

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE**

ALEXANDRE MOREIRA DE ALMEIDA

**MODELO DE CÂNCER COLORRETAL QUIMICAMENTE INDUZIDO EM
CAMUNDONGOS *HAIRLESS* ASSOCIADO A COLITE**

CAMPO GRANDE – MS

2023

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE**

ALEXANDRE MOREIRA DE ALMEIDA

**MODELO DE CÂNCER COLORRETAL QUIMICAMENTE INDUZIDO EM
CAMUNDONGOS *HAIRLESS* ASSOCIADO A COLITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Carcinogênese experimental e estudos do câncer na região Centro-Oeste.

Orientador: Prof. Dr. Rondon Tosta Ramalho.
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Takita

CAMPO GRANDE – MS

2023

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, pela vida e por ter me dado uma família maravilhosa.

A meus pais e irmão por todo amor e cuidado. Por terem enfrentado esse desafio comigo.

A meus avós, pela educação, conforto, amor, ajuda e incentivo que me deram desde a graduação.

A minha namorada, por sempre me ajudar e me incentivar a seguir meus sonhos e crescer como pessoa.

A minha família por todo apoio e incentivo. É o bem mais precioso que tenho em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rondon Tosta Ramalho, meu orientador, por ter acreditado no projeto, pelo conhecimento transmitido durante essa pesquisa, pela paciência, por ter me ensinado e orientado com maestria, além de ser meu orientador se tornou um amigo, ao qual sempre serei eternamente grato por tudo.

Ao colega e amigo que levarei para vida, o Dr. César Augusto Sobrinho pelo apoio e conhecimentos passados por meio do auxílio desde o começo até o final do mestrado.

A colega e amiga que levarei para vida Letícia Silva Fagundes que esteve presente em todas as fases do projeto sempre me ajudando e me tirando várias dúvidas.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Takita, que se disponibilizou a auxiliar na interpretação e construção dos resultados histopatológicos e por ter sido um ótimo coorientador.

A todos os membros do Laboratório de Carcinogênese Experimental, pela ajuda teórica e prática no desenvolvimento do projeto.

A Jade Alexandra, amor que me ajudou em diversos momentos, com apoio, força, conversas e por todo dia e noite que passou ao meu lado durante esse período.

A todos os professores, amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, obrigado por todo conhecimento adquirido no mestrado.

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul por ter concedido uma excelente estrutura e profissionais para o desenvolvimento do projeto.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Juliano por ter disponibilizado o espaço e recursos de seu laboratório de modelos experimentais.

A Capes pela bolsa de estudo concedida, para que eu pudesse me dedicar integralmente ao mestrado.

EPÍGRAFE

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”.

(Claude Lévi-Strauss)

RESUMO

Almeida, A. M. Modelo de câncer colorretal quimicamente induzido em camundongos *hairless* associado a colite, Campo Grande, 2023. [Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Objetivo: Esse estudo teve como objetivo desenvolver um modelo de câncer colorretal em camundongos *hairless* induzido com azoximetano (AOM) associado a colite.

Métodos: Os resultados foram obtidos através de um estudo experimental em modelo murino. O estudo foi desenvolvido na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso Do Sul, no município de Campo Grande - MS. Nesse estudo foram utilizados 140 animais distribuídos em 5 grupos de 28 animais, G1: Controle, G2: 2 doses de AOM, G3: 1 dose de AOM e 3 ciclos de dextran sulfato de sódio (DSS) *ad libitum*, G4: 2 doses de AOM e 3 ciclos de DSS *ad libitum*, G5: 3 ciclos de DSS *ad libitum*. Os camundongos foram induzidos a desenvolver câncer colorretal (CCR) com dose total de 20 mg/Kg de azoximetano, fracionadas em duas semanas, 10 mg/kg por semana, a primeira dose na terceira semana e segunda dose na quarta semana. Foi avaliado o estresse e ansiedade dos animais pós-DSS e antes da eutanásia em todos os grupos. Para indução da colite foram administrados 3 ciclos de DSS por 5 dias intercalados com 2 semanas de água *ad libitum*. Na quinta, décima, décima quinta e vigésima semanas do experimento sete camundongos de cada grupo foram submetidos a procedimento de eutanásia, seus cólons foram removidos para análise macroscópica e microscópica, e lâminas de microscopia foram confeccionadas para permitir a classificação histológica de lesões encontradas, visando a comparação entre os achados nos grupos experimentais.

Resultados: Dos números totais de pólipos, um ganho significativo foi observado na 10^a, 15^a e 20^a semanas em média. Pela análise histopatológica, a partir da 10^a semana os animais induzidos com AOM/DSS desenvolveram lesões pré-neoplásicas com diferenças entre os outros grupos quando comparados ao grupo controle. Focos de criptas aberrantes e displasia de alto grau foram visualizados nos grupos induzidos com AOM/DSS. Em relação ao estresse e a ansiedade, foram encontrados aumento do tempo de permanência na zona periférica do teste de campo aberto, indicando um aumento no estresse e ansiedade dos camundongos.

Conclusão: Os grupos que receberam AOM e DSS foram os que mais desenvolveram pólipos e lesões pré-neoplásicas, indicando que a colite associada a indução tumoral é um método eficaz de desenvolver um modelo rápido para estudos de CCR.

Palavras-Chave: Câncer colorretal. Colite. Modelo experimental. Azoximetano. Dextran sulfato de sódio.

ABSTRACT

Objective: This study aimed to develop a model of colorectal cancer in hairless mice induced with azoxymethane (AOM) associated with colitis.

Methods: The results were obtained through an experimental study in a murine model. The study was developed at the Faculty of Medicine of the Federal University of Mato Grosso Do Sul, in the city of Campo Grande, MS. In this study, 140 animals were distributed in 5 groups of 28 animals: G1: control; G2: 2 doses of AOM; G3: 1 dose of AOM and 3 cycles of dextran sulfate of sodium (DSS) ad libitum; G4: 2 doses of AOM and 3 cycles of DSS ad libitum; and G5: 3 cycles of DSS ad libitum. The mice were induced to develop colorectal cancer (CCR) with a total dose of 20 mg/Kg of azoxymethane, divided into two weeks of 10 mg/kg per week, with the first dose in the third week and the second dose in the fourth week. Stress and anxiety in post-DSS animals and before euthanasia were evaluated in all groups. For colitis induction, 3 cycles of DSS were administered for 5 days, interspersed with 2 weeks of tap water ad libitum. In the fifth, tenth, fifteenth, and twentieth weeks of the experiment, seven mice from each group were submitted to a euthanasia procedure, their colons were removed for macroscopic and microscopic analysis, and microscopy slides were made to allow the histological classification of lesions found, aiming at a comparison between the findings in the experimental groups.

Results: Of the total number of polyps, a significant gain was observed at the 10th, 15th, and 20th weeks on average. By histopathological analysis, from the 10th week on, the animals induced with AOM/DSS developed pre-neoplastic lesions, with differences between the other groups when compared to the control group. From aberrant crypt foci to high-grade dysplasia, these were visualized in the induced groups. Regarding stress and anxiety, an increase in the time spent in the peripheral zone of the open field test was found, indicating an increase in the mice's stress and anxiety.

Conclusion: The groups that received AOM and DSS were the ones that developed the most polyps and pre-neoplastic lesions, indicating that colitis associated with tumor induction is an effective method of developing a rapid model for CRC studies.

Keywords: Colorectal cancer. Colitis. Experimental model. Azoxymethane. Dextran sodium sulfate

LISTA DE SIGLAS

Akt - Protein Kinase B
AOM - Azoximetano
APC - Adenomatous Polyposis Coli Gene
CCR - Câncer Colorretal
CIMP - Metilação Da Ilha Cpg
cm - Centímetros
CTNNB1 - Catenin Beta 1
CYP2E1 - Citocromo P450 2 e 1
DMH - 1,2-Dimetil-hidrazina
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
DSS - Dextran sulfato de sódio
ER - Estrogen Receptor
g - Gramas
GRO- α - Growth Regulated Oncogene- α
GSK-3 - Glycogen Synthase Kinase 3
HRS/J - Camundongo *hairless*
IL-6 - Interleucina 6
IL-10 - Interleucina 10
KRAS - Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene
LCE - Labirinto em cruz elevado
MAM - Metilazoximetanol
MAPK - Mitogen-Activated Protein Kinase
mg - miligrama
MLH1 - Gene Human mut-L Homologue 1
MMR - Mismatch Repair
MNNG - N-Metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina
NIC - Instabilidade Cromossômica
p53 - Proteína 53
PAF - Polipose Adenomatosa Familiar
PDX - Xenoenxertos Derivados do Paciente
PHIP - 2-Amino-1-Metil-6-Fenilimidazo [4,5-B] Piridina

RAS - Rat Sarcoma Vírus

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

Sem - Semana

SMAD4 - Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4

TGF- β - Transforming Growth Factor- β

TNF- α - Tumor Necrosis Factor Alpha

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Fatores envolvidos com o surgimento de CCR.....	16
Figura 2- Sequência adenoma-carcinoma na porção distal do intestino grosso.....	17
Figura 3- O desenvolvimento da metástase do câncer colorretal e suas bases genéticas.....	20
Figura 4- Linha do tempo para a patogênese esporádica do CCR e as características de suas vias moleculares.....	22
Figura 5- Os genes que atuam entre as diversas etapas da carcinogênese colorretal.....	23
Figura 6- Cronograma de Indução do câncer colorretal associado a colite.....	40
Figura 7- a - Imagem do labirinto em cruz elevado usado para testar camundongos; b - comportamento típico de camundongo com níveis de ansiedade baixo (à esquerda) e alto (à direita). O traço verde demonstra o movimento do animal. A esquerda representa mais tempo nos braços abertos, enquanto a direita representa mais tempo nos braços fechados.....	42
Figura 8- (A) Imagem do teste de campo aberto usado para testar camundongos; (B) comportamento típico de camundongo com níveis baixos de ansiedade (à esquerda) e (C) comportamento típico de camundongo com níveis elevados de ansiedade (à direita).....	43
Figura 9- a - Efeitos da ingestão de DSS no peso corporal dos camundongos; b - Pontuação DAI.	49
Figura 10- Total de pólipos em diferentes semanas de eutanásia. Número médio de pólipos totais e desvio padrão da média em cada grupo.....	51
Figura 11- Fotomicrografia do cólon. A – Cólon normal de um camundongo. B – Cólon com a presença de focos de criptas aberrantes (setas).....	53
Figura 12- Fotomicrografia da mucosa colônica com presença de adenoma tubular de alto grau (setas vermelhas) com criptas aberrantes (setas amarelas).....	54
Figura 13- Fotomicrografia da mucosa colônica. A – Presença de adenoma tubular de alto grau e tecido linfóide reacional com vasos linfáticos dilatados. B – Tecido linfóide reacional com presença de dilatação linfática.....	55
Figura 14- Tempo de permanência nos braços aberto, fechado e central durante o teste do labirinto em cruz elevado de cada grupo de animais submetidos ao estudo.....	56

ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1- Características e genes mais envolvidos no câncer colorretal.....	19
Quadro 2- Modelos murinos para estudo de CCR.....	28
Quadro 3- Compilado de informações fenotípicas do camundongo HRS/J.....	34
Tabela 1- Comparação da média de massa corporal dos grupos de animais (em gramas) nas diferentes semanas de eutanásia.....	47
Tabela 2- Resultados das alterações histológicas, tanto de lesões pré-neoplásicas como de sinais inflamatórios, em cada um dos grupos em diferentes semanas de eutanásia.....	52
Tabela 3 – Teste de Campo Aberto - Comparação entre os grupos acerca do tempo de permanência na zona central e periférica.....	56
Tabela 4- Teste de Campo Aberto - Comparação entre os grupos acerca do número de entradas na zona central e periférica.....	57
Tabela 5- Visão geral das vantagens na utilização do nosso modelo murino em camundongo Hairless comparado ao rato.....	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Características do câncer colorretal.....	18
2.1.1 Instabilidades genéticas.....	22
2.2 Modelos animais utilizados em estudos de CCR.....	24
2.2.1 Modelo induzido quimicamente.....	29
2.2.2 Modelo quimicamente induzido por 1,2-Dimetil-hidrazina.....	30
2.2.3 Modelo quimicamente induzido por 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine.....	31
2.2.4 Modelo quimicamente induzido por N-metil-N'-nitro-N-nitrosguanidina.....	31
2.2.5 Modelo quimicamente induzido por azoximetano.....	32
2.2.6 Modelo quimicamente induzido por azoximetano e dextran sulfato de sódio.....	32
2.3 Camundongo hairless.....	33
2.4 Estresse e ansiedade no modelo murino.....	34
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4 METODOLOGIA	38
4.1 Hipótese da pesquisa.....	38
4.2 Local da Pesquisa.....	38
4.3 Aspectos éticos.....	38
4.4 Animais.....	38
4.4.1 Delineamento experimental.....	39
4.5 Indução da colite e câncer colorretal.....	39
4.5.1 Indução da colite.....	39
4.5.2 Indução do câncer colorretal.....	40
4.6 Avaliação da indução de colite e câncer.....	40
4.7 Avaliação do Estresse e Ansiedade.....	41
4.8 Eutanásia.....	43
4.8.1 Coleta e armazenamento dos cólons.....	44
4.9 Formolização e preparo dos segmentos de cólon.....	45
4.10 Preparo das lâminas histológicas.....	45
4.11 Parâmetros analisados nas lâminas histológicas.....	45
4.12 Análise estatística.....	46
5 RESULTADOS	47
5.1 Evolução da massa corporal dos grupos experimentais durante o experimento CCR associado a colite.....	47
5.2 Avaliação dos animais durante os ciclos dextran sulfato de sódio.....	48
5.3 Desenvolvimento de pólipos.....	50
5.4 Análise histopatológica.....	52
5.5 Análise do estresse e ansiedade.....	55
5.6 Visão geral do estudo.....	57
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	61
8 REFERÊNCIAS	62

9 ANEXO	81
Anexo 1- Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA da UFMS.	81
10 APÊNDICE	82

1 INTRODUÇÃO

Os fatores ambientais e genéticos desempenham um importante papel na etiologia do câncer colorretal (CCR). Uma grande parcela dos CCRs é esporádica, aproximadamente três quartos dos pacientes não possuem um histórico familiar para o CCR (KUIPERS *et al.*, 2015).

A segunda principal causa de morte relacionada ao câncer entre homens e mulheres é o CCR (SIMON, 2016). A incidência estimada do CCR é de 1,36 milhões de casos anuais no mundo (PILLERON *et al.*, 2020). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou 40.990 novos casos no Brasil no triênio 2020-2022, sendo 20.540 homens e 20.470 mulheres (BRASIL, 2019). Já para o triênio 2023 a 2025, estimou-se a incidência de 45.630 novos casos de CCR, sendo 21.970 casos entre os homens e 23.660 casos entre as mulheres. A comparação entre estas estimativas apresenta um aumento de aproximadamente 11% quando comparados os 2 triênios (BRASIL, 2022).

Os CCRs são conhecidos por surgir em consequência de uma série gradual de alterações histológicas, a chamada sequência 'adenoma-carcinoma', cada uma acompanhada por uma alteração genética em um oncogene específico ou gene supressor de tumor (FODDE, 2002).

No período de desenvolvimento do CCR, as células que mais frequentemente adquirem mutações genéticas são as células epiteliais do trato gastrointestinal. Elas adquirem mutações epigenéticas sequenciais nos genes supressores de tumor e/ou protoncogenes específicos, e isso às confere vantagens em sua proliferação e autorrenovação tumoral (DE ROSA *et al.*, 2015).

Mutações no gene da polipose adenomatosa coli (APC) não são apenas responsáveis pela polipose adenomatosa familiar (PAF), mas também desempenham um papel limitante na taxa de iniciação e progressão tumoral na maioria dos cânceres colorretais esporádicos (FODDE, 2002).

Acerca dos estudos de patogênese e desenvolvimento de tumores colorretais, afirma-se a importância dos modelos animais, em conjunto com avaliações de fatores de risco, agentes preventivos e tratamentos. Modelos animais para pesquisa de CCR humano são muito bem aceitos e considerados muito bons para esse tipo de estudo, todavia, a associação de no mínimo 2 métodos de tumorigênese colorretal é necessária para uma boa parte dos modelos. O fato disso acontecer é devido o CCR

ser uma doença dependente de vários fatores, tanto ambientais quanto genéticos (CAMPELO DE-SOUZA; COSTA-CASAGRANDE, 2018).

Foram empregados inúmeros esforços no início do século XXI para que fosse possível compreender o processo de tumorigênese. Grande parte do conhecimento sobre a carcinogênese provém da análise *in vitro* de tecidos tumorais em estágios avançados de desenvolvimento. Muitos modelos animais foram desenvolvidos nas últimas décadas, visando elucidar questões referentes ao câncer *in vivo* (PANTALEÃO; LUCHS, 2010).

Muito usado para a indução tumoral em roedores, de acordo com Burlamaqui *et al.* (2013), o azoximetano (AOM) é um metabólito ativo da 1,2-Dimetil-hidrazina (DMH), tendo como principais órgãos afetados o cólon, pulmões e fígado. O tempo de exposição e a dose administrada são diretamente proporcionais às lesões encontradas.

A junção de dextran sulfato de sódio (DSS), para indução da colite, com AOM no desenvolvimento do tumor como modelo para câncer associado à colite ganhou popularidade por sua reprodutibilidade, potência, baixo preço e facilidade de uso (SUN *et al.*, 2023). Embora tenham um mecanismo compartilhado, foi descoberto que o AOM é mais potente e estável em solução do que a DMH. O desenvolvimento do tumor em outros modelos geralmente requer vários meses, mas os camundongos injetados com AOM e subsequentemente tratados com DSS desenvolvem tumores adequados em apenas 7 a 10 semanas (Neufert *et al.* apud THAKER *et al.*, 2012).

Camundongos homozigotos recessivos *hairless* (*hr*) apresentam uma deficiência em células T-*helper* no sistema imunológico (MORRISSEY *et al.*, 1980). Essa deficiência acaba fazendo com que a função potencializadora da célula T auxiliar no processo de amadurecimento das células B secretoras de imunoglobulinas, sofram uma diminuição pois o número de células T-*helper* esplênicas no camundongo *hairless* é baixo. (BRODER, 1980; MORRISSEY *et al.*, 1980).

Com isso a padronização de um modelo murino torna-se primordial para o desenvolvimento de estudos relacionados à carcinogênese do CCR, desta maneira este estudo teve como objetivo desenvolver um modelo de CCR quimicamente induzido associado à colite em camundongos *hairless*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Boa parte dos tumores colônicos (cólon e reto) se desenvolve por meio de várias etapas e processos simultâneos e subsequentes, como alterações histológicas, morfológicas e até genéticas, as quais se acumulam com o tempo. Os fatores envolvidos com o surgimento e desenvolvimento do CCR variam e estão relacionados com diversos estilos de vida, etilismo e outros, mostrados na figura 1 (SIMON, 2016).

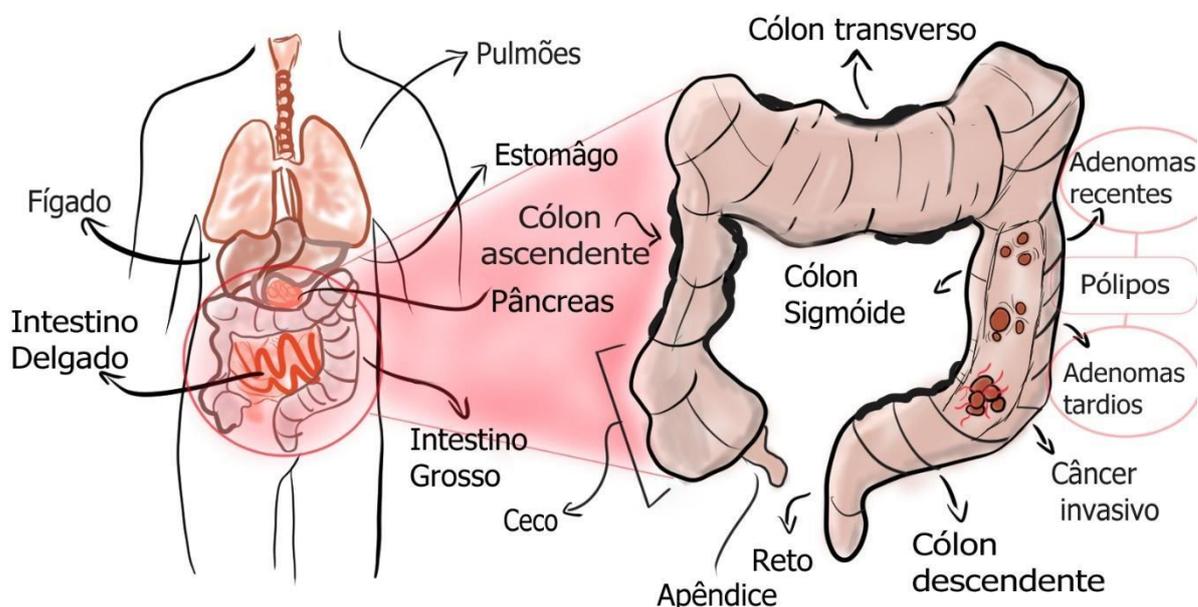
Figura 1- Fatores envolvidos com o surgimento do CCR.



