de PHD3 é reduzida em câncer colorretal humano, sugerindo que a hipóxia provavelmente não é a única via de regulação da expressão de PHD3.

Recentemente vários estudos têm demonstrado dados inconsistentes de expressão da proteína PHD3 durante o desenvolvimento do câncer colorretal (SOILLEUX et al., 2005; JUBB et al., 2009; XUE et al., 2010; XIE et al., 2012). O mecanismo pelo qual estas hidroxilases podem ser reguladas ainda não está completamente elucidado. Interessantemente, os genes de PHD possuem uma ilha CpG em sua região promotora e a hiper ou hipometilação destes genes pode alterar a expressão destes no microambiente tumoral (KONDO, 2009). Dados têm demonstrado que a região promotora do gene da PHD3 é hipermetilado em células de câncer de próstata, melanoma e mama (HATZIMICHAEL et al., 2010; PLACE, 2011).

Os resultados de Rawluszko et al. (2013), revelaram níveis aumentados de metilação na ilha CpG da PHD3 no câncer colorretal, em comparação com o epitélio do cólon normal, a partir dos mesmos doentes. Estas alterações epigenéticas foram

associadas com uma diminuição significativa dos níveis de expressão da PHD3 em pacientes com câncer colorretal (RAWLUSZKO et al., 2013).

Uma vez que a Prolil-4-hidroxilase apresenta tão amplo e profundo um efeito sobre tumorigênese, estudos sobre a regulação da expressão destas enzimas podem auxiliar na nossa compreensão da progressão do câncer colorretal.

2.4.2 Fator Induzível por Hipóxia (HIF)

O complexo HIF-1 (Fator induzível por hipóxia - 1) é o principal mecanismo de homeostase do oxigênio celular e sistêmico (HUANG; BUNN, 2003; SEMENZA, 2003). Quando ligado ao DNA genômico, o complexo age como fator de transcrição de mais de 100 genes que desencadeiam mecanismos específicos para evitar a morte celular causada pela hipóxia, como metabolismo celular, angiogênese, eritropoiese, transporte de glicose, glicólise, entre outros (SCHARTE et. al., 2003; SEMENZA, 2003).

Este complexo transcricional é um heterodímero proteico composto por duas subunidades, HIF1- α e HIF1- β . Ambas as subunidades são proteínas *basic helix-loop-helix* (bHLH) da família PAS (PER, AHR, ARNT e SIM), entretanto elas são expressas de maneira distinta. A subunidade HIF-1 β é constitutivamente expressa, ou seja, possui níveis de mRNA e de proteína constantes na célula. Entretanto a subunidade HIF1- α é geralmente regulada na presença de O₂. Sua transcrição e síntese proteica são constitutivas, no entanto, a mesma sofre uma regulação pós-traducional de acordo com o teor de oxigênio presente no microambiente, como hidroxilação e ubiquitinação seguida de degradação proteossomal (WANG; SEMENZA, 1993; BRAHIMI-HORN et al., 2005).

Em geral, a abundância da proteína HIF1- α é primariamente regulada pela família de Prolil-4-hidroxilases denominadas PHD1, PHD2 e PHD3 (KAELIN; RATCLIFFE, 2008), porém a HIF1- α pode ser alvo de uma gama de vias de regulação. Rawluszko-Wiecznerek et al. (2014) sugerem complexidade na regulação epigenética de HIF1- α , e deixam claro que as possíveis alterações nos níveis de expressão de HIF1- α estão relacionadas a regulações pós-traducionais. Por exemplo, o metilglioal (MGO) reduz significativamente a expressão de HIF1- α em neoplasias colorretais, que passam pelas vias: de modificação covalente do resíduo de arginina 23, impedindo sua dimerização com a HIF1- β para a formação do complexo HIF-1 (CERADINI et al, 2008); por interação covalente do MGO com a proteína p300, impedindo sua ligação à porção CTAD da HIF1- α e posterior transporte da mesma para o núcleo celular

(KAJIWARA et al., 2009; THANGARAJAH et al 2009); e por fim, por aumento da associação da HIF1- α com a chaperona Hsp40/70 (*heat shock protein 40/70*) resultando em ubiquitinação e degradação proteossomal, sem a necessidade de que este recrutamento seja feito pela pVHL (BENTO et al., 2010).

Sob condições de normóxia, a proteína PHD utiliza o oxigênio como cofator enzimático e transfere um grupo hidroxila para o domínio ODD da HIF1- α (KAELIN; RATCLIFFE, 2008). Após a hidroxilação, esta é reconhecida pela proteína supressora de tumor pVHL (von Hippel-Lindau), que recruta um complexo ubiquitina ligase para marcar a proteína HIF1- α , e promover a degradação proteossomal da mesma (BAEK et al., 2007).

Em condições de hipóxia, a atividade da proteína PHD decresce e a degradação da HIF1- α é reduzida, uma vez estabilizada, esta é translocada para o núcleo e se dimeriza com a subunidade HIF1- β , formando o complexo HIF-1 transcricionalmente ativo, o qual irá reconhecer seus vários genes alvo para a transcrição (SEMENZA, 1999; SCHARTE, 2003).

Agentes oxidantes presentes no microambiente também induzem o acúmulo da proteína HIF1- α , aumentando a atividade do complexo HIF-1 (KAELIN; RATCLIFFE, 2008; DEHNE; BRUNE, 2009). É mostrado que espécies reativas de oxigênio (ROS) oxidam o Fe(II) no sítio catalítico da PHD, bloqueando sua atividade (GERALD et al., 2004). Outra possibilidade é que o ROS inibe estas prolil hidroxilases por oxidação irreversível de seu sítio ativo com resíduos de histidina, levando a inativação desta enzima por oxidação. Estas considerações sugerem que um aumento de radicais livres no microambiente pode contribuir para um acúmulo de HIF1- α e sua ativação (CHANDEL et al., 2000; DEHNE; BRUNE, 2009).

Todavia, o intestino apresenta um perfil de oxigenação próprio. Apesar da lâmina própria do intestino ser altamente vascularizada, sua posição anatômica é bem próxima à luz do intestino a qual é anaeróbia, sendo assim, é possível observar um gradiente de concentração de oxigênio da serosa à luz intestinal (SHEPHERD, 1982; ALBENBERG et al., 2014). No intestino ocorre uma série de fatores que afetam a concentração e distribuição do oxigênio como o fluxo contra-corrente do sangue (SONNWEBER et al., 2014), flutuação de perfusão sanguínea ao longo do dia (COLGAN; TAYLOR, 2010) e difusão de oxigênio até o lúmen (SHEPHERD, 1982). Todas estas condições resultam em uma baixa pressão de oxigênio <10mmHg quando comparada à pressão de oxigênio em alvéolos saudáveis que apresentam uma pressão de oxigênio de 100-110mmHg, mostrando que nestes órgãos ocorre uma hipóxia fisiológica (KARHAUSEN et al., 2004; ALBENBERG et al., 2014; SCHAIBLE et al., 2010).

Além da regulação em nível de oxigênio, a glicose, presente em altas taxas no intestino, também afeta a expressão da HIF1- α neste órgão (VORDERMARK et al., 2005; STAAB et al., 2007). Muitas vezes, a relação entre glicose e HIF1- α é mútua. De um lado, a HIF1- α regula a expressão de enzimas envolvidas no processo de captação de glicose e glicólise (CHEN et al., 2001), por outro, o metabolismo da glicose influencia a estabilidade e ativação da HIF1- α , a qual pode ser observada em altas taxas de expressão no intestino saudável em virtude desta regulação por glicose (MALHOTRA et al., 2002; VORDERMARK et al., 2005; STAAB et al., 2007).

A elevada expressão de HIF1- α é frequentemente observada em tumores sólidos, pois normalmente estes tumores apresentam uma baixa taxa de oxigênio (BRIZEL et al., 1999), e nestes casos, a resposta celular em condições de hipóxia pela via da HIF1- α é essencial para sobrevivência e progressão tumoral (MAXWELL et al., 1997; RYAN et al., 2000). Em virtude desta ação da HIF1- α , a mesma tem sido estudada em vários tipos de tumores, tais como renal (NA et al., 2003), bexiga (THEODOROPOULOS et al., 2004), mama (BOS et al., 2003), ovário (NAKAYAMA et al., 2002) e colorretal (KUWAI et al., 2003), estando frequentemente associada à carcinogênese, prognóstico e sobrevida dos pacientes.

De fato, os efeitos do complexo HIF-1 podem ajudar a célula a se adaptar ao estresse hipóxico, e a mudança deste fenótipo pode ter um impacto sobre a radiosensibilidade do tumor, uma vez que muitas das alterações provocadas pelo complexo HIF-1 resultam em características essenciais para a efetividade da radioterapia, que visa, preferencialmente em tipos celulares com elevados níveis de oxigênio e metabolismo acelerado (MOELLER; DEWHIRST, 2006).

O resultado do complexo mecanismo de regulações presentes no tumor resulta na taxa de expressão da proteína HIF1- α e sua presença afetará todo o fenótipo e microambiente tumoral (SEMENZA, 2012). Consequentemente, a expressão de HIF1- α deve ser considerada para fins de abordagens terapêuticas.

2.4.3 Superóxido Dismutase (SOD)

Foram identificadas quatro classes de superóxido dismutase (SOD), as quais contém cofatores dinucleados, por exemplo Cu-Zn, ou mononucleados, como o Fe, Mn ou Ni (BUETNER, 2011). Em humanos, existem três isoformas de SOD, a saber: Cu-Zn-SOD citosólica (SOD1), Mn-SOD mitocondrial (SOD2) e SOD-extracelular (ZHAO et al., 2001).

Sendo parte integrante do sistema de defesa antioxidante, a SOD1 é responsável pela transformação do íon superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (McCORD; FRIDOVICH, 1969). Abundante em células eucariotas, a SOD corresponde a 1% do total de proteína celular (OKADO-MATSUMOTO; FRIDOVICH, 2001).

A SOD1, também chamada de cobre, zinco-superóxido dismutase (Cu,Zn-SOD) é uma das classes de enzima conservada ao longo da evolução, cuja composição é formada por duas subunidades idênticas pesando em torno de 32 kDa cada, contendo um sítio ativo constituído por um átomo de cobre e um de zinco, ligados entre si por uma ponte de histidina (BANCI et al., 2002). É uma enzima relativamente pequena, com 153 aminoácidos e que funciona como homodímero e requer alta estabilidade para a catálise. Esta estabilidade é dada pela estrutura quaternária da proteína, bem como a ligação dos dois íons metálicos, cobre e zinco, posicionados no núcleo catalítico dessa enzima rápida (TRUMBULL; BECKMAN, 2009; PERRY et al., 2010). Desta forma, a transformação do superóxido é uma reação química de oxirredução, distribuídas em duas etapas que envolvem a ciclagem do átomo de cobre (FRANCO et al, 2013).

Relatos descreveram que a SOD1 não é uma enzima essencial para a vida (SHIMIZU et al., 2010). No entanto, essa enzima não mostrou diferença na atividade em tecidos normais, em comparação com a SOD mitocondrial, por exemplo, mas mostrou-se em baixos níveis em tecidos tumorais (MARKLUND et al., 1982). Porém, sabe-se que diversos mecanismos podem induzir a transcrição de SOD1, como por exemplo, ginsenoides (tônicos naturais), citocinas (interferon-gama), fatores ambientais, calor, peróxido de hidrogênio, metais pesados (Cd, Cu, Zn), xenobióticos (β -naftoflavona), herbicidas (paraquat) e dioxina (CHO et al., 1997).

Inúmeros fatores de transcrição regulam a expressão de SOD, principalmente aqueles sensíveis ao estresse oxidativo, como a proteína AP-1 e o NF- κ B, que estão entre os componentes importantes da resposta celular em situação de estresse oxidativo, além de participarem decisivamente nas questões de sobrevivência ou morte celular (KARIN, 1999; SHAULIAN; KARIN, 2002; BUBICI et al., 2006).

Muita discrepância sobre a expressão e atividade de isoformas, mitocondrial e citosólica, de SOD em tumores foi observada, pois alguns autores relataram aumento da expressão (JANSSEN et al., 2000; DEVI et al., 2000; HILEMAN et al., 2004), enquanto outros verificaram uma diminuição da atividade ou até mesmo inalteração em vários tipos tumorais, bem como vários estágios clínicos da doença (CASARIL et al., 1994, VAN DRIEL et al., 1997; JUNG et al., 1997; WANG et al., 2005).

Em estágios iniciais de lesão da mucosa colorretal, os chamados focos de criptas aberrantes, a expressão de SOD1 esteve aumentada em relação a mucosa normal, em estudo utilizando modelo experimental de carcinogênese colorretal, mostrando que a atividade dessa enzima aumenta quando lesões pré-cancerígenas são instaladas (AMARAL et al, 2006). No entanto, a expressão e atividade de isoformas de SOD mudaram em relação a progressão tumoral, ou seja, estágios mais avançados da diferenciação tumoral culminaram com menor expressão de SOD, indicando adaptação das células tumorais do câncer colorretal ao estresse oxidativo, e que os reativos de oxigênio presente nas células tumorais podem aumentar a expressão de SOD1, porém, por outro lado, inativar parcialmente sua atividade, permitindo o acúmulo de mais espécies reativas de oxigênio (SKRZYCKI et al., 2009).

Neste contexto, Sajesh e McManus (2015) sugeriram que a SOD1 silenciada permitiu o aumento de espécies reativas de oxigênio, que culminaram em altas taxas de danos na dupla fita de DNA levando a apoptose em células defeituosas de mecanismos de reparo pelos genes BML e CHECK2. E devido a isso, a SOD1 tornou-se alvo de drogas terapêuticas para tratamento do câncer colorretal e demais tipos tumorais.

O microambiente tumoral no câncer colorretal é inerente a presença de espécies reativas em virtude do metabolismo aberrante (PLACE; DOMANN, 2013). Como visto, radicais livres podem interferir na ação da proteína PHD3 pela oxidação do Fe II ou até mesmo oxidação de seu sítio catalítico (CHANDEL et al., 2000; DEHNE; BRUNE, 2009) mostrando uma interessante conexão entre os radicais livres e a via de hipóxia, uma vez que há ação destes na expressão da proteína HIF1- α . A ativação da via de hipóxia já foi mostrada por ser indutora do crescimento tumoral (SCHARTE et. al., 2003; XUE et al., 2010; SEMENZA, 2012), assim, nota-se um importante papel da proteína SOD1 em regular os níveis de radicais livres no microambiente tumoral uma vez que estes constantemente refletem na regulação das proteínas PHD3 e HIF1- α .

Como visto estas três proteínas agem em conjunto no microambiente tumoral, e suas funções tornam-se responsáveis pelo fenótipo, comportamento e malignidade tumoral. O estudo da inter-relação destas proteínas pode levar à elucidação de processos de tumorigênese, malignização tumoral, e possível resposta ao tratamento.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar a influência da exposição à fumaça da queima direta do cigarro no desenvolvimento de lesões colorretais, bem como na expressão das proteínas PHD3, HIF1- α e SOD1, em modelo experimental de câncer colorretal, associando esses achados à resposta a radioterapia.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da exposição à fumaça da queima direta do cigarro no desenvolvimento e características das lesões em mucosa colorretal de modelo experimental de câncer colorretal induzido com o agente 1,2-dimetilhidrazina, bem como as limitações e áreas de aplicabilidade nos estudos que envolvem o câncer colorretal e hábito tabagista.

- Avaliar a influência da exposição à fumaça da queima direta do cigarro na expressão das proteínas PHD3, HIF1- α e SOD1 em adenocarcinoma tubular proveniente do modelo experimental para câncer colorretal e sua relação com a resposta radioterápica.

- Avaliar por meio da expressão de Caspase 3 clivada, a resposta à radioterapia no modelo experimental para câncer colorretal expostos e não expostos à fumaça da queima direta do cigarro.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

Os animais usados neste estudo foram mantidos de acordo com o Guia do Instituto Nacional de Saúde e Cuidados no uso de Animais de Laboratório (*NIH Publications N° 8023*), revisado em 2011 e com a Lei Brasileira de Procedimentos para Uso Científico de Animais (#11794/2008). Os procedimentos experimentais foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética e Utilização de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo de acordo com o protocolo 003/2014.

4.2 Delineamento Experimental

O experimento utilizou 53 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos jovens, pesando em média 181,35 g ($\pm 18,7$ g) no início do experimento, mantidos em grupos de cinco a seis animais por gaiola em sala com temperatura controlada entre 21° e 24°C, umidade relativa do ar entre 45 e 55%, e ciclo luz escuridão de 12 horas. Os animais receberam ração comercial para a espécie e água *ad libitum*.

A indução à carcinogênese colorretal com o agente químico 1,2-dimetilhidrazina (DMH) foi conduzida em 48 animais e cinco animais foram mantidos como grupo controle negativo (intestino normal). A indução ocorreu conforme metodologia modificada por Laranjeira et al. (1998) baseada no estudo de Nauss et al. (1984). Neste, o DMH foi dissolvido em NaCl 0,9% contendo como veículo 1,5% de EDTA, em pH final de 6,5, que foi atingido com o uso de solução de NaOH 1N quando necessário, e a aplicação do agente químico ocorreu por via subcutânea, uma vez por semana, por um período de cinco semanas, na dose de 65mg/kg/semana.

Os grupos experimentais foram divididos como segue:

- Grupo controle negativo DMH-/tabaco- (G0) = cinco animais
- Grupo DMH+ (G1) = 12 animais
- Grupo DMH+/radioterapia (G2) = 12 animais
- Grupo DMH+/tabaco+ (G3) = 12 animais
- Grupo DMH+/tabaco+/radioterapia (G4) = 12 animais

A exposição à fumaça da queima direta do cigarro para os grupos DMH+/tabaco+ (G3) e DMH+/tabaco+/radioterapia (G4) ocorreu em câmara de inalação equipada com *puff* de fumaça, e correspondeu a queima 12 cigarros

popularmente comercializados por dia/grupo, divididos em dois turnos (seis cigarros pela manhã e seis cigarros a tarde) de exposição de 60 minutos cada, onde a queima durou um minuto e o descanso entre os cigarros foi de 10 minutos. Ao total foram 143 dias de exposição (20 semanas) e utilizados 3432 cigarros, que continham 8 mg de alcatrão, 0,7 mg de nicotina e 7 mg de monóxido de carbono por maço de 20 cigarros segundo informação do fabricante. A exposição a fumaça do cigarro seguiu modificações da metodologia utilizada por Paiva et al. (2003), cuja finalidade foi o estudo de enfisema pulmonar.

Na 21^a semana de experimento os animais dos grupos G2 e G4 foram anestesiados com a associação ketamina (75mg/Kg) + xilasina (6mg/Kg) e submetidos à três sessões de radioterapia na dose de 700 cGy cada, totalizando 2500 cGy, em um acelerador linear devidamente calibrado.

Todos os animais foram eutanasiados na vigésima segunda semana, por meio da indução anestésica com a associação ketamina (75mg/Kg) + xilasina (6mg/Kg), seguido da aplicação de cloreto de potássio hipersaturado, necropsiados e tiveram toda a extensão do intestino grosso aberto pela inserção do mesentério para a retirada das lesões acima de 0,1 centímetro em sua maior porção.

Os tecidos coletados foram fixados em formalina 10% tamponada e submetidos ao processamento rotineiro de inclusão em parafina. Posteriormente, foram realizados cortes histológicos de 3µm de espessura e dispostos em lâminas histológicas e coradas com hematoxilina e eosina.

Todas as amostras dos grupos experimentais, com exceção do grupo controle negativo (intestinos normais) foram diagnosticadas de acordo com PERŠE e CERAR (2011). Nas amostras pertencentes aos Grupos DMH+ (G1) e DMH+/tabaco+ (G3) foram avaliadas as seguintes características histopatológicas: processo inflamatório (tipo e intensidade), pleomorfismo celular (intensidade), figuras de mitose (ausente, ≤3/campo, >3/campo), invasão de submucosa (ausência ou presença), invasão vascular (ausência ou presença), invasão perineural (ausência ou presença), invasão linfática (ausência ou presença), desmoplasia (ausência ou presença), debris glandulares (ausência ou presença), necrose (ausência ou presença).

As amostras classificadas como adenocarcinoma tubular (grupos experimentais), e mucosa normal foram selecionadas para a aplicação da técnica imunohistoquímica.

