

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

CÉSAR AUGUSTO SOBRINHO

**CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MOLECULAR DO ESTRESSE
DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO NA PROGRESSÃO DA
CARCINOGENESE COLORRETAL ASSOCIADA A COLITE INDUZIDA POR
AZOXIMETANO/DEXTRAN SULFATO DE SÓDIO EM CAMUNDOGOS
*HAIRLESS.***

**CAMPO GRANDE
2024**

CÉSAR AUGUSTO SOBRINHO

**CARACTERIZAÇÃO GÊNICA DO ESTRESSE DO RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO NA PROGRESSÃO DA CARCINOGENESE EM
MODELO DE CÂNCER COLORRETAL ASSOCIADA A COLITE INDUZIDOS
COM AZOXIMETANO/ DEXTRAN SULFATO DE SÓDIO EM
CAMUNDOGOS *HAIRLESS*.**

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

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

Orientador: Prof. Dr. Durval Batista Palhares.

Coorientador: Prof. Dr. Rondon Tosta Ramalho.

**CAMPO GRANDE
2024**

DEDICATÓRIA

À minha amada esposa, **Joelma**, e aos meus dois filhos queridos, **Gabriel** e **Rafael**. As três pessoas mais importantes em minha vida, por quem tenho eterna gratidão por serem tudo o que realmente eu preciso para viver bem neste mundo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus**, nosso Pai celestial, por ter me dado a oportunidade de vir a este mundo, com saúde, com capacidade, mas acima de tudo, com muita vontade de ser uma pessoa cada vez melhor. Agradeço a ele por ter me concedido as condições necessárias para cursar medicina na nossa querida Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), apesar de ser oriundo de uma família humilde e sem recursos. Obrigado Senhor por ter me dado uma família maravilhosa e cúmplice de todos os meus projetos de vida. Obrigado por ter me concedido também alguns amigos incondicionais, com os quais posso contar sempre que preciso.

Agradeço à **minha família**, por confiar em mim e me apoiar a todo tempo, especialmente nos momentos de dificuldade e desânimo que diversas vezes passei ao longo da pesquisa. Obrigado a vocês, meus amores, por me ensinar lições de amor e resiliência, e por tolerarem silentes a minha ausência e os meus momentos de falta de paciência.

À minha esposa **Joelma**, minha melhor amiga e companheira de uma vida toda, que está ao meu lado desde o início desse projeto. Obrigado por acreditar em mim e me impulsionar na direção dos meus objetivos.

Aos meus filhos, **Gabriel e Rafael**, criaturas que Deus confiou a mim e a minha esposa, com quem tenho a honra de compartilhar a convivência, experiências dessa vida, e ensinamentos que aprendi, e que também tenho tido a oportunidade de repassar a eles. Vocês são e sempre serão minha verdadeira fonte de inspiração para os projetos de nossas vidas. Joelma, Gabriel e Rafael, o meu amor por vocês é tamanho que essa dimensão terrena não pode definir ou quantificar, pois transcende os portões desse mundo físico. O carinho que tenho por vocês três está guardado em meu coração e será levado para toda a eternidade.

Ao **Prof. Dr. Rondon Tosta Ramalho**, do Laboratório de Carcinogênese Experimental, por ter me aceitado, inicialmente como seu orientado, e posteriormente por ser o meu coorientador. Prof. Rondon, sou-lhe muito grato por ter me direcionado a essa linha de pesquisa, e por fornecer o embasamento intelectual deste projeto. Agradeço muito por ter me apoiado nas horas de dificuldade e ter me tranquilizado nos momentos em que o desânimo e a incerteza tentavam arrombar a porta da minha tranquilidade, ocasiões em que o senhor soube afugentá-los com sua calma e conhecimentos oportunos.

Ao **Prof. Dr. Durval Batista Palhares**, por ter me acolhido como orientado na readaptação formal da pós-graduação, ter confiado em mim, e me apoiado durante o desenvolvimento do nosso trabalho. Meu profundo agradecimento por ter me dado a honra de ter sido seu orientado e por ter contribuído com a minha formação acadêmica.

Ao **Prof. Dr. Almir de Sousa Martins**, por ter me ensinado muito durante o período em que trabalhamos juntos no Laboratório de Patologia Molecular. Por ter contribuído com seu conhecimento em biologia molecular, indispensáveis para que essa pesquisa alcançasse seu termo de forma satisfatória. Professor Almir, sou-lhe eternamente grato por ter nos acolhido no seio de sua família e ter nos estendido sua mão amiga e confortadora nos momentos pessoais mais difíceis de nossas vidas.

Ao **Prof. Dr. Luiz Carlos Takita**, médico patologista, e meu amigo, que aceitou realizar a análise das lâminas de histologia, contribuindo muito para que esse projeto pudesse chegar ao fim. Agradeço por dispor do seu precioso tempo para me ajudar a concluir meu trabalho, produzindo imagens histopatológicas e laudos simplesmente admiráveis.

Ao **Alexandre Moreira de Almeida**, colega e amigo do curso de mestrado, que muito me ajudou com a elaboração de gráficos e ilustrações da pesquisa, e também com os cuidados dispensados aos nossos camundongos. Meu muito obrigado a você. Sou grato a Deus por ter permitido que nossos caminhos se cruzassem de uma maneira fraterna e cooperativa. Muito obrigado pela sua ajuda e amizade, amigo.