Fonte: Elaboração própria, baseado em Simon (2016).

Quando observado o ponto de vista clínico, através da figura 2, é possível determinar a subdivisão dos cânceres de cólon, sendo proximal ou do lado direito do intestino grosso, onde são encontrados nos segmentos de cólon proximal até a flexura esplênica (ceco, ascendente e cólon transverso), já os tumores distais ou do lado esquerdo, se originam mais próximos a porção final do intestino (Descendente, Cólon sigmóide e reto) (CARETHERS, 2018).

Figura 2- Sequência adenoma-carcinoma na porção distal do intestino grosso.



Fonte: Elaboração própria, baseado em Lodish (2014).

Os locais mais afetados, quando se avaliam metástases de cólon, são o fígado e o pulmão, sendo os pacientes mais jovens com mais metástases hepáticas notificadas. Já o câncer de reto, demonstra um tropismo metastático predominante para o fígado, tornando esses órgãos os mais acometidos frequentemente em neoplasias do cólon e reto, seguidas por metástases pulmonares e ósseas (TESTA; PELOSI; CASTELLI, 2018; NEUFERT *et al.*, 2021).

Doenças inflamatórias intestinais como a doença de Crohn, retocolite ulcerativa inespecífica e a colite indeterminada são doenças crônicas que aumentam o risco de câncer de intestino (BARBIERI, 2000). Nesse conjunto de doenças crônicas existem outras síndromes hereditárias, como a polipose adenomatosa familiar (FERNANDES *et al.*, 2007).

Quando o gene APC sofre mutações somáticas, e não em sua linhagem germinativa, é onde ocorre sua primeira alteração molecular no desenvolvimento do CCR. Muitos carcinomas colorretais iniciam seu desenvolvimento através de pólipos adenomatosos, e foi observada a coexistência de adenomas em pacientes com

carcinomas colônicos (FODDE, 2002). Ademais, os adenomas têm sido encontrados com frequência em populações com alta incidência de CCR (LASSANCE *et al.*, 2012).

Síndromes hereditárias do câncer têm uma proporção de 3% a 5% do total de CCRs. Os indivíduos que possuem mutações na sua linhagem germinativa em genes específicos, tendem a desenvolver CCR mais cedo. A síndrome de Lynch, a síndrome do câncer hereditário mais comum associada à predisposição para a CCR, está associada a mutações na linhagem germinativa nos genes de Mismatch Repair DNA (MMR) (STOFFEL *et al.*, 2018).

2.1 Características do câncer colorretal

O CCR pode ser classificado em diferentes subtipos e é tido como uma patologia não homogênea caracterizada por alterações morfológicas e moleculares específicas. A transição entre epitélio colônico normal com microbioma normal para lesão pré-cancerosa (adenoma) e carcinoma invasivo requer o acúmulo de mutações germinativas herdadas e/ou somáticas (adquiridas) (BIEN *et al.*, 2019).

São várias as etapas e processos que refletem as alterações genéticas da tumorigênese, levando a transformações progressivas de células humanas normais em células altamente malignas sem diferenciação celular (HANAHAN, 2022).

Adenomas ainda representam a lesão-alvo para prevenção e tratamento do CCR, mas foi verificada a necessidade de um aprofundamento maior ao longo dos anos no que tange a maior compreensão dos tipos de adenomas, as vias subjacentes e alterações moleculares diferenciadas envolvidas (HAGLAND *et al.*, 2013).

Mutações em duas grandes classes de genes estão envolvidas no aparecimento e crescimento do câncer: os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais (PRITCHARD *et al.*, 2016). Pode ser visto no quadro 1 os genes mais mutados correlacionados ao CCR.

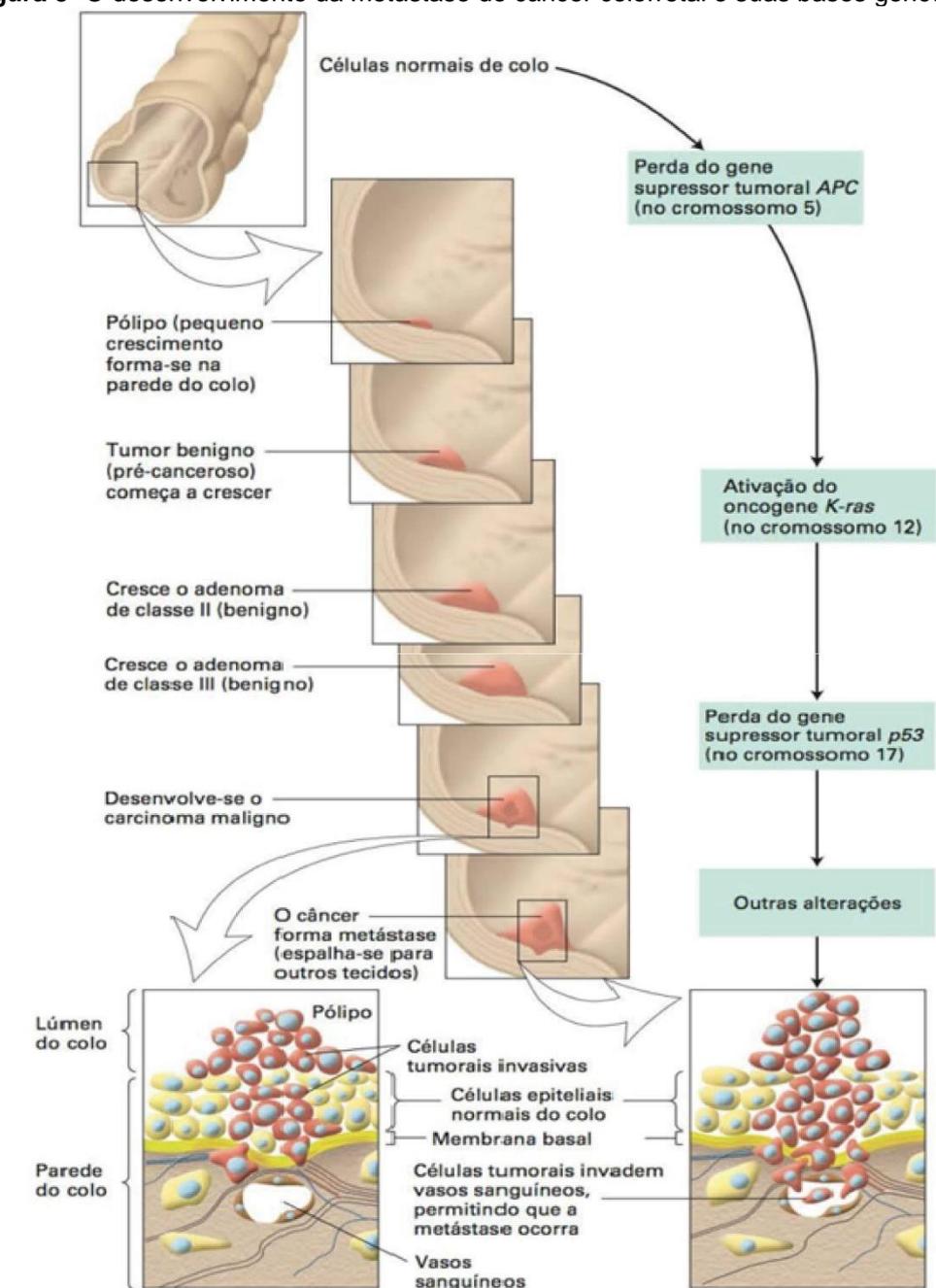
Quadro 1 – Características e genes mais envolvidos no câncer colorretal.

<i>Características do Câncer</i>	<i>Exemplos de fatores envolvidos no CCR</i>
<i>Autonomia de sinal de crescimento</i>	<i>EGFR, KRAS, BRAF</i>
<i>Insensibilidade a sinais antiproliferativos</i>	<i>P53, PTEN, APC</i>
<i>Potencial replicativo ilimitado</i>	<i>TERT</i>
<i>Angiogênese</i>	<i>VEGF</i>
<i>Escapar da apoptose</i>	<i>P53, MLH1</i>
<i>Invasão e metástase</i>	<i>Cdc-42, RhoA GTPase</i>
<i>Reprogramação do metabolismo celular</i>	<i>PI3K, AKT, c-MYC</i>
<i>Evitar destruição Imunológica</i>	<i>IL-8</i>

Fonte: Traduzido de Hagland *et al.* (2013).

No desenvolvimento do adenocarcinoma colorretal, as células epiteliais do trato gastrointestinal adquirem mutações genéticas e epigenéticas sequenciais em oncogenes específicos e/ou genes supressores de tumor, e isso confere uma vantagem seletiva na proliferação e na autorrenovação das células neoplásicas. Assim, o epitélio normal torna-se mucosa hiperproliferativa e subsequentemente origina um adenoma benigno que evolui para carcinoma e metástase em cerca de 10 anos no ser humano (DE ROSA *et al.*, 2015). Essa evolução é demonstrada através da figura 3.

Figura 3- O desenvolvimento da metástase do câncer colorretal e suas bases genéticas.



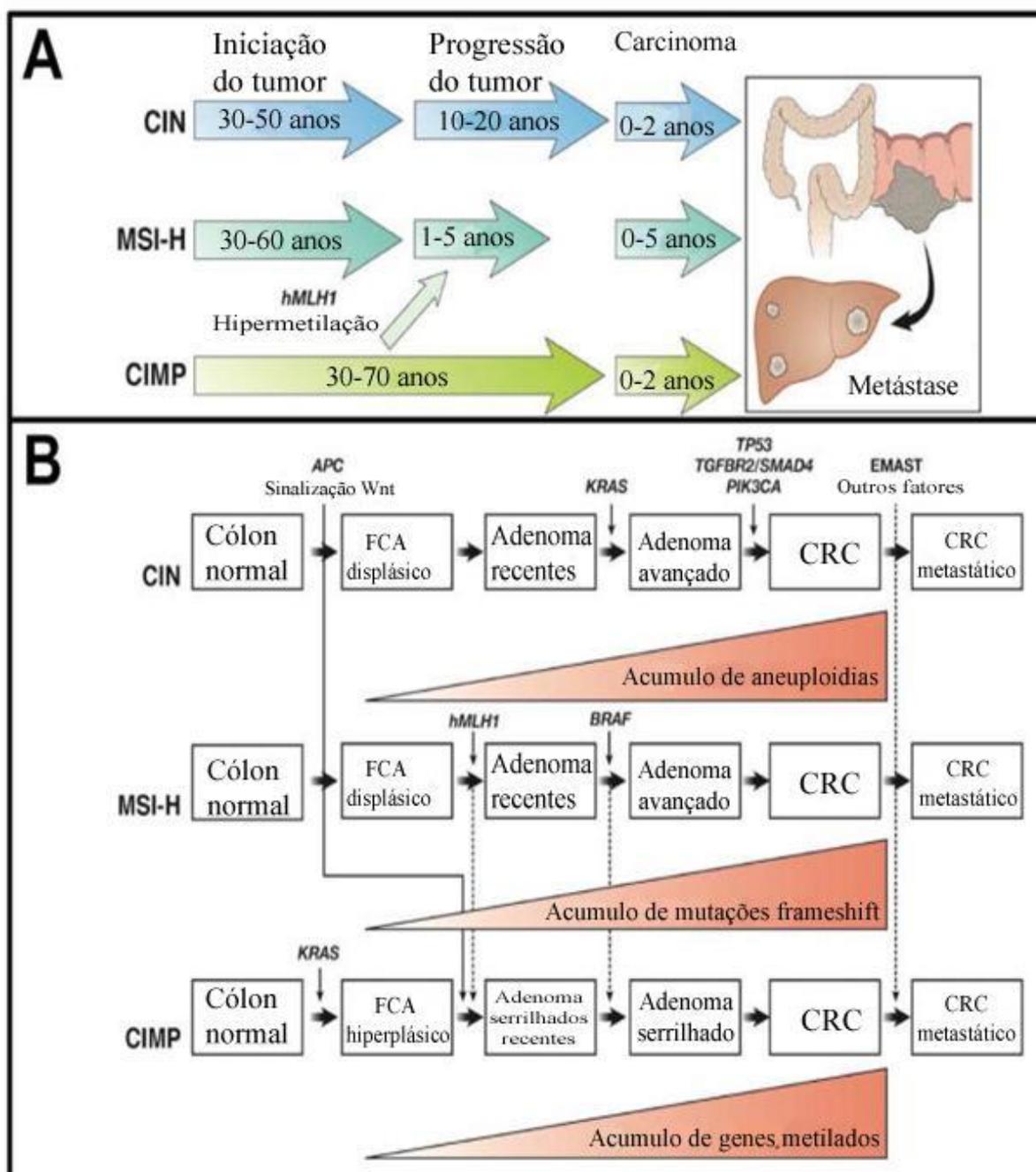
Fonte: Lodish (2014).

Evidências mostraram que os CCRs surgem de pólipos adenomatosos que normalmente adquirem alterações displásicas no período de 10 a 15 anos antes de desenvolver o carcinoma invasivo. Existe a teoria da carcinogênese colônica, que mostra a evolução de mutações clonais, oferecendo uma vantagem de sobrevivência na imortalidade celular, permitindo o desenvolvimento de mais mutações, e com isso demonstrando diversas características do câncer, como proliferação, invasão, metástase e outras (LOTFOLLAHZADEH; RECIO-BOILES; CAGIR, 2022).

Dentre as características do CCR, a mais importante é a instabilidade genômica que pode aparecer por meio de dois mecanismos diferentes, instabilidade de microssatélites (MIS) e instabilidade cromossômica (NIC). Na NIC acontecem diversas mutações inativadoras de genes cuja função normal é manter a estabilidade cromossômica durante a replicação, essas mutações são responsáveis pela maior parte da instabilidade cromossômica nos CCRs (MÁRMOL *et al.*, 2017).

Os microssatélites são sequências de DNA repetidas, distribuídas por todo o genoma humano, tanto nas regiões codificantes quanto nas não codificantes. Devido à sua estrutura repetida, os microssatélites são particularmente propensos a erros de replicação que normalmente são reparados pelo sistema *Mismatch Repair* (MMR) (DE' ANGELIS *et al.*, 2018). É possível identificar as diferentes vias moleculares do CCR juntamente com a evolução tumoral de focos de criptas aberrantes (FCA) para tumores colorretais metastáticos (Figura 4).

Figura 4- Linha do tempo para a patogênese esporádica do CCR e as características de suas vias moleculares.



2.1.1 Instabilidades genéticas

A Instabilidade cromossômica (NIC) é observada em 65 a 70% dos cânceres colorretais esporádicos. O termo refere-se a uma taxa acelerada de ganhos ou perdas

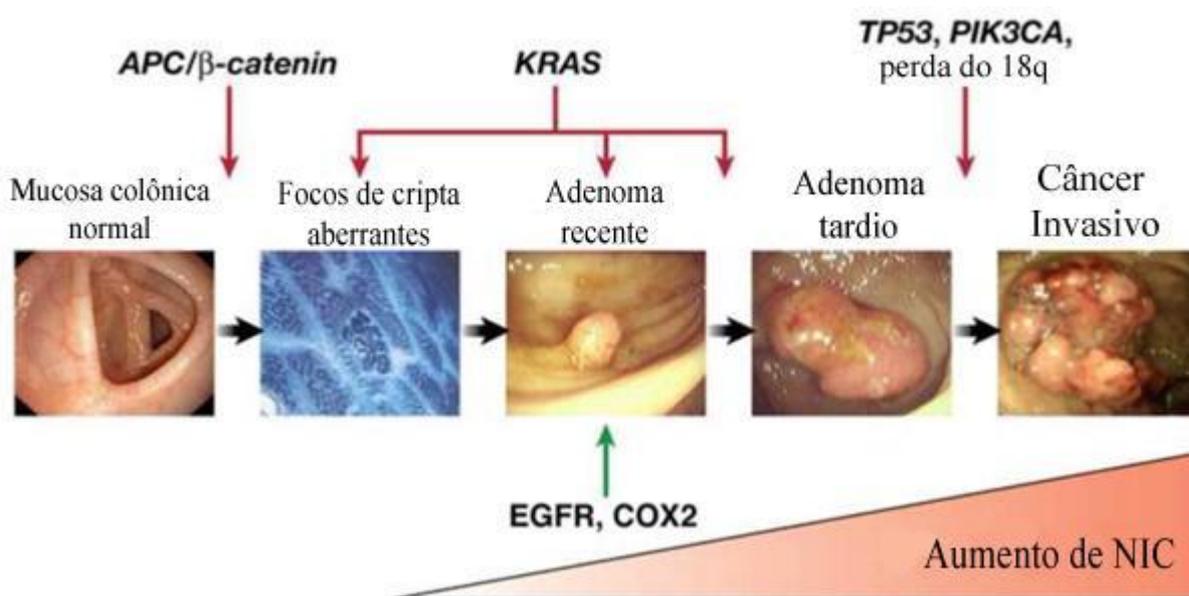
de porções inteiras ou parciais de cromossomos, resultando em variabilidade cariotípica de célula para célula (PINO & CHUNG; 2010, 2011).

O CCR esporádico é definido como câncer que surge no cólon e reto sem contribuição conhecida de causas da linhagem germinativa ou histórico familiar significativo de câncer ou doença inflamatória intestinal (CARETHERS; JUNG, 2015).

O passo inicial na tumorigênese colorretal é a formação de focos de criptas aberrantes (FCA). A ativação da via de sinalização Wnt pode ocorrer neste estágio como resultado de mutações no gene APC. A hiperativação da via de sinalização Wnt geralmente decorre de mutações no gene APC, e as anormalidades da via Wnt caracterizam a maioria dos cânceres colorretais esporádicos, bem como os tumores que surgem em pacientes com Polipose Adenomatosa Familiar (PAF). (PINO; CHUNG, 2010).

Mais de 80% dos adenomas e CCR exibem mutações APC e outros 5 a 10% apresentam mutações ou alterações epigenéticas em outros componentes de sinalização do Wnt (por exemplo, a β -Catenina) que resultam igualmente na hiperativação da via Wnt (BOLHAQUEIRO *et al.*, 2019). Através da figura 5 pode-se observar algumas etapas nas quais genes se mostram mais alterados em cada fase da progressão do tumor.

Figura 5 – Os genes que atuam entre as diversas etapas da carcinogênese colorretal.



NIC: Instabilidade cromossômica.

Fonte: Traduzido de Pino & Chung (2010).

As mutações de PIK3CA, SMAD4 e p53 são vistas relacionadas ao estágio tardio, a progressão de adenoma para carcinoma. Todavia, eventos genéticos precoces ou tardios contribuem para a metástase do CCR (KAWAGUCHI *et al.*, 2019).

Outro tipo de instabilidade genômica no CCR é a instabilidade de microssatélites (MSI), uma característica frequentemente presente nas células cancerígenas.

MSI é a marca registrada de CCR hereditário sem polipose (HNPCC) ou síndrome de *Lynch* e ocorre em mais de 95% dos casos de HNPCC (MALKI *et al.*, 2020).

Aproximadamente 15% dos CCRs esporádicos são resultados de hipermutações e podem conter instabilidade de microssatélites (MSI) devido ao reparo defeituoso do DNA MMR, frequentemente associado ao TP53 do tipo selvagem e a um padrão quase diplóide de instabilidade cromossômica. Além disso, o fenótipo de metilação da ilha CpG (CIMP) é uma característica que induz instabilidade epigenética por hipermetilação promotora e silenciamento de uma variedade de genes supressores de tumores, incluindo MLH1, um dos genes MMR (KHOT *et al.*, 2020).

Mutações e alterações no DNA geralmente ocorrem através do processo de perdas de segmentos de sua molécula durante o processo de divisão celular. Para corrigir tais alterações dispõe-se de algumas proteínas com função de realizar os reparos necessários para manter a integridade do DNA (GELSOMINO *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo é responsável por quebras nas fitas simples e duplas que compõem as moléculas de DNA e induz a erros de pareamento das bases nitrogenadas possibilitando, conseqüentemente, o aparecimento de mutações genéticas. Quando a mutação ocorre em genes responsáveis pelo controle do binômio proliferação/morte celular, pode dar início a formação de um clone de células com autonomia proliferativa ou resistência a apoptose, características comuns de uma célula neoplásica (MARTINEZ *et al.*, 2009).

2.2 Modelos animais utilizados em estudos de CCR

Ratos e camundongos constituem cerca de 95% de todos os animais de laboratório utilizados, sendo os camundongos ou comumente conhecido como modelo murino, o animal mais utilizado em pesquisas biomédicas. O camundongo é um pequeno mamífero pertencente à ordem *Rodentia*. O camundongo doméstico da

América do Norte e da Europa, *Mus musculus*, é a espécie mais comumente usada em pesquisas (HICKMAN *et al.*, 2017).

Os modelos de transplante de camundongos ou também definidos como modelos de xenoenxertos, caracterizam enxertos de células tumorais e pequenos tecidos tumorais tendo como um pré-requisito fundamental para o enxerto bem-sucedido de tecido xenogênico em camundongos (BÜRTIN; MULLINS; LINNEBACHER, 2020).

Já, os modelos espontâneos adotam algumas estratégias condicionais de genes *knock-in* e *knock-out* que permitem a ativação ou inativação específica de um gene em um dado tecido e/ou em um dado estágio do desenvolvimento do CCR (LODISH *et al.*, 2014).