4.3 Imunohistoquímica

Os cortes embebidos em parafina foram montadas em lâminas silanizadas. Os cortes de 3 µm foram desparafinados em xileno e re-hidratadas por meio de uma

série de banho em álcoois graduados. Em seguida foram enxaguadas com água desionizada e submetido a recuperação antigênica com citrato de sódio a uma temperatura elevada durante 15 minutos. Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas em 1x TRIS e as peroxidases endógenas foram bloqueadas com peróxido de hidrogênio a 30% em 1x TRIS durante 20 minutos a 25°C. Depois de três banhos de 5 minutos cada em 1x TRIS, as lâminas foram incubadas em solução de bloqueio de proteínas inespecíficas (3% de leite em pó diluído em 1x TRIS) durante 60 minutos a 25°C e, em seguida, foram lavadas em 1x TRIS por três vezes de 5 minutos.

As lâminas controle (sem anticorpo primário) e experimentais foram incubadas à temperatura ambiente, respectivamente, em 1x TRIS ou solução de diluição de anticorpo contendo anticorpo anti-HIF-1 α (1:2000, [EP1215Y], AB51608, Abcam, Cambridge, MA), anticorpo anti-PHD3 (1:250, AB30782, Abcam, Cambridge, MA), anticorpo anti-superóxido dismutase 1 (1:150, AB13498, Abcam, Cambridge, MA) e anticorpo anti-caspase 3 clivada (1:300, Asp175, Cell Signaling Technology, Danvers MA) durante 60 minutos. Depois de três banhos de 5 minutos em 1x TRIS, as lâminas foram incubadas com o sistema de detecção de tecido de rato (N-Histofine – Simple Stain Max PO Rat, 414191F, NICHIREI®) a 25°C durante 30 minutos. Após três lavagens com 1x TRIS, a coloração foi visualizada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO). Todas as lâminas foram contrastadas com hematoxilina de Harris durante 1 minuto, desidratadas em etanol, limpas em xileno e montadas com Permount (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA).

As lâminas foram analisadas por microscopia óptica, por dois observadores patologistas, que receberam as mesmas lâminas para análise de forma independente, sem discussão prévia dos achados, cujo índice de concordância foi de 99,1%, obtido pela seguinte fórmula: $[\text{CONCORDÂNCIA} / (\text{CONCORDÂNCIA} + \text{DISCORDÂNCIA})] \times 100$. O escore de cada amostra foi determinado por análise semiquantitativa, considerando-se o número de células coradas e a intensidade de expressão. Considerando a percentagem de células imunopositivas, foi atribuída uma pontuação de 0, quando todas as células foram negativas; uma pontuação de 1 quando 1-25% das células foram positivas, 2 quando 25-50% das células foram positivas e 3 quando >50% das células foram positivas. A intensidade de expressão foi classificada como negativa (0), fraca (1), moderada (2) e forte (3). Ambas as pontuações foram multiplicadas (SOINI et al, 2000; CAMPOS et al, 2009) e o escore resultante foi utilizado.

4.4 Resposta à radioterapia pelo índice apoptótico

A resposta à radioterapia foi obtida por meio do índice apoptótico das amostras pertencentes ao Grupo DMH+/radioterapia (G2) e Grupo DMH+/tabaco+/radioterapia (G4). Este foi obtido individualmente de cada amostra analisada e calculado a partir da média de cinco campos aleatórios sob microscopia óptica em aumento de 400X da seguinte forma: (número de células imunopositivas para caspase 3 clivada/número total de células) x 100.

4.5 Estatística

Os dados das características histopatológicas de adenocarcinoma tubular colorretal foram dispostos de forma descritiva, em número e percentual.

Para avaliar a variação dos escores de PHD3, HIF1- α e SOD1 nos grupos foi aplicado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pela análise *pos hoc* pelo teste t de Student (LSD).

Para a comparação dos escores de cada proteína estudada entre os grupos experimentais, bem como a comparação do índice apoptótico pela Caspase 3 Clivada, aplicou-se o teste U Mann-Whitney.

Os resultados estatisticamente significativos foram indicados por $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada com o software BioEstat® 5.3 e as figuras desenvolvidas no software GraphPad Prism® 6 Demo.

5. RESULTADOS

Os resultados estão descritos em três sessões, que compreendem, respectivamente, a influência da exposição à fumaça do cigarro no: 1) desenvolvimento das lesões colorretais em modelo experimental, 2) análise da expressão das proteínas PHD3, HIF1- α e SOD1 antes e após a radioterapia em neoplasia colorretal de modelo experimental, e 3) resposta à radioterapia no modelo experimental verificada por meio do índice apoptótico.

5.1 Desenvolvimento de lesões em mucosa colorretal de modelo experimental

5.1.1 Avaliação do número e características histopatológicas de lesões em mucosa colorretal de modelo experimental para câncer colorretal, exposto (G3) e não exposto (G1) à fumaça do cigarro

No Grupo DMH+/tabaco+ (G3) foram encontradas 34 lesões, com média de 2,83 lesões por animal, e número mínimo de uma lesão e máximo de nove. No Grupo DMH+ (G1) foram encontradas 26 lesões, com uma média de 2,17 lesões por animal. O menor número de lesão encontrado foi uma e o maior número foi oito. A análise estatística mostrou não haver diferença significativa no número de lesões nos dois grupos avaliados ($p=0,309$). A Figura 2 ilustra o aspecto macroscópico das lesões encontradas em cada grupo.



Figura 2 - Lesões induzidas por 1,2-dimethylhidrazina na mucosa colorretal de ratos, na 21ª semana de experimento. Lesões polipoides são observadas de forma multifocal na mucosa do intestino grosso. A – Grupo DMH+ (G1). B – Grupo DMH+/tabaco+ (G3).

Em relação às características histopatológicas avaliadas nos grupos G1 e G3, a Tabela 1 resume o número e percentual encontrados em adenocarcinoma tubular colorretal.

Tabela 1– Descritivo em número e percentual das características histopatológicas de adenocarcinoma tubular colorretal de ratos induzidos a carcinogênese pertencentes aos grupos DMH+/tabaco+ (G3) e Grupo DMH+ (G1),

| | DMH+ (G1) | DMH+/tabaco+ (G3) |
|------------------------------|--|--|
| Inflamação | Adenocarcinoma Tubular Colorretal n (%) | Adenocarcinoma Tubular Colorretal n (%) |
| Branda | 4 (22,22%) | 5 (23,81%) |
| Moderada | 7 (38,89%) | 12 (57,14%) |
| Severa | 7 (38,89%) | 4 (19,05%) |
| Pleomorfismo | | |
| Brando | 4 (22,22%) | 5 (23,81%) |
| Moderado | 10 (55,56%) | 12 (57,14%) |
| Severo | 4 (22,22%) | 4 (19,05%) |
| Mitose | | |
| Ausente | - | 1 (4,76%) |
| < 3/campo | 18 (100%) | 20 (95,24%) |
| > 3/campo | - | - |
| Invasão Submucosa | | |
| Ausente | 2 (11,11%) | 1 (4,76%) |
| Presente | 16 (88,89%) | 20 (95,24%) |
| Invasão Perineural | | |
| Ausente | 18 (100%) | 21 (100%) |
| Presente | - | - |
| Invasão Linfática | | |
| Ausente | 18 (100%) | 21 (100%) |
| Presente | - | - |
| Invasão Vascular | | |
| Ausente | 18 (100%) | 21 (100%) |
| Presente | - | - |
| Desmoplasia | | |
| Ausente | 5 (27,78%) | 10 (47,62%) |
| Presente | 13 (72,22%) | 11 (52,38%) |
| Debris Glandular | | |
| Ausente | - | - |
| Presente | 18 (100%) | 21 (100%) |
| Necrose | | |
| Ausente | 17 (94,44%) | 12 (57,14%) |
| Presente | 1 (5,56%) | 9 (42,86%) |
| Percentual Glandular | | |
| >95% | 4 (22,22%) | 3 (14,29%) |
| 50-95% | 9 (50%) | 11 (52,38%) |
| <50% | 5 (27,78%) | 7 (33,33%) |
| Grau de Diferenciação | | |
| Bem diferenciado | 4 (22,22%) | 3 (14,29%) |
| Moderadamente Diferenciado | 9 (50%) | 11 (52,38%) |
| Pouco Diferenciado | 5 (27,78%) | 7 (33,33%) |
| TOTAL | 18 (100%) | 21 (100%) |

5.1.2 Avaliação das características microscópicas quanto à malignidade.

Nenhuma lesão benigna foi encontrada no Grupo DMH+/tabaco+ (G3), no entanto, 85,29% (29/34) das lesões foram classificadas como malignas (Figura 3A) e

14,70% (5/34) como displasias (FIGURA 3B). As lesões malignas corresponderam a adenocarcinoma tubular, adenocarcinoma de células em anel em cinete e carcinoma *in situ* (FIGURA 3C).

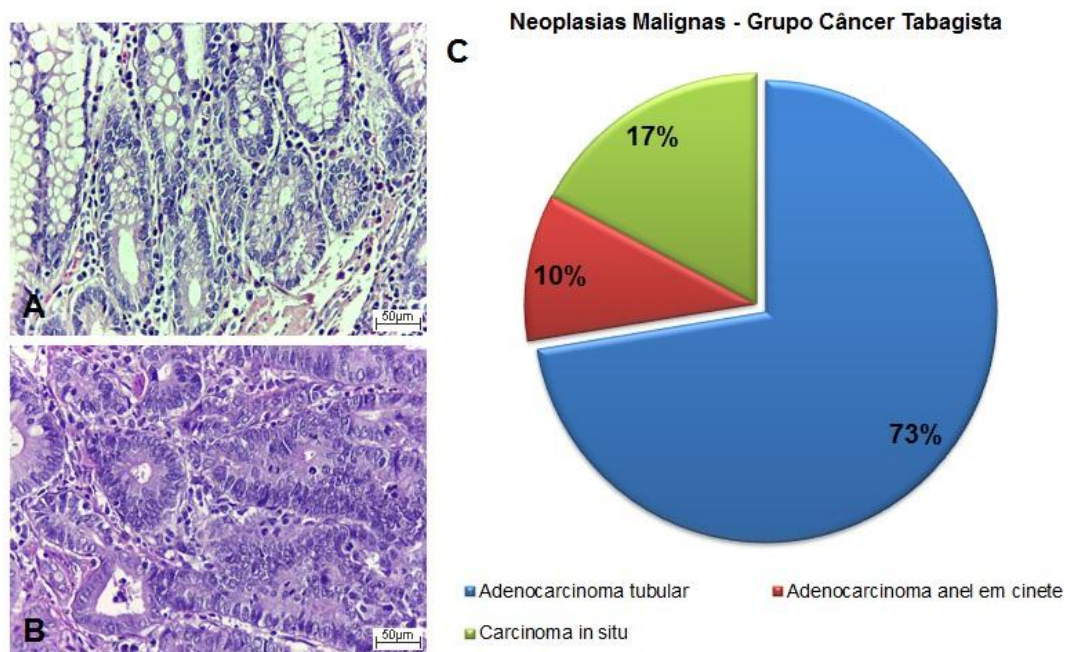


Figura 3 - Lesões em mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina pertencentes ao Grupo DMH+/tabaco+ (G3) na 21^a semana de experimento. A – Mucosa com displasia moderada das criptas, B – Adenocarcinoma tubular colorretal, C – Percentual de neoplasias malignas de acordo com o diagnóstico histopatológico, onde prevaleceu o adenocarcinoma tubular colorretal. A e B: HE.

A inflamação mononuclear com presença de eosinófilos foi a mais predominante nas amostras do Grupo DMH+/tabaco+ (G3). Uma amostra classificada como adenocarcinoma de células em anel em cinete apresentou invasão linfática. Amostras consideradas bem diferenciadas (4/29) compreenderam três adenocarcinomas tubular (75%) e um adenocarcinoma de células em anel em cinete (25%). Classificadas como moderadamente diferenciados (13/29) foram 11 adenocarcinomas tubular (84,62%) e dois carcinomas *in situ* (15,38%), ao passo que amostras consideradas pouco diferenciadas (12/29) eram sete adenocarcinomas tubular (58,33%), dois adenocarcinomas de células em anel em cinete (16,67%) e três carcinomas *in situ* (25%). A figura 4 resume as principais características encontradas nesse grupo.

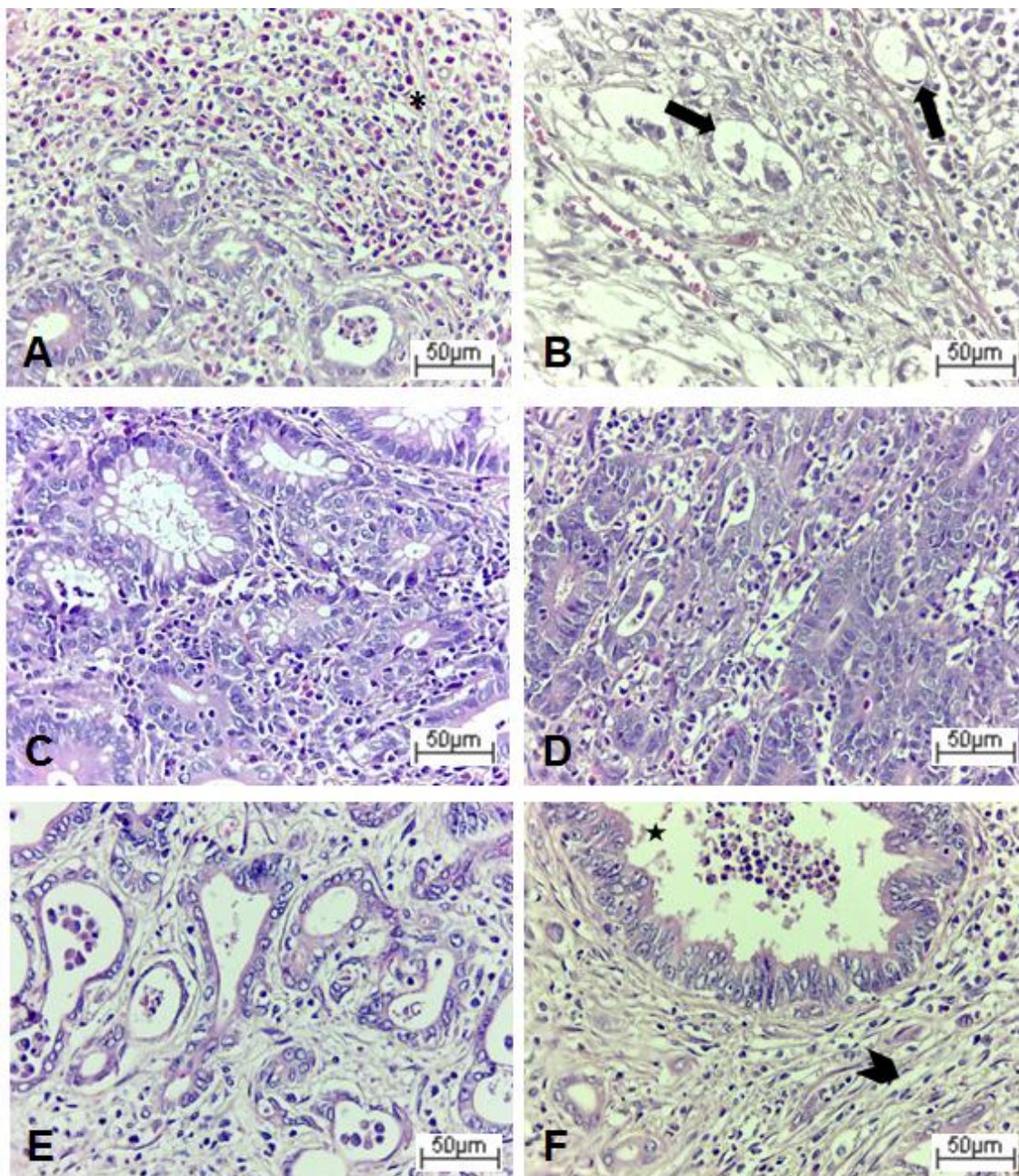


Figura 4 - Lesões em mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina pertencentes ao Grupo DMH+/tabaco+ (G3) na 21ª semana de experimento. A – Inflamação mononuclear com presença de numerosos eosinófilos em adenocarcinoma tubular (asterisco), B – Invasão linfática em amostra de adenocarcinoma de células em anel de cinete (setas), C – Adenocarcinoma tubular bem diferenciado, D – Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado, E – Adenocarcinoma tubular pouco diferenciado, F – Desmoplasia moderada (cabeça de seta) e *debris* glandulares (estrela). HE.

Em relação ao Grupo DMH+ (G1), as lesões benignas corresponderam a 7,69% (2/26) e foram classificadas como adenoma tubular; malignas 84,61% (22/26) e abrangeram adenocarcinoma tubular, adenocarcinoma de células em anel de cinete,

adenocarcinoma mucinoso e carcinoma *in situ*, enquanto as displasias corresponderam a 7,69% (2/26) das alterações encontradas (FIGURA 5 A-D).

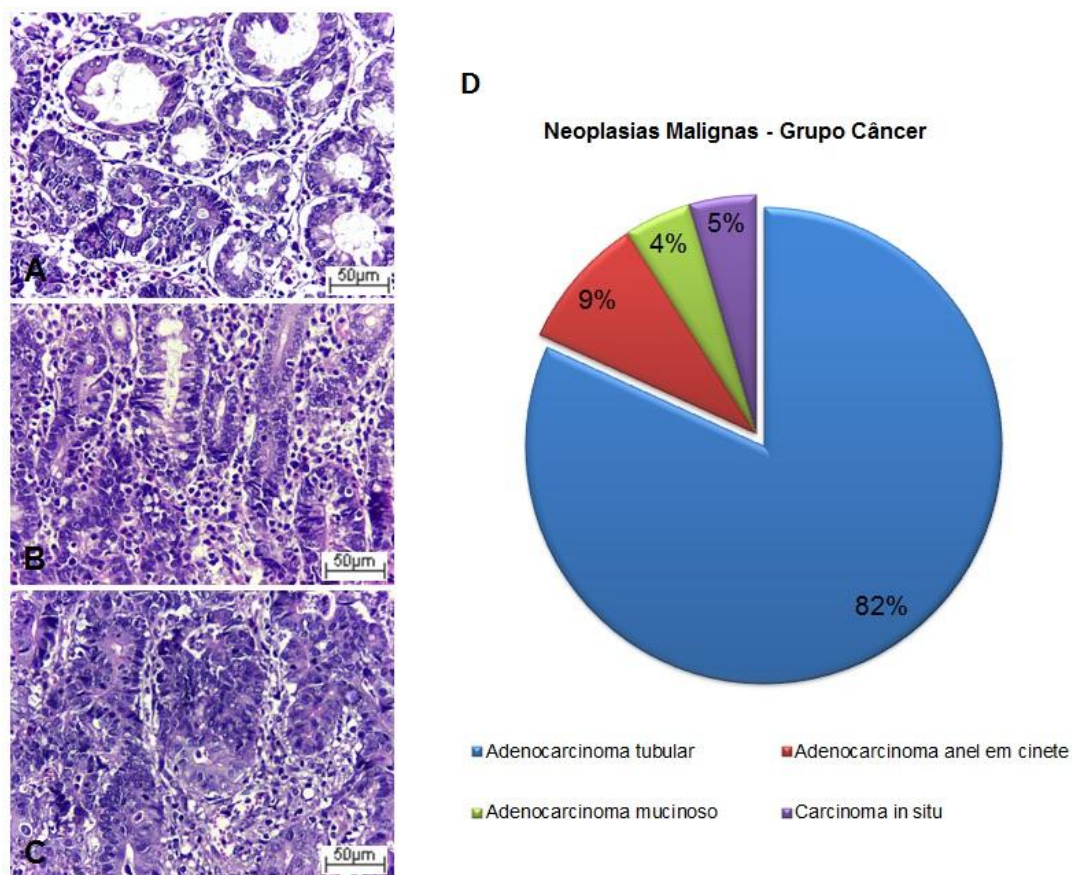


Figura 5 - Lesões em mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina pertencentes ao Grupo DMH+ (G1) na 21ª semana de experimento. A – Mucosa com displasia de alto grau das criptas, B – Adenoma tubular colorretal, C - Adenocarcinoma tubular colorretal, D – percentual de neoplasias malignas de acordo com o diagnóstico histopatológico, onde prevaleceu o adenocarcinoma tubular colorretal. A, B e C: HE.