À acadêmica de medicina e iniciante científica, **Maytana Roberta Taschin Grigolo** que me ajudou com o manejo dos animais. Você teve um papel importante na execução desse trabalho. Sou muito grato a você.

Ao colega e amigo de doutorado, o médico veterinário **Antônio Carlos de Abreu**, por ter prestado assistência, ter trabalhado e nos orientado nos dias de eutanásia.

Ao **IAPES** (Instituto de Assistência e Pesquisa em Educação e Saúde) pelo suporte financeiro do projeto.

A todos os integrantes do biotério central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, por nos acompanhar e orientar no manejo dos animais de laboratório, antes deles serem levados para o Laboratório de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen) – FAMED/UFMS.

EPÍGRAFE

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos ou as dificuldades. Se estivermos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho”.

(Dalai Lama)

RESUMO

Objetivo: Esse trabalho teve como objetivo principal caracterizar a evolução histopatológica e molecular do estresse do retículo endoplasmático (ERE) em modelo animal de experimentação de câncer colorretal associado a Azoximetano (AOM) e colite induzida por Dextran Sulfato de Sódio (DSS).

Método: O trabalho foi realizado na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, no período compreendido entre março de 2021 até janeiro de 2024. O presente estudo foi desenvolvido em 84 camundongos da raça *Hairless*. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: Grupo 1 (n=28) – Controle negativo; Grupo 2 (n=28) – Recebeu 1 dose de AOM intraperitoneal (IP) no início da 3ª semana e DSS a 2,5% na água de beber, por 7 dias consecutivos, na 2ª, 5ª e 8ª semanas e Grupo 3 (n=28) – Recebeu 2 doses de AOM IP no início da 3ª e 4ª semanas e DSS a 2,5% na água de beber, por 7 dias consecutivos, na 2ª, 5ª e 8ª semanas. Eutanásias foram realizadas em 4 momentos, nos finais das 5ª, 10ª, 15ª e 20ª semanas, respectivamente. Os cólons foram explantados, divididos em dois fragmentos de ~ 1 cm, devidamente armazenados, ou em formalina tamponada (10%) para análises histopatológicas, ou preservação imediata em nitrogênio líquido, com posterior armazenamento a -80°C, para posterior extração de RNA total, e avaliação da expressão gênica por RT-qPCR dos genes-alvos do estresse do retículo endoplasmático (ERE), codificadores das proteínas IRE1- α , PERK, ATF6 e CHOP, envolvidos na Resposta Proteica Desdobrada (UPR – Unfolded Protein Response) na carcinogênese colorretal associada à colite.

Resultados: Os animais tratados com AOM/DSS desenvolveram lesões pré-neoplásicas associadas a colite, nas células do tecido colorretal. Os controles (G1) apresentaram perfis progressivos na expressão relativa de cada gene-alvo analisado, correspondendo à cronologia das semanas e das idades dos animais. Os grupos sob intervenção, G2 (1 AOM + 3 DSS) e G3 (2 AOM + 3 DSS), apresentaram sub-expressão inicial dos mRNAs de IRE1- α , PERK, ATF6 e CHOP, seguida de discreto aumento nas expressões dos genes alvos, sem recuperação dos níveis controles, exceto o grupo G3, cujo gene-alvo ATF6, inicialmente apresentou discreta sub-expressão, seguida de supra-expressão em relação aos níveis iniciais da 5ª semana.

Conclusão: O presente modelo experimental em camundongo *Hairless* apresentou parâmetros biométricos e histopatológicos, característicos de lesões inflamatórias e pré-neoplásicas, com apresentação de pólipos pré-carcinogênicos, típicos de evolução experimental de câncer colorretal (CCR), pelo uso combinado de AOM/DSS. As expressões relativas de mRNAs para os genes IRE1- α , PERK, ATF6 e CHOP apresentaram um perfil de aumentos progressivos, sucessivamente, para cada respectiva semana do protocolo experimental no grupo controle, o que sugere uma influência fisiológica natural do envelhecimento animal sobre a expressão destes genes reguladores do ERE. Por outro lado, as expressões relativas dos mRNAs-alvo foram moduladas negativamente na maioria dos grupos experimentais CCR associados à colite sob tratamento com AOM/DSS. Nossos achados são compatíveis com a ativação de mecanismos adaptativos de sobrevivência e proliferação celular, através de estímulos inflamatórios e carcinogênicos, aplicados ao modelo animal do presente trabalho.

Palavras-chave: Azoximetano. Dextran Sulfato de Sódio. Câncer colorretal. Colite. Estresse do retículo endoplasmático. Resposta proteica desdobrada. Vias de sinalização do CCR.

ABSTRACT

Objective: The main objective of this work was to characterize the histopathological and molecular evolution of endoplasmic reticulum stress (ERE) in an experimental animal model of colorectal cancer associated with Azoxymethane (AOM) and colitis induced by Dextran Sodium Sulfate (DSS).