Alguns proto-oncogenes e genes supressores de tumor, mais precisamente os genes APC, KRAS e p53, são mutados em uma gama considerável de CCR e uma coleção maior de genes que são mutados em subconjuntos de CCR começaram a ser definidos (FEARON, 2011). Um excelente modelo murino com neoplasia intestinal múltipla é o camundongo *Apc*^{Min/+}. Esse modelo é usado para simular polipose adenomatosa familiar humana e tumores colorretais (LIU *et al.*, 2016; REN *et al.*, 2019).

O camundongo *hairless* (HRS/J) possui uma baixa resposta imunológica por possuir deficiência de células *T-helper*, (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006). Os linfócitos *T-helper* podem ser classificados em células Th1 e células Th2. Com os estímulos recebidos, linfócitos Th1 começam a secretar Interferon- γ , fator de crescimento transformador beta, TNF- α e IL-2, colaborando com a função citotóxica dos linfócitos CD8⁺. Visto isso, apesar de não carregarem uma verdadeira imunodeficiência, a ausência de células *T-helper* no camundongo *hairless* pode favorecer o desenvolvimento do CCR, com isso possibilitando uma maior taxa de positividade (BALKWILL; MANTOVANI, 2001; DENARDO; COUSSENS, 2007).

Modelos induzidos por carcinógenos em roedores moldaram uma longa tradição, mas mantiveram sua utilidade para certas aplicações até os dias atuais. Eles fornecem uma plataforma para estudos dietéticos e disponibilizam informações sobre os caminhos dos carcinógenos de origem alimentar e da carcinogênese associada à colite (BÜRTIN; MULLINS; LINNEBACHER, 2020).

É notável a importância dos modelos animais para estudos do desenvolvimento e patogênese de tumores colorretais, tal qual para a avaliação de possíveis fatores de risco, agentes preventivos e tratamentos. Como demonstrado, alguns modelos individuais são representativos do CCR em seres humanos e considerados modelos animais bons para esse tipo de estudo. Entretanto, foi visto que a associação de pelo menos dois métodos de indução de carcinogênese colorretal é necessária para a maioria dos modelos. Isso se deve ao fato de que o CCR é uma doença multifatorial que se desenvolve pela associação de múltiplas condições (genéticas e/ou ambientais) (CAMPELO DE-SOUZA; COSTA-CASAGRANDE, 2018).

Modelos de camundongos induzidos por produtos químicos não são homogêneos e possuem vantagens e desvantagens específicas. Esses produtos são de longe o método mais antigo de indução de CCR em animais, e estudos foram e ainda são tradicionalmente realizados em ratos e outros roedores. A maioria dos modelos reflete muito bem a progressão de focos de criptas aberrantes para adenomas e carcinomas da sequência adenoma-carcinoma humano (DE ROBERTIS *et al.*, 2011).

Os carcinomas induzidos por substâncias químicas raramente apresentam propriedades invasivas juntamente com a ausência de metástases locais ou distantes. Uma exceção foi o trabalho de Derry *et al.* (2014), que observaram um número relevante de metástases pulmonares em um modelo de camundongo induzido por AOM, que é, até onde se sabe, o único relato de disseminação metastática em um modelo de camundongo induzido por produtos químicos.

Além da falta de invasividade, muitos modelos induzidos por carcinógenos mostram alta latência desde a primeira aplicação até o desenvolvimento do tumor, e dependendo do carcinógeno, do protocolo de dosagem e da linhagem do camundongo, foram relatadas latências de 24 a 50 semanas (CLAPP *et al.*, 1984; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2000).

Estudos em modelos de camundongos com CCR induzidos quimicamente e geneticamente modificados aumentaram a compreensão da iniciação, progressão e resposta do tumor de cólon às terapias quimiopreventivas. Existem diversos modelos para o estudo de CCR, e o modelo ideal deve apresentar a evolução de um adenoma pré-canceroso para um carcinoma invasivo com potencial metastático e, ao mesmo tempo, deve refletir a diversidade molecular interindividual da doença.

Modelos murinos para CCR foram criados através de mutações nos genes do camundongo, cujo complemento humano esteve envolvido no início e progressão do CCR. O quadro 2 demonstra as correlações entre a doença humana, os tipos de modelo animal e as vantagens e desvantagens de cada uma dessas correlações.

Quadro 2 – Modelos murinos para estudo de CCR

<i>Doença humana</i>	<i>Modelo animal</i>	<i>Vantagens e desvantagens</i>
<i>PAF</i>	<i>Mutação APC ou camundongos transgênicos β-catenina.</i>	<i>Mimetiza a mutação APC em humanos. No entanto, a maioria dos tumores é localizada no intestino delgado. Os tumores não são metastáticos.</i>
<i>HNPC</i>	<i>Msh2 $-/-$, Msh6 $-/-$, and Mlh1 $-/-$ mice</i>	<i>Mimetiza a deficiência MMR em humanos. No entanto, camundongos deficientes em MMR desenvolvem tumores em outros órgãos. Os tumores colônicos não são metastáticos.</i>
<i>Inflamação relacionada ao CCR</i>	<i>Modelo murino induzido com DSS</i>	<i>Fácil e reprodutível. A incidência de tumores é baixa. A combinação AOM/DSS produz mais tumores em um período menor. Alta incidência de tumores de cólon e reto.</i>
	<i>IL10$^{-/-}$, IL2$^{-/-}$, receptor de células T$^{-/-}$/p53$^{-/-}$ ou TGF-1$^{-/-}$/Rag-2$^{-/-}$ Muc2$^{-/-}$.</i>	<i>A incidência de tumores é baixa. Requer o envolvimento da microflora entérica. Alta incidência de tumores de cólon e reto. O desenvolvimento precoce do prolapso retal reduz o tempo de vida.</i>
<i>Câncer colorretal esporádico</i>	<i>Modelo induzido por carcinógeno</i>	<i>Fácil e reprodutível. DMH/AOM/MAM têm incidência relativamente alta de tumor colorretal. IQ, PhIP, DMAB, MNNG ou MNU visam múltiplos órgãos e exibem uma baixa incidência de tumor. Os tumores não são metastáticos.</i>
	<i>Inativação de Apc - mediada por adenovírus Cre</i>	<i>Requer procedimentos cirúrgicos. Os resultados são reprodutíveis. Desenvolve metástases em aproximadamente 20% dos animais.</i>
<i>Câncer colorretal metastático</i>	<i>Modelo de inoculação ortotópica</i>	<i>Imita invasão tumoral do cólon, disseminação vascular e metástase para órgãos distais. As taxas de metástase dependem das linhagens celulares e cepas de roedores.</i>
	<i>Modelo de inoculação intraesplênica</i>	<i>Reprodutível e imita a disseminação vascular do câncer colorretal. As taxas de metástase dependem das linhagens celulares e cepas de roedores.</i>
	<i>Modelo de inoculação intraportal</i>	<i>Imita a disseminação vascular da metástase do câncer colorretal e teoricamente limita o crescimento do tumor predominantemente no fígado. As taxas de metástase dependem das linhas celulares e cepas de roedores.</i>
	<i>Modo de inoculação intra-hepática</i>	<i>O modelo é reprodutível, mas não imita a hipótese geralmente aceita de disseminação hematogênica do câncer colorretal.</i>

Fonte: Traduzido de Tong et al. (2011).

Esses modelos permitem interrogações rápidas e repetidas de hipóteses, e cada um produz um método para testar várias modalidades terapêuticas que não seriam possíveis em humanos. Cada método tem uma ótima e alta capacidade de modelar o câncer de cólon humano, facilitando uma compreensão melhor e mais rápida de sua etiologia e oferecendo novas oportunidades para desenvolver e testar rapidamente novas terapias (TONG; *et al.*, 2011).

2.2.1 Modelo induzido quimicamente

Diferentes compostos químicos são capazes de causar distintas mutações no DNA, e a utilização de mutagênicos químicos resulta na geração de uma variedade de tumores. Tumores induzidos quimicamente mimetizam a ampla gama de alterações genéticas encontradas nos CCRs esporádicos. Além disso, a indução química de tumores intestinais pode ser utilizada para estudar as propriedades tumorigênicas de substâncias químicas comumente encontradas na dieta humana ou no ambiente. (STASTNA *et al.*, 2019). Entretanto, por conta da significativa individualidade de cada tumor, assim como em humanos, a interpretação dos dados de estudos se torna comprometida em relação ao desenvolvimento tumoral e a resposta às terapias (LEYSTRA; CLAPPER, 2019).

A tumorigênese e a resposta às terapias em humanos e camundongos são influenciadas pelo microambiente tumoral do cólon. As complexas interações existentes entre a microbiota comensal e as células imunes residentes no tecido colônico fornecem um microbioma dinâmico que está bem equipado para responder rapidamente aos estímulos. Alterações no microbioma intestinal impactam diretamente na homeostase do epitélio colônico e podem conseqüentemente apresentar uma propensão para doenças. Apesar das evidências crescentes do papel crítico que a microbiota residente desempenha em influenciar a frequência de iniciação de tumores, a taxa de progressão e a resposta às terapias, há uma subavaliação desses fatores ao selecionar e desenvolver modelos animais de CCR (CHENG; LING; LI, 2020).

Existem diversas vantagens em estudar a patogênese do CCR induzido por carcinógenos em modelos de roedores. Os modelos são altamente reprodutíveis, podem ser testados prontamente em animais com diferentes origens genéticas e a

patogênese recapitula o CCR humano, pelo menos nos estágios iniciais (ROSENBERG; GIARDINA; TANAKA, 2009).

Os estudos de carcinogênese do cólon eram mais comumente realizados em ratos. No entanto, a alta frequência de tumores gerados no cólon distal de camundongos, bem como a histogênese de múltiplos adenomas com posterior desenvolvimento de adenocarcinomas, também validam a importância desta espécie para o estudo da patogênese do CCR (DE ROBERTIS *et al.*, 2011).

2.2.2 Modelo quimicamente induzido por 1,2-Dimetil-hidrazina

1,2-Dimetilhidrazina (DMH) é tido como um poluente ambiental tóxico relatado como um pró-carcinógeno específico do cólon. Estudos em animais mostraram que tumores colônicos experimentais induzidos por DMH eram de origem epitelial com histologia, morfologia e anatomia semelhantes às neoplasias colônicas humanas (MA *et al.*, 1996).

O estudo de CCR em rato induzido pela 1,2-Dimetil-hidrazina (DMH) mostrou ser um valioso modelo animal de pesquisa de CCR. Sua semelhança morfológica com o CCR humano foi propícia para o modelo de rato com DMH, e por conta disso, foi usado para produzir informações em histologia e bioquímica do desenvolvimento de tumores, bem como sobre fatores que retardam ou aumentam a tumorigênese (PERŠE; CERAR, 2007).

O pró-carcinógeno DMH, após uma série de reações metabólicas, atinge o cólon, e assim produz as espécies cancerígenas e ROS finais, que alquilam ainda mais o DNA e iniciam o desenvolvimento da carcinogênese do cólon (VENKATACHALAM *et al.*, 2020).

O metabólito carcinogênico final do DMH é responsável pela metilação das bases do DNA de vários órgãos, incluindo células epiteliais no compartimento proliferativo das criptas, o que resulta em uma grande perda de células colônicas por apoptose, um aumento na proliferação e um aumento aparente em mutações de células epiteliais do cólon (PERŠE; CERAR, 2011).

A maioria desses tumores possui mutações no gene da β -Catenina 1 (CTNNB1), que é semelhante ao HNPCC. Essas mutações afetam os aminoácidos N-terminais do produto do gene β -Catenina, tornando a proteína resistente à degradação

regulatória, estabilizando a β -Catenina e aumentando a sinalização Wnt para conduzir a tumorigênese. Além disso, a incidência e multiplicidade do tumor podem ser alteradas tanto pela base genética quanto pela dieta (OGATA *et al.*, 2010).

2.2.3 Modelo quimicamente induzido por 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine

O PHIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina) é uma amina heterocíclica produzida no processo de cozimento da carne e acaba se tornando mutagênico atuando como causador de CCR em ratos. Já em camundongos, a PHIP induz o aparecimento de focos de criptas aberrantes do cólon, mas não de adenocarcinomas ou adenomas. Quando combinado com dextran sulfato de sódio, a PHIP pode aumentar a tumorigênese, assim como em camundongos $Apc^{Min/+}$ com PHIP (NICKEN *et al.*, 2013).

PHIP possui ação hormonal estrogênica, estimulando a proliferação celular de uma via dependente do receptor de estrogênio (ER) e assim ativa a via de sinalização da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) através de RNA mensageiro dos genes *PR* e *C-Myc* (NAKAGAMA; NAKANISHI; OCHIAI, 2005).

2.2.4 Modelo quimicamente induzido por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina

Uma substância química tumorigênica direta e com alta afinidade e capacidade de metilação do DNA em regiões específicas, a N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) em baixas concentrações possui capacidade indutora de focos de criptas aberrantes no epitélio do cólon, os quais apresentam altas chances de transformação maligna (MACHADO *et al.*, 2020).

A injeção de MNNG também é capaz de induzir câncer de próstata e de mama, entretanto, a alta incidência de neoplasia extracolônica induzida por esses compostos nitrosos é uma variável de confusão neste modelo. Quando administrada via retal, o MNNG causa reprodutivamente uma alta incidência de CCR, mas ainda induz linfoma tímico e câncer pulmonar, que podem causar mortalidade (NARISAWA *et al.*, 1976).

2.2.5 Modelo quimicamente induzido por azoximetano

Um modelo bem concretizado de CCR é o induzido pelo azoximetano (AOM) em roedores, comumente usados em estudos de quimioprevenção, tratamento do CCR, e em pesquisas de biologia molecular. Este modelo é tão bem aceito pois mimetiza características histopatológicas semelhantes ao CCR humano e compartilha vias moleculares semelhantes a um fenótipo de CCR esporádico humano (CHAN; COOK; STANNERS, 2006).

AOM, um metabólito ativo de 1,2-Dimetil-hidrazina (DMH), é um carcinógeno específico do cólon que serve como uma ferramenta eficaz para avaliar tumores de cólon em roedores suscetíveis (BOATENG *et al.*, 2007). Foi relatado que o AOM oferece vantagens sobre DMH, incluindo maior potência e maior estabilidade na solução de dosagem (NEUFERT; BECKER; NEURATH, 2007; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2000).

Após a administração, o AOM é metabolizado em metilazoximetanol (MAM) pelo citocromo P-450 2E1 (CYP2E1), causando mutações no DNA. A mutação de KRAS ativa a via PI3K/Akt a jusante e a via MAPK. A mutação de β -Catenina também evita que ela seja degradada pela Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) e o acúmulo de β -Catenina leva à proliferação celular, além disso, o TGF- β (Transforming Growth Factor- β), uma proteína pró-apoptótica, é inibida. Todas essas mudanças formam a base da carcinogênese do AOM. Através dos produtos de metilguanina no DNA, o AOM induz transições de bases nitrogenadas (G \rightarrow A) após ser excretado na bile, é então absorvido pelo epitélio colônico e induz a mutagênese (AVELINO *et al.*, 2022; CHEN; HUANG, 2009).

2.2.6 Modelo quimicamente induzido por azoximetano e dextran sulfato de sódio

A primeira ligação entre câncer e inflamação foi atribuída a Rudolf Virchow, o qual observou a presença de leucócitos em tumores no ano de 1863 (BALKWILL; MANTOVANI, 2001). Com o passar dos anos, foram sendo obtidas cada vez mais evidências de que a inflamação atua como um fator crítico na tumorigênese. Por analogia, pode-se dizer que a inflamação abre a porta para que o câncer entre.

AOM induz adutos O6-metilguanina resultando em transições (G→A) no DNA, enquanto o DSS administrado descontinuadamente desencadeia uma neoplasia colite-dependente através da alteração do microbioma intestinal (SUN *et al.*, 2023).

A administração simultânea de DSS com AOM como modelo para câncer associado à colite se tornou popular por sua reprodutibilidade, potência, baixo preço e facilidade de uso, embora tenham um mecanismo compartilhado. Enquanto o desenvolvimento do tumor em outros modelos geralmente requer vários meses, os camundongos injetados com AOM e subsequentemente tratados com DSS desenvolvem tumores adequados em apenas 7 a 10 semanas. Esses tumores apresentam algumas características comuns compartilhadas entre o CCR humano e o induzido no camundongo, como mutação ou desregulação de KRAS e CTNNB1 (THAKER *et al.*, 2012).

As vantagens do tratamento combinado de AOM + DSS é a capacidade de avaliar o CCR iniciado com mutações esporádicas produzidas pelo AOM, ao mesmo tempo que induz uma resposta inflamatória dose-dependente de DSS (PAN *et al.*, 2017).

As características principais do modelo AOM/DSS são sua linha do tempo relativamente curta e modelagem precisa do CCR. Em até 10 semanas pode ocorrer o desenvolvimento tumoral, ademais, a histopatologia de tumores induzidos por AOM/DSS traz uma semelhança significativamente alta em relação ao CCR humano, como adenocarcinomas invasivos e tumores distais.

A aplicação deste modelo foi crucial para desvendar a patogênese do CCR através do papel das vias de sinalização (por exemplo, receptor semelhante a Toll-4). Deste modo, o modelo AOM/DSS é um protocolo poderoso a ser empregado no estudo da patogênese do CCR associado a inflamação do cólon (PARANG; BARRETT; WILLIAMS, 2016).

2.3 Camundongo *hairless*

A partir de análises imunológicas de camundongos HRS/J mutantes, comparou-se homocigotos hr/hr com heterocigotos hr/+. Foram encontradas células hr/hr do baço que apresentaram um defeito específico para funções relacionadas com células T auxiliares (T-helper) quando comparadas com o genótipo hr/+ da mesma ninhada. Este defeito é expresso por respostas proliferativas deprimidas a

aloantígenos, não afeta a capacidade das células do baço hr/h de responder normalmente aos mitógenos das células T nem afeta sua capacidade de gerar células efectoras citotóxicas normais in vitro (MORRISSEY *et al.*, 1980).

Todas essas alterações sugerem que estes defeitos surgem a partir de anormalidades no epitélio do timo, relacionado ao alto grau de expressão do vírus xenotrópico em timócitos antigos e se relaciona com o desenvolvimento subsequente de leucemia (MORRISSEY *et al.*, 1980). Informações importantes acerca do camundongo HRS/J constam no quadro 3.

Quadro 3 - Compilado de informações fenotípicas do camundongo HRS/J.

Local de alterações	Características	Referências
<i>Celular</i>	<i>Diminuição da proliferação de células T</i>	<i>(MORRISSEY et al., 1980)</i>
<i>Neoplasia</i>	<i>Aumento da incidência de leucemia</i>	<i>(HEINIGER; HUEBNER; MEIER, 1976)</i>
	<i>Aumento da incidência de leucemia</i>	<i>(HIAI et al., 1977)</i>
	<i>Aos 8 a 10 meses de idade, 45% dos homozigotos têm leucemia linfóide, em comparação com apenas 1% nos heterozigotos, e aproximadamente 72% desses homozigotos desenvolvem leucemia mielóide mais tarde na vida até 18 meses de idade</i>	<i>(MEIER; MYERS; HUEBNER, 1969)</i>
<i>Audição/Orelha</i>	<i>Potenciais evocados vestibulares lineares (VESPs) estão ausentes na intensidade máxima de estímulo usado</i>	<i>(JONES et al., 2005)</i>
<i>Sistema hematopoiético e Imunológico</i>	<i>Diminuição da proliferação de células T</i>	<i>(MORRISSEY et al., 1980)</i>
	<i>Diminuição do número de células T</i>	<i>(RESKE-KUNZ; SCHEID; BOYSE, 1979)</i>
	<i>Aumento do número de macrófagos</i>	<i>(SUZU et al., 2000)</i>

Fonte: Modificado de Morrissey *et al.* (1980).

2.4 Estresse e ansiedade no modelo murino

Jones *et al.* (2005) indicaram potenciais evocados vestibulares lineares (VESP) ausentes na intensidade máxima de estímulo usada na audição dos camundongos HRS/J. Algo que pode ou não estar relacionado com um possível estresse e maior ansiedade neste modelo murino.

Essa resposta do organismo envolve diferentes áreas do sistema nervoso, tais como: a amígdala, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e o lócus cerúleo. Quando um organismo não consegue se adaptar ao estresse, acaba deixando de apresentar uma resposta fisiológica adaptativa e passa a ter uma resposta patológica prejudicial capaz de ser analisada através de testes comportamentais (BORODOVITSYNA; FLAMINI; CHANDLER, 2018; SEO, 2018).

O teste do campo aberto nada mais é que uma superfície grande e vazia, a qual possui linhas dispostas no fundo. O animal é colocado tanto no centro quanto próximo da parede e é avaliado pelo seu comportamento. Neste teste, verifica-se o número de vezes que as linhas são cruzadas pelo animal, o número de vezes que se apoia nas patas posteriores observando (*rearing*) e realiza autolimpeza (*grooming*), além da quantidade de bolos fecais produzidos. Esses parâmetros indicam possíveis alterações comportamentais (BRITO, 1994).