No Grupo DMH+ (G1) a inflamação mononuclear com presença de neutrófilos e eosinófilos foi predominante. Apenas uma amostra apresentou invasão sanguínea e essa foi classificada como adenocarcinoma de células em anel em cinete. As lesões consideradas bem diferenciadas (6/24) foram classificadas como adenoma tubular (33,33%), enquanto as quatro restantes foram classificadas como adenocarcinoma tubular (66,67%). Moderadamente diferenciadas (10/24) compreenderam nove amostras de adenocarcinoma tubular (90%) e uma de carcinoma *in situ* (10%). Em relação às amostras classificadas como pouco diferenciadas (8/24), cinco eram adenocarcinoma tubular (62,5%), uma era adenocarcinoma mucinoso (12,5%) e duas eram adenocarcinoma de células em anel em cinete (25%). A figura 6 resume as principais características encontradas nesse grupo.

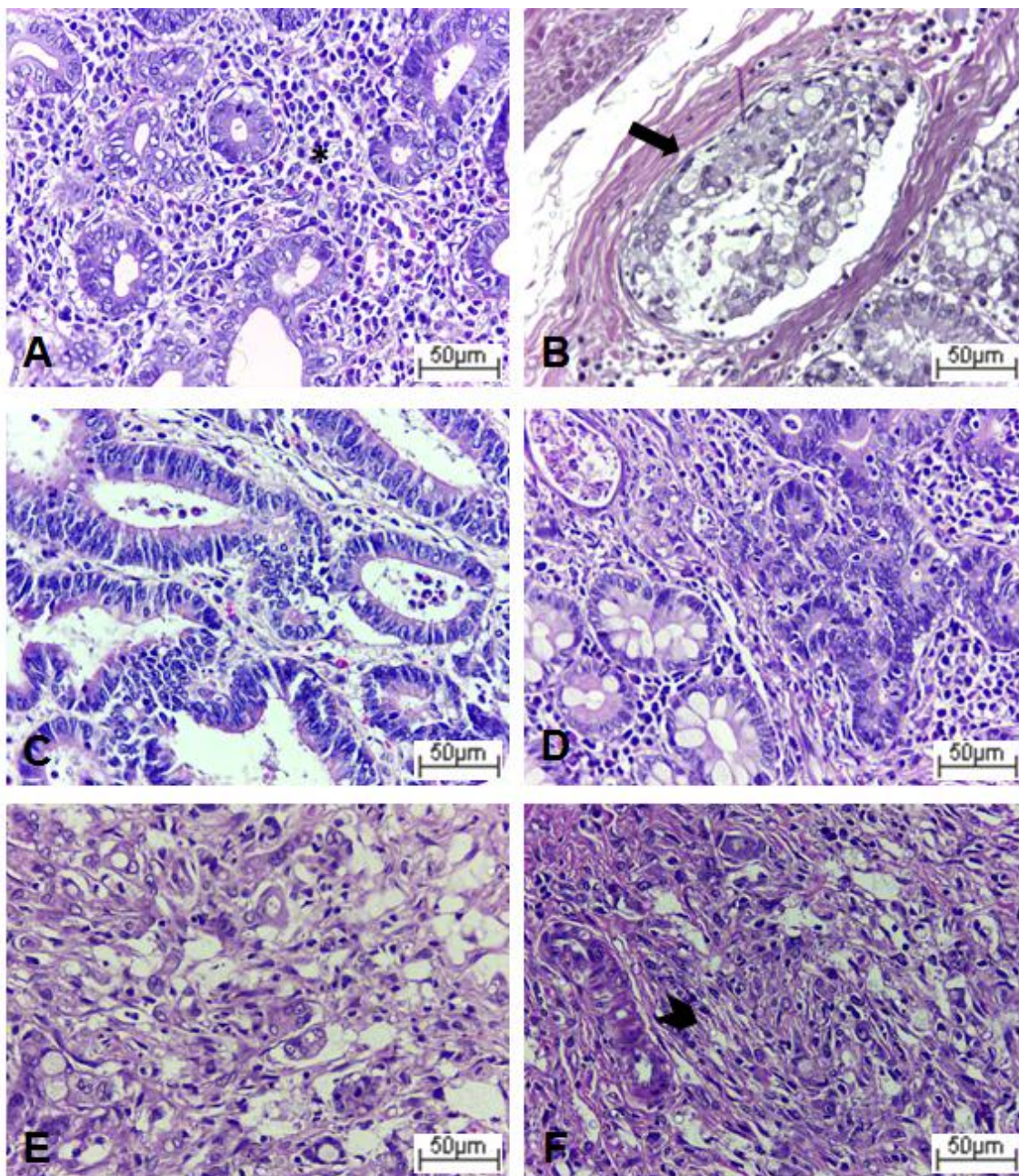


Figura 6 - Fotomicrografia de neoplasia colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina pertencentes ao Grupo DMH+ (G1) na 21^a semana de experimento. A – Notar inflamação mononuclear com presença de neutrófilos e eosinófilos em adenocarcinoma tubular (asterisco), B – Invasão sanguínea em amostra de adenocarcinoma de células em anel em cinete (seta), C – Adenocarcinoma tubular bem diferenciado, D – Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado, E – Adenocarcinoma de células em anel em cinete exemplificando neoplasia pouco diferenciada, F – Desmoplasia moderada (cabeça de seta). HE

5.2 Análise da expressão de HIF-1 α , PHD3 e SOD1

Para análise da expressão da PHD3, HIF1- α e SOD1 foram utilizadas 73 neoplasias diagnosticadas como adenocarcinoma tubular colorretal, sendo 18 amostras pertencentes ao Grupo DMH+ (G1), 21 amostras oriundas do Grupo

DMH+/tabaco+ (G3), 15 do Grupo DMH+/radioterapia (G2) e 19 do Grupo DMH+/tabaco+/radioterapia (G4), além de cinco mucosas normais, Grupo controle negativo DMH-/tabaco- (G0).

5.2.1 Análise da expressão de PHD3 em adenocarcinoma tubular de modelo experimental para câncer colorretal, antes e após tratamento radioterápico

O escore de expressão da proteína PHD3 em adenocarcinoma tubular de modelo experimental para câncer colorretal foi menor nos grupos DMH+ (G1) e câncer DMH+/tabaco+ (G3) em relação ao grupo DMH-/tabaco- (G0), antes do tratamento radioterápico, mostrando-se, desta forma, em subexpressão ($p=0,0002$). Ainda, que a comparação dos escores de expressão entre o Grupo DMH+ (G1) e Grupo DMH+/tabaco+ (G3), mostrou diferença significativa, sendo o menor escore de expressão nos tumores pertencentes ao grupo G1 ($p=0,0270$) (FIGURA 7 A-C; F).

Após radioterapia, o escore de expressão de PHD3 foi maior nas neoplasias pertencentes aos animais tabagistas tratados [Grupo DMH+/tabaco+/radioterapia (G4)] que nos de animais do Grupo DMH+/radioterapia (G2) ($p=0,0011$) (FIGURA 7 D-E, G). A comparação entre o Grupo DMH+ (G1) com o Grupo DMH+/radioterapia (G2) mostrou que a radioterapia não modulou a expressão de PHD3 ($p=0,7449$). Porém, a expressão de PHD3 em tumores pertencentes ao Grupo DMH+/tabaco+/radioterapia (G4) foi superior àquela observada no Grupo DMH+/tabaco+ (G3) ($p=0,0001$) (FIGURA 7 G).

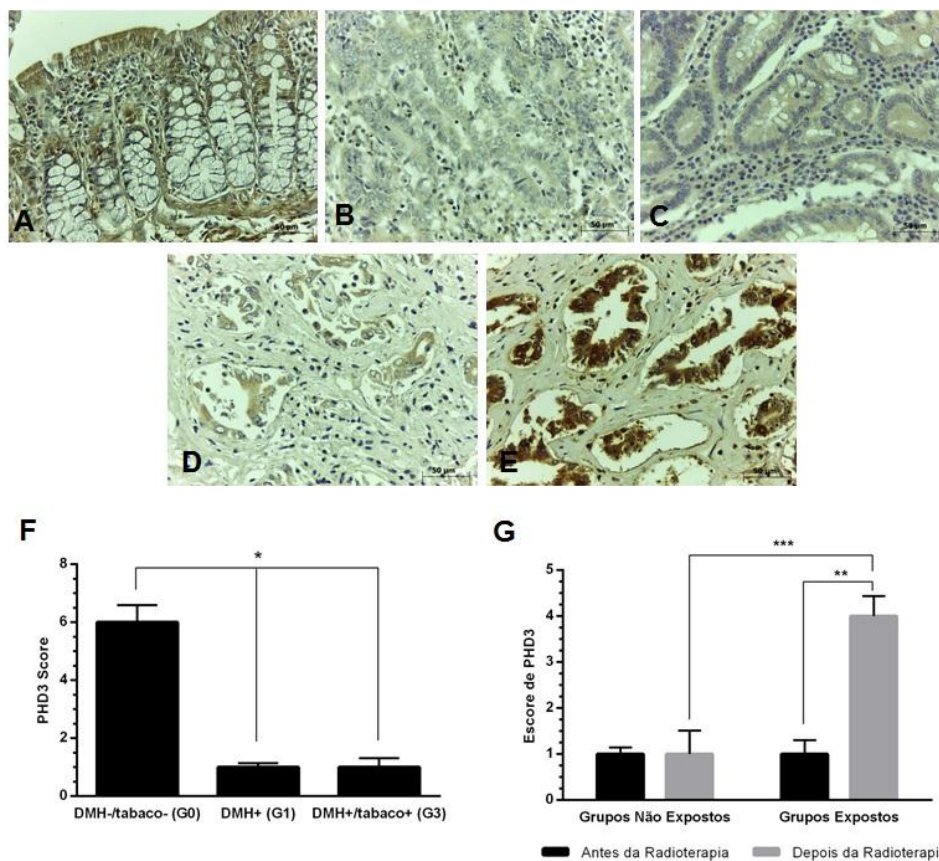


Figura 7 – Análise da expressão de PHD3 em adenocarcinoma tubular de modelo experimental para câncer colorretal exposto e não exposto à fumaça do cigarro. Notar diferença no escore de expressão de PHD3 em controle negativo DMH-/tabaco- (G0) (A), adenocarcinoma tubular do grupo DMH+ (G1) (B) e grupo DMH+/tabaco+ (G3) (C). Em D, expressão em adenocarcinoma tubular do grupo DMH+/radioterapia (G2), e E, expressão em adenocarcinoma tubular no grupo DMH+/tabaco+/radioterapia (G4). F – Notar a diferença no escore de expressão da proteína PHD3 utilizando o anticorpo anti-PHD3 em G0, G1 e G3. O escore de expressão de PHD3 foi menor no grupo DMH+ (G1) em relação aos grupos controle negativo DMH-/tabaco- (G0) e grupo DMH+/tabaco+ (G3) ($p=0,0002$). G – Análise dos escores de expressão de PHD3 antes e após radioterapia. O escore de expressão de PHD3 foi significativamente maior no grupo DMH+/tabaco+/radioterapia (G4) em relação ao grupo DMH+/radioterapia (G2) ($p=0,0011$) e em relação ao grupo DMH+/tabaco+ (G3) ($p=0,0001$). * - Significativo pelo teste Kruskal-Wallis (alfa=5%); ** e *** - Significativo pelo teste de Mann-Whitney (alfa=5%), mediana e erro padrão, IHQ.

5.2.2 Análise da expressão da HIF1- α em adenocarcinoma tubular de modelo experimental para câncer colorretal, antes e após tratamento radioterápico

A proteína HIF1- α também apresenta variação no escore de expressão entre os grupos estudados ($p=0,0005$) antes da radioterapia. O escore de expressão de HIF1- α observado no grupo DMH+/tabaco+ (G3) se assemelha ao escore encontrado no grupo controle negativo DMH-/tabaco- (G0) ($p=0,9721$), no entanto, é significativamente maior que aquele observado no grupo DMH+ (G1) ($p=0,0002$) (FIGURA 8 A-C, F). A radioterapia não alterou o escore de expressão de HIF1- α no grupo DMH+/tabaco+/radioterapia (G4) em comparação ao grupo DMH+/radioterapia

(G2) ($p=0,4988$). Ademais, a comparação entre o grupo DMH+ (G1) com o grupo DMH+/radioterapia (G2) mostrou que a expressão de HIF1- α foi maior após radioterapia ($p=0,0398$). No entanto, nos grupos DMH+/tabaco+/radioterapia (G4) e DMH+/tabaco+ (G3) a expressão de HIF1- α não mostrou diferença significativa ($p=0,2407$) (FIGURA 8 D-E, G).

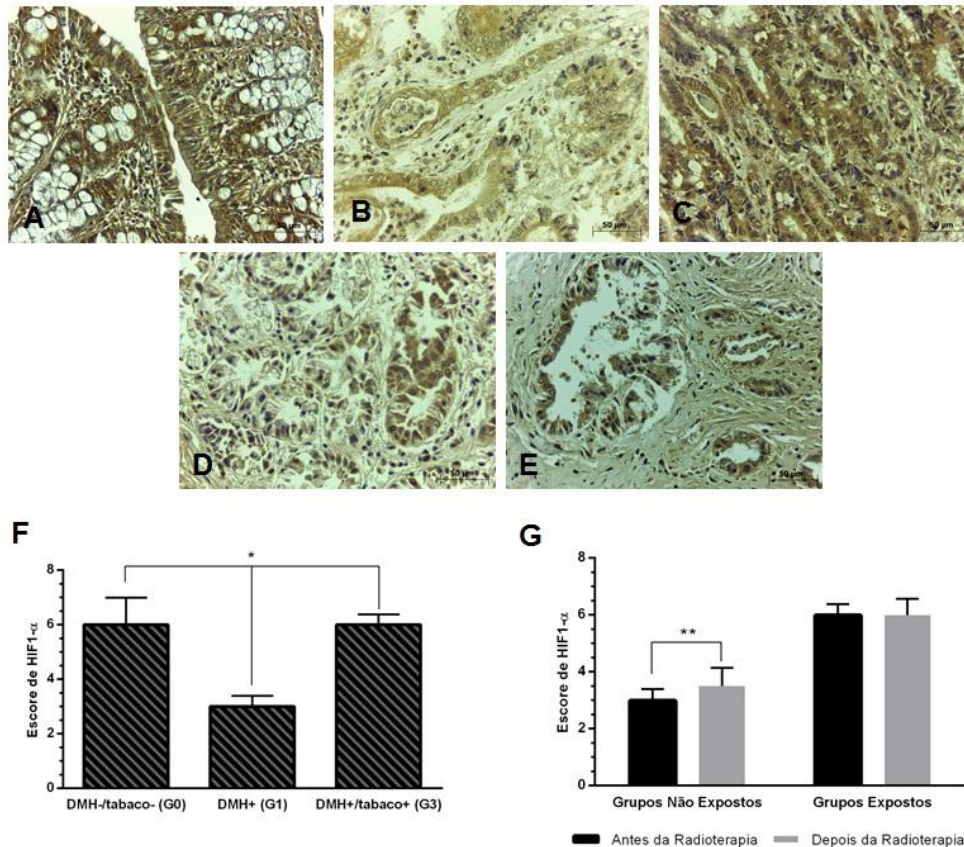


Figura 8 - Análise da expressão de HIF1- α em adenocarcinoma tubular de modelo experimental para câncer colorretal exposto e não exposto à fumaça do cigarro. Notar diferença no escore de expressão de HIF1- α no grupo controle negativo DMH-/tabaco- (G0) (A), adenocarcinoma tubular do grupo DMH+ (G1) (B) e grupo DMH+/tabaco+ (G3) (C). Em D, expressão em adenocarcinoma tubular do grupo DMH+/radioterapia (G2), e E expressão em adenocarcinoma tubular do grupo DMH+/tabaco+/radioterapia (G4). F – Notar a diferença no escore de expressão da proteína HIF1- α utilizando o anticorpo anti- HIF1- α em G0, G1 e G3. O escore de expressão de HIF1- α foi menor no grupo DMH+ (G1) em relação ao escore observado no grupo controle negativo DMH-/tabaco- (G0) e DMH+/tabaco+ (G3) ($p=0,0005$). G – Análise dos escores de expressão de HIF1- α antes e após radioterapia. O escore de expressão de HIF1- α foi significativamente maior no grupo DMH+/radioterapia (G2) em relação ao grupo DMH+ (G1) ($p=0,0398$). * - Significativo pelo teste Kruskal-Wallis (alfa=5%); ** - Significativo pelo teste de Mann-Whitney (alfa=5%), mediana e erro padrão, IHQ.

5.2.3 Análise da expressão de SOD1 em adenocarcinoma tubular de modelo experimental para câncer colorretal, antes e após tratamento radioterápico

Antes da radioterapia o escore de SOD1 diferiu entre os grupos controle negativo DMH-/tabaco- (G0), DMH+ (G1) e DMH+/tabaco+ (G3) ($p=0,0002$), sendo

maior no grupo DMH+ (G1) em relação ao grupo controle negativo DMH-/tabaco- (G0) ($p=0,0168$), e em relação ao grupo DMH+/tabaco+ (G3) ($p=0,0002$) (FIGURA 9 A-C, F).

Após tratamento radioterápico, a comparação entre o grupo DMH+ (G1) com o grupo DMH+/radioterapia (G2) mostrou que a radioterapia não modulou a expressão de SOD1 ($p=0,1695$). Porém, o escore de expressão de SOD1 aumenta significativamente nos tumores do grupo DMH+/tabaco+/radioterapia (G4) em relação ao grupo DMH+/tabaco+ (G3) ($p=0,005$) (FIGURA 9 D-E, G).

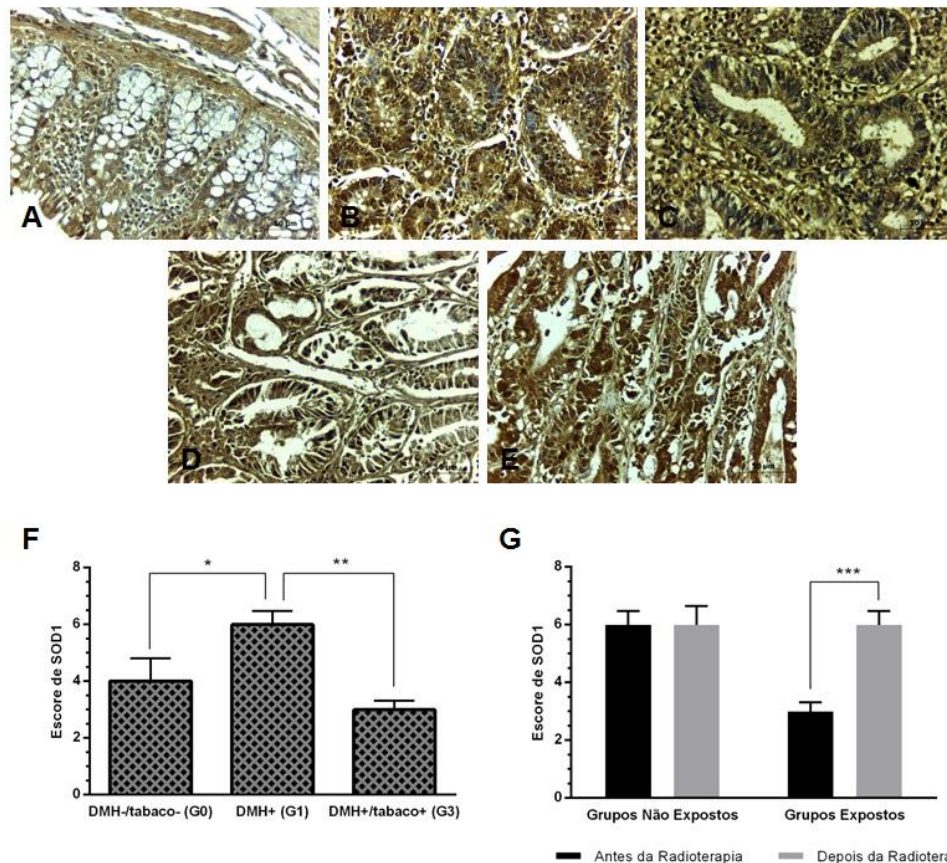


Figura 9 - Análise da expressão de SOD1 em adenocarcinoma tubular de modelo experimental para câncer colorretal exposto e não exposto à fumaça do cigarro. O escore de expressão de SOD1 diferiu no grupo controle negativo DMH-/tabaco- (G0) (A), adenocarcinoma tubular do grupo DMH+ (G1) (B) e grupo DMH+/tabaco+ (G3) (C). Em D, expressão em adenocarcinoma tubular do grupo DMH+/radioterapia (G2), e E expressão em adenocarcinoma tubular do grupo DMH+/tabaco+/radioterapia (G4). F – Notar a diferença no escore de expressão da SOD1 utilizando o anticorpo anti- SOD1 no grupo controle negativo DMH-/tabaco- (G0), grupo DMH+ (G1) e grupo DMH+/tabaco+ (G3). SOD1 foi mais expressa no grupo DMH+ (G1) em relação aos grupos DMH-/tabaco- (G0) ($p=0,0168$) e grupo DMH+/tabaco+ (G3) ($p=0,0002$). G – Análise dos escores de expressão de SOD1 antes e após radioterapia. O escore de expressão de SOD1 foi significativamente maior no grupo DMH+/tabaco+/radioterapia (G4) em relação ao grupo DMH+/tabaco+ (G3) ($p=0,005$). * e ** - Significativo pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pela análise *post hoc* pelo teste *t* de Student ($\alpha=5\%$); *** - Significativo pelo teste de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), mediana e erro padrão, IHQ.