Methodology: The work was carried out at the Faculty of Medicine of the Federal University of Mato Grosso do Sul, in Campo Grande, from March 2021 to January 2024. The present study was carried out on 84 Hairless mice. The animals were distributed into 3 groups: Group 1 – Negative control (n=28); Group 2(n=28) – Received 1 dose of intraperitoneal (IP) AOM at the beginning of the 3rd week and 2.5% DSS in drinking water, for 7 consecutive days, in the 2nd, 5th and 8th weeks and Group 3(n=28) – Received 2 doses of AOM IP and 2.5% DSS in drinking water, at the beginning of the 3rd and 4th weeks, for 7 consecutive days, in the 2nd, 5th and 8th weeks. Euthanasia was performed in 4 moments, at the end of the 5th, 10th, 15th and 20th weeks, respectively). Colons were explanted, divided into two fragments of ~ 1 cm, duly stored, either in buffered formalin (10%) for histopathological analysis, or immediate preservation in liquid nitrogen with subsequent storage at -80C, for subsequent extraction of total RNA, and evaluation of relative expression by RT-qPCR of ERS target genes IRE1- α , PERK, ATF6 and CHOP, involved in the Unfolded Protein Response (UPR) of colorectal carcinogenesis associated with colitis.

Results: Animals treated with AOM/DSS developed pre-neoplastic lesions associated with colitis in colorectal tissue cells. Controls (G1) presented progressive profiles in the relative expression of each target gene analyzed, corresponding to the chronology of weeks and ages of the animals. The groups under intervention, G2 (1 AOM + 3 DSS) and G3 (2 AOM + 3 DSS), showed initial under-expression of IRE1- α , PERK, ATF6 and CHOP mRNAs, followed by a slight increase in the expressions of target genes, without recovery of control levels, except for the G3 group (2 AOM + 3 DSS), whose target gene ATF6 initially showed slight down regulation, followed by upregulation in relation to the initial levels of the 5th week.

Conclusion: The present experimental model in the Hairless mouse presented biometric and histopathological parameters, characteristic of inflammatory and pre-neoplastic lesions, with the presentation of pre-carcinogenic polyps, typical of the experimental evolution of CRC, through the combined use of AOM/DSS. The relative expressions of mRNAs for the IRE1- α , PERK, ATF6 and CHOP genes showed a profile of successive and progressive increases for each week of the experimental protocol in the control groups, which suggests the influence of animal aging on the expression of these genes ERS regulations. On the other hand, the relative expressions of target mRNAs were sub modulated in most experimental groups under AOM/DSS treatment. The findings are compatible with the activation of adaptive mechanisms of cell survival and proliferation, through inflammatory and carcinogenic stimuli, applied to the animal model of the present work.

Keywords: Azoxymethane. Dextran Sodium Sulfate. Colorectal cancer. Colitis. Endoplasmic reticulum stress. Unfolded protein response. CCR signaling pathways.

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% – Porcento

μL – Microlitro

μm – Micrômetro

100x – Aumento de 100 vezes ao microscópio óptico

400x – Aumento de 400 vezes ao microscópio óptico

40x – Aumento de 40 vezes ao microscópio óptico

AD – Água destilada

ad libitum – À vontade

AhR – Translocador Nuclear de Receptor de Hidrocarboneto Aril

AICR – Instituto Americano de Pesquisa do Câncer

AINEs – Anti-inflamatório não esteroide

AMPK – Proteína Quinase Ativada por AMP

AOM – Azoximetano

APC – Polipose adenomatosa coli

ARE – Elemento de resposta antioxidante

AREG – Anfirregulina

ASK1 – Quinase 1 reguladora de sinal de apoptose

ATF4 – Fator ativador de transcrição 4

ATF6 – Fator ativador de transcrição 6

ATF6p50 – Fator de transcrição bZIP de 50 kDa

ATP – Trifosfato de adenosina

Bad – Proteína D associada a BCL-2

Bax – Proteína X associada a Bcl-2

BBR – Berberina

BCL-2 – Linfoma de células B2

BFA – Brefeldina-A

BFT – Toxina *Bacteroides fragilis*

Bim – Mediador de morte celular que interage com Bcl-2

BiP – Proteína de ligação

BMDC – Medula óssea dendrítica semelhante a células mielóides

BRAF – v-Raf Sarcoma Murino Oncogene Viral Homólogo a B1

CA125 – Antígeno carcinoembrionário 125

CA19-9 – Antígeno carcinoembrionário 19-9

Ca²⁺ – Íon cálcio

CA72-4 – Antígeno carcinoembrionário 72-4

CAC – Câncer associado a colite

CCR – Câncer colorretal

Cdc48 – Proteína de controle de divisão celular 48

CDT – Toxina distensora citoletal

CEA – Antígeno carcinoembrionário

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CFZ – Carfilzomibe

CHOP – Gene de proteína homóloga C/EBP

cm – Centímetro

CMS – Subtipos moleculares de consenso

c-Myc – Protocogene Myc

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COX1 – Enzima ciclooxigenase 1

COX2 – Enzima ciclooxigenase 2

CREB/ATF bZip – Fator de transcrição CREB/ATF bZIP

CT – Tubulares complexas

ctDNA – DNA tumoral circulante

Cue1 – Conjugação de Ubiquitina com Proteína 1 de Degradação do Estresse do Retículo

Cul3 – Complexo de ubiquitina E3 ligase dependente de culina-3

DCA – Ácido Desoxicólico

DE – Desmoplásicas

DII – Doença Inflamatória Intestinal

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeo trifosfato

Doa10 – Ubiquitina Ligase Doa10

DPE – 2-(3,4-dihidroxifenil) etanol

DR5 – Receptor da Morte 5

DSS – Dextran Sulfato de Sódio

dT20 – Primer com 20 nucleotídeos Desoxitimídico (T)