O teste de campo aberto possui uma ampla distinção no formato do aparato e no número de quadrantes, podendo limitar a zona central da zona periférica em uma superfície grande e vazia com paredes que impeçam o modelo murino de escapar. O teste é comumente avaliado acerca do tempo de permanência no aparato, geralmente de 5 a 10 minutos totais por animal.

Um outro teste utilizado para detectar ansiedade e medo é o teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE), a quantidade de tempo gasto nos braços fechados é comparada com o tempo gasto nos braços abertos como uma medida de ansiedade ou medo. O teste baseia-se nas tendências naturais dos roedores em evitar locais abertos ou elevados, contrabalançadas com a sua curiosidade inata para explorar áreas que lhes são novas. Em teoria, um camundongo menos ansioso visitará os braços abertos e mais expostos do labirinto com mais frequência, enquanto um camundongo com ansiedade elevada tenderá a passar mais tempo nos braços fechados (KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2018).

O LCE tem sido utilizado para demonstrar a relação entre ansiedade, emocionalidade e estresse através de medidas comportamentais. O desempenho

nesse teste baseia-se na criação de um conflito entre o desejo natural de exploração e o medo de áreas abertas ou expostas, caracterizado por manifestações comportamentais e fisiológicas (LIEBSCH *et al.*, 1998).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um modelo de câncer colorretal quimicamente induzido associado à colite em camundongos *hairless*.

3.2 Objetivos específicos

a) Avaliar as alterações macroscópicas nos cólons dos camundongos induzidos quimicamente com diferentes doses de AOM e DSS.

b) Avaliar as alterações histopatológicas nos cólons dos camundongos induzidos quimicamente com diferentes doses de AOM e DSS.

c) Avaliar as alterações comportamentais dos camundongos induzidos quimicamente com diferentes doses de AOM e DSS.

d) Avaliar o escore de atividade da doença relacionado a colite nos camundongos.

4 METODOLOGIA

4.1 Hipótese da pesquisa

O camundongo *hairless* é um modelo adequado para induzir o câncer colorretal utilizando o AOM associado a três ciclos de DSS e é capaz de desenvolver alterações histopatológicas, histológicas e comportamentais.

4.2 Local da Pesquisa

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Carcinogênese Experimental e executado no Laboratório de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen) e as análises foram feitas no Laboratório de Patologia Molecular do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste da FAMED/UFMS, no município de Campo Grande – MS, no período compreendido entre agosto de 2022 até janeiro de 2023.

4.3 Aspectos éticos

Todas as etapas e procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram protocolados na Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMS (CEUA -UFMS) com o nº 1.204/2022 (anexo 1), sendo realizados após aprovação na mesma.

4.4 Animais

Os camundongos *hairless* machos com 4 semanas de idade e peso inicial aproximado de 25g foram recebidos do Biotério Central, uma unidade de apoio vinculada à Diretoria de Cooperação Científica e Tecnológica da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Foram utilizados 140 animais, os quais foram mantidos em gaiolas coletivas (dimensão 48 cm x 33 cm x 18 cm), na quantidade de sete animais/gaiola, todas as caixas alojadas na mesma estante ventilada com exposição à luz de maneira igual a

todas as gaiolas, à temperatura de aproximadamente 23°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão (NUVITAL® CR1) e água *ad libitum*. Os mesmos foram aclimatados às condições do laboratório durante 10 dias antes do experimento.

O número de animais por grupo foi calculado considerando um $p < 0,05$, poder de teste de 95% desvio máximo de 15% e uma diferença máxima entre grupos de 30%, e devido ao procedimento de indução tumoral com o azoximetano possuir uma toxicidade, considerando perder até 20% dos animais durante o experimento. Sendo assim, o número total de animais e o número de animais por grupo foi calculado seguindo a seguinte fórmula: $N = n + N \times f$ (ENG, 2003).

4.4.1 Delineamento experimental

Para o experimento de indução tumoral associado à colite, os animais foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos.

Grupo G1 (C): controle (n=28);

Grupo G2 (AOM2): animais submetidos a duas doses de AOM para indução tumoral (n=28);

Grupo G3 (AOM1DSS): animais submetidos a uma dose de AOM para indução tumoral e três ciclos de 5 dias de DSS diluído em água *ad libitum* (n=28);

Grupo G4 (AOM2DSS): animais submetidos a duas doses de AOM para indução tumoral e três ciclos de 5 dias de DSS diluído em água *ad libitum* (n=28).

Grupo G5 (DSS): animais submetidos a três ciclos de 5 dias de DSS diluído em água *ad libitum* (n=28).

4.5 Indução da colite e câncer colorretal

4.5.1 Indução da colite

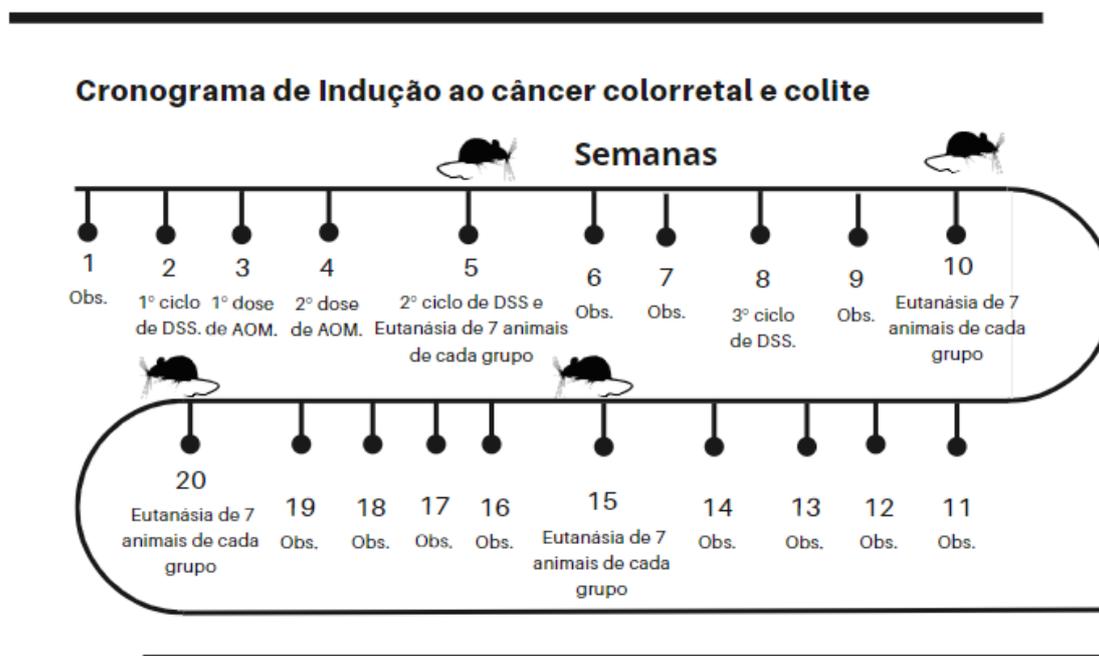
Para a indução apenas da colite foi disponibilizado aos camundongos dos grupos AOM1DSS, AOM2DSS e DSS, *ad libitum*, por 3 ciclos de 5 dias consecutivos, água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) numa solução de DSS a 2,5% (25 g/1000 ml) em água destilada, intercalados por 2 semanas de água normal, com a finalidade de induzir inflamação intestinal (KIM *et al.*, 2012). Para fornecer um suprimento contínuo de DSS por 5 dias, a solução DSS foi substituída por frascos limpos a cada 1 dia durante esse período do ciclo. Foi medida a quantidade de DSS consumida em cada troca de frasco como medida de exposição para cada grupo. O

primeiro ciclo de DSS foi realizado na semana 2, o segundo ciclo na semana 5 e o terceiro ciclo na semana 8 (Figura 6).

4.5.2 Indução do câncer colorretal

Para a indução do CCR os animais dos grupos AOM2 e AOM2DSS receberam duas injeções intraperitoneais e o AOM1DSS apenas uma injeção intraperitoneal (Quadrante inferior direito do abdômen) de azoximetano (AOM – Laboratório Sigma-Aldrich) utilizando-se de seringa de 1 ml e agulha 25x5 mm. A dose total administrada variou de 10-20 mg, fracionadas em duas semanas, 10 mg/kg/dose diluída em 1 ml de solução salina isotônica uma vez por semana. A solução de AOM foi mantida a -20° C, sendo que a primeira dose foi aplicada na semana 3 e a segunda dose foi aplicada na semana 4 (Figura 6).

Figura 6 - Cronograma da indução do câncer colorretal associado à colite



Fonte: Elaboração própria.

4.6 Avaliação da indução da colite e câncer

Baseado no protocolo de avaliação de Snider *et al.* (2016), a partir do primeiro ciclo de DSS os animais foram inspecionados diariamente, nos dias 2 a 6 dos ciclos de tratamento com DSS. Como um indicador de indução de colite e câncer, os camundongos poderiam ter perdido aproximadamente 10% de sua massa corporal e

apresentarem sangramento retal, diarreia ou prolapso retal. Durante a avaliação de cada animal, naqueles em que as manchas de sangue que não estiveram óbvias na região anal, foram coletadas as fezes dos animais para determinar a presença de sangue oculto, usando o Kit de sangue oculto *Renycult*, baseado na reação de *Meyer*. As fezes foram coletadas em tubos cônicos identificados para cada animal (THAKER *et al.*, 2012).

Todos os animais foram pesados antes de cada eutanásia para análise de ganho/perda de massa corporal. Além desse período, também foi acompanhado o peso dos animais durante os 3 ciclos de DSS para comparar com o grupo controle a possível perda de peso causada pela colite.

Durante os ciclos de DSS os animais foram examinados para avaliar o desenvolvimento da colite. Trabalhando um animal de cada vez, foi levantada a cauda para elevar as patas traseiras. Segurando o animal com uma mão para induzir o camundongo a defecar, com a outra mão foi segurada uma espátula e coletado todo o material fecal que o animal eliminou, e avaliado a consistência das fezes e a presença de sangue visível ou oculto (*Renycult*) ao final do período dos ciclos.

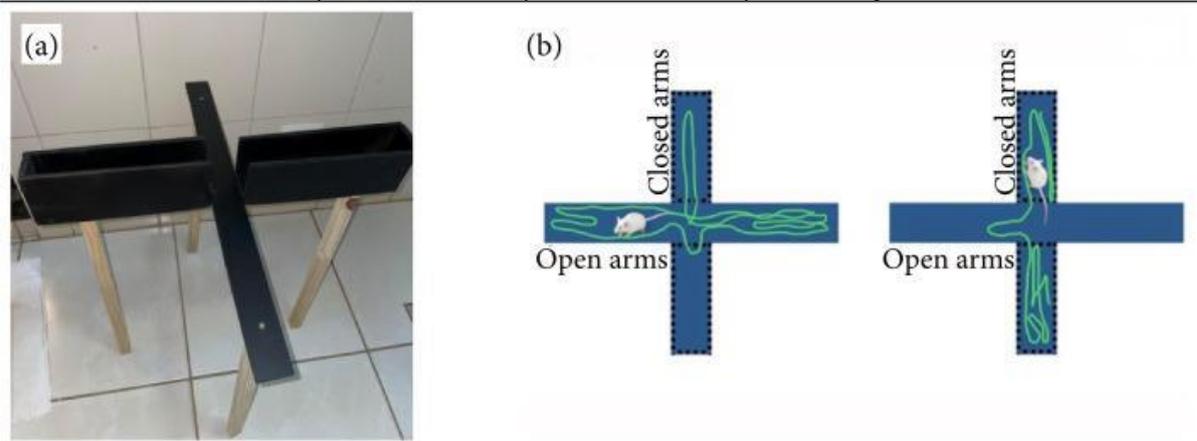
Os sintomas clínicos foram avaliados usando o Índice de Atividade da Doença (DAI), que inclui perda de peso corporal, caracterização das fezes e hematoquezia. O DAI foi pontuado por um pesquisador de forma cega (PARK *et al.*, 2015). O índice de atividade da doença (DAI) foi calculado marcando a porcentagem de perda de peso, sangramento intestinal [sem sangue, sangue oculto (*Renycult* +) ou sangue visível] e consistência das fezes (fezes normais, fezes amolecidas ou diarreia). As características clínicas foram pontuadas separadamente e então correlacionadas com uma pontuação histológica: $DAI = (\text{perda de peso corporal}) + (\text{pontuação de diarreia}) + (\text{pontuação de sangramento retal})$. No modelo animal tratado com AOM/DSS, a perda de peso é uma medida sensível da gravidade da colite, que por sua vez está ligada à carcinogênese.

4.7 Avaliação do Estresse e Ansiedade

O Labirinto em cruz elevado (LCE) foi realizado em conjunto com o teste do campo aberto. O LCE utilizado neste teste é uma estrutura de dois braços abertos e opostos com 50 cm de comprimento e 10 cm de largura cada um e outros dois braços opostos, do mesmo tamanho, fechados com paredes laterais de 15 cm de altura. Após

um período de adaptação de um camundongo por vez, no labirinto, foi-lhe permitido circular livremente no seu interior. Cada camundongo teve seu comportamento avaliado por 5 minutos (PELLOW S *et al.*, 1985). Como podemos ver demonstrado na figura 7.

Figura 7 - (a) Imagem do labirinto em cruz elevado usado para testar camundongos; (b) comportamento típico de camundongo com níveis baixos de ansiedade (à esquerda) e alto (à direita). O traço verde demonstra o movimento do animal. A esquerda representa mais tempo nos braços abertos, enquanto a direita representa mais tempo nos braços fechados.

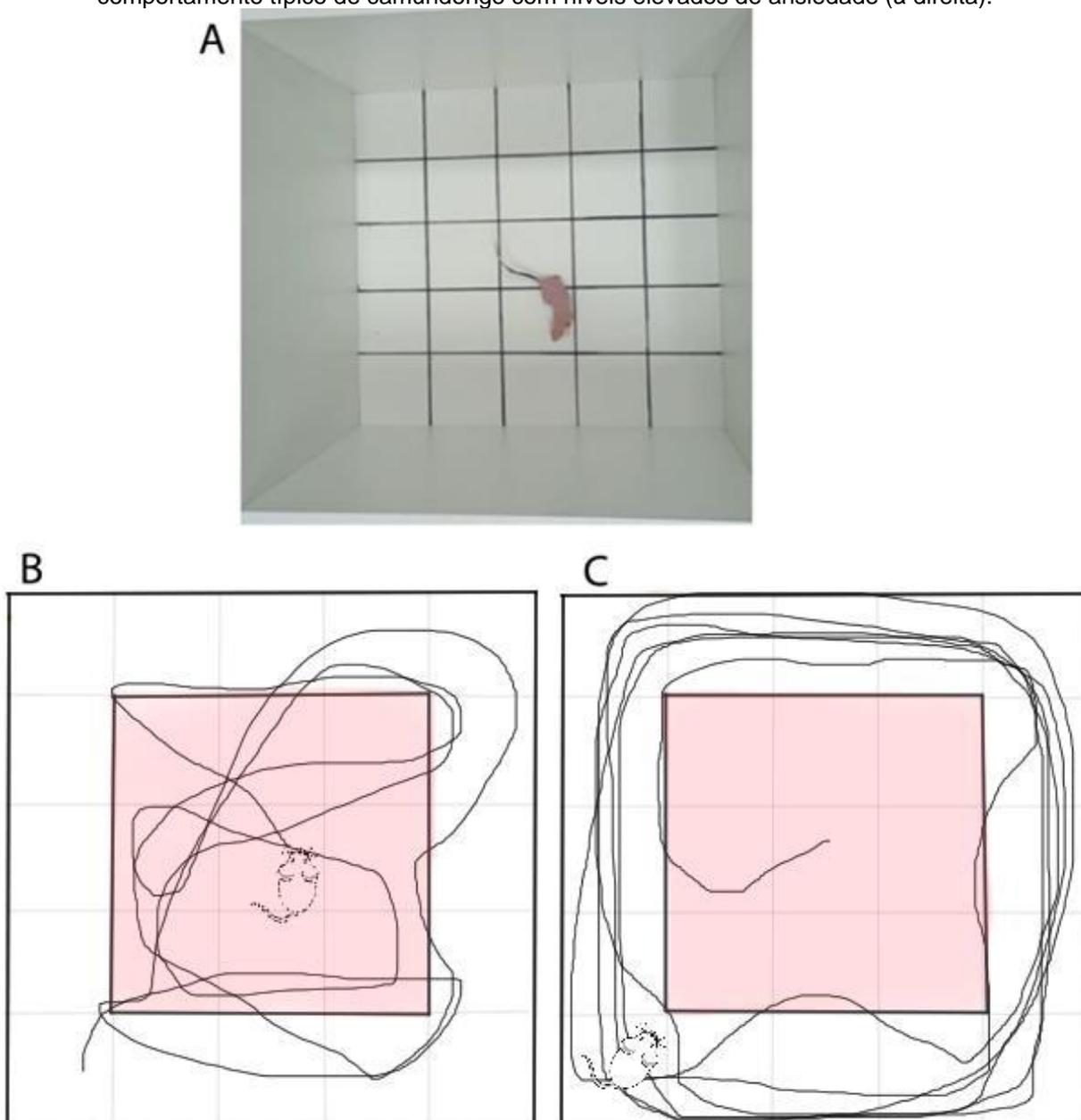


Fonte: Silva Junior *et al.* (2022).

O campo aberto utilizado possui 50 cm de comprimento, 50 cm de largura e bordas com 40 cm de altura, sendo de 10 cm a distância entre as linhas dispostas na superfície de movimentação (WILCOCK; BROADHURST, 1967).

O animal é posicionado no centro, onde se dá início ao teste. Através da figura 8 é possível observar a disposição das áreas e dos quadrantes, assim como o percurso percorrido pelo camundongo. Os traços demonstram os movimentos do animal. A esquerda (B) representa um caráter mais exploratório no aparato inteiro, enquanto a direita (C) representa mais tempo na zona periférica do teste.

Figura 8 - (A) Imagem do teste de campo aberto usado para testar camundongos; (B) comportamento típico de camundongo com níveis baixos de ansiedade (à esquerda) e (C) comportamento típico de camundongo com níveis elevados de ansiedade (à direita).



Fonte: Elaboração própria.

Para a avaliação dos resultados do teste de estresse e ansiedade, cada animal foi avaliado individualmente através do software de rastreamento de vídeo e análise de dados ANY-maze (Stoelting Co.- EUA) (BAILLOO; BOHLEN; WAHLSTEN, 2010).

4.8 Eutanásia

A eutanásia foi realizada em 7 animais de cada grupo no final da quinta, décima, décima quinta e vigésima semanas (Figura 6). Os animais foram eticamente submetidos a eutanásia com anestésico inalatório isoflurano. Cada camundongo foi imobilizado com o focinho dentro de um recipiente contendo algodão embebido com isoflurano, em média por 1 minuto, e após o animal apresentar perda da consciência e movimentos dos membros, mas com a respiração preservada, foi realizada a eutanásia por exsanguinação por punção cardíaca a céu aberto com uma seringa de 3 mL dotada de agulha 13x0,3 mm.

4.8.1 Coleta e armazenamento dos cólons

O procedimento de coleta dos cólons foi baseado no estudo de Thaker *et al.* (2012). Usando-se uma pinça de dissecação e um bisturi com lâmina 15, foi feita uma incisão na pele do abdome, na linha média. Com uma pinça dente de rato, segurou-se a borda da pele incisada e a mesma foi puxada suavemente para longe do tecido muscular abdominal, usando uma tesoura, divulsionou-se a pele do abdome dos músculos abdominais, expondo o peritônio. Com uma tesoura curva foi realizada uma incisão no tecido peritoneal com cuidado, e continuando sua abertura, foram expostos os intestinos. Foi identificado o cólon, pela sua extremidade distal, onde se junta ao reto/ânus. Com uma tesoura, foi realizada uma secção transversal no reto, 1 cm acima da abertura anal. Com uma das mãos segurou-se a extremidade distal do cólon e, com a outra mão portando uma tesoura curva, esticou-se suavemente o cólon, desconectando-o de qualquer tecido conjuntivo mesentérico. Identificou-se o ceco (pequena bolsa entre os intestinos delgado e grosso) e seccionou-se transversalmente no local onde o ceco e o cólon se unem (a extremidade proximal do cólon) para liberar o cólon. Para realizar a limpeza do lúmen do órgão usou-se uma seringa de 10 ml com solução de formalina tamponada a 10%, e conectou-se a uma agulha de gavagem. A agulha foi inserida cerca de meio centímetro na abertura proximal do cólon, e com os dedos de uma das mãos, segurou-se a agulha dentro do cólon aplicando uma pressão firme no cólon; e com a outra mão, segurando a seringa, aplicou-se uma pressão suave, para enxaguar o conteúdo do cólon. Esta etapa permitiu a limpeza do cólon, e a seguir, usando-se uma tesoura reta, foi aberto o cólon longitudinalmente sobre uma placa de polipropileno branca. Segurando-se a borda do cólon com uma pinça anatômica, o cólon foi novamente limpo e aberto com um pincel

contendo formalina tamponada a 10%, colocando-se a face luminal voltada para cima. A superfície luminal foi facilmente identificada pelas pregas e cristas presentes na mucosa colônica. Por último, foi identificado qualquer crescimento tumoral ao longo da extensão do cólon e registrado o número de pólipos de cada animal.