5.3 Análise da Caspase 3 clivada na resposta à radioterapia

A resposta à radioterapia, pelo índice apoptótico, foi maior no grupo DMH+/tabaco+/radioterapia (G4) que no grupo DMH+/radioterapia (G2) ($p=0,0289$) (FIGURA 10 A-C). No grupo exposto à fumaça do cigarro e submetido ao tratamento radioterápico, o índice apoptótico médio foi 97%, com mínimo de 78,79% e o máximo de 100% de células apoptóticas. Ao passo que no grupo de animais não expostos à fumaça do cigarro tratados com radioterapia, o índice apoptótico médio encontrado foi 77%, sendo que o menor índice observado foi 9,72% e o maior índice 100% de células em apoptose em adenocarcinoma tubular colorretal.

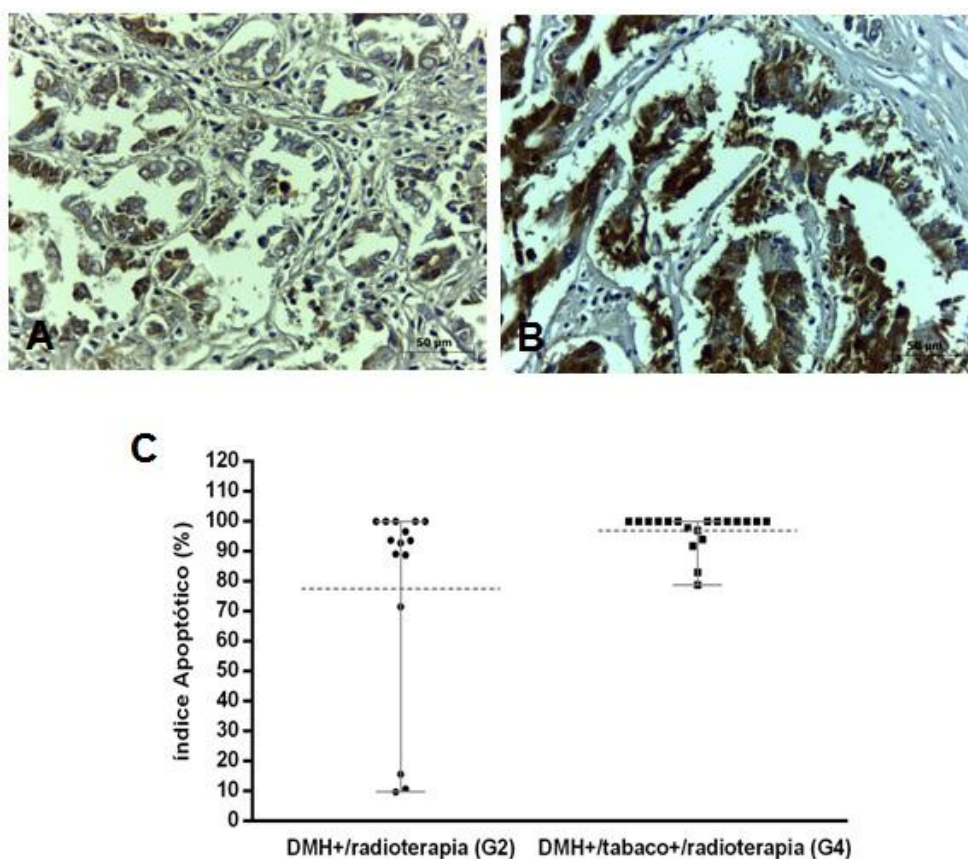


Figura 10 – Análise do índice apoptótico após tratamento radioterápico em adenocarcinoma tubular de modelo experimental para câncer colorretal induzido com 1,2-dimetilhidrazina. A – Fotomicrografia de adenocarcinoma tubular pertencente ao grupo DMH+/radioterapia (G2), evidenciando células imunopositivas para o anticorpo anti-caspase3 clivada em quantidade representativa do índice apoptótico encontrado para esse grupo. B – Fotomicrografia de adenocarcinoma tubular pertencente ao grupo DMH+/tabaco+/radioterapia (G4), evidenciando células imunopositivas para o anticorpo anti-caspase3 clivada em quantidade representativa do índice apoptótico encontrado. C – Comparativo da distribuição de cada amostra analisada em cada grupo estudado. O índice apoptótico mostrou-se mais variável no grupo G2 que no grupo G4 ($p = 0,0289$), pelo teste de Mann-Whitney, $\alpha = 0,05$, IHQ.

6. DISCUSSÃO

6.1 Desenvolvimento de lesões em mucosa colorretal de modelo experimental

Os resultados deste experimento mostraram que apesar do número maior de lesões no grupo tabagista, a exposição à fumaça da queima direta do cigarro não alcançou diferença significativa em relação ao grupo não exposto, e que as lesões apresentaram pleomorfismo e inflamação brandas a moderadas, bem como características histopatológicas compatíveis com lesões em humanos. Além disso, o protocolo utilizando a 1,2-dimetilhidrazina (DMH) induziu, como esperado, lesões macroscópicas tanto no grupo DMH+/tabaco+ (G3) quanto no grupo DMH+ (G1), as quais foram possíveis de diagnosticar por meio da histopatologia.

Estudando a associação de uma simples dose de 1,2-dimetilhidrazina como pró-carcinógeno seguido de colite ulcerativa crônica, Wang et al. (2004) encontraram alta incidência de displasia e câncer colorretal. Além disso, o hábito tabagista associado à colite tem sido bem estudado e mostrou que alterações moleculares importantes são encontradas e favorecem o aparecimento de lesões displásicas e pólipos-adenomatosas (LIU et al., 2003), e também seu envolvimento na co-regulação de 5-lipoxigenase e ciclooxigenase-2 na promoção do câncer colorretal (SHEN et al., 2016). Nesse contexto, nosso modelo experimental de carcinogênese colorretal tabagista utilizando 1,2-dimetilhidrazina permitiu encontrar lesões com características histopatológicas semelhantes às aquelas encontradas em neoplasias colorretais em humanos e que também podem favorecer estudos moleculares e de expressão proteica.

Protocolos de carcinogênese colorretal utilizando o DMH são bem estabelecidos e permitem o estudo de alterações pré-neoplásicas até lesões malignas (BALMAIN; HARRIS, 2000), sejam para fins morfológicos, moleculares ou terapêuticos (SUMAN et al., 2012). Além disso, o modelo experimental utilizando DMH/AMO é útil no estudo de interações gene-gene, bem como gene-ambiente, que influenciam de maneira significativa a patogênese do câncer colorretal (JOHNSON; FLEET, 2013), como é o caso do hábito tabagista.

O tempo de exposição ao tabaco influencia no desenvolvimento de lesões na mucosa colorretal (GIOVANUCCI, 2001). Nesse sentido, a escolha do protocolo utilizado por Laranjeira et al. (1998) se deu pelo fato de o mesmo ter encontrado lesões macroscópicas a partir da décima quinta semana após administração do DMH, ou seja, tempo capaz de permitir a ação dos elementos presentes na fumaça do

cigarro no desenvolvimento da lesão neoplásica colorretal, mimetizando, em comparação ao tempo de vida de um humano, um período considerável de hábito tabagista.

O número de lesões encontradas neste estudo foi variável nos dois grupos estudados. Utilizando o DMH como indutora da carcinogênese colorretal, Laranjeira et al (1998) encontraram nove lesões no máximo em mucosa colorretal, o que se assemelha aos resultados encontrados em nosso estudo e que viabiliza o modelo experimental de câncer colorretal tabagista para estudos aplicáveis a pacientes tabagistas que desenvolvem câncer colorretal esporádico, no que diz respeito à patogênese, morfologia e alterações biomoleculares, e também estudos de sobrevida e prognóstico, bem como estratégias de tratamento.

O presente estudo mostrou que as lesões malignas foram predominantes tanto no grupo exposto à fumaça do cigarro quanto no grupo não exposto. No entanto, no grupo de animais expostos à fumaça do cigarro não foram observadas neoplasias benignas, sugerindo até uma possível influência dos componentes do cigarro na diferenciação neoplásica durante a carcinogênese. Como as primeiras lesões observadas após aplicação de DMH são os focos de criptas aberrantes (McLELLAN, 1991; THORUP, 1994; PARK et al., 1997), além da abundante fonte de compostos carcinogênicos e genotóxicos encontrados nos cigarros (HECHT, 1999), é provável que a exposição à fumaça da queima direta do cigarro tenha levado também à indução de alterações no DNA bem como falha nos sistemas de reparo nas células da mucosa (SALNIKOW; ZHITKOVICH, 2008; CHEN et al., 2009) que poderiam culminar no desenvolvimento de displasias ou hiperplasias e a partir destas na formação da neoplasia maligna.

A inflamação observada nos grupos DMH+ (G1) e DMH+/tabaco+ (G3) variou de branda a severa. No que tange o efeito do tabagismo e nicotina na inflamação do intestino grosso, Cabral e Barbosa (2014) mostraram em sua revisão que modelos animais que analisaram o efeito do tabaco ao nível de mucosa intestinal saudável chegaram a um consenso de que o uso do tabaco e a exposição nicotínica não causam danos histológicos ou macroscópicos, nem inflamação na mucosa intestinal, tampouco qualquer impacto no marcador de infiltração linfocitária, a mieloperoxidase cólica (MPO), portanto, de forma geral, o tabaco apresenta efeito favorável no cólon, sendo a maioria deles de caráter "tolerogênico". Além disso, já foi relatado que o tabagismo protegeu de forma significativa contra o aparecimento de retocolite ulcerativa inespecífica e doença de Chron (MARTINS JÚNIOR et al., 1996).

A inflamação é considerada um ponto crítico no desenvolvimento de câncer colorretal, uma vez que a colite ulcerativa e a doença inflamatória do intestino estão

associadas ao desenvolvimento deste tipo neoplásico, pois existe uma correlação entre a extensão e duração da inflamação e o risco de câncer (EKBOM et al., 1990; ULLMAN; ITZKOWITZ, 2011).

Porém, em relação ao tabaco, inflamação e câncer, dados publicados sugerem não existir um consenso sobre o papel da fumaça do cigarro no desenvolvimento de neoplasia colorretal associada à inflamação (POHL et al., 2000). Assim, observamos em nosso estudo que os tumores encontrados no grupo exposto à fumaça do cigarro, estiveram relacionados principalmente a ação da 1,2-dimetilhidrazina, e que ao hábito tabagista em si, não alterou significativamente a indução de tumores.

Sabe-se que o pleomorfismo celular está associado ao grau de diferenciação tumoral (JONES et al., 2000). Neste sentido, tanto neoplasias malignas de animais expostos à fumaça do cigarro quanto animais não expostos foram moderadas a pouco diferenciadas. No entanto, o grau de diferenciação atribuído para estas lesões levou em consideração a informação publicada por Fleming et al. (2012) para tumores colorretais humanos, na qual, acima de 95% do tumor formado por glândulas, atribui-se bem diferenciado; moderadamente diferenciado apresenta entre 50-95% de glândulas e tumores pouco diferenciados possui maior parte sólida com menos de 50% de formação glandular. E como relatado também por esses autores, aproximadamente 70% dos adenocarcinomas colorretais são diagnosticados como moderadamente diferenciados, seguido de pouco diferenciado (20%) e bem diferenciado (10%), respectivamente. Assim, observamos que os tumores encontrados nesse estudo seguiram essa dinâmica, contribuindo ainda mais para a aplicação desse modelo também em estudos relativos ao tabagismo e câncer colorretal.

As características histopatológicas avaliadas neste experimento foram importantes para o diagnóstico das lesões produzidas pela indução carcinogênica com 1,2-dimetilhidrazina, pois abrangem critérios importantes de malignidade tumoral, além disso, as mesmas podem ser usadas para estratificar as amostras em estudos de prognóstico e sobrevida. Importante salientar que essas características foram baseadas em apresentações histopatológicas do câncer colorretal humano, como as descritas na revisão de Fleming et al. (2012), o que favorece a aplicação e comparação modelo experimental x humano. Porém, como trabalhamos com o modelo experimental de câncer colorretal, procuramos balizar nossa classificação de acordo com as descrições de lesões em mucosa colorretal relatadas por Perse e Cerar (2011) em sua revisão sobre as características histopatológicas encontradas nesses modelos.

Assim, observamos que a abordagem histopatológica para o diagnóstico das lesões em mucosa colorretal de animais expostos e não expostos à fumaça da queima

direta do cigarro deste experimento abrangeu aquelas encontradas em pacientes humanos garantindo, por sua vez, a paridade das informações histopatológicas.

6.2 Análise da expressão de HIF-1 α , PHD3 e SOD1

Nossos resultados mostraram que a PHD3 é subexpressa em adenocarcinoma tubular colorretal em relação à mucosa intestinal normal. Além disso, nas neoplasias de animais expostos à fumaça da queima direta do cigarro o escore de expressão da PHD3 foi significativamente maior que o escore de expressão observado no grupo não exposto. Estudos revelaram que a função da PHD3 é simultaneamente sensível à concentração de oxigênio, a perturbações do ciclo tricarboxílico e ao estado *redox* intracelular, e que a sensibilidade desta proteína a esses parâmetros é mais notável num microambiente de grave distúrbio metabólico e estresse oxidativo, como muitas vezes é observado no microambiente tumoral, inclusive em câncer colorretal (CHANDEL et al, 2000; DEHNE; BRUNE, 2009; PLACE; DOMANN, 2013).

Dados publicados mostraram inconsistência na expressão da PHD3 durante o desenvolvimento do câncer colorretal (XUE et al., 2010; XIE et al., 2012), no entanto, estudos mostraram que os genes de PHD possuem uma ilha CpG em sua região promotora e a hiper ou hipo metilação destes genes podem alterar a expressão da mesma no microambiente tumoral (KONDO, 2009). Corroborando essa hipótese, Rawluszko et al. (2013) revelaram níveis aumentados de metilação na ilha CpG da PHD3 no câncer colorretal em comparação com o epitélio normal dos mesmos pacientes, e que essa alteração culminou com a diminuição significativa dos níveis de expressão de PHD3. Assim, podemos sugerir que o baixo escore de expressão da PHD3 observado nas neoplasias do modelo experimental utilizado nesse experimento poderia estar relacionado à metilação das ilhas CpG.

Por outro lado, a exposição à fumaça do cigarro elevou a expressão de PHD3 em adenocarcinoma tubular colorretal, conforme resultados obtidos neste estudo. É possível que a exposição tenha conferido um caráter protetor à mucosa colorretal, ou seja, existe a possibilidade de que componentes da fumaça do cigarro tenham aumentado a expressão da PHD por mecanismos diversos, inclusive epigenéticos.

Uma publicação recente mostrou que a baixa expressão de PHD3 em neoplasias colorretais de humanos esteve relacionada ao aumento da frequência de metástases, piores prognósticos e formação de colônias migratórias reforçadas, mostrando a importância que essa proteína possui para estudos prognósticos (RADHAKRISHNAN et al., 2016). Desta forma, a partir dos dados da literatura e relacionando com os resultados obtidos em nosso estudo, houve aumento da

expressão da PHD3 nos ratos tabagistas e correlação com melhor resposta à radioterapia, assim podemos sugerir a possibilidade de que indivíduos tabagistas reduziram risco de metástases por apresentarem tendência ao aumento da expressão de PHD3, com possibilidade de melhor prognóstico.

As PHDs são conhecidas por diversas funções, das quais destacamos a regulação da via da hipóxia (SEMENZA, 2012; PLACE et al., 2011). No entanto, pelos escores encontrados da HIF1- α , verificamos que a PHD3 não é a principal reguladora nos níveis de expressão da HIF1- α no câncer colorretal, estando essa, sujeita a outras vias de regulação. Nossos resultados mostraram que a HIF1- α diminuiu sua expressão em adenocarcinoma tubular colorretal em relação à mucosa normal (acompanhando a baixa expressão de PHD3), mas seus níveis voltaram aos de “hipóxia fisiológica” quando os animais com adenocarcinoma tubular colorretal foram expostos à fumaça do cigarro.

A literatura relata que a alta expressão de HIF1- α em neoplasias colorretais humanas está relacionada a um pior prognóstico (RASHEED et al., 2009) e também associados à maior mortalidade, independente das características clínicas do paciente e variáveis moleculares (BABA et al., 2010b). Assim, em contraste com nossos resultados, percebemos que a expressão dessa importante proteína é controversa em tumores colorretais, mostrando a necessidade da observação das vias de regulação da mesma, já que a PHD não é a única fonte de regulação da HIF em tumores de intestino. Neste sentido, procurando avaliar a regulação da transcrição de HIF1- α por metilação do gene em câncer colorretal, Rawluszko-Wiecznerek et al. (2014) não encontraram mudanças na expressão dessa proteína, sugerindo complexidade na regulação epigenética de HIF1- α , e deixando claro que as possíveis alterações nos níveis de expressão de HIF1- α estão relacionadas a regulações pós-traducionais. Porém, diversos fatores ambientais como a dieta, atividade física e até mesmo o tabagismo podem afetar a metilação do DNA em neoplasias colorretais (MIGLIORE et al., 2011). Assim, destacamos que até mesmo o hábito tabagista poderia alterar a expressão da HIF, já que o tabagismo é indutor de hipóxia.

Pelo que observamos a exposição à fumaça do cigarro ou hábito tabagista foi capaz de modular a expressão de HIF1- α , promovendo aumento da sua expressão em mucosa colorretal neoplásica, indicando a necessidade de maiores estudos relacionando o papel epigenético do tabaco no desenvolvimento de neoplasias colorretais.

A expressão da proteína HIF1- α foi avaliada em mucosa colorretal normal e uma alta expressão da mesma foi encontrada, indicando uma hipóxia local. Esses resultados são confirmados por estudos que revelaram uma hipóxia fisiológica no

intestino pela baixa pressão de oxigênio local, geralmente <10mmHg (KARHAUSEN et al., 2003; KARHAUSEN et al., 2004; ALBENBERG et al., 2014). Adicionalmente, a elevada expressão de HIF1- α em indivíduos saudáveis também é explicada pela hiperglicemia local, a qual aumenta o número de receptores de fator de crescimento semelhante a insulina (IGFR) que ativa vias de síntese de HIF1- α (FUKUDA et al., 2002).

Esta indução da HIF1- α em mucosa colorretal saudável é plausível, pois uma vez sob condições hipóxicas, as células demonstram uma preferência pelo metabolismo glicolítico ao invés do metabolismo oxidativo para a produção de ATP (ZHANG et al., 2008). Assim, o complexo HIF-1 medeia a transcrição de vários genes que favorecem este fenótipo como, proteínas que inibem a entrada do ciclo carboxílico como PDK1 (piruvato desidrogenase kinase 1), a qual irá fosforilar e desativar a PDH que tem a função de converter o piruvato em acetil-coenzima A (KIM et al., 2006; PAPANDREOU et al., 2006) e LDHA (lactato deidrogenase A) que converte o piruvato a lactato (SEMENZA et al., 1996).