ECM – Matriz extracelular

EGCG – Epigallocatequina galato

EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico

eIF2- α – Fator de Iniciação Eucariótica 2 Alfa

EMT – Transição Epitelial Mesenquimal

ER – Retículo endoplasmático

ERAD – Degradação de proteínas associadas ao retículo endoplasmático

ERE – Estresse do retículo endoplasmático

EREG – Epirregulina

ERK – Proteína Quinase Regulada por Sinal Extracelular

ERO1- α – Retículo Endoplasmático Oxidorredutina - 1 Alfa

ERQC – Controle de qualidade do retículo endoplasmático

et al. – E outros

fACY-1215 – Ricolinostate

FadA – Adesina de *Fusobacterium nucleatum*

FADD – Fas associado ao domínio da morte

FCA – Foco de cripta aberrante

F-FDG – Fluorodesoxiglicose (18F)

FOXO – Caixa de garfo O

G – Força gravidade

GADD153 – CHOP induz danos ao DNA 34

GRP75 – Proteína Regulada por Glicose 75

GRP78 – Proteína Regulada por Glicose 78 (BiP)

GRP94 – Proteína Regulada por Glicose 94

GST – Glutathiona S-transferase

H⁺ – Hídron

H₂O – Água

H₂O₂ – Água oxigenada

H₂S – Sulfeto de hidrogênio

HCT116 – Linhagem celular isolada do cólon de um homem adulto com câncer de cólon

HDAC – Histona Desacetilase

HIF- α – Fator alfa induzível por hipóxia

HO-1 – Heme Oxigenase-1

Hrd1 – E3 Ubiquitina-Proteína Ligase

HSO₄⁻ – Íon hidrogenossulfato

HSP – Proteína de choque térmico

HSP110 – Proteína de choque térmico 110 KDa
HSP27 – Proteína de choque térmico 27 KDa
HSP40 – Proteína de choque térmico 40 KDa
HSP60 – Proteína de choque térmico 60 KDa
HSP70 – Proteína de choque térmico 70 KDa
HSP90 – Proteína de choque térmico 90 KDa
HSPB3 – Família B de Proteína de Choque Térmico (Pequena) Membro 3
HT-29 – Linhagem celular adenocarcinoma de cólon caucasiano humano grau II
IGFBP7 – Proteína 7 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1 – Interleucina 1
IL-23 – Interleucina 23
IL-6 – Interleucina 6
IRE1 α – Inositol que requer quinase 1 alfa
I κ β – Inibidor kappa Beta
JNK - c-Jun Quinase N-terminal
KDa – Kilodaltons
Keap1 – Proteína 1 associada a ECH semelhante a NRF2-Kelch
Kg – Quilograma
KRAS – Homólogo oncogênico viral do sarcoma de rato Kirsten
LC3 – Proteína 1A/1B-Cadeia Leve 3 Associada a Microtúbulos
LGD – Displasia de baixo grau
MAMP – Padrão Molecular Associado a Micróbios
MDR1 – Gene de resistência a múltiplas drogas
MEPK – Proteínas quinases ativadas por mitógeno
mg – Miligrama
min – Minuto
miR-155-5p – Micro RNA oncogênico e pró-inflamatório
mL – Mililitro
mm – Milímetro
mM – Milimolar
MMP-9 – Metalopeptidase de matriz-9
MPO – Mieloperoxidase
mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro
MS – Ministério da Saúde

MSigDB – Banco de dados de assinaturas moleculares

mTI – Inibidor de tripsina de feijão mungo

MU – Mucinosas

MutS p53 – Proteína mutante p53

Myc – Homólogo oncogênico viral da mielocitomatose aviária

NADP – Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina

nATF6IEC – Camundongos homozigotos com adenomas espontâneos de cólon às 12 semanas de idade