4.9 Formolização e preparo dos segmentos de cólon

Assim que os segmentos de cólon suspeitos foram sendo removidos, eles foram colocados sobre a placa de polipropileno e imediatamente, foram pincelados com solução de formalina tamponada a 10%.

À medida que foram enrijecendo, os fragmentos de tecido foram acondicionados em cassetes e colocados em frascos plásticos transparentes e individuais com tampas, contendo formalina tamponada a 10%, que foram identificados e acondicionados por 72 horas. Após 3 dias, todos os fragmentos foram trocados para frascos devidamente identificados com álcool 70% os quais foram guardados em caixas plásticas e ao abrigo de luz, para posteriores análises histológicas.

4.10 Preparo das lâminas histológicas

Cada fragmento de cólon extraído de cada animal foi incluído em um bloco de parafina. Em seguida foi cortado em micrótomo na espessura de 5µm, montado sobre lâmina de vidro, corado com Hematoxilina–Eosina, e em seguida encaminhado ao patologista para análise histopatológica.

4.11 Parâmetros analisados nas lâminas histológicas

Os aspectos histopatológicos considerados para fins de análise estatísticas neste estudo foram divididos em dois grupos: o grupo de lesões pré-neoplásicas/câncer e o grupo de lesões inflamatórias.

O grupo de lesões pré-neoplásicas/câncer contemplou 3 parâmetros histopatológicos:

1. Criptas aberrantes;

2. Adenoma com displasia de baixo grau;
3. Adenoma com displasia de alto grau;

O grupo de lesões inflamatórias contemplou 2 parâmetros histopatológicos:

1. Grau de inflamação
2. Placa linfóide reacional
3. Vasos linfáticos dilatados

4.12 Análise estatística

Para a análise da perda de peso, hematoquezia e diarreia, foi realizado o escore DAI.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico SPSS, versão 24.0.

Para a avaliação da massa corporal dos animais, e número de pólipos totais foi realizado o teste Anova de uma via para variância com pós-teste de Tukey-Kramer, pois tiveram distribuição normal.

Os resultados do teste do labirinto em cruz elevado, expressos em média \pm desvio padrão, foram submetidos ao teste paramétrico Anova de uma via comparando as médias dos grupos (C, AOM2, AOM2DSS, AOM2DSS e DSS). Valores de p menores que 5% ($p < 0,05$) foram considerados significativos.

Os demais resultados das variáveis avaliadas neste estudo foram apresentados na forma de estatísticas descritivas ou na forma de tabela.

A partir da comparação dos resultados do nosso estudo foi construído um quadro da visão geral com comparações e precificação do modelo murino em comparação com o rato.

5 RESULTADOS

5.1 Evolução da massa corporal dos grupos de animais durante o experimento CCR associado à colite.

Todos os animais foram pesados antes das eutanásias para avaliar os diferentes grupos a cada etapa da eutanásia. Através da análise estatística da massa corporal dos animais submetidos a eutanásia com 5 semanas o C ($35,57g \pm 2,15$) apresentou valores significantes ($p < 0,05$) no peso corporal comparado ao DSS ($32g \pm 1,91$), assim como AOM2 ($36,71g \pm 1,11$) apresentou alteração significativa na média de peso.

Na semana 10 os dados não tiveram grandes diferenças entre si, assim como na semana 15 e 20 não apresentaram valores significativos acerca da comparação entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1 – Comparação da média de massa corporal dos grupos de animais (em gramas) nas diferentes semanas de eutanásia.

	Semana 5	Semana 10	Semana 15	Semana 20
	Média ± Erro padrão			
	n=7	n=7	n=7	n=7
Controle	35,57 ± 2,15a	37,42± 2,63a	40,42± 2,07a	41± 2,23a
AOM2	36,71± 1,11a	39,28± 2,87a	38,71± 3,04a	41,14± 2,91a
AOM1DSS	33,85± 2,41ab	39,14± 2,41a	40± 1,91a	39,71± 1,49a
AOM2DSS	34,14± 1,34ab	37,14± 2,48a	40,57± 1,51a	40,28± 4,07a
DSS	32± 1,91b	38,14± 3,43a	39,71± 1,97a	42± 2,71a
Valor de p	0,0007	0,5055	0,5253	0,6174

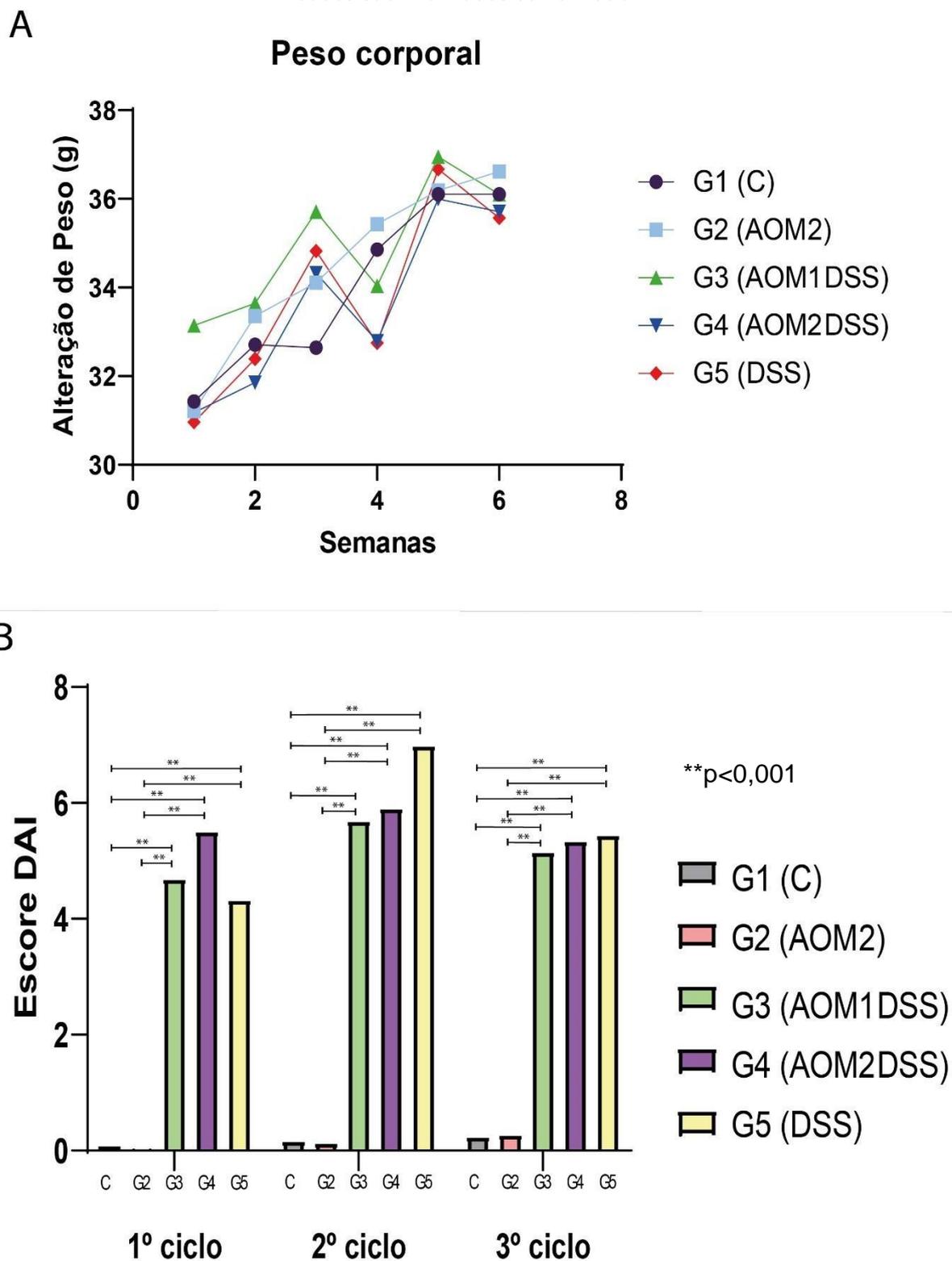
Teste Anova com pós-teste de Tukey. Letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

5.2 Avaliação dos animais durante os ciclos dextran sulfato de sódio

Durante os três ciclos do DSS houve perda de massa corporal em alguns grupos como mostrado na tabela de forma descritiva. Os grupos 1 e 2 tiveram ganho de massa corporal durante o período do 1º ao 3º ciclo de indução da colite, visto que eles não receberam DSS na água *ad libitum*. No grupo AOM1DSS, AOM2DSS e DSS no ciclo 1 houve uma média de ganho de massa corporal de aproximadamente 1 grama, no ciclo 2 ocorreu uma média de perda de massa corporal de 2 gramas representando uma perda maior que no ciclo 1, e no ciclo 3 ocorreu uma média de perda de massa corporal de 3,4 gramas (Figura 9A).

Através da análise do escore DAI, notou-se diferença significativa ($p < 0,01$) dos grupos induzidos a colite em relação aos grupos 1 e 2 que não receberam DSS. Através da análise do peso corporal foi possível identificar uma perda de peso nos grupos que receberam DSS (Figura 9B).

Figura 9 – A. Efeitos da ingestão de DSS no peso corporal dos camundongos. B. Pontuação DAI, os dados são informados como média.



5.3 Desenvolvimentos de pólipos

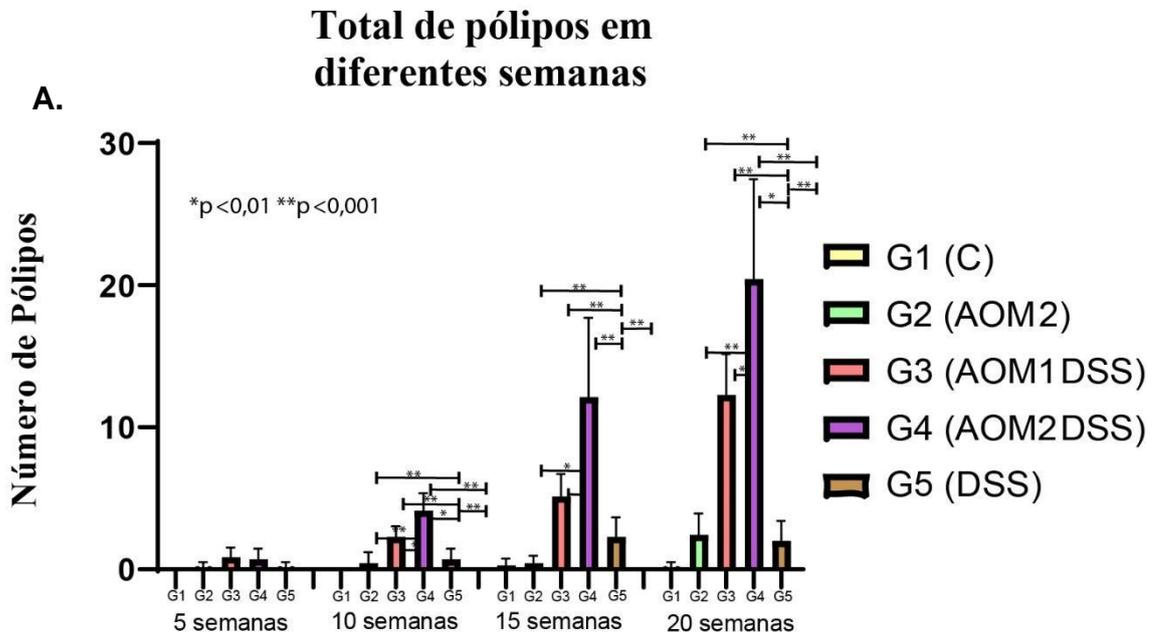
Acerca do número de pólipos, alguns grupos tiveram diferenças significativas quando comparados entre si em diferentes semanas. O C foi o único que não teve diferença significativa, o AOM2, AOM1DSS, AOM2DSS e DSS quando comparados entre si em diferentes semanas de eutanásia mostraram um aumento significativo no número de pólipos, AOM2 e DSS apresentaram o valor de $p < 0,05$ e o AOM1DSS e AOM2DSS apresentaram o valor de $p < 0,001$.

Com 5 semanas, o teste de comparação não indicou valores significativos entre os 5 grupos (Figura 10A). A partir da 10ª semana os valores médios do C (0 ± 0) apresentaram resultados significativos comparados com a média de AOM1DSS ($2,29 \pm 0,75$) e AOM2DSS ($4,14 \pm 1,21$). O AOM2 ($0,42 \pm 0,79$), por sua vez, mostrou valores significantes comparados com as médias do AOM1DSS e AOM2DSS. AOM1DSS apresentou um aumento significativo comparado aos demais grupos, assim como AOM2DSS apresentou diferença significativa comparado a média de todos os outros grupos (Figura 10A).

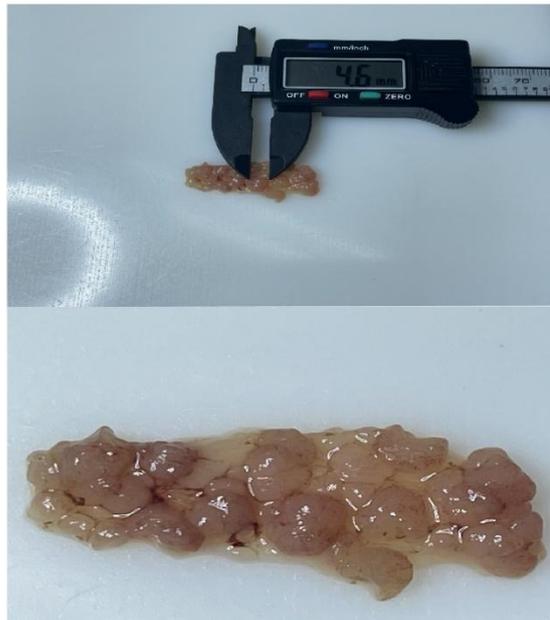
Através da análise da 15ª semana de eutanásia o C ($0,28 \pm 0,48$) foi comparado com a média dos outros grupos e foram encontrados resultados significativos dele com o AOM1DSS ($5,14 \pm 1,57$) e AOM2DSS ($12,14 \pm 5,58$). O AOM2 ($0,42 \pm 0,53$) apresentou um nível alto de significância quando comparado ao AOM1DSS e AOM2DSS. Em 5 semanas, o AOM2DSS apresentou comparação com alto nível de significância com os outros grupos, já o AOM1DSS não apresentou nível de significância somente com DSS ($2,28 \pm 1,38$) (Figura 10A).

Por último, a 20ª semana foi a que apresentou valores médios mais altos de pólipos. O C ($0,14 \pm 0,37$) e o AOM2 ($2,42 \pm 1,51$) tiveram resultados significativos comparados ao AOM1DSS ($12,28 \pm 2,87$) e AOM2DSS ($20,42 \pm 7,04$). Através da análise do AOM1DSS e do AOM2DSS foi visto que eles apresentaram resultados significativos em relação a todos os grupos, inclusive o DSS ($2 \pm 1,41$) (Figura 10A).

Figura 10 – Total de pólipos em diferentes semanas de eutanásia. Número médio de pólipos totais e desvio padrão da média em cada grupo. **A** – Total de pólipos. Os dados são informados como média \pm Desvio padrão da média. **B** – Fotomicrografia de segmento do cólon contendo diversos pólipos.
* $p < 0,01$ ** $p < 0,001$.



B. Foto do segmento do cólon



5.4 Análise histopatológica

AOM/DSS causou destruição epitelial acentuada, lesões inflamatórias, deformação de criptas, displasia, indicando a existência de inflamação e adenoma bem diferenciado do cólon, sendo alguns capazes de evoluir até para adenoma de alto grau (tabela 2), juntamente com aumentos nas pontuações de lesões microscópicas.

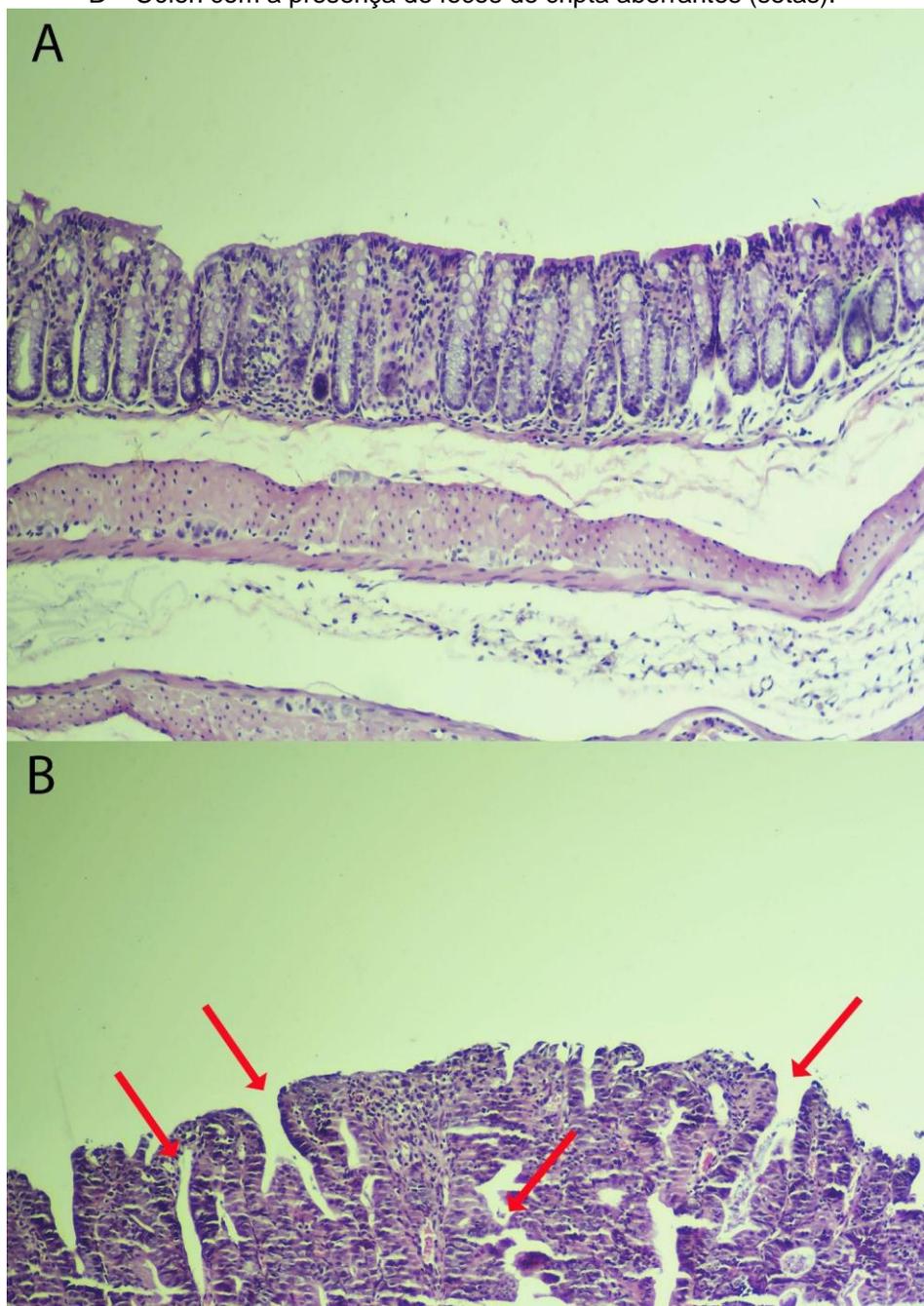
Através da análise histopatológica, foi encontrado a frequência relativa e absoluta de cada grupo, em diferentes semanas de eutanásia.

Tabela 2 - Resultados das alterações histológicas, tanto de lesões pré-neoplásicas como de sinais inflamatórios, em cada um dos grupos em diferentes semanas de eutanásia

		Lesões pré-neoplásicas			Sinais Inflamatórios		
		Criptas aberrantes	Displasia de baixo grau	Displasia de alto grau	Tecido linfóide reacional	Grau de inflamação de leve	Dilatação de vasos linfáticos
C	5ªS n=7	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	10ªS n=7	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	15ªS n=7	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	20ªS n=7	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
AOM2	5ªS n=7	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	10ªS n=7	0% (0)	0% (0)	0% (0)	57,14% (4)	85,71% (6)	57,14% (4)
	15ªS n=7	14,28% (1)	0% (0)	0% (0)	0%	0%	0%
	20ªS n=7	0% (0)	0% (0)	0% (0)	85,71% (6)	100% (7)	85,71% (6)
AOM1 DSS	5ªS n=7	14,28% (1)	14,28% (1)	0% (0)	100% (7)	71,42% (5)	100% (7)
	10ªS n=7	100% (7)	100% (7)	0% (0)	100% (7)	100% (7)	100% (7)
	15ªS n=7	71,42% (5)	57,14% (4)	0% (0)	100% (7)	100% (7)	100% (7)
	20ªS n=7	100% (7)	85,71% (6)	28,57% (2)	100% (7)	100% (7)	100% (7)
AOM2 DSS	5ªS n=7	28,57% (2)	28,57% (2)	0%	100% (7)	85,71% (6)	100% (7)
	10ªS n=7	85,71% (6)	100% (7)	0%	100% (7)	85,71% (6)	100% (7)
	15ªS n=7	100% (7)	100% (7)	0%	100% (7)	100% (7)	100% (7)
	20ªS n=7	100% (7)	100% (7)	0%	85,71% (6)	85,71% (6)	85,71% (6)
DSS	5ªS n=7	14,28% (1)	14,28% (1)	0%0	100% (7)	100% (7)	100% (7)
	10ªS n=7	14,28% (1)	0% (0)	0%0	100% (7)	100% (7)	100% (7)
	15ªS n=7	0% (0)	0% (0)	0%0	100% (7)	100% (7)	100% (7)
	20ªS n=7	14,28% (1)	0% (0)	0%0	100% (7)	100% (7)	100% (7)

Na figura 11A observamos um cólon normal com células do epitélio intestinal sem alterações. Na figura 11B identificou-se a presença de criptas na mucosa colônica do animal 3 do grupo AOM2DSS de 10 semanas.