Os resultados deste experimento mostraram que nos adenocarcinomas tubulares colorretais dos animais não expostos ao cigarro foi observada uma redução da expressão da proteína HIF1- α . Nós inferimos que esse resultado esteja relacionado à elevada quantidade de açúcares simples em seu estágio final de digestão no intestino delgado (WANTEN et al., 2007; BOUDRY et al., 2010), que é todo absorvido no intestino grosso, culminando com uma hiperglicemia local e aumentando a captação dos mesmos pelas células neoplásicas.

Um dos metabólitos encontrados na via glicolítica em condições aberrantes é o metilglioxal (MGO) (XIAO et al., 2013). Alguns trabalhos relataram uma relação próxima entre o MGO e a expressão de HIF1- α , de modo que esse metabólito reduz significativamente a expressão da HIF1- α em neoplasias colorretais por várias vias, sendo elas: por modificação covalente do resíduo de arginina 23, impedindo sua dimerização com a HIF1- β para a formação do complexo HIF-1 (CERADINI et al., 2008); por interação covalente do MGO com a proteína p300, impedindo sua ligação à porção CTAD da HIF1- α e posterior transporte da mesma para o núcleo celular (KAJIWARA et al., 2009; THANGARAJAH et al 2009); e por fim, por aumento da associação da HIF1- α com a chaperona Hsp40/70 (*heat shock protein 40/70*) resultando em ubiquitinação e degradação proteossomal, sem a necessidade de que este recrutamento seja feito pela pVHL (BENTO et al., 2010). Desta forma, acreditamos pelo escore de expressão encontrado de HIF1- α em nosso estudo, que essa última via seja uma importante reguladora pós-traducional em adenocarcinoma tubular colorretal no modelo experimental utilizado.

Interessantemente, após exposição à fumaça do cigarro, a expressão de HIF1- α em adenocarcinoma tubular colorretal esteve aumentada em comparação à expressão encontrada nos tumores do modelo experimental não tabagista (G1). Acreditamos que essa condição esteja relacionada à hipóxia causada pela exposição à fumaça do cigarro. Jensen et al. (1991) mostraram que fumar por 10 minutos diminui a tensão de oxigênio nos tecidos por aproximadamente uma hora e Yu et al. (2012) apontaram em pesquisa, significativo aumento em fatores indutores de hipóxia em células expostas a componentes da fumaça do cigarro.

Outra linha de raciocínio que poderia relacionar os dados obtidos para a expressão da HIF1- α passa pela presença de radicais livres no microambiente tumoral. Dados sugerem que as espécies reativas de oxigênio geradas pelo complexo III do ciclo da ubiquinona estão relacionadas à ativação dos fatores induzíveis de hipóxia (HIFs) (BELL et al., 2007; KLIMOVA; CHANDEL, 2008).

Uma vez que as espécies reativas de oxigênio funcionam como ativadoras da transcrição de HIF1- α , questionamos como estariam as expressões de enzimas antioxidantes envolvidas no bloqueio desses superóxidos, como é o caso da superóxido dismutase 1. Para tanto, nossos resultados mostraram surpreendentemente, que nos tumores pertencentes ao grupo de animais não expostos à fumaça do cigarro e cuja expressão de HIF1- α estava baixa, a expressão de SOD1 foi significativamente maior e possivelmente esteve mais ativa, bloqueando os ROS, enquanto nos tumores de animais expostos à fumaça do cigarro, a expressão de SOD1 foi significativamente menor e a expressão de HIF1- α atingiu níveis elevados possivelmente devido à presença de maior quantidade de ROS.

Em mucosa colorretal normal, a exposição à fumaça do cigarro promove menor atividade de SOD (VERSCHUERE et al., 2012). Esses dados da literatura corroboram os resultados obtidos neste estudo, cuja expressão de SOD1 foi menor em tumores de animais expostos, sugerindo a premissa do envolvimento dos radicais livres na modulação de HIF1- α . Porém, relatos descreveram que a SOD1 não é uma enzima essencial para a vida (SHIMIZU et al., 2010), no entanto, inúmeros fatores de transcrição regulam a expressão de SOD, principalmente aqueles sensíveis ao estresse oxidativo, como a proteína AP-1 e o NF- κ B, que estão entre os componentes importantes da resposta celular em situação de estresse oxidativo, além de participarem decisivamente nas questões de sobrevivência ou morte celular (KARIN, 1999; SHAULIAN; KARIN, 2002; BUBICI et al., 2006).

Em estágios iniciais de lesão da mucosa colorretal, os chamados focos de criptas aberrantes, a expressão de SOD1 esteve aumentada em relação à mucosa normal, em estudo utilizando modelo experimental de carcinogênese colorretal,

mostrando que a atividade dessa enzima aumenta quando lesões pré-cancerígenas são instaladas (AMARAL et al, 2006). No entanto, a expressão e atividade de isoformas de SOD mudaram em relação à progressão tumoral, ou seja, estágios mais avançados da diferenciação tumoral culminaram com menor expressão de SOD, indicando adaptação das células tumorais do câncer colorretal ao estresse oxidativo, e que os reativos de oxigênio presentes nas células tumorais podem aumentar a expressão de SOD1, porém, por outro lado, podem inativar parcialmente sua atividade, permitindo o acúmulo de mais espécies reativas de oxigênio (SKRZYCKI et al., 2009).

Sajesh e McManus (2015) sugeriram que a SOD1 silenciada permitiu o aumento de espécies reativas de oxigênio, que culminaram em altas taxas de danos na dupla fita de DNA levando a apoptose em células defeituosas de mecanismos de reparo pelos genes BML e CHECK2. Também, que o microambiente tumoral no câncer colorretal é inerente à presença de espécies reativas em virtude do metabolismo aberrante (PLACE; DOMANN, 2013). Ainda, radicais livres podem interferir na ação da proteína PHD3 pela oxidação do Fe II ou até mesmo oxidação de seu sítio catalítico (CHANDEL et al., 2000; DEHNE; BRUNE, 2009) mostrando uma interessante conexão entre os radicais livres e a via de hipóxia, uma vez que há ação destes na expressão da proteína HIF1- α . Assim, nota-se um importante papel da proteína SOD1 em regular os níveis de radicais livres no microambiente tumoral uma vez que estes constantemente refletem na regulação das proteínas PHD3 e HIF1- α .

Como visto estas três proteínas agem em conjunto no microambiente tumoral, e suas funções tornam-se responsáveis pelo fenótipo, comportamento e malignidade tumoral. O estudo da inter-relação destas proteínas pode levar à elucidação de processos de tumorigênese, malignização tumoral e possível resposta ao tratamento.

Este trabalho buscou avaliar a expressão das proteínas relacionadas ao tratamento radioterápico. Os indivíduos induzidos à carcinogênese por DMH (G1) apresentaram baixa expressão de PHD3 e baixa expressão de HIF1- α , sugerindo que a expressão desta última seja regulada por outras vias não dependentes da PHD3, como é o caso da via da hiperglicemia ou até mesmo pela pouca presença de radicais livres. Além disso, nestes mesmos indivíduos foi observada uma alta expressão de SOD1, que possui a função de inibir as espécies reativas de oxigênio (ROS), o que permite que a pouca PHD3 presente exerça sua função de inibir ainda mais a proteína HIF1- α .

O grupo DMH+/tabaco+ (G3) teve um perfil de expressão proteica divergente. Nesses indivíduos foi observado um aumento da expressão da PHD3, alta taxa de expressão de HIF1- α e uma pequena redução na expressão de SOD1. Apesar de ter

sido observado um acréscimo de PHD3, é possível que esta proteína esteja afunacional na presença da fumaça do cigarro, uma vez que apresenta mais de 7.000 substâncias, dentre elas metais, como níquel e cobalto, que podem substituir o núcleo metálico da PHD3 evitando assim que a mesma exerça sua função de inibir a proteína HIF1- α . Esta, por sua vez esteve presente em elevadas concentrações no tecido, sendo capaz de ativar o complexo HIF-1 para a ativação de genes que, em caso de radioterapia, aumentam a sua efetividade.

Após radioterapia, a expressão de PHD3 em tumores de modelo experimental não exposto à fumaça do cigarro (G2) aumentou, porém não se mostrou diferente significativamente em relação aos tumores de modelos também não expostos sem tratamento radioterápico (G1). Diante disso, podemos inferir que todas as questões prognósticas relacionadas à baixa expressão de PHD3, como por exemplo, o risco de metástase, pode ser atribuído após o tratamento radioterápico. No entanto, nos tumores de animais expostos à fumaça do cigarro (G4), o tratamento radioterápico promoveu uma elevada expressão de PHD3 em relação aos demais grupos. De certa forma, se pensarmos em resistência à ação radioterápica e também no papel que a PHD3 desenvolve no prognóstico de pacientes com câncer colorretal, a exposição à fumaça do cigarro permitiria maior controle da via de hipóxia por essa proteína, desde que a mesma estivesse ativa.

A radiação normalmente atinge células oxigenadas com metabolismo acelerado, então após a radiação, a morte celular libera oxigênio, deixando-o disponível para distribuição em outras áreas previamente hipóxicas. Este processo aumenta o suprimento de oxigênio e nutrientes, tornando-o mais responsável à radiação (ROOTS; SMITH, 1974; MOELLER; DWEHRIST, 2006).

Como visto o aumento da expressão de HIF1- α ocorre em condições hipóxicas (SEMENZA, 1999), entretanto, no caso de tumores irradiados, a reoxigenação também é responsável por um aumento de HIF1- α . Isto se deve ao estresse oxidativo causado pela reoxigenação do tumor, de modo que ocorre um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) em tumores após a radiação, promovendo a expressão de HIF1- α (MOELLER et al., 2004). Desta forma, a mudança do microambiente *redox* promovido pela reoxigenação causa um acúmulo de HIF1- α no microambiente (MOELLER; DWEHRIST, 2006). Neste trabalho, encontramos níveis elevados de HIF1- α após tratamento radioterápico, em tumores de modelo experimental não exposto à fumaça do cigarro, corroborando as informações descritas anteriormente de que o acúmulo de espécies reativas de oxigênio pós-irradiação pode ser a causa dessa elevação de expressão.

No que diz respeito à expressão de HIF1- α em tumores de modelo experimental exposto à fumaça do cigarro após radioterapia, não houve um aumento da expressão desta proteína como ocorreu em indivíduos não expostos à fumaça. Possivelmente, a expressão desta proteína nos tumores colorretais estudados já estava demasiadamente elevada que mesmo com a radiação do tratamento, não foi possível ocorrer alguma outra via de aumento de expressão nestas células.

Em relação à expressão de SOD1 após tratamento radioterápico, sugerimos que o acúmulo de espécies reativas de oxigênio tenha exigido a transcrição de maior número de moléculas dessa enzima antioxidante. Isso pode ser justificado pelos escores de expressão estatisticamente iguais nos tumores de modelo experimental não exposto à fumaça do cigarro (grupo G2) e ao aumento da expressão nos tumores de modelo experimental exposto (grupo G4), significativamente diferente da expressão encontrada nos tumores de modelo experimental exposto à fumaça e não tratado com radioterapia.

O que o estudo da expressão dessas três proteínas após o tratamento radioterápico trouxe de importante em relação ao tratamento do câncer colorretal? Em sua maioria, a conduta terapêutica da neoplasia colorretal passa pela ressecção cirúrgica primeiramente, seguido da radioterapia associada ou não à quimioterapia (INCA, 2016). No entanto, uma possível resistência terapêutica após radioterapia, pelas células tumorais, culminaria com recidivas e piores prognósticos. Desta forma, dada a importância que as proteínas estudadas e seus escores de expressão possuem na progressão tumoral e prognóstico, validam sua utilização como painel preditor de resposta terapêutica e sucesso do tratamento.

6.3 Resposta à radioterapia pelo índice apoptótico

Este estudo revelou que a expressão de HIF1- α esteve elevada e a de SOD1 foi levemente reduzida nos tumores de modelo experimental para câncer colorretal exposto à fumaça do cigarro anteriormente ao procedimento radioterápico, permitindo, possivelmente, que houvesse um maior acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), culminando com melhor resposta terapêutica, confirmada com a porcentagem de 97% de células apoptóticas nos adenocarcinomas tubulares destes indivíduos, em contraste com os indivíduos não expostos à fumaça do cigarro, com baixa expressão de HIF-1 α e alta expressão de SOD1, que provavelmente não permitiram um aumento de espécies reativas de oxigênio o suficiente para induzirem a uma maior taxa de apoptose, sendo esta representada apenas por 77% das células em apoptose.

Relatos anteriores mostraram que, normalmente, tumores hipóxicos são resistentes à radioterapia e à quimioterapia, uma vez que estes tratamentos

necessitam da geração de (ROS) para induzir dano letal ao DNA (GATENBY et al, 1988; TOMIDA; TSURUO, 1999). No entanto, observamos que nos tumores cuja expressão de HIF1- α esteve elevada, a resposta à radioterapia foi melhor. Somamos ainda, a considerável diminuição na expressão de SOD1, enzima responsável pelo metabolismo de ROS. Assim, inferimos um importante papel desempenhado pelas ROS na resposta à radioterapia.

Corroborando a importância dos ROS e de suas vias de metabolização, Gao et al. (2008) mostraram uma relação de radorresistência de células de glioma humano quando a proteína SOD1 foi superexpressa. Esses autores também relataram que a maior radiosensibilidade foi observada em células deficientes de SOD1, sugerindo que a forte presença da SOD1 estava ligada a uma menor concentração de ROS, necessárias para um maior dano e morte celular.

Outro fato observado é que a expressão de HIF-1 α esteve mais elevada no grupo que respondeu melhor à radioterapia. Possivelmente pela capacidade da formação do complexo HIF-1 e posterior transcrição de vários genes que favorecem o aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) após a radioterapia, o que por sua vez torna esses tumores mais susceptíveis a este tipo de terapia (MOELLER; DWEHRIST, 2006).

Uma vez que a radiação é mais efetiva em células oxigenadas e com o metabolismo acelerado (ROOTS; SMITH, 1974), e que o complexo HIF-1 é capaz de transcrever mais de 100 genes responsáveis por estas características (SEMENZA, 2012), é razoável esperar uma maior taxa de sucesso da radioterapia em tumores com elevada expressão de HIF1- α , baixa expressão de SOD1, elevado metabolismo e concomitantemente uma elevada concentração de espécies reativas de oxigênio, levando à morte das células tumorais de forma mais eficiente.

Estudos mostraram que células deficientes de HIF1- α não respondem bem à radioterapia (MOELLER et al., 2005), de forma semelhante, Santos et al. (2012) observaram que uma elevada expressão de HIF1- α em tumores de cavidade oral promove maior radiosensibilidade e conseqüentemente melhor prognóstico. Estes dados corroboram o presente estudo, onde tumores que apresentaram elevada expressão de HIF1- α tiveram uma maior índice apoptótico obtido por meio da Caspase-3 clivada, sugerindo uma maior taxa de apoptose destas células.

Assim, os dados acima sugerem que o conjunto de alta expressão de HIF1- α e baixa expressão de SOD-1 em indivíduos tabagistas estejam facilitando o aumento de espécies reativas de oxigênio no microambiente tumoral, e conseqüentemente, aumentando os níveis de apoptose pós-radioterapia.

7. CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento deste estudo conclui-se:

- A exposição à fumaça da queima direta do cigarro não afeta o número de lesões em mucosa colorretal de animais induzidos à carcinogênese, em comparação àqueles não expostos;
- O modelo experimental de câncer colorretal aplicado, sob condições de exposição ou não à fumaça do cigarro, permite estudar características histopatológicas compatíveis com o câncer colorretal de humanos, e as limitações desse modelo experimental passam pelo não surgimento de lesões benignas e a possibilidade de estudos inerentes a essa categoria neoplásica;
- O modelo experimental de câncer colorretal aplicado possibilita os estudos moleculares e resposta terapêutica, e abre perspectiva para estudos de prognóstico e sobrevida de pacientes tabagistas;
- A exposição à fumaça do cigarro modula a expressão de PHD3, HIF1- α e SOD1 em adenocarcinoma tubular colorretal em modelo experimental, e PHD3 subexpressa, HIF1- α superexpressa e SOD1 expressa em níveis abaixo de neoplasia de animais não expostos, culminam com melhor resposta radioterápica;
- A exposição à fumaça do cigarro promove melhor resposta à radioterapia em modelo experimental de câncer colorretal.

8. REFERÊNCIAS

ALBENBERG, L.; ESIPOVA, T. V.; JUDGE, C. P.; BITTINGER, K.; CHEN, J.; LAUGHLIN, A.; GRUNBERG, S.; BALDASSANO, R. N.; LEWIS, J. D.; LI, H.; THOM, S. R.; BUSHMAN, F. D.; VINOGRADOV, S. A.; WU, G. D. Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. **Gastroenterology**, v. 18, 2014, p. 1055–1063.

ALMEIDA, V. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**. v. 28, n. 1, 2005, p. 118-129.

AMARAL, E. G. A. S.; FAGUNDES, D. J.; MARKS, G.; INOUE, C. M. Study of superoxide dismutase's expression in the colon produced by azoxymethane and inositol hexaphosphate's paper, in mice. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, supl. 4, 2006, p. 27-31.

APPELHOFF, R. J.; TIAN, Y. M.; RAVAL, R. R.; TURLEY, H.; HARRIS, A. L.; PUGH, C. W.; RATCLIFFE, P. J.; GLEADLE, J. M. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 279, n. 37, 2004, p. 38458–38465.

ARMAGHANY, T.; WILSON, J. D.; CHU, Q.; MILLS, G. Genetic Alterations in Colorectal Cancer. **Gastrointestinal Cancer Research**. v. 5, 2012, p. 19-27.

ASCIERTO, P. A.; KIRKWOOD, J. M.; GROB, J. J.; SIMEONE, E.; GRIMALDI, A. M.; MAIO, M.; PALMIERI, G.; TESTORI, A.; MARINCOLA, F. M.; MOZZILLO, N. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. **Journal of Translational Medicine**. v. 10, 2012, p. 85-111.

ATKIN, W. S.; EDWARDS, R.; KRALJ-HANS, I.; WOOLDRAGE, K.; HART, A. R.; NORTHOVER, J. M.; PARKIN, D. M.; WARDLE, J.; DUFFY, S. W.; CUZICK, J.; UK FLEXIBLE SIGMOIDOSCOPY TRIAL INVESTIGATORS. Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial. **Lancet**, v. 375, 2010, p. 1624-33.

BABA, Y.; HUTTENHOWER, C.; NOSHO, K.; TANAKA, N.; SHIMA, K.; HAZRA, A.; SCHERNHAMMER, E. S.; HUNTER, D. J.; GIOVANNUCCI, E. L.; FUCHS, C. S.; OGINO, S. Epigenomic diversity of colorectal cancer indicated by LINE-1 methylation in a database of 869 tumors. **Molecular Cancer**. 2010a, 17p., doi: 10.1186/1476-4598-9-125

BABA, Y.; NOSHO, K.; SHIMA, K.; IRAHARA, N.; CHAN, A. T.; MEYERHARDT, J. A.; CHUNG, D. C.; GIOVANNUCCI, E. L.; FUCHS, C. S.; OGINO, S. HIF1A overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorectal cancers. **American Journal of Pathology**, v. 176, n. 5, 2010b, p. 2292-301.

BAEK, J. H.; LIU, Y. V.; McDONALD, K. R.; WESLEY, J. B.; HUBBI, M. E.; BYUN, H.; SEMENZA, G. L. Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase 2 is an essential component of the ubiquitin ligase complex that regulates hypoxia-inducible factor 1 α . **Journal of Biology and Chemistry**, v. 282, 2007, p. 23572–23580.

BALMAIN, A.; HARRIS, C. C. Carcinogenesis in mice and human cells: parallels and paradoxes. **Carcinogenesis**, v. 21, 2000, p. 371-377.

BANCI, L.; BERTINI, I.; CRAMARO, F.; DEL CONTE, R.; VIEZZOLI, M. S. The solution structure of reduced dimeric copper zinc superoxide dismutase. The structural effects of dimerization. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 7, 2002, p. 1905–1915

BANDRES, E.; CUBEDO, E.; AGIRRE, X.; MALUMBRES, R.; ZARATE, R.; RAMIREZ, N.; ABAJO, A.; NAVARRO, A.; MORENO, I.; MONZO, M.; GARCIA-FONCILLAS, J. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. **Molecular Cancer**, v.5, n. 29, 2006, 10p., doi 10.1186/1476-4598-5-29.