NF- κ B – Fator de transcrição nuclear Kappa Beta

ng – Nanograma

NLR – Receptores semelhantes a NOD

nm – Nanômetro

n° – Número

Npl4 – Localização de Proteína Nuclear 4

NQO1 – NAD(P)H quinona oxidoreductase 1

NRF2 – Fator Nuclear relacionado a eritróide E2

ns – Ausência de significância estatística

°C – Graus Célsius

OMS – Organização Mundial de Saúde

OS – Sobrevivência geral

p – Nível descritivo ou probabilidade de significância

p21 – Proteína supressora de tumor 21

P58IPK/DNAJC3 – Família de proteínas de choque térmico DnaJ (Hsp40) Membro C3

PERK – Quinase do retículo endoplasmático pancreático denominado eIF2 α

pH – Potencial de Hidrogênio

PIGF – Fator de crescimento placentário

pL – Picolitro

PLK1 – Quinase semelhante a polo 1

pmol – Picomol

Png1 – Peptídeo - N-Glicanase 1

PP – Papilares

pT – Pós-Terapia

q.s.p. – Quantidade suficiente para

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa

Rad23 – Proteína de reparo de excisão UV RAD23

RCU – Retocolite ulcerativa

RFS – Sobrevivência sem recaídas

RIDD – Queda de mRNAs dependente de IRE1 regulada por IRE1- α

RNAP – Polimerase do Ácido Ribonucleico

RNS – Espécies reativas de nitrogênio

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RT – Transcritase reversa

RTK – Receptor de Tirosina Quinase

RT-PCR – Transcrição Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase

SCFA – Ácidos Graxos de Cadeia Curta

SE – Serrilhadas

SERCA2 – Retículo Sarcoendoplasmático Ca^{2+} ATPase

SF 0,9% – Solução fisiológica a 0,9%

siRNA – Pequeno Ácido Ribonucléico interferente

SOD – Superóxido dismutase

SPSS – Pacote Estatístico para Ciências Sociais

sscDNA – DNA complementar de fita simples

STAT3 – Transdutores de Sinal e Ativação de Transcrição 3

TAp73 – Fator transcricional p73

TB – Sólidas/Trabeculares

TCD4⁺ – Linfócitos TCD4⁺

TCD8⁺ – Linfócitos TCD8⁺

Th17 cell – Linfócitos auxiliares 17

TLR – Receptor tipo pedágio

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TP53 – Proteína tumoral p53

TRAF2 – Fator 2 associado ao receptor de TNF

TRAP1 – Proteína 1 associada ao receptor de TNF

TRB3 – Fator de ligação de repetição de telômero 3

Tregcell – Célula T Regulatória

U – Unidades

Ubc7 – Proteína Conjugadora de Ubiquitina E2

Ufd1 – Proteína 1 de degradação de fusão de ubiquitina

Ufd2 – Proteína 2 de degradação de fusão de ubiquitina
UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UPR – Resposta Proteica Desdobrada
USA – Estados Unidos da América
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFA – Fator de crescimento endotelial vascular A
VEGFB – Fator de crescimento endotelial vascular B
VEGFC – Fator de crescimento endotelial vascular C
VEGFD – Fator de crescimento endotelial vascular D
VEGFF – Fator de crescimento endotelial vascular F
VEGF-R2 – Fator de crescimento endotelial vascular - Receptor 2
Wnt – Vias de sinalização Wnt-1
XBP1 – Proteína 1 de ligação ao X-Box
XBP1s – Emenda da proteína 1 de ligação X-Box
 γ -GCL – γ -Glutamilcisteína ligase
 $\Delta\Delta$ CT – Δ CT(uma amostra alvo) – Δ CT(uma amostra de referência)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Apoptose induzida pela ativação de CHOP.....	25
Figura 2:	Fatores de risco para o câncer colorretal.....	28
Figura 3:	Comparação entre a eubiose e disbiose intestinal e sua relação com a inflamação e carcinogênese.....	30
Figura 4:	A modulação da carcinogênese pela microbiota intestinal.....	32
Figura 5:	Índice de atividade histológica da Retocolite Ulcerativa (RCU).....	34
Figura 6:	Características colonoscópicas e histológicas dos focos de cripta aberrante.....	36
Figura 7:	Evolução da mucosa colônica normal até tumor metastático – Relação com multifatores promotores do CCR.....	38
Figura 8:	Aspecto histológico da cripta normal e aberrante.....	40
Figura 9:	Aspecto colonoscópico e anátomo-patológico macroscópico do câncer colorretal.....	42
Figura 10:	Modelo de câncer colorretal associado e colite induzido pelo Azoximetano e Dextran Sulfato de Sódio.....	44
Figura 11:	Principais características celulares e bioquímico-moleculares das proteínas de choque térmico e potenciais alvos para ferramentas terapêuticas.....	48
Figura 12:	Visão geral da sinalização da Resposta de Proteína Desdobrada no estresse do Retículo Endoplasmático.....	54
Figura 13:	Inter-relação entre os fatores de risco para CCR.....	63
Figura 14:	Perspectivas futuras em pesquisa de sinalizadores moleculares voltados para CCR.....	66
Figura 15:	Ilustração das marcações de identificação dos animais (7 animais por caixa).....	70
Figura 16:	Delineamento da pesquisa experimental em modelo animal (Camundongos Hairless) com indução de câncer colorretal associado a colite utilizando AOM/DSS – Linha do tempo.....	72
Figura 17:	Quadro com os grupos amostrais selecionados randomicamente para os testes RT-qPCR.....	74
Figura 18:	Disposição das amostras dos genes S26, PERK, CHOP, IRE1- α e ATF6 nas placas de RT-qPCR.....	76

Figura 19:	Iniciadores para ERN1- α , PERK, ATF6, CHOP e S26.....	78
Figura 20:	Ilustração da técnica de RT-qPCR utilizada para processar as amostras genéticas (primeira parte).....	80
Figura 21:	Ilustração da técnica de RT-qPCR utilizada para processar as amostras genéticas (continuação).....	81
Figura 22:	Quadro de oligonucleotídeos codificadores de IRE- α , PERK, ATF6, CHOP e S26 e e suas curvas de Melt.....	83
Figura 23:	Expressão de IRE1- α	87
Figura 24:	Expressão de PERK.....	89
Figura 25:	Expressão de ATF6.....	91
Figura 26:	Expressão de CHOP.....	93
Figura 27:	Expressão dos genes agrupados.....	95

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Atribuição de pontuações clínicas de colite em camundongos.....	96
--	-----------