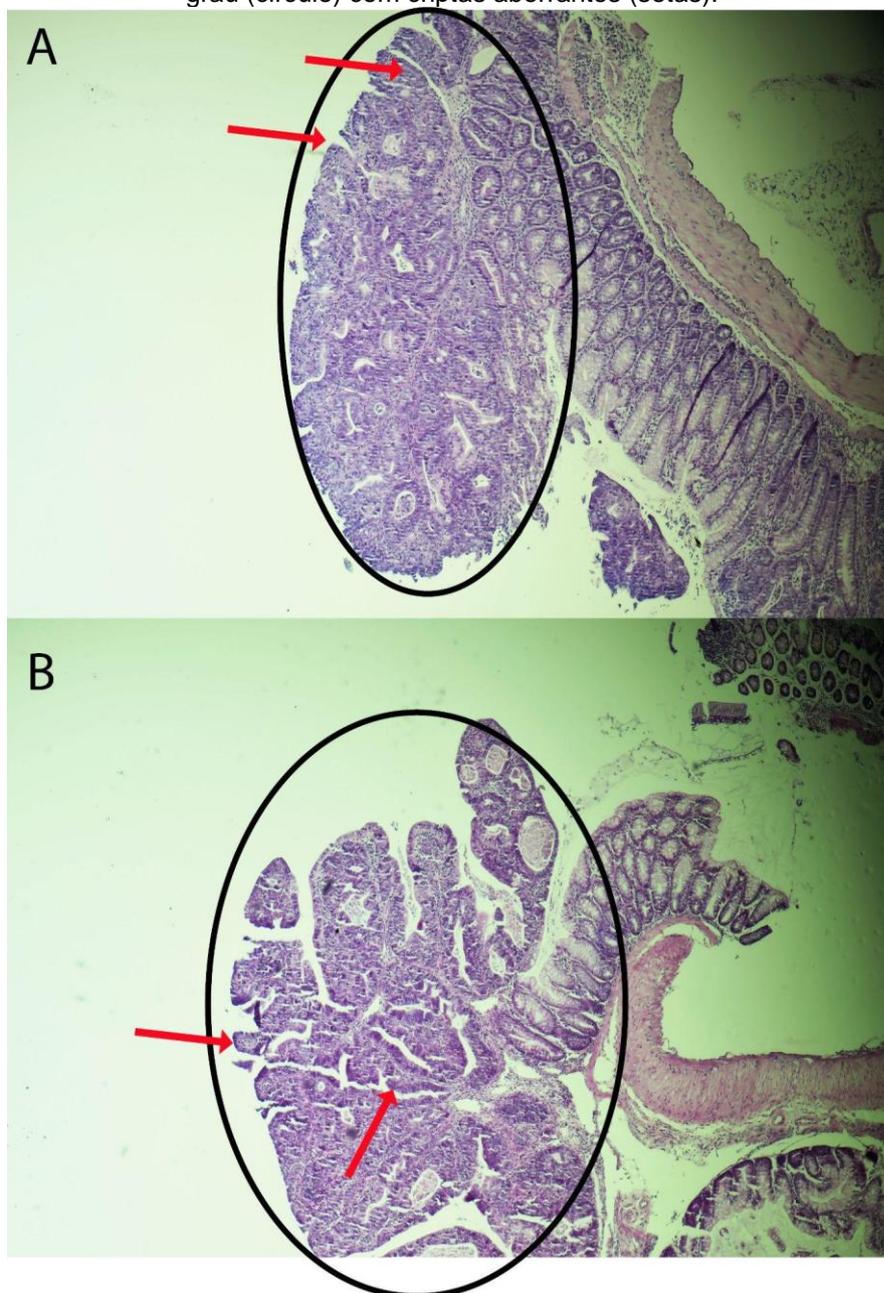
Figura 11 - Fotomicrografia do cólon. A – Cólon normal de um camundongo.
B – Cólon com a presença de focos de cripta aberrantes (setas).



Na figura 12 observamos um adenoma tubular na mucosa colônica circulado (setas vermelhas). Essa lesão é caracterizada por apresentar estruturas tubuliformes

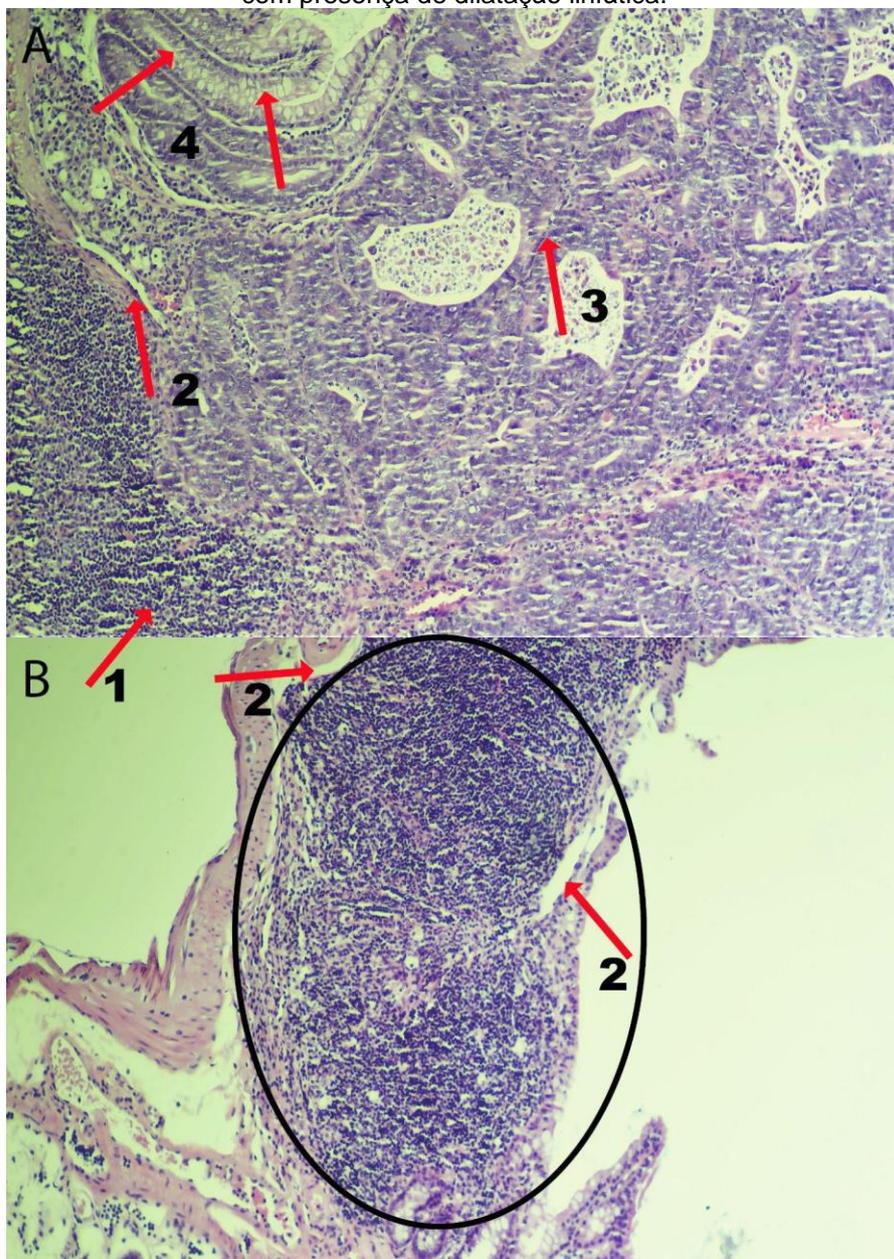
com projeção polipóide acima do plano da mucosa, juntamente com criptas aberrantes alongadas com células cilíndricas, núcleos fusiformes/ovais (setas).

Figura 12 - Fotomicrografia da mucosa colônica com presença de adenoma tubular de alto grau (círculo) com criptas aberrantes (setas).



Através da visualização da figura 13 é possível observar 3 diferentes morfologias sendo elas as células intestinais sem alterações (seta 4), adenoma (seta 3) com tecido linfoide reacional circulado (seta 1) e na submucosa, a presença de vaso linfáticos de lúmen dilatado (seta 2).

Figura 13 - Fotomicrografia da mucosa colônica. A – Presença de adenoma tubular de alto grau e tecido linfóide reacional com vasos linfáticos dilatados. B – Tecido linfóide reacional com presença de dilatação linfática.

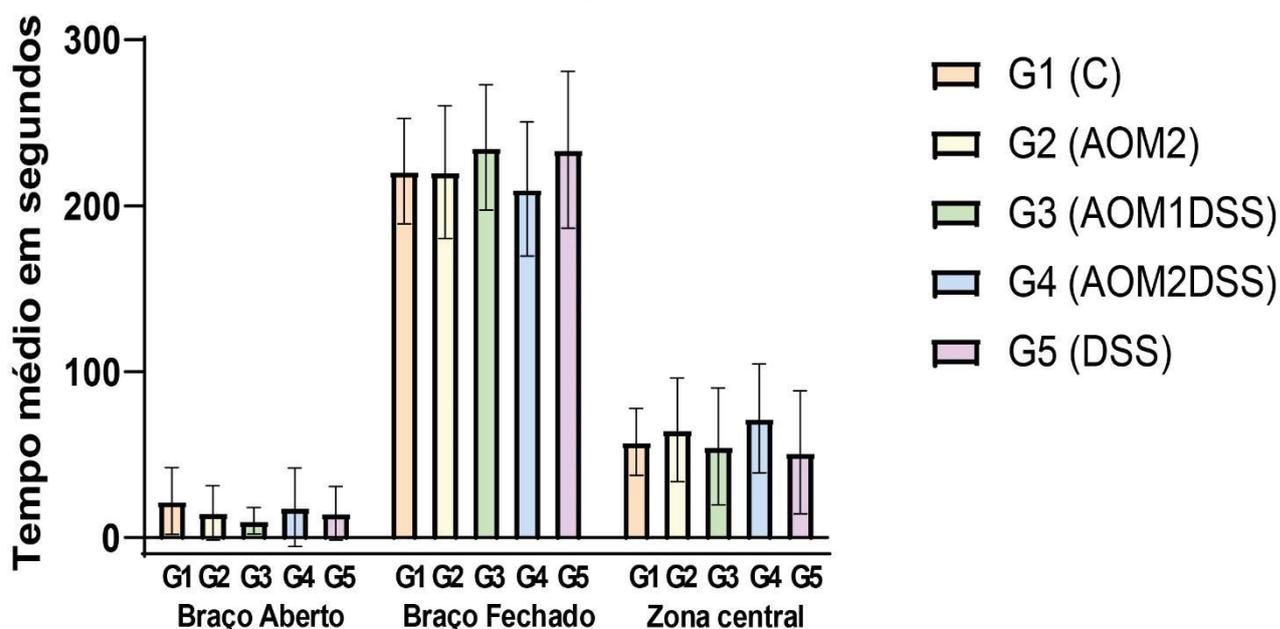


5.5 Análise do estresse e ansiedade

Verificou-se que em relação aos resultados da comparação entre os grupos experimentais submetidos ao DSS e ao AOM no período pós-DSS e na semana que antecedeu a eutanásia, pode-se destacar que o tempo absoluto que cada grupo ficou nos braços abertos e fechados no teste do labirinto em cruz elevada foi diferente para cada grupo.

Considerando agora a análise dos camundongos na semana após o último ciclo de DSS, não houve diferença significativa entre os grupos em relação a média de tempo no braço fechado (Figura 14) , ($p=0.5032$).

Figura 14 - Tempo de permanência nos braços aberto, fechado e central durante o teste do labirinto em cruz elevado de cada grupo de animais submetidos ao estudo.



Os resultados apresentaram um valor de $p = 0.2796$ em relação ao tempo de permanência no braço aberto, $p = 0.2166$ no braço fechado e $p = 0.2365$ na zona central do aparato de LCE.

Já, em relação a resposta comportamental dos camundongos relacionada à atividade locomotora e exploratória devido ao efeito do estresse induzido pelo DSS e pelo AOM, pode-se comparar o número de entrada dos camundongos do grupo C ao DSS na zona periférica e na zona central após o DSS (Tabela 3) e fazer a mesma análise entre os grupos na semana que antecedeu a eutanásia.

Tabela 3 – Teste de Campo Aberto - Comparação entre os grupos acerca do tempo de permanência na zona central e periférica.

Grupos	Tempo de permanência	Tempo de permanência
	na área central (segundos)	na área periférica (segundos)
	Média±Desvio padrão	
C (Controle)	57,19±23,07	242,81±23,07
AOM2	61,69±26,20	238,31±26,20

AOM1DSS	44,00±21,57	256,00±21,57
AOM2DSS	64,29±24,16	235,71±24,16
DSS	63,10±33,99	236,90±33,99
Valor de p	0.0846	0.0846

Teste de anova de 2 vias.

Já na semana que antecedeu a eutanásia, considerando o número médio de entradas na zona periférica pelos camundongos de cada grupo em específico, temos um aumento significativo no quesito estresse e ansiedade (Tabela 4).

Tabela 4 – Teste de Campo Aberto - Comparação entre os grupos acerca do número de entradas na zona central e periférica

Grupos	Nº de entradas na zona	Nº de entradas na zona
	central	periférica
	Média±Desvio padrão	
C (Controle)	15,61±5,70	15,46±5,71
AOM2	15,68±7,57	15,46±7,75
AOM1DSS	15±7,57	14,93±7,67
AOM2DSS	7,93±5,20	7,82±5,13
DSS	8,82±6,19	8,75±6,10
Valor de p	<0,0001	<0,0001

Teste de anova de 2 vias.

5.6 Visão geral do estudo

Através da interpretação dos resultados do presente estudo, foi possível uma comparação com pesquisas da literatura em outro modelo animal. Foram comparados o nosso modelo murino (hr/hr) com modelo em rato, acerca das diferenças encontradas e gastos em cada modelo (Tabela 5).

Tabela 5 – Visão geral das vantagens na utilização do nosso modelo murino em camundongo *Hairless* comparado ao rato.

Parâmetros	Modelo murino (HRS/J)	Modelo em rato	Referência
Peso médio em adultos (g)	40 g (machos) 30/35 g (fêmeas)	300 a 400 g (fêmeas) 500 a 600 g (Machos) (<i>Rattus norvegicus</i>)	(ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006).
Consumo de água por dia (ml)	10 ml	50 ml	
Consumo de ração por dia (g)	10 g	25 g	
Quantidade necessária de maravalha/Cepilho como “cama” (g)	300 x 195 x 120 – 60g (para 2 dias)	410 x 340 x 175 – 100g (para 2 dias)	
Tempo no surgimento de lesões pré-neoplásicas (semanas)	10 semanas	18 semanas (fêmeas <i>Sprague-Dawley</i>)	(Håkansson <i>et. al</i> , 2011)
Criptas aberrantes (semanas)	5 semanas	12 semanas	(LIMEIRAS, 2016)
Quantidade de azoximetano injetada/ Preço por animal (25 MG – US\$ 703,44) (20/06/2023).	10 mg/kg/peso 40g = 0,04 kg = 0,4mg de AOM por animal = US\$ 11,17	15 mg/kg/peso 350g = 0,35 kg = 5,25mg de AOM por animal = US\$ 146,68	(Håkansson <i>et. al</i> , 2011)
Quantidade de DSS diluída/consumida em água (25 MG – US\$ 688,12) (20/06/2023).	DSS 2,5% (25g/1000 ml) 1 ciclo (7dias) = 70 ml por animal = US\$ 47,83	DSS 4% (40g/1000 ml) 1 ciclo (7dias) = 350 ml = US\$ 382,63	(Håkansson <i>et. al</i> , 2011)

Fonte: Elaboração própria

6 DISCUSSÃO

Foram utilizados modelos murinos do mesmo sexo pela possibilidade de comparação dos resultados e por permitir a uniformidade do estudo (LARANJEIRA *et al.*, 1998). Há evidências que os estrogênios possuem relação com a carcinogênese induzida experimentalmente. Através do estudo de Kobaec-larsen (2004), sobre os efeitos secundários da indução de CCR com AOM em ratos, foi demonstrado que as fêmeas desenvolveram tumorigênese renal, não aparecendo nos machos.

A administração oral do polissacarídeo sulfatado DSS, diluído na água de beber, a camundongos, induz colite grave caracterizada por diarreia, hematoquezia, perda de peso, formação de úlcera, perda de células epiteliais e infiltrações com neutrófilos, assemelhando-se a algumas características de surtos de retocolite Ulcerativa humana (WIRTZ *et al.*, 2017).

Através dos resultados encontrados, notou-se que nem o pré-tratamento com apenas AOM nem a administração distinta de 3 ciclos de DSS a 2,5% são capazes de induzir significativas lesões tumorais no colón e reto dos camundongos com 20 semanas de indução tumoral. No entanto, a combinação dos dois compostos foi capaz de induzir adenomas com displasia de baixo e alto grau em apenas 10 semanas de indução tumoral.

O CCR associado à colite resulta da inflamação crônica no intestino, que por sua vez é imprescindível para o desenvolvimento mais acelerado do CCR. O crescimento tumoral associado à colite está situado dentro do cólon em áreas de inflamação aguda procurando mimetizar o CCR por meio do acúmulo de várias mutações nas células epiteliais do intestino (STASTNA *et al.*, 2019).

O modelo murino de AOM/DSS exhibe colite severa com perda de peso corporal e diarreia sanguinolenta, seguida pelo desenvolvimento de múltiplos tumores de cólon (SUN *et al.*, 2023). O estudo de Burtin *et al.*, (2020) mostrou que o carcinógeno, o protocolo de dosagem e linhagem do camundongo estão relacionados e interferem no período de latência que varia de 24-50 semanas. Com os resultados encontrados em nosso estudo utilizando o camundongo *Hairless*, foi visto um crescimento de adenomas em animais com apenas 10 semanas de indução tumoral.

Segundo o estudo de Do Amaral (2022) e Higa *et al.* (2011), foram observados somente focos de cripta aberrantes em ratos Wistar, após 12 semanas de indução tumoral com DMH. Em outro estudo realizado, utilizou-se o modelo de CCR induzido

com AOM em ratos *Wistar* submetidos a eutanásia com 6 semanas, e na avaliação acerca da carcinogênese do cólon, apenas criptas aberrantes foram observadas (MARKS *et al.*, 2008). Por outro lado, em nosso estudo utilizando camundongos *hairless*, e com apenas 10 semanas de indução tumoral por meio de 2 doses de AOM e 3 dss, observamos adenomas com diversas alterações histopatológicas.

A maioria dos estudos de CCR utilizando modelos animais apresentam pequena progressão do câncer, encontrando apenas focos de criptas aberrantes normalmente. Em um estudo com camundongos *Swiss* induzidos ao CCR com DMH, os animais apresentaram focos de cripta aberrantes em 12 semanas de indução tumoral (LIMEIRAS, 2016).

Em estudos prévios com este modelo murino, observamos que em todos os grupos que foram induzidos com AOM + DSS apresentaram adenomas, com criptas aberrantes e lesões inflamatórias. Foi visto que os animais submetidos a indução tumoral e colite apresentaram um aumento no estresse e ansiedade (NEVES, 2021).

A exposição prolongada a estímulos estressantes desencadeia uma resposta fisiológica adaptativa no organismo, resultando em comportamentos de estresse e ansiedade (BORODOVITSYNA; FLAMINI; CHANDLER, 2018). Antoni e Dhabar (2019) relataram a existência da relação entre estresse, progressão, surgimento de tumores e surgimento de metástases, consequência do desencadeamento de processos neuroendócrinos e desregulação do sistema imunológico (ANTONI; DHABHAR, 2019). Nos resultados obtidos no nosso estudo, valores significativos foram encontrados no Teste de Campo Aberto, indicando maiores períodos na zona periférica de animais submetidos ao estresse ambiental, estresse da colite e da indução tumoral. Além de maiores tempos no braço fechado no teste de LCE.

A colite induzida por DSS em roedores aumenta os níveis plasmáticos de corticosteróides e citocinas pró-inflamatórias, com elevação de interleucina-6 e GRO- α no cérebro. Consequentemente, essa resposta ativa sinais no sistema nervoso central, desencadeando uma resposta reflexa ao estresse e um comportamento semelhante a ansiedade, que se agrava com a perda de peso e a debilitação progressiva decorrente da neoplasia (REICHMANN *et al.*, 2015). Em nosso estudo também observamos perda de peso, prolapso retal, e outras alterações que influenciam na resposta do estresse e ansiedade murino.