BELL, E. L.; KLIMOVA, T. A.; EISENBART, J.; MORAES, C. T.; MURPHY, M. P.; BUDINGER, G. R.; CHANDEL, N. S. The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 177, 2007, p. 1029-36.

BENTO, C. F.; FERNANDES, R.; RAMALHO, J.; MARQUES, C.; SHANG, F.; TAYLOR, A.; PEREIRA, P. The chaperone-dependent ubiquitin ligase CHIP targets HIF-1 α for degradation in the presence of methylglyoxal. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, 2010, e15062.

BISSAHOYO, A.; PEARSALL, R. S.; HANLON, K.; AMANN, V.; HICKS, D.; GODFREY, V. L.; THREADGILL, D. W. Azoxymethane is a genetic background-dependent colorectal tumor initiator and promoter in mice: effects of dose, route, and diet. **Toxicological Sciences**, v. 88, n. 2, 2005, p. 340-345.

BOCK, C.; REITHER, S.; MIKESKA, T.; PAULSEN, M.; WALTER, J.; LENGAUER, T. BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfate sequencing. **Bioinformatics**, v. 21, n. 21, 2005, p. 4067–4068.

BOS, R.; van der GROEP, P.; GREIJER, A. E.; SHVARTS, A.; MEIJER, S.; PINEDO, H. M.; SEMENZA, G. L.; van DIEST, P. J.; van der WALL, E. Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. **Cancer**, v. 97, n. 6, 2003, p. 1573-81.

BOUDRY, G.; DAVID, E. S.; DOUARD, V.; MONTEIRO, I. M.; LE HUËROU-LURON, I.; FERRARIS, R. P. Role of intestinal transporters in neonatal nutrition: carbohydrates, proteins, lipids, minerals, and vitamins. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.4, 2010, p.380-401.

BRAHIMI-HORN, C.; MAZURE, N.; POUYSSEGUR, J. Signalling via the hypoxia inducible factor-1alpha requires multiple post translational modifications. **Cell Signaling**. v. 17, 2005, p. 1-9.

BRAMBILLA, E.; PONTE, M. D.; RUSCHEL, L. G.; BOSI, H. R.; BRAGA, G. L.; SILVA, P. G. Staging of colorectal cancer in the private service versus Brazilian National Public Health System: what has changed after five years? **Journal of Coloproctology**. v. 32, n. 2, 2012, p. 144-147.

BRESKVAR, L.; CERAR, A. A role of gender in the occurrence of dimethylhydrazine induced colorectal tumors in Wistar rats. **Radiology and Oncology**, v. 31, 1997, p. 373-379.

BRIZEL, D. M.; DODGE, R. K.; CLOUGH, R. W.; DEWHIRST, M. W. Oxygenation of head and neck cancer: changes during radiotherapy and impact on treatment outcome. **Radiotherapy and Oncology**, v. 53, n. 2, 1999, p. 113-117.

BRUICK, R. K.; MCKNIGHT, S. L. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. **Science**. v. 294, 2001, p. 1337-1340.

BUBICI, C.; PAPA, S.; PHAM, C. G.; ZAZZERONI, F.; FRANZOSO, G. The NF-kappaB-mediated control of ROS and JNK signaling. **Histology and Histopathology**, v. 21, 2006, p. 69-80.

BUETTNER, G. R. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**. v. 11, 2011, p. 341-346

CABRAL, P.; BARBOSA, E. Tabacco and inflammatory bowel disease. *Revista Portuguesa de Coloproctologia*, mai/out, 2014, p. 14-22.

CAMPOS, A. H.; ALDRED, V. L.; RIBEIRO, K. C.; VASSALLO, J.; SOARES, F. A. Role of immunoexpression of nitric oxide synthases by Hodgkin and Reed-Sternberg cells

- on apoptosis deregulation and on clinical outcome of classical Hodgkin lymphoma. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 321, 2009, 95-102.
- CAMPOS, F. G.; CALJURI-HAMRA, M. C.; IMPERIALE, A. R.; KISS, D. R.; NAHAS, S. C.; CECCONELLO, I. Locally advanced colorectal cancer: results of surgical treatment and prognostic factors. *Arquivos de Gastroenterologia*. v. 48, n. 4, 2011, p. 270-5.
- CASARIL, M.; CORSO, F.; BASSI, A.; CAPRA, F.; GABRIELLI, G. B.; STANZIAL, A. M.; NICOLI, N.; CORROCHER, R. Decreased activity of scavenger enzymes in human hepatocellular carcinoma, but not in liver metastases. **International Journal of Clinical and Laboratorial Research**, v. 24, 1994, p. 94–97.
- CEKANOVA, M.; RATHORE, K. Animal models and therapeutic molecular targets of câncer utility and limitations. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 8, 2014, p. 1911-1922.
- CERADINI, D. J.; YAO, D.; GROGAN, R. H.; CALLAGHAN, M. J.; EDELSTEIN, D.; BROWNLEE, M.; GURTNER, G. C. Decreasing intracellular superoxide corrects defective ische-mia-induced new vessel formation in diabetic mice. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 283, 2008, p. 10930-10938.
- CHAN, A. T.; BABA, Y.; SHIMA, K.; NOSHO, K.; CHUNG, D. C.; HUNG, K. E.; MAHMOOD, U.; MADDEN, K.; POSS, K.; RANIERI, A.; SHUE, D.; KUCHERLAPATI, R.; FUCHS, C. S.; OGINO, S.. Cathepsin B expression and survival in colon cancer: Implications for molecular detection of neoplasia. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. v. 19, 2010, p. 2777–2785.
- CHANDEL, N. S.; McCLINTOCK, D. S.; FELICIANO, C. E.; WOOD, T. M.; MELENDEZ, J. A.; RODRIGUEZ, A. M.; SCHUMACKER, P. T. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 275, n. 33, 2000, p. 25130-8.
- CHEN, C.; PORE, N.; BEHROOZ, A.; ISMAIL-BEIGI, F.; MAITY, A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. **Journal of Biology and Chemistry**. v. 276, 2001, p. 9519-9525.
- CHEN, F.; DING, M.; CASTRANOVA, V.; SHI, X. Carcinogenic metals and NF-kappaB activation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 222, 2001, p. 159–171.
- CHEN, H.; GIRI, N. C.; ZHANG, R.; YAMAKE, K.; ZHANG, Y.; MARONEY, M.; COSTA, M. Nickel ions inhibit histone demethylase JMJD1A and DNA repair enzyme

ABH2 by replacing the ferrous iron in the catalytic centers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 10, 2009, p. 7374-7382.

CHO, G.; KANG, S.; SEO, S. J.; KIM, Y.; JUNG, G. The transcriptional repression of the human Cu/Zn superoxide dismutase (sod1) gene by the anticancer drug, mitomycin C(MMC). **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.42, n. 5, 1997, p. 949–956.

CHOWDHURY, R.; HARDY, A.; SCHOFIELD, C.J. The human oxygen sensing machinery and its manipulation. **Chemical Society Reviews**. v. 37, 2008, p. 1308–1319.

COLGAN, S. P.; TAYLOR, C. T. Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, 2010, p. 281–287.

CORPET, D. E.; PIERRE, F. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. **European Journal of Cancer**, v. 41, 2005, p. 1911-1922.

CORVINUS, F. M.; ORTH, C.; MORIGGL, R.; TSAREVA, S. A.; WAGNER, S.; PFITZNER, E. B., BAUS, D.; KAUFMANN, R.; HUBER, L. A.; ZATLOUKAL, K.; BEUG, H.; OHLISCHLÄGER, P.; SCHÜTZ, A.; HALBHUBER, K, J.; FRIEDRICH, K. Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth. **Neoplasia**. v. 7, 2005, p. 545–555.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**. v. 420, 2002, p. 860–867.

CRUZ, M. T.; GONCALO, M.; FIGUEIREDO, A.; CARVALHO, A. P.; DUARTE, C. B.; LOPES, M. C. Contact sensitizer nickel sulfate activates the transcription factors NF- κ B and AP-1 and increases the expression of nitric oxide synthase in a skin dendritic cell line. **Experimental Dermatology**, v.13, n.1, 2004, p.18–26.

CUNNINGHAM, D.; ATKIN, W; LENZ, H. J.; LYNCH, H. T.; MINSKY, B.; NORDLINGER, B.; STARLING, N. Colorectal cancer. **Lancet**. v.375, 2010, p. 1030-47.

CUNNINGHAM, J. M.; CHRISTENSEN, E. R.; TESTER, D. J.; KIM, C. Y.; ROCHE, P. C.; BURGART, L. J.; THIBODEAU, S. N. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. **Cancer Research**. v. 58, 1998, p. 3455-60.

DEHNE, N.; BRUNE, B. HIF-1 in the inflammatory microenvironment. **Experimental Cell Research**. v. 315, n. 11, 2009, p. 1791-1797.

DEMING, D. A.; LEYSTRA, A. A.; NETTEKOVEN, L.; SIEVERS, C.; MILLER, D.; MIDDLEBROOKS, M.; CLIPSON, L.; ALBRECHT, D.; BACHER, J.; WASHINGTON, M. K.; WEICHERT, J.; HALBERG, R. B. *PIK3CA* and *APC* mutations are synergistic in the development of intestinal cancers. **Oncogene**. 2013, doi: 10.1038/onc.2013.167.

DEVI, G. S.; PRASAD, M. H.; SARASWATHI, I.; RAGHU, D.; RAO, D. N.; REDDY, P. P. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. **Clinica Chimica Acta**, v. 293, 2000, p. 53–62.

DRAY, X.; BOUTRON-ROUALT, M. C.; BERTRAISS, S.; SAPINHO, D.; BENHAMICHE-BOUVIER, A. M.; FAIVRE, J. Influence of dietary factors on colorectal cancer survival. **Gut**. v. 52, n. 6, 2003, p. 868-73.

EKBOM, A.; HELMICK, C.; ZACK, M.; ADAMI, H. O. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. **New England Journal Medicine**. v. 323, 1990, p. 1228-1233.

ELSAYED, A. M. e SHAMSUDDIN, A. M. Neoplasms of the colon. In: STINSON, S. F.; SCHULLER, H. M.; REZNIK, G. K. **Atlas of tumorpathology of the Fischer rat**, Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 2000. p.133-91.

ENDO, T.; OOKAWA, K.; TANAKA, M.; NAKAJI, S.; TSUCHIDA, S.; SUGAWARA, K. Differences in carcinogenesis by the length of carcinogen exposure period in rat colon. **Digestive Diseases and Science**, v. 46, 2001, p. 109-117.

EPSTEIN, A. C.; GLEADLE, J. M.; McNEILL, L. A.; HEWITSON, K. S.; O'ROURKE, J.; MOLE, D. R.; MUKHERJI, M.; METZEN, E.; WILSON, M. I.; DHANDA, A.; TIAN, Y. M.; MASSON, N.; HAMILTON, D. L.; JAAKKOLA, P.; BARSTEAD, R.; HODGKIN, J.; MAXWELL, P. H.; PUGH, C. W.; SCHOFIELD, C. J.; RATCLIFFE, P. J. C. *elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. **Cell**. v. 107, n. 1, 2001, p. 43–54.

FARHOUD, S.; BROMBERG, S. H.; BARRETO, E.; GODOY, A. C. Variáveis clínicas e macroscópicas que influenciam o prognóstico do carcinoma colorretal. **Arquivos de Gastroenterologia**. v. 39, n. 3, 2002, p. 163-72.

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

FEMIA, A. P.; CADERNI, G. Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. **Planta Medica**, v. 74, n. 13, 2008, p. 1602-1607.

FIALA, E. S.; STATHOPOULOS, C. Metabolism of methylazoxymethanol acetate in the F344 rat and strain-2 guinea pig and its inhibition by pyrazole and disulfiram. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 108, 1984, p. 129-134.

FIGUEIREDO, J. A.; CAMPOS, F. F.; MARCOS, A. J. F.; MAFRA, M. M. M.; MEYER DE, BARBOSA, S. D.; CUNHA JÚNIOR, G. F. Avaliação retrospectiva da sobrevida de 171 pacientes com câncer colorretal após seguimento de três anos. **Revista Médica de Minas Gerais**. v. 24, supl. 6, 2014, p. S72-S77.

FLATMARK, K.; NOME, R. V.; FOLKVORD, S.; BRATLAND, A.; RASMUSSEN, H. ELLEFSEN, M. S.; FODSTAD, Ø; REE, A. H. Radiosensitization of colorectal carcinoma cell lines by histone deacetylase inhibition. *Radiation Oncology*, 1:25, 2006, doi:10.1186/1748-717X-1-25

FLEMING, M.; RAVULA, S.; TATISHCHEV, S. F.; WANG, H. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. **Journal of Gastrointestinal Oncology**. v. 3, n. 3, 2012, p. 153-173.

FONG, G. H.; TAKEDA, K. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. **Cell Death & Differentiation**. v. 15, 2008, p. 635– 641.

FRANCA, A.; RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; ROCHA, J. J. R.; FÉRES, O. Effects of preoperative pelvic irradiation on colonic anastomosis healing. Na experimental study in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 23, 2008, p. 24-30.

FRANCO, M. C.; DENNYS, C. N.; ROSSI, F. H.; ESTÉVEZ, A. G. Superoxide Dismutase and Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis. In: ESTÉVEZ, A. **Current Advances in Amyotrophic Lateral Sclerosis**, Rijeka: InTech, 2013, p. 141-158. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/current-advances-in-amyotrophic-lateral-sclerosis/superoxide-dismutase-and-oxidative-stress-in-amyotrophic-lateral-sclerosis>> Acesso em 15 de fevereiro de 2016.

FUKUDA, R.; HIROTA, K.; FAN, F.; JUNG, Y. D.; ELLIS, L. M.; SEMENZA, G. L. Insulin-like Growth Factor 1 Induces Hypoxia-inducible Factor 1-mediated Vascular Endothelial Growth Factor Expression, Which is Dependent on MAP Kinase and Phosphatidylinositol 3-kinase Signaling in Colon Cancer Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 41, 2002, p. 38205-38211.

GAMBERINI, M.; CIDADE, M. R.; VALOTTA, L. A.; ARMELIN, M. C. S.; LEITE, L. C. C. Contribution of hydrazines-derived alkyl radicals to cytotoxicity and transformation induced in normal c-myc-overexpressing mouse fibroblasts. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 1, 1998, p. 147–155.

GAO, Z.; SARSOOR, E. H.; KALEN, A. L.; LI, L.; KUMAR, M. G.; GOSWAMI, P. C. Late ROS accumulation and radiosensitivity in SOD1-overexpressing human glioma cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v.45, 2008, p. 1501-1509.

GARVALOV, B. K.; FOSS, F.; HENZE, A. T.; BETHANI, I.; GRAF-HOCHST, S.; SINGH, D.; FILATOVA, A.; DOPESO, H.; SEIDEL, S.; DAMM, M.; ACKER-PALMER, A.; ACKER, T. PHD3 regulates EGFR internalization and signalling in tumours. **Nature Communication**. v. 5, 2014, 5577.

GATENBY, R. A.; KESSLER, H. B.; ROSENBLUM, J. S.; COIA, L. R.; MOLDOFSKY, P. J.; HARTZ, W. H.; BRODER, G. J. Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v 14, 1988, p. 831–838.

GEIERSBACH, K. B.; SAMOWITZ, W. S. Microsatellite instability and colorectal cancer. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**. v. 135, 2011, p.1269-77.

GERALD, D.; BERRA, E.; FRAPART, Y. M.; CHAN, D. A.; GIACCIA, D. A.; MANSUV, D.; POUYESSÉQUER, J.; YANIV, M.; MECHTA,-GRIGORJOU, F. JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. **Cell**. v. 118, 2004, p. 781–794.

GIOVANNUCCI, E. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 10, n. 7, 2001, p. 725-731.

GOIS, E. JR.; DANIEL, R. A.; PARRA, R. S.; ALMEIDA, A. L. ROCHA, J. J.; GARCIA, S. B., FÉRES, O. Hyperbaric oxygen therapy reduces COX-2 expression in a dimethyldiazine-induced rat model of colorectal carcinogenesis. **Undersea & Hiperbaric Medicine**, v. 39, n. 3, 2012, p. 693-698.

GOLEBIEWSKI, F.; KASPRZAK, K. S. Inhibition of core histones acetylation by carcinogenic nickel (II). **Molecular Cell Biochemistry**, v. 279, 2005, p. 133–139.

GRODEN, J.; THLIVERIS, A.; SAMOWIT, W.; CARLSON, M.; GELBERT, L.; ALBERTSEN, H.; JOSLYN, G.; STEVENS, J.; SPIRIO, L.; ROBERTSON, M.; SARGEANT, L.; KRAPCHO, K.; WOLFF, E.; BURT, R.; HUGHES, J. P.; WARRINGTON, J.; McPHERSON, J.; WASMUTH, J.; LE PASLIER, D.; ABDERRAHIM, H.; COHEN, D.; LEPPERT, M.; WHITE, R. Identification and

characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. **Cell**, v. 66, n. 3, 1991, p. 589-600.

GROSS, J. L.; BARANAUSKAS, M. V. B. Tabaco e Câncer. In: LOPES, A.; CHAMMAS, R.; IYEYASU, H. **Oncologia para a Graduação**, 3ª ed., São Paulo: Lemar, 2013, p. 196-201.

GUERRERO, S.; CASANOVA, I.; FARRE, L.; MAZO, A.; CAPELLA, G.; MANGUES, R. *K-ras* codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. **Cancer Research**. v. 60, 2000, p. 6750–6756.

HAASE, P.; COWEN, D. M.; KNOWLES, J. C. Histogenesis of colonic tumours in mice induced by dimethylhydrazine. **The Journal of Pathology**, v. 109, n. 1, 1973, Px

HAMILTON, S. R. e AALTONEN, L. A. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. IARC Press:Lyon, 2000.

HATZIMICHAEL, E.; DASOULA, A.; SHAH, R.; SYED, N.; PAPOUDOU-BAI, A.; COLEY, H. M.; DRANITSARIS, G.; BOURANTAS, K. L.; STEBBING, J.; CROOK, T. The prolyl-hydroxylase EGLN3 and not EGLN1 is inactivated by methylation in plasma cell neoplasia. **European Journal of Haematology**. v. 84, n. 1, 2010, p. 47 – 51.

HAU, J. Animal models. In: HAU, J. e VAN HOOSIER, G. **Handbook of Laboratory Animal Science: Animal Models**, Boca Raton, Florida: CRC Press, 2003, p. 1–9.

HECHT, S. S. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. **Journal of National Cancer Institute**, v. 91, 1999, p. 1194-1210.

HECHT, S. S. Research opportunities related to establishing standards for tobacco products under the Family Smoking Prevention and Tobacco Control Act. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 14, 2012, p. 18–28.

HILEMAN, E. O.; LIU, J.; ALBITAR, M.; KEATING, M. J.; HUANG, P. Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 53, 2004, p. 209–219.

HIRSILA, M.; KOIVUNEN, P.; GUNZLER, V.; KIVIRIKKO, K.I.; MYLLYHARJU, J. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 278, 2003, p. 30772–30780.

HUANG, L. E. e BUNN, H. F. Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance. **Journal of Biological Chemistry**. v. 278, n. 22, 2003, p. 19575-8.

HYER, W. Polyposis syndromes: pediatric implications. **Gastrointestinal endoscopy clinics of North America**, v. 11, n. 4, 2001, p. 659-82, vi-vii.

IARC, International Agency for Research on cancer. **GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=colorectal>. Acesso em: 03 fev. 2016

INCA Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas 2008/09: incidência de câncer no Brasil**. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Rio de Janeiro, Brasil. 2008; www.inca.gov.br.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015, 122p. <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

INCA. Instituto nacional do câncer. Tipos de câncer, colorretal. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal/tratamento>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

JANSSEN, A. M.; BOSMAN, C. B.; VAN DUIJN, W.; OOSTENDORP-VAN DE RUIT, M. M.; KUBBEN, F. J.; KANBAGLI, O.; OZDEMIRLER, G.; BULUT, T.; YAMANER, S.; AYKAC-TOKER, G., UYSAL, M. Mitochondrial lipid peroxides and antioxidant enzymes in colorectal adenocarcinoma tissues. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 91: 2000, p.1258–1263.

JASS, J. R.; YOUNG, J.; LEGGETT, B. A. Evolution of colorectal cancer: change of pace and direction. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. 2002, 17-26.

JENSEN, J. A.; GOODSON, W. H.; HOPF, H. W.; HUNT, T. K. Cigarette smoking decreases tissue oxygen. **Archives of surgery**. 126, 1991, p. 1131-1134.