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	27
2.1	Epidemiologia do câncer colorretal.....	27
2.2	O câncer colorretal tem etiopatogenia multicausal.....	27
2.3	Disbiose como fator desencadeador do câncer colorretal.....	29
2.4	A relação entre inflamação do cólon e CCR.....	33
2.5	Aspectos histológicos e colonoscópicos da lesão pré-neoplásica do câncer colorretal.....	35
2.6	Azoximetano e Dextran Sulfato de Sódio como indutores de câncer colorretal associado a colite em modelos animais.....	41
2.7	O câncer colorretal tem relação com o Estresse do Retículo Endoplasmático e Resposta Proteica Desdobrada.....	45
2.8	Retículo endoplasmático e as proteínas chaperonas.....	45
2.9	Ativação da resposta proteica desdobrada (UPR).....	49
2.10	A via de ativação e sinalização do IRE1-α reduz a carga proteica.....	49
2.11	Ativação da via de sinalização PERK para minimizar a tradução.....	50
2.12	Ativação das vias de sinalização UPR.....	50
2.13	Via de sinalização IRE1- α.....	51
2.14	Via de sinalização PERK.....	52
2.15	Via de sinalização ATF6.....	53
2.16	Inter-relação entre os sistemas IRE1-α, PERK e ATF6.....	55
2.16.1	Via de sinalização ATF6 ativa o ERAD.....	55
2.16.2	Caminhos de adaptação e sobrevivência celular.....	55
2.16.3	Caminhos para ativação de apoptose.....	55
2.17	Mecanismos antagonistas observados pela ativação da UPR pelo ERE.....	56

2.17.1	Sobrevivência de células neoplásicas por ativação da UPR.....	56
2.17.2	A vida e morte das células neoplásicas são controladas pela via CHOP.....	57
2.17.3	Via PERK e indução de metástase.....	58
2.18	Interações entre vias UPR e chaperonas em tecidos de câncer colorretal...	58
2.18.1	IRE1- α como protagonista na angiogênese do desenvolvimento do CCR.....	59
2.18.2	A via PERK no equilíbrio redox para adaptação celular oncogênica.....	60
2.18.3	Respostas citoprotetoras da via ATF6 dependentes da microbiota.....	61
2.18.4	Dieta, microbiota intestinal e câncer colorretal.....	62
2.19	Perspectivas futuras em pesquisa de sinalizadores moleculares voltados para CCR.....	65
3	OBJETIVO GERAL.....	67
3.1	Objetivos específicos.....	67
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	68
4.1	Aspectos éticos.....	68
4.2	Tipo de pesquisa.....	68
4.3	Local da pesquisa.....	68
4.4	Animais e ambiente.....	68
4.5	Delineamento da pesquisa experimental em modelo animal.....	69
4.6	Caracterização e quantificação genômica.....	73
4.7	Randomização dos animais para o processamento por RT-qPCR.....	73
4.8	Técnica utilizada para organizar as amostras nas placas de RT-qPCR.....	75
4.9	Técnica de processamento das amostras em RT-qPCR.....	77
4.9.1	Extração de RNA total.....	77
4.9.2	Primers (iniciadores) de oligonucleotídios.....	77
4.9.3	Transcrição reversa (RT) e PCR em tempo real (qPCR).....	79
4.10	Estatística.....	84

5	RESULTADOS.....	85
5.1	Resultados da expressão dos genes alvos avaliados.....	85
6	DISCUSSÃO.....	97
7	LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	102
8	CONCLUSÃO.....	103
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	104
10	REFERÊNCIAS.....	105
11	ANEXOS.....	115
12	APÊNDICES.....	116

1 – INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é a neoplasia que acomete o cólon, o reto e o ânus, e sua taxa de mortalidade vem aumentando progressivamente em quase todos os estados brasileiros, mais entre homens que mulheres. Nos homens, o incremento foi observado em todos os Estados, e nas mulheres em 21 Estados brasileiros. De acordo com o estudo de Oliveira *et al.* (2018), essa neoplasia representou 5,1% em 1996 e 6,9% em 2012, de todos os óbitos por câncer no país, ocupando o quinto e quarto lugares, nos respectivos anos.

O CCR é a terceira neoplasia maligna mais comumente diagnosticada e a quarta causa principal de mortes relacionadas ao câncer no mundo, e estima-se que seu impacto aumente em 60%, gerando uma expectativa de 2,2 milhões de novos casos e 1,1 milhão de mortes até 2030 (ARNOLD *et al.*, 2016).

A maioria desses tumores iniciam a partir de pólipos, que são lesões benignas, planas ou elevadas, precursoras do CCR, e que se originam na mucosa da parede interna do intestino grosso (SUN; KLEBANER; TIAN, 2014).

No Estado de Mato Grosso do Sul, entre os anos 1996 e 2012, foi observado um aumento na mortalidade por CCR entre os homens, de 33 para 104 óbitos/100.000 habitantes, e entre as mulheres o aumento foi de 30 para 78 óbitos/100.000 habitantes. (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

A oncogênese intestinal guarda uma estreita relação com as doenças inflamatórias do intestino, fatores genéticos, fatores ambientais tais como estilo de vida, tipo de dieta predominantemente consumida, e microbiota intestinal (SANTOS JR, 2007).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CCR são: histórico familiar de câncer de intestino, história pessoal de câncer de intestino, idade igual ou superior a 50 anos, excesso de peso corporal, dieta rica em gorduras, açúcares, carnes processadas, e pobre em fibras, inatividade física, diabetes mellitus, tabagismo e consumo de bebidas alcoólicas, dentre outros (MOURA *et al.*, 2020).