O modelo de indução tumoral colorretal utilizado em nosso estudo é parcialmente parecido com estudos encontrado na literatura, e optou-se por utilizar o

camundongo *hairless* como alvo de indução do CCR associado a colite com AOM/DSS, em diferentes doses, comparados em diferentes progressões semanais de indução tumoral. Portanto, mais estudos serão necessários para validar o modelo ora desenvolvido, visto que outros dados de biologia molecular, bioquímica e imunohistoquímica serão necessários.

7 CONCLUSÃO

A indução com AOM e DSS foi responsável pelo desenvolvimento de pólipos adenomatosos a partir da 10^a semana de indução tumoral com 1 e 2 doses de AOM associadas ao DSS.

A histopatologia nos cólons dos camundongos apresentou diversas alterações pré-neoplásicas com sinais inflamatórios nos animais induzidos quimicamente com diferentes doses de AOM e DSS.

É possível afirmar que as alterações comportamentais como o estresse e a ansiedade murina se mostraram alterados em todos os testes realizados, demonstrando uma correlação dos camundongos frente a diferentes doses de AOM e DSS.

Por fim, o índice de atividade da doença (DAI), confirmou a colite nos cólons dos camundongos induzidos com DSS, através da mensuração dos diversos parâmetros envolvidos na patogênese da colite.

Como visto anteriormente, a utilização de 3 ciclos de DSS encarece muito a pesquisa no modelo animal utilizando ratos, assim como as injeções de AOM, já no modelo murino *hairless* o custo-benefício é evidente quando se trata das substâncias utilizadas, tempo necessário e tipo de alterações encontradas no camundongo *hairless*.

8 REFERÊNCIAS

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. DE. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Editora Fiocruz, ano: 2006, Páginas: 388, ISBN: 85-7541-015-6. DOI: 10.7476/9788575413869 2006.

ANTONI, M.H.; DHABHAR, F.S. O impacto do estresse psicossocial e do gerenciamento do estresse nas respostas imunes em pacientes com câncer. **Câncer**. v. 125, n. 9, p. 1417–1431, May. 2019. DOI: 10.1002/CNCR.31943. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30768779/> . Acesso em: 20 set. 2022.

AVELINO, A. L. N.; E SILVA, N. V. R.; DE OLIVEIRA, G. B.; SILVA, A. A. DE S.; CAVALCANTI, B. C.; JAMACARU, F. V. F.; DORNELAS, C. A. Antioxidant and Antigenotoxic Actions of Gum Arabic on the Intestinal Mucosa, Liver and Bone Marrow of Swiss Mice Submitted to Colorectal Carcinogenesis. **Nutrition and Cancer**, v. 74, n. 3, p. 956-964, June 2022. DOI: 10.1080/01635581.2021.1931699. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34085880/>. Acesso em: 30 out. 2022.

BAILOO, J. D.; BOHLEN, M. O.; WAHLSTEN, D. The precision of video and photocell tracking systems and the elimination of tracking errors with infrared backlighting. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 188, n. 1, Apr. 2010. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2010.01.035. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20138914/>. Acesso em: 23 set. 2022.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? **Lancet**; v. 357, n. 9255, p. 539-345, Feb. 2001. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)04046-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11229684/>. Acesso em: 12 dez. 2021.

BARBIERI, D. Doenças inflamatórias intestinais. **Jornal de Pediatria**, v. 76, n. 7, p. 173-180, jul. 2000. DOI: 10.2223/jped.151. Disponível em:

<https://scholar.archive.org/work/jfj3dgpbhzcceoidsfbopsfya/access/wayback/http://www.wjped.com.br/conteudo/00-76-S173/port.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.

BIEN, S. A.; SU, YU-RU.; CONTI, D. V.; HARRISON, T. A.; QU, C.; GUO, X.; LU, Y.; ALBANES, D.; AUER, P. L.; BANBURY, B. L.; BERNDT, S. I.; BÉZIEAU, S.; BRENNER, H.; BUCHANAN, D. D.; CAAN, B. J.; CAMPBELL, P. T.; CARLSON, C. S.; CHAN, A. T.; CHANG-CLAUDE, J.; CHEN, S.; CONNOLLY, C. M.; EASTON, D. F.; FESKENS, E. J. M.; GALLINGER, S.; GILES, G. G.; GUNTER, M. J.; HAMPE, J.; HUYGHE, J. R.; HOFFMEISTER, M.; HUDSON, T. J.; JACOBS, E. J.; JENKINS, M. A.; KAMPMAN, E.; KANG, H. M.; KÜHN, T.; KÜRY, S.; LEJBKOWICZ, F.; LE MARCHAND, L.; MILNE, R. L.; LI, L.; LI, C. I.; LINDBLOM, L.; LINDOR, N. M.; MARTÍN, V.; MCNEIL, C. E.; MELAS, M.; MORENO, V.; NEWCOMB, P. A.; OFFIT, K.; PHARAOH, P. D. P.; POTTER, J. D.; QU, C.; RIBOLI, E.; RENNERT, G.; SALA, N.; SCHAFMAYER, C.; SCACHERI, P. C.; SCHMIT, S. L.; SEVERI, G.; SLATTERY, M. L.; SMITH, J. D.; TRICHOPOULOU, A.; TUMINO, R.; ULRICH, C. M.; VAN DUIJNHOFEN, F. J. B.; VAN GUELPEN, B.; WEINSTEIN, S. J.; WHITE, E.; WOLK, A.; WOODS, M. O.; WU, A. H.; ABECASIS, G. R.; CASEY, G.; NICKERSON, D. A.; GRUBER, S. B.; HSU, L.; ZHENG, W.; PETERS, U. Genetic variant predictors of gene expression provide new insight into risk of colorectal cancer. **Human Genetics**, v. 138, n. 4, p. 307-326, Apr. 2019. DOI: 10.1007/s00439-019-01989-8 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30820706/>. Acesso em: 21 set. 2022.

BOATENG, J.; VERGHESE, M.; SHACKELFORD, L.; WALKER, L. T.; KHATIWADA, J.; OGUTU, S.; WILLIAMS, D. S.; JONES, J.; GUYTON, M.; ASIAMAH, D.; HENDERSON, F.; GRANT, L.; DEBRUCE, M.; JOHNSON, A.; WASHINGTON, S.; CHAWAN, C. B. Selected fruits reduce azoxymethane (AOM)-induced aberrant crypt foci (ACF) in Fisher 344 male rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 5, p. 725-732, May 2007. DOI: 10.1016/j.fct.2006.10.019 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17321025/>. Acesso em: 14 mar. 2022.

BOLHAQUEIRO, A. C. F.; PONSIOEN, B.; BAKKER, B.; KLAASEN, S. J.; KUCUKKOSE, E.; VAN JAARVELD, R. H.; VIVIÉ, J.; VERLAAN-KLINK, I.; HAMI, N.; SPIERINGS, D. C. J.; SASAKI, N.; DUTTA, Z.; BOJ, S. F.; VRIES, R. G. J.;

LANSDORP, P. M.; VAN DE WETERING, M.; VAN OUDENAARDEN, A.; CLEVERS, H.; KRANENBURG, O.; FOIJER, F.; SNIPPERT, H. J. G.; KOPS, G. J. P. L. Ongoing chromosomal instability and karyotype evolution in human colorectal cancer organoids. **Nature Genetics**, v. 51, n. 5, p. 824–834, Apr. 2019. DOI: 10.1038/s41588-019-0399-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31036964/>. Acesso em: 22 out. 2022.

BORODOVITSYNA, O.; FLAMINI, M. D.; CHANDLER, D. J. Acute Stress Persistently Alters Locus Coeruleus Function and Anxiety-like Behavior in Adolescent Rats. **Neuroscience**, v. 373, p. 7-19, Mar. 2018. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.01.020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29341884/>. Acesso em: 02 jan. 2023.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro, 2019.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro, 2022.

BRITO, Alba Souza. Manual de ensaios toxicológicos in vivo. In: **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. São Paulo, 1994. p. 122-122.

BRODER, S. Normal and malignant T cells in the regulation of inflammation and immunity. **Agents and Actions Supplements**, v. 7, p. 134-142, 1980.

BURLAMAQUI, I. M. B.; DORNELAS, C. A.; ALMEIDA, P. R. C.; JAMACARU, F. V. F.; MOTA, D. M. C.; MESQUITA, F. J. C.; DE BRITO, L. A.; VERAS, L. B.; RODRIGUES, L. V. Hepatic repercussions of azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 40, n. 2, p. 137-141, mar./apr. 2013. DOI: 10.1590/s0100-69912013000200010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23752641/>. Acesso em: 24 nov. 2022.

BÜRTIN, F.; MULLINS, C. S.; LINNEBACHER, M. Mouse models of colorectal cancer: Past, present and future perspectives. **World Journal of Gastroenterology**, v. 26, n. 13, p. 1394-1426, Apr. 2020. DOI: 10.3748/wjg.v26.i13.1394. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32308343/>. Acesso em: 26 set. 2022.

CAMPELO DE-SOUZA, A. S.; COSTA-CASAGRANDE, T. A. Animal models for colorectal cancer. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 31, n. 2, jul. 2018. DOI: 10.1590/0102-672020180001e1369. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29972397/>. Acesso em: 28 nov. 2021.

CARETHERS, J. M. Risk factors for colon location of cancer. **Transl Gastroenterol Hepatol**. V. 12, p. 3-76, oct. 2018. DOI: 10.21037/tgh.2018.09.15. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30505963/>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30505963/>. Acesso: 27 set. 2022.

CARETHERS, J. M.; JUNG, B. H. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, v. 149, n. 5, p. 1177-1190, Oct. 2015. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.06.047. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26216840/>. Acesso em: 21 ago. 2022.

CHAN, C. H. F.; COOK, D.; STANNERS, C. P. Increased colon tumor susceptibility in azoxymethane treated CEABAC transgenic mice. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 9, p. 1909-1916, Sep. 2006. DOI: 10.1093/carcin/bgl040. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16632476/>. Acesso em: 13 nov. 2022.

CHEN, J.; HUANG, X-F. The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. **Cancer Biology & Therapy**, v. 8, n. 14, p. 1313-1317, July 2009. DOI: 10.4161/cbt.8.14.8983. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19502780/>. Acesso em: 23 out. 2022.

CHENG, Y.; LING, Z.; LI, L. The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 1, Nov. 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.615056.

CLAPP, N. K.; HENKE, M. A.; LONDON, J. F.; SHOCK, T. L. Enhancement of 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Large Bowel Tumorigenesis in Balb/c Mice by Corn, Soybean, and Wheat Brans. **Nutrition and Cancer**, v. 6, n. 2, p. 77-85, Aug. 1984. DOI: 10.1080/01635588509513810. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6100660/>. Acesso em: 18 nov. 2022.

DE' ANGELIS, J. L.; BOTTARELLI, L.; AZZONI, C.; DE' ANGELIS, N.; LEANDRO, G.; DI MARIO, F.; GAIANI, F.; NEGRI, F. Microsatellite instability in colorectal cancer. **Acta Biomedica Atenei Parmensis**, v. 89, n. 9-S, p. 97-101, Dec. 2018. DOI: 10.23750/abm.v89i9-S.7960. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30561401/>. Acesso em: 31 out. 2022.

DE ROBERTIS, M.; MASSI, E.; POETA, M. L.; CAROTTI, S.; MORINI, S.; CECCHETELLI, L.; SIGNORI, E.; FAZIO, V. M. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. **Journal of Carcinogenesis**, v. 10, n. 9, Mar. 2011. DOI: 10.4103/1477-3163.78279. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21483655/>. Acesso em: 23 jan. 2023.

DE ROSA, M.; PACE, U.; REGA, D.; COSTABILE, V.; DURATURO, F.; IZZO, P.; DELRIO, P. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). **Oncology Reports**, v. 34, n. 3, p. 1087-1096, Sep. 2015. DOI: 10.3892/or.2015.4108. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26151224/>. Acesso em: 24 nov. 2022.

DENARDO, D. G.; COUSSENS, L. M. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: Crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 4, Aug. 2007. DOI: 10.1186/bcr1746. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17705880/>. Acesso em: 12 set. 2022.

DERRY, M. M.; RAINA, K.; AGARWAL, R.; AGARWAL, C. Characterization of azoxymethane-induced colon tumor metastasis to lung in a mouse model relevant to human sporadic colorectal cancer and evaluation of grape seed extract efficacy.

Experimental and Toxicologic Pathology, v. 66, n. 5-6, p. 235-242, Aug. 2014.

DOI: 10.1016/j.etp.2014.02.003. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24670932/>. Acesso em: 19 jan. 2023.

DO AMARAL, L. A. Avaliação dos efeitos de um produto alimentício natural rico em fibras na prevenção e tratamento do CCR em modelo pré-clínico. **Tese de**

Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e

Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Linha de Pesquisa: Tecnologia em

saúde. 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufms.br/handle/123456789/4381>.

Acesso em: 06 fev. 2023.

ENG, J. Sample size estimation: how many individuals should be studied?

Radiology, v. 227, n. 2, p. 309-313, May 2003. DOI: 10.1148/radiol.2272012051.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12732691/>. Acesso em: 10 ago. 2022.

FEARON, E. R. Molecular genetics of colorectal cancer. **Annual Review of**

Pathology: Mechanisms of Disease, v. 6, p. 479-507, Feb. 2011. DOI:

10.1146/annurev-pathol-011110-130235. 2011. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21090969/>. Acesso em: 21 ago. 2022.

FERNANDES, G. O.; JUNIOR, J. J. P.; FRANÇA, M. A. V.; COSTA, J. H. G. Polipose adenomatosa familiar atenuada. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 27, n. 2,

p. 179-184, jun. 2007. DOI: 10.1590/S0101-98802007000200008. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rbc/a/CVsjwJDkf8t3NnZrmtgcwJg/#>. Acesso em: 07 jun. 2022.

FODDE, R. The APC gene in colorectal cancer. **European Journal of Cancer**, v. 38,

n. 7, p. 867-871, May 2002. DOI: 10.1016/s0959-8049(02)00040-0. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11978510/>. Acesso em: 25 jul. 2022.

GELSOMINO, F.; BARBOLINI, M.; SPALLANZANI, A.; PUGLIESE, G.; CASCINU, S.

The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. **Cancer**

Treatment Reviews, v. 51, p. 19-26, Dec. 2016. DOI: 10.1016/j.ctrv.2016.10.005.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27838401/>. Acesso em: 22 set. 2022.

HAGLAND, H. R.; BERG, M.; JOLMA, I. W.; CARLSEN, A.; SØREIDE, K. Molecular pathways and cellular metabolism in colorectal cancer. **Digestive Surgery**, v. 30, n. 1, p. 12-25, Apr. 2013. DOI: 10.1159/000347166. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23595116/>. Acesso em: 22 ago. 2022.

HÅKANSSON, A.; BRÄNNING, C.; MOLIN, G.; ADAWI, D.; HAGSLÄTT, M. L.; NYMAN, M.; JEPPSSON, B.; AHRNÉ, S. Colorectal Oncogenesis and Inflammation in a Rat Model Based on Chronic Inflammation due to Cycling DSS Treatments. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2011, n. 924045, Oct. 2011. DOI: 10.1155/2011/924045. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22007198/>. Acesso em: 10 abr. 2022.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, Jan. 2022. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35022204/>. Acesso em: 13 dez. 2022.

HEINIGER, H. J.; HUEBNER, R. J.; MEIER, H. Effect of allelic substitutions at the hairless locus on endogenous ecotropic murine leukemia virus titers and leukemogenesis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 56, n. 5, p. 1073-1084, May 1976. DOI: 10.1093/jnci/56.5.1073. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/186616/>. Acesso em: 30 jan. 2023

HIAI, H.; MORRISSEY, P.; KHIROYA, R.; SCHWARTZ, R. S. Selective expression of xenotropic virus in congenic HRS/J (hairless) mice. **Nature**, v. 270, n. 5634, p. 247-249, Nov. 1977. DOI: 10.1038/270247a0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/201855/>. Acesso em: 22 nov. 2022.

HICKMAN, D. L.; JOHNSON, J.; VEMULAPALLI, T. H.; CRISLER, J. R.; SHEPHERD, R. Commonly Used Animal Models. **Principles of Animal Research for Graduate and Undergraduate Students**, p. 117–175, Jan. 2017. DOI:

10.1016/B978-0-12-802151-4.00007-4. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7150119/>. Acesso em: 12 jun. 2022.

HIGA, R. A.; AYDOS, R. D.; SILVA, I. S.; RAMALHO, R. T.; SOUZA, A. S. D. Estudo da ação antineoplásica da *Tabebuia avellanedae* (Ipê-Roxo) na carcinogênese induzida pelo azoximetano em camundongos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 125-128, abr. 2011. DOI: 10.1590/S0102-86502011000200009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/acb/a/cYnrJcB58Qh5yT5NthBwwNQ/?lang=en>. Acesso em: 23 dez. 2022.

JONES, S. M.; JOHNSON, K. R.; YU, H.; ERWAY, L. C.; ALAGRAMAM, K. N.; POLLAK, N.; JONES, T. A. A quantitative survey of gravity receptor function in mutant mouse strains. **JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, v. 6, n. 4, p. 297-310, Dec. 2005. DOI: 10.1007/s10162-005-0009-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16235133/>. Acesso em: 31 out. 2022.

KAWAGUCHI, Y.; KOPETZ, S.; NEWHOOK, T. E.; DE BELLIS, M.; CHUN, Y. S.; TZENG, C-W. D.; ALOIA, T. A.; VAUTHEY, J-N. Mutation status of Ras, TP53, and Smad4 is superior to mutation status of Ras alone for predicting prognosis after resection of colorectal liver metastases. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 19, p. 5843-5851, Oct. 2019. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0863. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31221662/>. Acesso em: 27 set. 2022.

KHOT, M.; SREEKUMAR, D.; JAHAGIRDAR, S.; KULKARNI, A.; HARI, K.; FASEELA, E. E.; SABARINATHAN, R.; JOLLY, M. K.; SENGUPTA, K. Twist1 induces chromosomal instability (CIN) in colorectal cancer cells. **Human Molecular Genetics**, v. 29, n. 10, p. 1673-1688, Jun. 2020. DOI: 10.1093/hmg/ddaa076. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32337580/>. Acesso em: 10 ago. 2022.

KOBAEC-LARSEN, M.; FENGER, C.; RITSKES-HOITINGA, J. Secondary effects induced by the colon carcinogen azoxymethane in BDIX rats. **Journal of Pathology, Microbiology and Immunology**, v. 112, n. 6, p. 319-329, Oct. 2004. DOI:

10.1111/j.1600-0463.2004.apm1120601.x. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15511268/>. Acesso em: 12 set. 2022.

KIM, J. J.; SHAJIB, M. S.; MANOCHA, M. M.; KHAN, W. I. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. **Journal of Visualized Experiments**, v. 1, n. 60, p. 1-6, Feb. 2012. DOI: 10.3791/3678. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22331082/>. Acesso em: 03 Jan 2023.

KRAEUTER, A. K.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. **Methods in Molecular Biology**, v. 1916, p. 69-74, Dec. 2018. DOI: 10.1007/978-1-4939-8994-2_4. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30535682/>. Acesso em: 14 nov. 2022.

KUIPERS, E. J.; GRADY, W. M.; LIEBERMAN, D.; SEUFFERLEIN, T.; SUNG, J. J.; BOELEN, P. G.; VAN DE VELDE, C. J. H.; WATANABE, T. Colorectal cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, p. 15.065, Nov. 2015. DOI: 10.1038/nrdp.2015.65. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27189416/>. Acesso em: 13 ago. 2022

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 Cirúrgica Brasileira**, v. 13, n. 3, p. 177-182, jul. 1998. DOI: 10.1590/S0102-86501998000300008. Disponível em <https://www.scielo.br/j/acb/a/qBbP3bmN6NhmJrcDJHvVX3m/?lang=pt>. Acesso em: 10 set. 2022.

LASSANCE, F. A. C.; LASSANCE, P. M. S.; GARICOCHEA, B.; COTTI, G. C. C.; CUTAIT, R. Câncer colorretal e síndromes hereditárias. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, v. 1, n. 1, abr. 2012. *E-book*. Disponível em:
<https://portalrevistas.ucb.br/index.php/rmsbr/article/view/3204>. Acesso em: 14 set. 2022.

LEYSTRA, A. A.; CLAPPER, M. L. Gut microbiota influences experimental outcomes in mouse models of colorectal cancer. **Genes**, v. 10, n. 11, Nov. 2019. DOI:

10.3390/genes10110900. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31703321/>. Acesso em: 10 dez. 2022.

LIEBSCH, G.; MONTKOWSKI, A.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R. Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. **Behavioural Brain Research**, v. 94, n. 2, p. 301–310, Aug. 1998. DOI: 10.1016/s0166-4328(97)00198-8. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9722280/>. Acesso em: 13 ago. 2022.

LIMEIRAS, S. M. DE A. Efeito do extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum* sobre a carcinogênese colorretal induzida por 1,2-dimetil-hidrazina. **Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**. Agosto de 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufms.br/handle/123456789/2939>. Acesso em: 22 mar. 2023.