JOHNSON, R. L. e FLEET, J. C. Animal models of colorectal cancer. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 32, 2013, p. 39-61.

JOKILEHTO, T.; JAAKKOLA, P. M. The role of HIF prolyl hydroxylases in tumour growth. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v. 14, n. 4, 2010, p. 758– 770.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. Patologia Veterinária. 6ª ed., São Paulo: Manole, 2000, p. 96.

JORDE, L. B., CAREY, J. C., BAMSHAD, M. J., WHITE, R. L. **Genética Médica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 197 – 221.

JUBB, A. M.; TURLEY, H.; MOELLER, H. C.; STEERS, G.; HAN, C.; LI, J. I. L.; LEEK, R.; TAN, E. Y.; SINGH, B.; MORTENSEN, N. J.; NOGUERA-TROISE, I.; PEZZELLA, F.; GATTER, K. C.; THURSTON, G.; FOX, S. B.; HARRIS, A. L. Expression of delta-like ligand 4 (Dll4) and markers of hypoxia in colon cancer. **British Journal of Cancer**. v. 101, n. 10, 2009, p. 1749–1757.

JUCÁ, M. J.; BANDEIRA, B. C.; CARVALHO, D. S.; LEAL, A. T. Comparative study of 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane on the induction of colorectal cancer in rats. **Journal of Coloproctology**, v. 34, n. 3, 2014, p. 167-173.

JUNG, K.; SEIDEL, B.; RUDOLPH, B.; LEIN, M.; CRONAUER, M. V.; HENKE, W.; HAMPEL, G.; SCHNORR, D.; LOENING, S. A. Antioxidant enzymes in malignant prostate cell lines and in primary cultured prostatic cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, 1997, p. 127–133.

KAELIN, W. G. JR. e RATCLIFFE, P. J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. **Molecular Cell**. v. 30, 2008, p. 393–402.

KAJIWARA, H.; LUO, Z. Y.; BELANGER, A. J.; URABE, A.; VINCENT, K. A.; AKITA, G. Y.; CHENG, S. H.; MOCHIZUKI, S.; GREGORY, R. J.; JIANG, C.. A hypoxic inducible factor-1 α hybrid enhances collateral development and reduces vascular leakage in diabetic rats. **The Journal of Gene Medicine**. v. 11, 2009, p. 390-400.

KARHAUSEN, J.; FURUTA, G. T.; TOMASZEWSKI, J. E.; JOHNSON, R. S.; COLGAN, S. P.; HAASE, V. H. Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, 2004, p. 1098 – 1106.

KARHAUSEN, J.; IBLA, J. C.; COLGAN, S. P. Implications of hypoxia on mucosal barrier function. **Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)**, v. 49, 2003, 77–87, 2003.

KARIN, M. How NF- κ B is activated: the role of I κ B kinase (IKK) complex. **Oncogene**, v. 18, 1999, p. 6867–6874.

KATSCHINSKI, D. M. In vivo functions of the prolyl-4-hydroxylase domain oxygen sensors: Direct route to the treatment of anaemia and the protection of ischaemic tissues. **Acta Physiologica**. v. 195, 2009, p. 407–414.

KERN, S. E.; FEARON, E. R.; TERSMETTE, K. W.; ENTERLINE, J. P.; LEPPERT, M.; NAKAMURA, Y.; WHITE, R.; VOGELSTEIN, B.; HAMILTON, S. R. Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma [corrected]. **JAMA**. v. 261, 1989, p. 3099–3103.

KIM, J. W.; TCHERNYSHYOV, I.; SEMENZA, G. L.; DANG, C. V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. **Cell Metabolism**, v. 3, 2006, p. 177–185.

KIM, S. Y.; YANG, E. G. Recent Advances in Developing Inhibitors for Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylases and Their Therapeutic Implications. **Molecules**. v. 20, 2015, p. 20551-20568.

KLIMOVA, T.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. **Cell Death and Differentiation**. v. 15, 2008, p. 660-66.

KODITZ, J.; NESPER, J.; WOTTAWA, M.; STIEHL, D.P.; CAMENISCH, G.; FRANKE, C.; MYLLYHARJU, J.; WENGER, R.H.; KATSCHINSKI, D.M. Oxygen-dependent atf-4 stability is mediated by the PHD3 oxygen sensor. **Blood**. v. 110, 2007, p. 3610–3617.

KONDO, Y. Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers. **Yonsei Medical Journal**, v. 50, n. 4, 2009, p. 455-463.

KOPPE, M. J.; SOEDE, A. C.; PELS, W.; OYEN, W. J. G.; GOLDENBERG, D. M.; BLEICHRODT, R. P.; BOERMAN, O. C. Experimental radioimmunotherapy of small peritoneal metastases of colorectal origin. **International Journal of Cancer**, v. 106, 2003, p. 965-972.

KOIVUNEN, P.; TIAINEN, P.; HYVARINEN, J.; WILLIAMS, K. E.; SORMUNEN, R.; KLAUS, S. J.; KIVIRIKKO, K. I.; MYLLYHARJU, J. An endoplasmic reticulum transmembrane prolyl 4-hydroxylase is induced by hypoxia and acts on hypoxia-inducible factor alpha. **Journal of Biological Chemistry**. v. 282, 2007, p. 30544–30552

KREBS, C. Experimenteller Alkoholkrebs bei weissen Mäusen. **Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie**, v. 50, 1928, p. 203-218.

KUWAI, T.; KITADAI, Y.; TANAKA, S.; ONOGAWA, S.; MATSUTANI, N.; KAIO, E.; ITO, M.; CHAVAMA, K. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 105, n. 2, 2003, p. 176-81.

LAMONT, J. T.; O'GORMAN, T. A. Experimental colon cancer. **Gastroenterology**, v. 75, n. 6, 1978, p. 1157-1169.

LANZA, G.; MATTEUZZI, M.; GAFA, R.; ORVIETO, E.; MAESTRI, I.; SANTINI, A.; del SENNO, L. Chromosome 18q allelic loss and prognosis in stage II and III colon cancer. **International Journal of Cancer**. v. 79, 1998, p. 390–395.

LAQUEUR, G. L. Carcinogenic effects of cycad meal and cycasin, methylazoxymethanol glycoside in rats and effects of cycasin in germfree rats. **Federation Proceedings**, v. 23, 1964, p. 1386-1388.

LAQUEUR, G. L.; MICKELSEN, O.; WHITING, M. KURLAND, L. Carcinogenic properties of nuts from *Cycas circinalis* L. indigenous Guam. **Journal of National Cancer Institute**, v. 31, 1963, p. 919-951.

LARANGEIRA, L. L. S.; TAHA, M. O.; FERME, A.; LEMOS, R.; PLAPLER, H. Localização de lesões tumorais induzidas pela 1, 2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no cólon de ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 13, n. 3, 1998.

LE VOYER, T. E.; SIGURDSON, E. R.; HANLON, A. L.; MAYER, R. J.; MACDONALD, J. S.; CATALANO, P. J.; HALLER, D. G. Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089. *Journal of Clinical Oncology*. v. 21, n. 15, 2003, p. 2912-9.

LEE, D. C.; SOHN, H. A.; PARK, Z. Y.; OH, S.; KANG, Y. K.; LEE, K. M.; KANG, M.; JANG, Y. J.; YANG, S. J.; HONG, Y. K.; NOH, H.; KIM, J. A.; KIM, D. J.; BAE, K. H.; KIM, D. M.; CHUNG, S. J.; YOO, H. S.; YU, D. Y.; PARK, K. C.; YEOM, Y. I. A lactate-induced response to hypoxia. **Cell**. v. 161, 2015, p. 595–609.

LENGAUER, C.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature**. v. 396, n. 6712, 1998, p. 643-649.

LESER, S. M.; SOARES, E. A. Aspectos nutricionais e atividade física na prevenção do câncer colorretal. **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação Nutrição**. v. 21, 2001, p. 121-145.

LIU, E. S. L.; YE, Y.; SHIN, V. Y.; YUEN, S.; LEUNG, S.; WONG, B. C. Y.; CHO, C. Cigarette smoke exposure increases ulcerative colitis-associated colonic adenoma formation in mice. **Carcinogenesis**. v. 24, n. 8, 2003, p.1407-1413.

LUO, W.; HU, H.; CHANG, R.; ZHONG, J.; KNABEL, M.; O'MEALLY, R.; COLE, R.N.; PANDEY, A.; SEMENZA, G.L. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. **Cell**. v. 145, 2011, p. 732–744.

LYNCH, H. T.; SHAW, M. W.; MAGNUSON, C. W.; LARSEN, A. L.; KRUSH, A. J. Hereditary factors in cancer: study of two large Midwestern kindreds. **Archives of internal medicine**, v. 117, n. 2, 1966, p. 206-212.

MA, X. T.; WANG, S.; YE, Y. J.; DU, R. Y.; CUI, Z. R.; SOMSOUK, M. Constitutive activation of Stat3 signaling pathway in human colorectal carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**. v. 10, 2004, p. 1569–1573.

MAGNUSON, B. A.; SOUTH, E. H.; EXON, J. H.; DASHWOOD, R. H.; XU, M.; HENDRIX, K.; HUBELE, S. Increased susceptibility of adult rats to azoxymethane-induced aberrant crypt foci. **Cancer Letter**, v. 161, n. 2, 2000, p. 185-193.

MALHOTRA, R.; TYSON, D. G.; SONE, H.; AOKI, K.; KUMAGAI, A. K.; BROSIUS, F. C. Glucose uptake and adenoviral mediated GLUT1 infection decrease hypoxia-induced HIF-1 α levels in cardiac myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 34, 2002, p. 1063-1073.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. RAS oncogenes: The first 30 years. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, 2003, p. 459-465.

MANGO, C.; MEDEIROS, M. L.; MALUF, F. C. Pólipos e polipose juvenil: estudo epidemiológico e histológico de 45 casos. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 14, n. 2, 1994, p. 92-5.

MARKLUND, S. L.; WESTMAN, N. G.; LUNDGREN, E.; ROOS, G. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. **Cancer Research**, v. 42, n. 5, 1982, p. 1955-1961.

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

MARTINEZ, M. E.; McPHERSON, R. S.; ANNEGERS, J. F.; LEVIN, B. Cigarette smoking and alcohol consumption as risk factors for colorectal adenomatous polyps. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 87, n. 4, 1995, p. 274-279.

MARTINS JÚNIOR, E. V.; ARAÚJO, I. S.; ATALLAH, A. N.; MISZPUTEN, S. J. Smoking and inflammatory bowel disease: an epidemiological case-control study. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 33, n. 2, 1996, p. 74-78.

MASKENS, A. P.; DUJARDIN-LOITS, R. M. Experimental adenomas and carcinomas of the large intestine behave as distinct entities: most carcinomas arise de novo in flat mucosa. **Cancer**, v. 47, 1981, p. 81-89.

MAXWELL, P. H.; DACHS, G. U.; GLEADLE, J. M.; NICHOLLS, L. G.; HARRIS, A. L.; STRATFORD, I. J.; HANKINSON, O.; PUGH, C. W.; RATCLIFFE, P. J. Hypoxia inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, v. 94, n. 15, 1997, p. 8104-9.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, 1969, p. 6049-6055.

McGARRITY, T. J.; PEIFFER, L. P.; COLONY, P. C. Cellular proliferation in proximal and distal rat colon during 1,2-dimethylhydrazine-induced carcinogenesis. **Gastroenterology**, v. 95, 1988, 343-348.

McLELLAN, E. A.; MEDLINE, A.; BIRD, R. P. Dose response and proliferative characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions in rat colon. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 11, 1991, p. 2093-98.

METZEN, E.; BERCHNER-PFANNSCHMIDT, U.; STENGEL, P.; MARXSEN, J. H.; STOLZE, I.; KLINGER, M.; HUANG, W. Q.; WOTZLAW, C.; HELLWING-BÜRGELE, T.; JELKMANN, W.; ACKER, H.; FANDREY, J. Intracellular localisation of human HIF-1 hydroxylases: implications for oxygen sensing. *Journal of Cell Science*. v. 116, 2003, p. 1319 –1326.

MIGLIORE, L.; MIGHELI, F.; SPISNI, R.; COPPEDE, F. Genetics, cytogenetics and epigenetics of colorectal cancer. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2011, artigo 792362.

MOELLER, B. J.; CAO, Y.; LI, C. Y.; DEWHIRST, M. W. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: Role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. **Cancer Cell**, v. 5, n. 5, 2004, p. 429-41.

MOELLER, B. J.; DEWHIRST, M. W. HIF-1 and tumour radiosensitivity. **British Journal of Cancer**, v.1, 2006, p. 1-5.

MOELLER, B. J.; DREHER, M. R.; RABBANI, Z. N.; SCHROEDER, T.; CAO, Y.; LI, C. Y.; DEWHIRST, M. W. Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radio-sensitivity. **Cancer Cell**, v8, 2005, p. 99 – 110.

MUNDADE, R.; IMPERIALE, T. F.; PRABHU, L.; LOEHRER, P. J.; LU, T. Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. **Oncoscience**, v. 1, n. 6, 2014, p. 400-406.

NA, X.; WU, G.; RYAN, C. K.; SCHOEN, S. R.; DI'SANTAGNESE, P. A.; MESSING, E. M. Overproduction of vascular endothelial growth factor related to von Hippel-Lindau tumor suppressor gene mutations and hypoxia-inducible factor-1a expression in renal cell carcinomas. **The Journal of Urology**, v. 170, 2003, p. 588-92.

NAKAYAMA, K.; KANZAKI, A.; HATA, K.; KATABUCHI, H.; OKAMURA, H.; MIYAZAKI, K.; FUKUMOTO, M.; TAKEBAYASHI, Y. Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha)

gene expression in human ovarian carcinoma. **Cancer Letters**, v. 176, n. 2, 2002, p. 215-23.

NAUSS, K. M.; LOCNISKAR, M.; PAVLINA, T.; NEWBERNE, P. M. Morphology and distribution of 1, 2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced colon tumors and their relationship to gut-associated lymphoid tissue in the rat. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 73, n. 4, 1984, p. 915-924.

NEWCOMB, P. A.; STORER, B. E.; MARCUS, P. M. Cigarette smoking in relation to risk of large bowel cancer in women. **Cancer Research**, v. 55, n. 21, 1995, p. 4906-4909.

NOFFSINGER, A. E. Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. *Annual Review of Pathology*, v. 4, 2009, p. 343-64.

NOGUERA AGUILAR, J. F.; CUADRADO GARCÍA, A. Ethanol and colic experimental carcinogenesis. *Ethanol y carcinogénesis cólica experimental*. **Revista Espanola de Enfermedades Digestivas**, v. 99, n. 8, 2007, p. 438–439.

OGINO, S.; KAWASAKI, T.; KIRKNER, G. J.; SUEMOTO, Y.; MEYERHARDT, J. A.; FUCHS, C. S. Molecular correlates with MGMT promoter methylation and silencing support CpG island methylator phenotype-low (CIMP-low) in colorectal cancer. **Gut**. v. 56, 2007, p. 1564–1571.

OGINO, S.; ODZE, R. D.; KAWASAKI, T.; BRAHMANDAM, M.; KIRKNER, G. J.; LAIRD, P. W.; LODA, M.; FUCHS, C. S. Correlation of pathologic features with CpG island methylator phenotype (CIMP) by quantitative DNA methylation analysis in colorectal carcinoma. **The American Journal of Surgical Pathology**. v. 30, 2006, p. 1175–1183

OIKAWA, T.; OKUDA, M.; MA, Z.; GOORHA, R.; TSUJIMOTO, H.; INOKUMA, H.; FUKASAWA, K. Transcriptional control of BubR1 by *p53* and suppression of centrosome amplification by BubR1. **Molecular and Cellular Biology**. v. 25, 2005, p. 4046–4061.

OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver Cu, Zn-SOD in mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 42, 2001, p. 38388-38393.

OLIVEIRA, C. E.; LEITE, M. S., MIRANDA, J. S., ANDRADE, A. L., GARCIA, S. B., LUQUETTI, A. O.; MOREIRA, H. Chronic *Trypanosoma cruzi* infection associated with low incidence of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 5, 2001, p. 737-740.

PAPANDREOU, I.; CAIRNS, R. A.; FONTANA, L.; LIM, A. L.; DENKO, N. C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. **Cell Metabolism**. v. 3, 2006, p. 187–197.

PARK, H. S.; GOODLAD, R. A.; 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 Research**, v. 57, 1997, p. 4507-10.

PEREIRA, J. T.; TORRES, R. A. B.; NOGUEIRA, A. M. M. F. Acometimento metastático linfonodal no câncer colorretal. **Arquivos de Gastroenterologia**. v. 43, n. 2, 2006, p. 89-93.

PERRY, J. J.; SHIN, D. S.; GETZOFF, E. D.; TAINER, J. A. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1804, 2010, p. 245-262.

PERŠE, M.; CERAR, A. Dimethylhydrazine model is not appropriate for evaluating effect of ethanol on colorectal cancer. **Revista Espanola de Enfermedades Digestivas**, v. 99, 2007, p. 463-466.

PERŠE, M. e CERAR, A. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2011, ID 473964, 14 páginas.

PERŠE, M.; CERAR, A. The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat-experimental colorectal carcinogenesis. **Radiology and Oncology**, v. 39, 2005, p. 61-87.

PETKO, Z.; GHIASSI, M.; SHUBER, A.; GORHAM, J.; SMALLEY, W.; WASHINGTON, M. K.; SCHULTENOVER, S.; GAUTAM, S.; MARKOWITZ, S. D.; GRADY, W. M. Aberrantly methylated CDKN2A, MGMT, and MLH1 in colon polyps and in fecal DNA from patients with colorectal polyps. **Clinical Cancer Research**. v. 11, 2005, p. 1203–1209.

PITOT, H. C. Adventures in hepatocarcinogenesis. **Annual Review of Pathology of Mechanisms of Disease**, v. 2, 2007, p. 1-29.

PLACE, T. L.; DOMANN, F.E. Prolyl-hydroxylase 3: Evolving roles for an ancient signaling protein. **Hypoxia**. v. 1, 2013, p. 13–17.

PLACE, T. L.; FITZGERALD, M. P.; VENKATARAMAN, S.; VORRINK, S. U.; CASE, A. J.; TEOH, M. L.; DOMANN, F. E. Aberrant promoter CpG methylation is a mechanism for impaired PHD3 expression in a diverse set of malignant cells. **PLoS One**. v. 6, n. 1, 2011, e14617.

POHL, C.; HOMBACH, A.; KRUIS, W. Chronic inflammatory bowel disease and cancer. **Hepatogastroenterology**, v. 47, 2000, p. 57-70.

RADHAKRISHNAN, P.; RUH, N.; HARMOSS, J. M.; KISS, J.; MOLLENHAUER, M.; SCHERR, A. L.; PLATZER, L. K.; SCHMIDT, T.; PODAR, K.; OPFERMAN, J. T.; WEITZ, J.; SCHULZE-BERGMANN, H.; KOEHLER, B. C.; ULTICH, A.; SCHNEIDER, M. Prolyl hydroxylase 3 attenuates MCL-1-mediated ATP production to suppress the metastatic potential of colorectal cancer cells. **Cancer Research**, 2016, [Epub ahead of print].

RASHEED, S.; HARRIS, A. L.; TEKKIS, P. P.; TURLEY, H.; SILVER, A.; McDONALD, P. J.; TALBOT, I. C.; GLYNNE-JONES, R.; NORTHOVER, J. M.; GUENTHER, T. Hypoxia-inducible factor-1 α and -2 α are expressed in most rectal cancers but only hypoxia-inducible factor-1 α is associated with prognosis. **British Journal of Cancer**, v. 100, 2009, p. 1666–1673.

RAWLUSZKO, A. A.; BUJINICKA, K. E.; HORBACKA, K.; KROKOWICZ, P.; JAGODZINSKI, P. P. Expression and DNA methylation levels of prolylhydroxylases PHD1, PHD2, PHD3 and asparaginyl hydroxylase FIH in colorectal cancer. **BMC Cancer**. v. 13:526, 2013. doi 10.1186/1471-2407-13-526.

RAWLUSZKO-WIECZOREK, A. A.; HORBACKA, K.; KROKOWICZ, P.; MISZTAL, M.; JAGODZINSKI, P. P. Prognostic potential of DNA methylation and transcript levels of HIF1A and EPAS1 in colorectal cancer. **Molecular Cancer Research**, v. 12, n. 8, 2014, p. 1112-27.