O CCR tem sua origem em uma única célula, que após sofrer sucessivas mutações, transmite sua carga de instabilidade genômica para as próximas gerações de células filhas. Na sequência, esse grupo de células instáveis desenvolve variados graus de atipia celular, displasia intraepitelial, e como evento final a transformação do pólipo adenomatoso em carcinoma, que pode invadir a lâmina própria da submucosa e se disseminar em metástases por via linfohematogênica (LASSANCE *et al.*, 2012).

O CCR induzido por carcinógenos em camundongos pode simular de forma altamente confiável as fases de iniciação e progressão tumoral que ocorrem em humanos (DE ROBERTIS *et al.*, 2011).

O camundongo *Hairless* (HR) não têm pelos devido a ação de um gene recessivo autossômico situado no cromossomo 14 e essa característica é exibida quando ocorre o acasalamento entre macho hr/hr e fêmea hr/+. Estes animais não apresentam deficiência imunológica severa como os camundongos nude e a sua baixa resposta imunológica se deve a deficiência de células T helper (BENAVIDES *et al.*, 2009).

Os modelos experimentais em animais cuja carcinogênese colorretal é induzida quimicamente, são de rápida evolução e fácil reprodutibilidade, pois mimetizam com fidelidade a via adenoma-carcinoma que ocorre no CCR humano (PEREIRA, 2016).

O Azoximetano (AOM) é empregado para induzir CCR em murinos, e requer várias etapas de ativação metabólica, incluindo N-oxidação e hidroxilação, para induzir adutos reativos ao DNA. A hidroxilação do AOM resulta na formação do metabólito reativo metilazoximetanol (MAM), que pode alquilar macromoléculas no fígado e cólon, e promover a adição de grupos metil na posição O6 ou N7 da guanina (O6-metil-desoxiguanosina e N7-metil-desoxiguanosina) na molécula de DNA. A metilação na posição O6 da guanina demonstrou ser a lesão promutagênica primária induzida pelo AOM (DE ROBERTIS *et al.*, 2011).

O uso concomitante do Dextran Sulfato de Sódio (DSS) com AOM como indutor de CCR associado a colite é bastante utilizado devido sua reprodutibilidade, potência e facilidade de uso, e apesar de terem um mecanismo de sinergismo, foi descoberto que o AOM é mais potente e estável em solução que a Dimetil-Hidrazina (DMH), outro indutor de CCR bastante utilizado em modelo animal. O desenvolvimento do tumor induzido por outros modelos geralmente requer vários meses, entretanto, os camundongos injetados com AOM e subsequentemente tratados com DSS na água de beber, podem desenvolver tumores macroscópicos em apenas 7 a 10 semanas (THAKER *et al.*, 2012).

Diversos modelos animais de CCR disponíveis forneceram informações importantes para elucidar o caráter complexo e multifatorial do desenvolvimento da patogênese tumoral. Esses modelos podem ser empregados para entregar novos conhecimentos sobre os mecanismos etiológicos e fisiopatológicos, bem como o desenvolvimento de novos tratamentos contra o CCR humano. Os modelos animais ajudam-nos a compreender a aquisição sequencial de alterações genéticas e epigenéticas, com consequentes alterações no comportamento celular e na biologia molecular tumoral que se observa no homem (DE ROBERTIS *et al.*, 2011).

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela de suma importância em organismos eucariotos, visto que desempenha importantes funções tais como a síntese, dobramento e

modificação de proteínas, além de ser reservatório de cálcio e o principal compartimento de biossíntese de lipídios (HETZ; ZHANG; KAUFMAN, 2020).

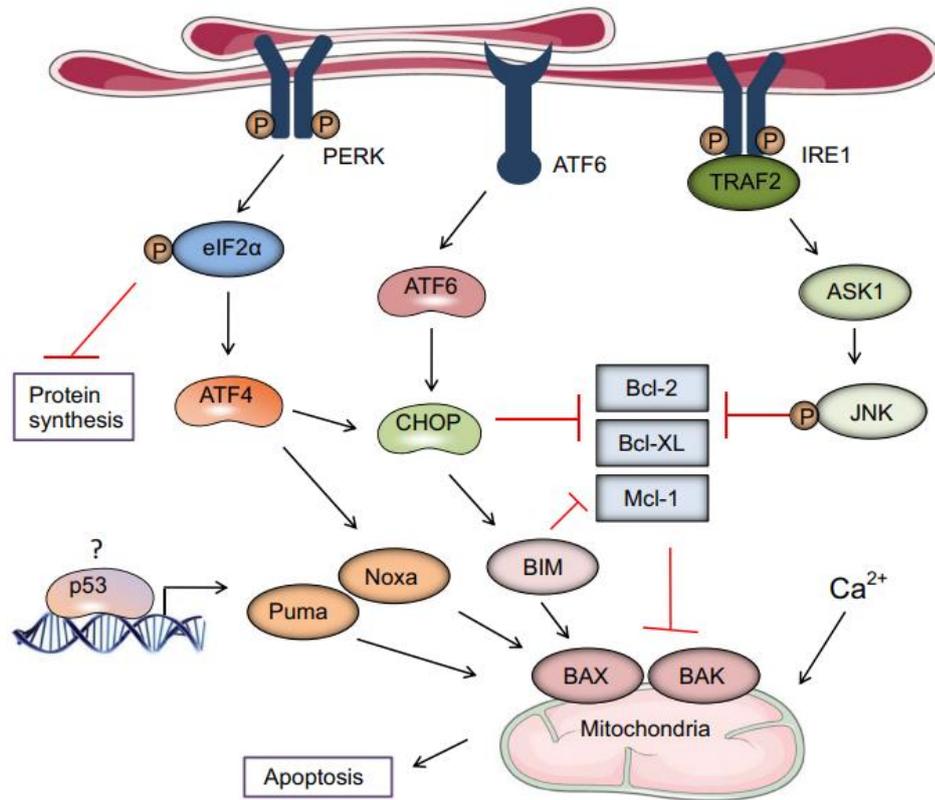
Já foi demonstrado que o estresse do retículo endoplasmático (acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen da organela) exerce influência sobre a progressão neoplásica e função das células imunes no microambiente tumoral (TME). Entretanto, o papel subjacente dos padrões genéticos relacionados ao estresse do retículo endoplasmático (ERE) no desenvolvimento do CCR permanece incerto (LIU *et al.*, 2020).