LOTFOLLAHZADEH, S.; RECIO-BOILES, A.; CAGIR, B. Colon Cancer. **StatPearls [Internet]**, Dez. 2022. *E-book*. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470380/>. Acesso em: 11 set. 2022.

LIU, Z.; XIAO, Y.; ZHOU, Z.; MAO, X.; CAI, J.; XIONG, L.; LIAO, C.; HUANG, F.; LIU, Z.; SHEIKH, M. S. A.; PLUTZKY, J.; HUANG, H.; YANG, T.; DUAN, Q. Extensive metabolic disorders are present in APC(min) tumorigenesis mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 427, p. 57–64, May 2016. DOI:

10.1016/j.mce.2016.03.004. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26948948/>. Acesso em 13 jan. 2023.

LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; BRETSCHER, A.; PLOEGH, H.; AMON, A. *Biologia Celular e Molecular*. 7ª edição. **ARTMED, Porto Alegre**, 2014.

MA, Q.; HOPER, M.; ANDERSON, N.; ROWLANDS, J. B. Effect of supplemental L-arginine in a chemical-induced model of colorectal cancer. **World Journal of**

Surgery, v. 20, n. 8, p. 1087-1091, Oct. 1996. DOI: 10.1007/s002689900165.
Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8798369/>. Acesso em: 29 ago. 2022.

MACHADO, V. F.; PARRA, R. S.; LEITE, C. A.; MINTO, S. B.; CUNHA, T. M.; CUNHA, F DE Q.; GARCIA, S. B.; FEITOSA, M. R.; DA ROCHA, J. J. R.; FERES, O. Experimental model of rectal carcinogenesis induced by n-methyl-n-nitrosoguanidine in mice with endoscopic evaluation. **International Journal of Medical Sciences**, v. 17, n. 16, p. 2505-2510, Sep. 2020. DOI: 10.7150/ijms.48231. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33029093/>. Acesso em: 21 set. 2022.

MALKI, A.; ELRUZ, R. A.; GUPTA, I.; ALLOUCH, A.; VRANIC, S.; AL MOUSTAFA, A-E. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 130, Dec. 2020. DOI: 10.3390/ijms22010130. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33374459/>. Acesso em: 20 jan. 2023.

MARKS, G.; AYDOS, R. D. Apoptotic effects of inositol hexaphosphate on biomarker Itpr3 in induced colon rat carcinogenesis. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 157-164, abr. 2008. DOI: 10.1590/S0102-86502008000200008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18372961/>. Acesso em: 24 fev. 2023.

MÁRMOL, I.; SÁNCHEZ-DE-DIEGO. C.; DIESTE, A. P.; CERRADA, E.; YOLDI, M. J. R. Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 197, Jan. 2017. DOI: 10.3390/ijms18010197. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28106826/>. Acesso em: 30 jan. 2023.

MARTINEZ, C. A. R.; CORDEIRO, A. T.; PRIOLLI, D. G.; MIRANDA, D. D. DA C.; JÚNIOR, W. B.; MARGARIDO, N. F.; RIBEIRO, M. L. Avaliação da expressão tecidual do gene de reparo MLH1 e dos níveis de dano oxidativo ao DNA em doentes com câncer colorretal. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 29, n. 3, set. 2009. DOI: 10.1590/S0101-98802009000300004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbc/a/hb3RGBZT6qv4DxP9Tg6gyXK/?lang=pt>. Acesso em: 21 jun. 2022.

MEIER, H.; MYERS, D. D.; HUEBNER, R. J. Genetic control by the *hr* -locus of susceptibility and resistance to leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 63, n. 3, p. 759–766, July 1969. DOI: 10.1073/pnas.63.3.759.

MORRISSEY, P. J.; PARKINSON, D. R.; SCHWARTZ, R. S.; WAKSAL, S. D. Immunologic abnormalities in HRS/J mice. I. Specific deficit in T lymphocyte helper function in a mutant mouse. **The Journal of Immunology**, v. 125, n. 4, p. 1558-1562, Oct. 1980. DOI: 10.4049/jimmunol.125.4.1558. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article-abstract/125/4/1558/12648/Immunologic-abnormalities-in-HRS-J-mice-I-Specific?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 05 set. 2022.

NAKAGAMA, H.; NAKANISHI, M.; OCHIAI, M. Modeling human colon cancer in rodents using a food-borne carcinogen, PhIP. **Cancer Science**, v. 96, n. 10, p. 627-636, Oct. 2005. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2005.00107.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16232193/>. Acesso em: 27 jul. 2022.

NARISAWA, T. WONG, C. Q.; MARONPOT, R. R.; WEISBURGER, J. H. Large Bowel Carcinogenesis in Mice and Rats by Several Intrarectal Doses of Methylnitrosourea and Negative Effect of Nitrite Plus Methylurea. **Cancer Research**, v. 36, n. 2 Pt 1, p. 505-510. v. 36, Feb.1976. DOI: 10.1007/BF00402475. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6590558/>. Acesso em: 30 ago. 2022.

NEUFERT, C.; BECKER, C.; NEURATH, M. F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. **Nature Protocols**, v. 2, n. 8, p. 1998-2004, Aug. 2007. DOI: 10.1038/nprot.2007.279. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17703211/>. Acesso em: 10 jun. 2022

NEUFERT, C.; HEICHLER, C.; BRABLETZ, T.; SCHEIBE, K.; BOONSANAY, V.; GRETEN, F. R.; NEURATH, M. F. Inducible mouse models of colon cancer for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression and lymph node metastasis. **Nature Protocols**, v. 16, n. 1, p. 61-85, Jan. 2021. DOI:

10.1038/s41596-020-00412-1. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33318692/>. Acesso em: 04 mar. 2023.

NEVES, M. B. Efeito do exercício físico aeróbico e resistido no desenvolvimento do câncer colorretal em camundongos. 2021. 117 f. **Tese (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul**, Campo Grande 2021. Disponível em:

<https://repositorio.ufms.br/handle/123456789/3627>. Acesso em: 23 fev. 2023.

NICKEN, P.; SCHRODER, B.; KEUTZ, A. V.; BREVES, G.; STEINBERG, P. The colon carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) is actively secreted in the distal colon of the rat: an integrated view on the role of PhIP transport and metabolism in PhIP-induced colon carcinogenesis. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 5, p. 895–904, May 2013. DOI: 10.1007/s00204-012-1006-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23306951/>. Acesso em: 16 fev. 2023.

OGATA, D. C. GRECA, F. H.; LUZ, M. A.; IOSHII, S. O.; TOMASICH, F. D. S. Foco de criptas aberrantes e câncer da junção colorretal: análise da presença de lesões precoces microscópicas na periferia do câncer colorretal e correlação com a expressão da β -catenina e Ki-67. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, n. 2, p. 114-120, abr. 2010. DOI: 10.1590/S0100-69912010000200008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20549101/>. Acesso em: 27 ago. 2022.

PAN, Q.; LOU, X.; ZHANG, J.; ZHU, Y.; LI, F.; SHAN, Q.; CHEN, X.; XIE, Y.; SU, S.; WEI, H.; LIN, L.; WU, L.; LIU, S. Genomic variants in mouse model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate improperly mimic human colorectal cancer. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 25, Dec. 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-00057-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28154415/>. Acesso em: 21 set. 2022.

PANTALEÃO, C.; LUCHS, A. Câncer e modelos experimentais de tumores murinos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, p. 439-445, out. 2010. E-book.

Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/32599>. Acesso em: 26 ago. 2022.

PAPANIKOLAOU, A.; WANG, Q. S.; PAPANIKOLAOU, D.; WHITELEY, H. E.; ROSENBERG, D. W. Sequential and morphological analyses of aberrant crypt foci formation in mice of differing susceptibility to azoxymethane-induced colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 8, p. 1567–1572, Aug. 2000. DOI: 10.1093/carcin/21.8.1567. Disponível em: <https://academic.oup.com/carcin/article/21/8/1567/4033362>. Acesso em: 28 fev. 2023

PARANG, B.; BARRETT, C. W.; WILLIAMS, C. S. AOM/DSS Model of Colitis-Associated Cancer. **Methods in Molecular Biology**, v. 1422, p. 297-307, June 2016. DOI: 10.1007/978-1-4939-3603-8_26. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27246042/>. Acesso em: 19 mar. 2023.

PARK, Y. H.; KIM, N.; SHIM, K. S.; CHOI, Y. J.; NAM, R. H.; CHOI, Y. J.; HAM, M. H.; SUH, J. H.; LEE, S. M.; LEE, C. M.; YOON, H.; LEE, H. S.; LEE, D. H. Adequate Dextran Sodium Sulfate-induced Colitis Model in Mice and Effective Outcome Measurement Method. **Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 4, p. 260–267, Dec. 2015. DOI: 10.15430/JCP.2015.20.4.260. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26734588/>. Acesso em: 22 ago.

PATEL, G.; PATIL, P. Worrisome Trends in Young-Onset Colorectal Cancer: Now Is the Time for Action. **Indian Journal of Surgical Oncology**, v. 13, n. 3, p. 446-452, Sep. 2022. DOI: 10.1007/s13193-022-01496-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36187542/>. Acesso em: 12 out. 2022

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, F. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, Aug. 1985. DOI: 10.1016/0165-0270(85)90031-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2864480/>. Acesso em: 13 nov. 2022.

PERŠE, M.; CERAR, A. Dimethylhydrazine model is not appropriate for evaluating effect of ethanol on colorectal cancer. **Revista Espanola de Enfermedades Digestivas**, v. 99, n. 8, p. 463-466, Aug. 2007. DOI: 10.4321/s1130-01082007000800007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18020863/>. Acesso em: 16 jul. 2022

PERŠE, M.; CERAR, A. Morphological and Molecular Alterations in 1,2 Dimethylhydrazine and Azoxymethane Induced Colon Carcinogenesis in Rats. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, n. 473964, p. 1–14, Dec. 2010. DOI: 10.1155/2011/473964. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21253581/>. Acesso em: 30 nov. 2022.

PILLERON, S. CABASAG, C. J.; FERLAY, J.; BRAY, F.; LUCIANI, S.; ALMONTE, M.; PIÑEROS, M. Cervical cancer burden in Latin America and the Caribbean: Where are we? **International Journal of Cancer**, v. 147, n. 6, p. 1638-1648, Sep. 2020. DOI: 10.1002/ijc.32956. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32150288/>. Acesso em: 25 ago. 2022.

PINO, M. S.; CHUNG, D. C. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2059-2072, June 2010. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.12.065. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20420946/>. Acesso em: 31 out. 2022.

PINO, M. S.; CHUNG, D. C. Microsatellite instability in the management of colorectal cancer. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, v. 5, n. 3, p. 385-399, June 2011. DOI: 10.1586/egh.11.25. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21651356/>. Acesso em: 29 out. 2022.

PRITCHARD, C. C.; JOAQUIN MATEO, J.; WALSH, M. F.; DE SARKAR, N.; ABIDA, W.; BELTRAN, H.; GAROFALO, A.; GULATI, R.; CARREIRA, S.; EELES, R.; ELEMENTO, O.; RUBIN, M. A.; ROBINSON, D.; LONIGRO, R.; HUSSAIN, M.; CHINNAIYAN, A.; VINSON, J.; FILIPENKO, J.; GARRAWAY, L.; TAPLIN, M. E.; ALDUBAYAN, S.; HAN, G. C.; BEIGHTOL, M.; MORRISSEY, C.; NGHIEM, B.; CHENG, H. H.; MONTGOMERY, B.; WALSH, T.; CASADEI, S.; BERGER, M.;

ZHANG, L.; ZEHIR, A.; VIJAI, J.; SCHER, H. I.; SAWYERS, C.; SCHULTZ, N.; KANTOFF, P. W.; SOLIT, D.; ROBSON, M.; ALLEN, E. M. V.; OFFIT, K.; JOHANN DE BONO, J.; NELSON, P. S. Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 5, p. 443-453, Aug. 2016. DOI: 10.1056/NEJMoa1603144. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27433846/>. Acesso em: 18 nov. 2022.

REICHMANN, F.; HASSAN, A. M.; FARZI, A.; JAIN, P.; SCHULIGOI, R.; HOLZER, P. Dextran sulfate sodium-induced colitis alters stress-associated behaviour and neuropeptide gene expression in the amygdala-hippocampus network of mice. **Scientific Reports**, v. 5, n. 9970, June 2015. DOI: 10.1038/srep09970. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26066467/>. Acesso em: 23 ago. 2022.

REN, J.; SUI, H.; FANG, F.; LI, Q.; LI, B. The application of Apc^{Min/+} mouse model in colorectal tumor researches. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 145, n. 5, p. 1111-1122, May 2019. DOI: 10.1007/s00432-019-02883-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30887153/>. Acesso em: 07 mar. 2023.

RESKE-KUNZ, A. B.; SCHEID, M. P.; BOYSE, E. A. Disproportion in T-cell subpopulations in immunodeficient mutant hr/hr mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 149, n. 1, p. 228-233, Jan. 1979. DOI: 10.1084/jem.149.1.228. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/310859/>. Acesso em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/310859/>. Acesso em: 09 set. 2022.

ROSENBERG, D. W.; GIARDINA, C.; TANAKA, T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 2, p. 183-196, Feb. 2009. DOI: 10.1093/carcin/bgn267. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19037092/>. Acesso em: 03 jan. 2023.

SEO, J. H. Treadmill exercise alleviates stress-induced anxiety-like behaviors in rats. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 14, n. 5, p. 724-730, Oct. 2018. DOI: 10.12965/jer.1836442.221. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30443516/>. Acesso em: 09 jun. 2022

SILVA JUNIOR, U. N. D.; BOUTRIK, A.; GONÇALVES, A. F.; NEVES, M. B.; ALVES, G. R.; FAGUNDES, L. S.; ABREU, A. C.; AYDOS, R. D.; RAMALHO, R. T.

Assessment of stress and anxiety in mice with colorectal cancer submitted to physical exercise. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 37, n. 5, ago. 2022. DOI:

10.1590/acb370508. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35976343/>.

Acesso em: 24 mar. 2023.

SIMON, K. Colorectal cancer development and advances in screening. **Clinical**

Interventions in Aging, v. 11, p. 967-976, July 2016. DOI: 10.2147/CIA.S109285.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27486317/>. Acesso em: 30 ago.

2022.

SNIDER, A. J.; BIALKOWSKA, A. B.; GHALEB, A. M.; YANG, V. W.; OBEID, L. M.;

HANNUN, Y. A. Murine Model for Colitis-Associated Cancer of the Colon. **Methods**

in Molecular Biology, v. 1438, n. 2, p. 245-254, May 2016. DOI: 10.1007/978-1-

4939-3661-8_14. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27150094/>. Acesso

em: 10 maio 2022.

SOARES, V. M. DO C. O preconceito com coloproctologia: revisão de literatura.

Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação, v. 8, n. 3, mar.

2022. DOI: 10.51891/rease.v8i3.4585. Disponível em:

<https://periodicorease.pro.br/rease/article/view/4585>. Acesso em: 28 jun. 2022.

STASTNA, M.; JANECKOVA, L.; HRCKULAK, D.; KRIZ, V.; KORINEK, V. Human

colorectal cancer from the perspective of mouse models. **Genes**, v. 10, n. 10, p. 1-

33, Oct. 2019. DOI: 10.3390/genes10100788. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31614493/>. Acesso em: 17 ago. 2022.

STOFFEL, E. M.; KOEPPE, E.; EVERETT, J.; ULINTZ, P.; KIEL, M. OSBORNE, J.;

WILLIAMS, L.; HANSON, K.; GRUBER, S. B.; ROSEK, L. S.; Germline Genetic

Features of Young Individuals with Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, v. 154, n.

4, p. 897- 905.e1, mar. 2018. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.11.004. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29146522/>. Acesso em: 13 nov. 2022.

SUN, W.; GAO, J.; YANG, B.; CHEN, X.; KANG, N.; LIU, W. Protocol for colitis-associated colorectal cancer murine model induced by AOM and DSS. **STAR Protocols**, v. 4, n. 1, Feb. 2023. DOI: 10.1016/j.xpro.2023.102105. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36853726/>. Acesso em: 21 abr. 2023.

SUZU, S.; TANAKA-DOUZONO, M.; NOMAGUCHI, K.; YAMADA, M.; HAYASAWA, H.; KIMURA, F.; MOTOYOSHI, K. p56dok-2 as a cytokine-inducible inhibitor of cell proliferation and signal transduction. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 19, p. 5114–5122, Oct. 2000. DOI: 10.1093/emboj/19.19.5114. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11013214/>. Acesso em: 15 jul. 2022.

TESTA, U; PELOSI, E.; CASTELLI, G. Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor progression, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells. **Medical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 31, 2018. DOI: 10.3390/medsci6020031. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29652830/>. Acesso em: 23 set. 2022.

THAKER, A. I.; SHAKER, A.; RAO, M. S.; CIORBA, M. A. Modeling colitis-associated cancer with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS). **Journal of Visualized Experiments**, n. 67, Sep. 2012. DOI: 10.3791/4100. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22990604/>. Acesso em: 10 maio 2022.

TONG, Y.; YANG, W.; KOEFFLER, H. P. Mouse models of colorectal cancer. **Chinese Journal of Cancer**, v. 30, n. 7, p. 450–462, July 2011. DOI: 10.5732/cjc.011.10041. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21718591/>. Acesso em 21 abr. 2022.

VENKATACHALAM, K.; VINAYAGAM, R.; ANAND, M. A. V.; ISA, N. M.; PONNAYIAN, R. Biochemical and molecular aspects of 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis: A review. **Toxicology Research**, v. 9, n. 1, p. 2-18, Mar. 2020. DOI: 10.1093/toxres/tfaa004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32440334/>. Acesso em: 31 maio 2022.

WILCOCK, J.; BROADHURST, P.L. Strain differences in emotionality: Open-field and conditioned avoidance behavior in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 63, n. 2, p. 335–338, 1967.

DOI:10.1037/h0024363. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6050043/>.
Acesso em: 22 jul. 2022.

WIRTZ, S.; POPP, V.; KINDERMANN, M.; GERLACH, K.; WEIGMANN, B.;
FICHTNER-FEIGL, S.; NEURATH, M. F. Chemically induced mouse models of acute
and chronic intestinal inflammation. **Nature Protocols**, v. 12, n. 7, p. 1295-1309, July
2017. DOI: 10.1038/nprot.2017.044. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28569761/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

9 ANEXO

ANEXO A- Certificado Da Comissão De Ética No Uso De Animais CEUA da UFMS.



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Modelo de câncer colorretal em camundongos *hairless* induzidos com azoximetano (AOM) associado a colite", registrada com o nº 1.204/2022, sob a responsabilidade de RONDON TOSTA RAMALHO - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 1ª reunião ordinária do dia 09/02/2022.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/06/2022 a 28/02/2025
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo <i>Hairless</i>
Nº de animais	140
Peso/Idade	20 a 30g / aprox 8 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério central - UFMS

Fábio José Carvalho Faria
Coordenador da CEUA/UFMS
Campo Grande, 10 de fevereiro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Fabio Jose Carvalho Faria, Presidente de Comissão**, em 10/02/2022, às 16:31, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3082470** e o código CRC **FD256757**.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone: (67) 3345-7925

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

10 APÊNDICE

APÊNDICE A - Avaliação dos animais durante os ciclos de DSS.

Grupos	CICLO 1				CICLO 2				CICLO 3			
	Consistência das fezes			Sangramento	Consistência das fezes			Sangramento	Consistência das fezes			Sangramento
	Nor mal	Mole	Diarreia		Normal	Mole	Diarreia		Normal	Mole	Diarreia	
Controle	27	1	0	0	28	0	0	0	28	0	0	0
AOM2	28	0	0	0	28	0	0	0	26	2	0	0
AOM1DSS	0	13	15	19	1	3	24	12	1	3	23	17
AOM2DSS	0	4	24	19	1	1	26	14	0	1	27	15
DSS	0	18	10	18	0	0	28	18	1	2	25	17

APÊNDICE B– Média da massa corporal dos grupos de animais durante os ciclos de dextran sulfato de sódio.

GRUPOS	CICLO 1		CICLO 2		CICLO 3	
	Média da massa corporal inicial	Média da massa corporal final	Média da massa corporal inicial	Média da massa corporal final	Média da massa corporal inicial	Média da massa corporal final
Controle	31,43g	32,71 g	32,64g	34,86	36,10g	36,10g
AOM2	31,21g	33,36g	34,11g	35,43g	36,19g	36,62g
AOM1DSS	33,14g	33,64g	35,71g	34,04g	36,95g	36,10g
AOM2DSS	31,18g	31,86g	34,32g	32,79g	36,00g	35,71g
DSS	30,96g	32,39g	34,82g	32,75g	36,67g	35,57g

g = gramas.

APÊNDICE C– Média do número de pólipos dos animais em diferentes semanas de indução tumoral.

	5 Semanas	10 Semanas	15 Semanas	20 Semanas
Controle	0±0	0±0	0,28 ± 0,48	0,14±0,37
AOM2	0,14±0,37	0,42±0,79	0,42±0,53	2,42±1,51
AOM1DSS	0,85±0,69	2,29±0,75	5,14 ±1,57	12,28±2,87
AOM2DSS	1±1,15	4,14±1,21	12,14 ±5,58	20,42±7,04
DSS	0,14±0,37	0,71±0,75	2,28±1,38	2±1,41