ROHDE, C.; ZHANG, Y.; JURKOWSKI, T. P.; STAMERJOHANN, H.; REINHARDT, R.; JELTSCH, A. Bisulfite sequencing Data Presentation and Compilation (BDPC) web server– a useful tool for DNA methylation analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 5, 2008, e34.

ROOTS, R.; SMITH, K. C. On the nature of the oxygen effect on x-ray-induced DNA single-strand breaks in mammalian cells. **International Journal of Radiation Biology & Related Studies in Physics Chemistry & Medicine**, v.26, 1974, p. 467 – 480.

ROOTS, R.; SMITH, K. C. On the nature of the oxygen effect on x-ray-induced DNA single-strand breaks in mammalian cells. **International Journal of Radiation Biology & Related Studies in Physics Chemistry & Medicine**, v.26, 1974, p. 467 – 480.

ROSENBERG, D.; GIARDINA, C.; TANAKA, T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 2, 2009, p. 183-196.

ROSSI, B. M.; AGUIAR JÚNIOR, S.; FERREIRA, F.O.; NAKAGAWA, W. T.; LOPES, A. Câncer colorretal. *Revista Brasileira de Medicina*. v. 67, n. 1, 2010, p. 4-9.

ROYNETTE, C. E.; CALDER, P. L.; DUPERTUIS, Y. M.; PICHARD, C. n-3 Polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. **Clinical Nutrition**, v.23, 2004, p.139-151.

RUSSO, G. L. Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 4, 2007, p. 533-544.

RUSTGI, A. K. BRAF: A Driver of the Serrated Pathway in Colon Cancer. **Cancer Cell**. v. 24, 2013, p. 1-2.

RYAN, H. E.; POLONI, M.; McNULTY, W.; ELSON, D.; GASSMANN, M.; ARBEIT, J. M.; JOHNSON, R. S. Hypoxia-inducible factor-1 α is a positive factor in solid tumor growth. **Cancer Research**, v. 60, n. 15, 2000, p. 4010-4015.

SAJESH, B. V.; McMANUS, K. J. Targeting SOD1 induces synthetic lethal killing in BLM and CHECK2-deficient colorectal cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 29, 2015, p. 27907-27922.

SALNIKOW, K.; ZHITKOVICH, A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis nickel, arsenic and chromium. **Chemical Research in Toxicology**. v. 21, n. 1, 2008, p. 28-44.

SALNIKOW, K.; BLAGOSKLONNY, M. V.; RYAN, H.; JOHNSON, R.; COSTA, M. Carcinogenic nickel induces genes involved with hypoxic stress. **Cancer Research**. v. 60, n. 1, 2000, p. 38-41.

SAMUELS, Y.; VELCULESCU, V. E. Oncogenic mutations of *PIK3CA* in human cancers. **Cell Cycle**. v. 3, 2004, p. 1221–1224.

SANTOS, M.; LOURO, I. D.; MERCANTE, A. M. C.; CARVALHO, M. B.; SILVA, E. H. T.; SILVA, A. M. A. HIF1-Alpha expression. Predicts survival of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity, **Plos One**, v. 7, 2012, e45228.

SCHAIBLE, B.; SCHAFFER, K.; TAYLOR, C. T. Hypoxia, innate immunity and infection in the lung. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 174, 2010, p. 235–243.

SCHARTE, M.; HAN, X.; BERTGES, D.J.; FINK, M.P.; DELUDE, R.L. Cytokines induce HIF-1 DNA binding and the expression of HIF-1-dependent genes in cultured rat enterocytes. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 284, 2003, p. 373–384.

SCHOEN, R. E.; PINSKY, P. F.; WEISSFELD, J. L.; YOKOCHI, L. A.; CHURCH, T.; LAYEMO, A. O.; BRESALIER, R.; ANDRIOLE, G. L.; BUYS, S. S.; CRAWFORD, E. D.; FOUAD, M. N.; ISAACS, C.; JOHNSON, C. C.; REDING, D. J.; O'BRIEN, B.; CARRICK, D. M.; WRIGHT, P.; RILEY, T. L.; PURDUE, M. P.; IZMIRLIAN, G.; KRAMER, B. S.; MILLER, A. B.; GOHAGAN, J. K.; PROROK, P. C.; BERG, C. D.; PLCO PROJECT TEAM. Colorectal-cancer incidence and mortality with screening flexible sigmoidoscopy. **New England Journal of Medicine**. v. 366, 2012, p. 2345-57.

SCHOFIELD, C. J.; RATCLIFFE, P. J. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**. v. 5, 2004, p. 343-354.

SCOTT-STUMP, S.; MAHAN, L. K. **Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**, 9ª ed., São Paulo: Roca, 2002.

SEMENZA G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**. v. 3, n. 10, 2003, p. 721-32.

SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. **Trends in Pharmacological Science**. v. 33, n. 4, 2012, p. 207-14.

SEMENZA, G. L. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia inducible factor 1. **Annual Review of Cell and Development Biology**. v. 15, 1999, p. 551–78.

SEMENZA, G. L. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. v. 15, 1999, p. 551–78.

SEMENZA, G. L.; JIANG, B. H.; LEUNG, S. W.; PASSANTINO, R.; CONCORDET, J. P.; MAIRE, P.; GIALLONGO, A. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 271, 1996, p. 32529– 32537.

SHAULIAN, E.; KARIN, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. **Nature Cell Biology**, v. 4, 2002, E131–E136.

SHEN, J.; LI, W. X.; XIAO, Z. G.; ZHANG, L.; LI, M. X.; LI, L. F.; HU, W.; LU, G.; CHO, C. H. The co-regulatory role of 5-Lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in the carcinogenesis and their promotion by cigarette smoking in colons. **Current Medicinal Chemistry**, mar. 21, 2016, [Epub ahead of print].

SHEPHERD, A. P. Metabolic control of intestinal oxygenation and blood flow. **Federation Proceedings**, v. 41, 1982, p. 2084 –2089.

SHIH, I. M.; ZHOU, W.; GOODMAN, S. N.; LENGAUER, C.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. **Cancer Research**. v. 61, 2001, p. 818–822.

SHIMA, K.; ORIKAWA, T.; BABA, Y.; NOSHO, K.; SUZUKI, M.; YAMAUCHI, M.; HAYASHI, M.; GIOVANNUCCI, E.; FUCHS, C. S.; OGINO, S. MGMT promoter methylation, loss of expression and prognosis in 855 colorectal cancers. **Cancer Causes & Control**. v. 22, 2011, p. 301–309.

SHIMIZU, T.; NOJIRI, H.; KAWAKAMI, S.; UCHIYAMA, S.; SHIRASAWA, T. Model mice for tissue-specific deletion of the manganese superoxide dismutase gene. **Geriatrics & Gerontology International**, v. 10, suppl. 1, 2010, S70–S79

SHIRAI, T.; NAKANOWATARI, J.; KURATA, Y.; FUKUSHIMA, S.; ITO, N. Different dose-response relationship in the induction of different types of colonic tumours in Wistar rats by 1,2-dimethylhydrazine. **Gann**, v. 74, 1983, p. 21-27.

SIEBER, O. M.; LAMLUM, H.; CRABTREE, M. D.; ROWAN, A. J.; BARCLAY, E.; LIPTON, L.; HODGSON, S.; THOMAS, H. J.; NEALE, K.; PHILLIPS, R. K.; FARRINGTON, S. M.; DUNLOP, M. G.; MUELLER, H. J.; BISGAARD, M. L.; BULOW, S.; FIDALGO, P.; ALBUQUERQUE, C.; SCARANO, M. I.; BODMER, W.; TOMLINSON, I. P.; HEINIMANN, K. Whole-gene APC deletions cause classical familial adenomatous polyposis, but not attenuated polyposis or “multiple” colorectal adenomas. **Proceeding of the National Academy of Science of the United State of America**. v. 99, 2002, p. 2954–2958.

SIEGEL, R.; DESANTIS, C.; JEMAL, A. Colorectal cancer statistics, 2014. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**. v. 62, n. 2, 2014, p. 104-117.

SKRZYCKI, M.; MAJEWSKA, M.; PODSIAD, M.; CZECZOT, H. Expression and activity of superoxide dismutase isoenzymes in colorectal cancer. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 4, 2009, p. 663-670.

SOHN, O. S.; FIALA, E. S.; REQUEJO, S. P.; WEISBURGER, J. H.; GONZALEZ, F. J. Differential effects of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoxymethanol. **Cancer Research**, v. 61, 2001, p. 8435-8440.

SOILLEUX, E. J.; TURLEY, H.; TIAN, Y. M.; PUGH, C. W.; GATTER, K. C.; HARRIS, A. L. Use of novel monoclonal antibodies to determine the expression and distribution of the hypoxia regulatory factors PHD-1, PHD-2, PHD-3 and FIH in normal and neoplastic human tissues. **Histopathology**, v. 47, n. 6, 2005, p. 602– 610.

SOINI, Y.; KAHLOS, K.; PUHAKKA, A.; LAKARI, E.; SÄILY, M.; PÄÄKKÖ, P.; KINNULA, V. Expression of inducible nitric oxide synthase in healthy pleura and in malignant mesothelioma. **British Journal of Cancer**. v. 3, 2000, p. 880-886.

SONNWEBER, T.; NACHBAUR, D.; SCHROLL, A.; NAIRZ, M.; SEIFERT, M.; DEMETZ, E.; HASCHKA, D.; MITTERSTILLER, A. M.; KLEINSASSER, A.; BURTSCHER, M.; TRUBSBACH, S.; MURPHY, A. T.; WROBLEWSKI, V.; WITCHER, D. R.; MLECZKO-SANECKA, K.; VECCHI, C.; MUCKENTHALER, M. U.; PIETRANGELO, A.; THEURL, I.; WEISS, G. Hypoxia induced downregulation of hepcidin is mediated by platelet derived growth factor BB. **Gut**, v. 63, 2014, p. 1951–1959.

SPARKS, A. B.; MORIN, P. J.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. **Cancer Research**. v. 58, 1998, p. 1130–1134.

STAAB, A.; LÖFFLER, J.; SAID, H. M.; KATZER, A.; BEYER, M.; POLAT, B.; EINSELE, H.; FLENTIE, M.; VORDERMARK, D. Modulation of glucose metabolism inhibits hypoxic accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). **Strahlentherapie und Onkologie**. V. 183, 2007, p. 366-373.

SUMAN, S.; FORNACE JR, A. J.; DATTA, K. Animal Models of Colorectal Cancer in Chemoprevention and Therapeutics Development. In: ETTARH, R. **Colorectal Cancer - From Prevention to Patient Care**, Rijeka: InTech, 2012, p. 277-300. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/colorectal-cancer-from-prevention-to-patient-care/animal-models-ofcolorectal-cancer-in-chemoprevention-and-therapeutics-development>. Acesso em 15 de fevereiro de 2016.

SUNTER, J. P.; APPLETON, D. R.; WRIGHT, N. A.; WATSON, A. J. Pathological feature of the colonic tumours induced in rats by the administration of 1,2-dimethylhydrazine. **Virchows Archiv B., Cell Pathology**, v. 29, n. 3, 1978, p. 211-223.

SWAMY, M. V.; HERZOG, C. R.; RAO, C. V. Inhibition of COX-2 in colon cancer cell lines by celecoxib increases the nuclear localization of active p53. **Cancer Research**. v. 63, 2003, p. 5239–5242.

SWENBERG, J. A.; COOPER, H. K.; BUCHELER, J.; KLEIHUES, P. 1,2-Dimethylhydrazine induced methylation of DNA bases in various rat organs and the effects of pre-treatment with disulfiram. **Cancer Research**, v. 39, 1979, p. 465-7.

TAKEDA, K.; COWAN, A.; FONG, G. Essential role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis of the adult vascular system. **Circulation**. v. 116, 2007, p. 774–781.

TAKEDA, K.; HO, V. C.; TAKEDA, H.; DUAN, L.; NAGY, A.; FONG, G. Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2. **Molecular and Cell Biology**. v. 26, 2006, p. 8336–8346.

TAKETO, M. M.; EDELMANN, W. Mouse models of colon cancer. **Gastroenterology**, v. 136, 2009, p. 780-798.

TANAKA, T. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. **Journal of Carcinogenesis**, v. 8, 2009, p. 5. doi:10.4103/1477-3163.49014.

TERRY, P.; EKBOM, A.; LICHTENSTEIN, P.; FEYCHTING, M.; WOLK, A. Long-term tobacco smoking and colorectal cancer in a prospective cohort study. *International Journal of Cancer*, v. 91, 2001, p. 585-587.

TERZIC, J.; GRIVENNIKOV, S.; KARIN, E.; KARIN, M. Inflammation and colon cancer. **Gastroenterology**. v. 138, 2010, p. 2101–2114.

THANGARAJAH, H.; YAO, D.; CHANG, E. I.; SHI, Y.; JAZAYERI, L.; VIAL, I. N.; GALIANO, R. D.; DU, X. L.; GROGAN, R.; GALVEZ, M. G.; JANUSZYK, M.; BROWNLEE, M.; GURTNER, G. C. The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in dia-betic tissues. **Proceeding of the National Academy of Science of the United State of America**. v. 106, 2009, p. 13505-13510.

THEODOROPOULOS, V. E.; LAZARIS, A. C.; SOFRAS, F.; GERZELIS, I.; TSOUKALA, V.; GHIKONTI, I.; MANIKAS, K.; KASTRIOTIS, I. Hypoxia-inducible factor 1a expression correlates with angiogenesis and unfavorable prognosis in bladder cancer. **European Urology**, v. 46, 2004, p. 200-8.

THORSON, A. G.; KNEZETIC, J. A.; LYNCH, H. T. A century of progress in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). **Diseases of the colon & rectum**, v. 42, n. 1, 1999, p. 1-9.

THORUP, I.; MEYER, O.; KRISTIANSEN, E. Influence of a dietary fiber on development of dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci and colon tumor incidence in Wistar rats. **Nutrition and Cancer**, v. 21, n. 2, 1994, p. 177-182.

TOMIDA, A.; TSURUO, T. Drug resistance mediated by cellular stress response to the microenvironment of solid tumors. **Anticancer Drug Design**, v.14, 1999, p. 169–177.

TOMONAGA, T.; MATSUSHITA, K.; ISHIBASHI, M.; NEZU, M.; SHIMADA, H.; OCHIAI, T.; YODA, K.; NOMURA, F. Centromere protein H is up-regulated in primary human colorectal cancer and its overexpression induces aneuploidy. **Cancer Research**. v. 65, 2005, p. 4683–4689.

TRUMBULL, K. A.; BECKMAN, J. S. A role for copper in the toxicity of zinc-deficient superoxide dismutase to motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, 2009, p. 1627-1639.

TSOI, K. K.; PAU, C. Y.; WU, W. K.; CHAN, F. K.; GRIFFITHS, S.; SUNG, J. J. Cigarette Smoking and the Risk of Colorectal Cancer: A Meta-analysis of Prospective Cohort Studies. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**. v. 7, n. 6, 2009, p. 682–688.

ULLMAN, T. A.; ITZKOWITZ, S. H. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology*, v. 140, 2011, p. 1807-1816.

VAN DRIEL, B. E.; LYON, H.; HOOGENRAAD, D. C.; ANTEN, S.; HANSEN, U.; VAN NOORDEN, C. J. Expression of CuZn- and Mn-superoxide dismutase in human colorectal neoplasms. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, 1997, p. 435–444.

VECERIC, Z; CERAR, A. Comparison of wistar vs. fischer rat in the incidence of 1,2-dimethylhydrazine induced intestinal tumours. **Radiology and Oncology**, v. 38, 2004, p. 227-34.

VERSCHUERE, S.; DE SMET, R.; ALLAIS, L.; CUVELIER, C. The effect of smoking on intestinal inflammation: What can be learned from animal models? *Journal of Crohn's and Colitis*, v. 6, n. 1, 2012, p. 1-12.

VOGEL, S.; WOTTAWA, M.; FARHAT, K.; ZIESENISS, A.; SCHNELLE, M.; LE-HUU, S.; VON AHLEN, M.; MALZ, C.; CAMENISCH, G.; KATSCHINSKI, D. M. Prolyl hydroxylase domain (PHD) 2 affects cell migration and F-actin formation via RhoA/rhoassociated kinase-dependent cofilin phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 285, 2010, p. 33756–33763.

VORDERMARK, D.; KRAFT, P.; KATZER, A.; BÖLLING, T.; WILLNER, J.; FLENTJE, M. Glucose requirement for hypoxic accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). **Cancer Letters**. v. 230, 2005, p. 122-133.

WANG, G. L.; SEMENZA, G. L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. **Proceedings of the National Academy of Science**. v. 90, 1993; p. 4304-8.

WANG, J.G.; WANG, D. F.; LY, B. J.; SI, J. M. A novel mouse model for colitis associated colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sulfate sodium. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 20, 2004, p. 2958-2962.

WANG, S. H.; WANG, Y. Z.; ZHANG, K. Y.; SHEN, J. H.; ZHOU, H. Q.; QIU, X. Y. Effect of superoxide dismutase and malondialdehyde metabolic changes on carcinogenesis of gastric carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, 2005, p. 4305–4310.

WANG, Y.; LIU, Y. F.; CHENG, Y.; YI, D. H.; LI, P.; SONG, W. Q.; FU, D. Z.; WANG, X. Prognosis of colorectal cancer with liver metastasis: value of a prognostic index. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 11, 2010, p. 1116-22.

WANTEN, G. SAUERWEIN, H. P., VAN DEN BROEK, P.; KRISTINSSON, J. Treatment of intestinal failure in adults, Dietary measures. **Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde**, v.33, 2007, p. 1819-1824.

WARD, J. M.; TREUTING, P. M. Rodent Intestinal Epithelial Carcinogenesis: Pathology and Preclinical Models. **Toxicologic Pathology**. v. 42, 2014, p. 148-161

WHO – **World Health Organization** - Disponível em: <<http://www.who.int/tobacco>> Acesso em: 17 janeiro de 2016.

XIAO, H.; GU, Z.; WANG, G.; ZHAO, T. The Possible Mechanisms Underlying the Impairment of HIF-1alpha Pathway Signaling in Hyperglycemia and the Beneficial Effects of Certain Therapies. **International Journal of Medical Sciences**, v.10, 2013, p. 1412-1421.

XIE, G.; ZHENG, L.; OU, J.; HUANG, H.; HE, J.; LI, J.; PAN, F.; LIANG, H. Low expression of prolyl hydroxylase 2 is associated with tumor grade and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Experimental Biology and Medicine*, v. 237, n. 7, 2012, p. 860 – 866.

XUE, J.; LI, X.; JIAO, S.; WEI, Y.; WU, G.; FANG, J. Prolyl Hydroxylase-3 is down-regulated in Colorectal Cancer Cells and Inhibits IKKB Independent of Hydroxylase Activity. **Gastroenterology**, v.138, 2010; p. 606-615.

YAMADA, Y.; YOSHIMI, N.; HIROSE, Y.; KAWABATA, K.; MATSUNAGA, K.; SHIMIZY, M.; HARA, A.; MORI, H. 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 Research**, v. 60, 2000, p. 3323-3327.

YU, H.; LI, Q.; KOLOSOV, V. P.; PERELMAN, J. M.; ZHOU, X. Regulation of cigarette smoke-mediated mucin expression by hypoxia-inducible factor-1 α via epidermal growth factor receptor-mediated signaling pathways. **Journal of Applied Toxicology**. v. 32, 2012, p. 282-292.

YU, H.J.A.; LIN, K. M.; OTA, D. M.; LYNCH, H. T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: preventive management. **Cancer treatment reviews**, v. 29, n. 6, 2003, p. 461-470.

ZHANG, H.; BOSCH-MARCE, M.; SHIMODA, L. A.; TAN, Y. S.; BAEK, J. H.; WESLEY, J. B.; GONZALEZ, F. J.; SEMENZA, G. L. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 16, 2008, p. 10892-903.

ZHAO, Y.; XUE, Y.; OBERLEY, T. D.; KININGHAM, K. K.; LIN, S.; YEN, H.; MAJIMA, H.; HINES, J.; St. CLAIR, D. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor formation by modulation of activator protein-1 signaling in a multistage skin carcinogenesis model. **Cancer Research**. v.61, 2001, p. 6082–6088.