O equilíbrio do retículo endoplasmático é indispensável para que os processos celulares ocorram normalmente. O ERE pode ser induzido por situações como alta demanda de secreção ou síntese proteica e está envolvido na gênese de muitas patologias, dentre elas o câncer, onde o TME requer altas concentrações de oncoproteínas que compõem a estrutura do tecido neoplásico (HETZ, 2012).

Quando ocorre o ERE, a célula lança mão de um mecanismo conhecido como Resposta Proteica Desdobrada (**UPR** - **U**nfolded **P**rotein **R**esponse), que inclui a ativação de três sensores do retículo endoplasmático, que são proteínas transmembranares, a saber: a enzima 1- α que requer inositol (IRE1- α , também denominada ERN1), a quinase do retículo endoplasmático tipo PRKR (PERK, também denominada EIF2AK3) e o ativador do fator de transcrição 6 (ATF6). Quando recrutada, a UPR aciona sinalizadores citoplasmáticos e nucleares que induzirão o redobramento das proteínas defeituosas, a destruição dessas proteínas, a redução da síntese proteica, ou em situações extremas, a apoptose celular (CHEN, CUBILLOS-RUIZ; 2021).

Na via de sinalização PERK, a proteína C/EBP homóloga à proteína de regulação da ativação transcricional 4 (CHOP) é uma mediadora essencial de apoptose induzida pelo ERE. A sequência de sinalização: PERK - eIF2- α - ATF4 - CHOP é uma via crítica que frequentemente culmina em apoptose por ERE. Além disso, o ATF6 também tem uma contribuição importante na produção de CHOP nos primeiros momentos do ERE (IURLARO, MUÑOZ-PIÑEDO; 2016). A Figura 1 apresenta resumidamente as três principais vias de sinalização da UPR capazes de induzir apoptose.

Figura 1 – Apoptose induzida pela ativação de CHOP.



Fonte: Iurlaro, Muñoz-Pinedo (2016).

Atualmente, o diagnóstico do CCR é feito, geralmente tardiamente, através de histopatologia de biópsias de cólon de pacientes que apresentem sinais e sintomas suspeitos de CCR, como inexplicada perda de peso, sangramento pelas fezes, afinamento do bolo fecal com ou sem dor abdominal (SWIDERSKA *et al.*, 2014).

Deste modo, justifica-se a relevância deste estudo, visto que a caracterização do ERE e a quantificação da expressão gênica dos sinalizadores moleculares da UPR que ocorrem nas células colônicas durante a progressão tumoral em modelo murino, poderão abrir novos caminhos para a detecção precoce do CCR em humanos.

Os conhecimentos gerados pelo estudo ora concluído, além de atuais, poderão contribuir para futuros estudos experimentais e ensaios clínicos, podendo inclusive, nortear o desenvolvimento de novas terapias clonais específicas para o bloqueio de alvos moleculares tumorais, contribuindo para a ampliação da expectativa de sobrevida e para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes portadores de CCR.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Epidemiologia do câncer colorretal.

O câncer colorretal (CCR) é uma neoplasia maligna do trato gastrointestinal que pode afetar o cólon direito, transverso, esquerdo, sigmóide e reto. Entre os tumores malignos incidentes do trato gastrointestinal, e de acordo com dados da Agência Internacional de Investigação do Câncer, em 2018, o CCR ocupou o terceiro lugar em termos de incidência, mas o segundo em mortalidade. É também o terceiro tipo de câncer mais comum em homens, depois do câncer de pulmão e de próstata, e o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres, depois do câncer de mama. As estimativas prevêem que a carga global do CCR atingirá aproximadamente 2,2 milhões de novos casos por ano em 2030, indicando assim um aumento adicional de 20% (HUANG *et al.*, 2021).

O câncer colorretal é a neoplasia cuja taxa de mortalidade vem se elevando progressivamente em todos os estados brasileiros. A taxa de mortalidade por essa doença foi de 7,98 óbitos/100 mil habitantes em 2014. As regiões Sul e Sudeste foram as que tiveram as maiores taxas de mortalidade, e o sexo feminino foi o que teve a maior prevalência em todas as regiões do Brasil (MENEZES *et al.*, 2016).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) demonstram que o CCR está entre as dez maiores causas de mortalidade e morbidade no mundo (ARNOLD *et al.*, 2016).

O Brasil é o país com a maior incidência de CCR em ambos os sexos no mundo e o terceiro maior em mortalidade, além disso, no sexo masculino perde apenas para as Filipinas e Bielorrússia (ARNOLD *et al.*, 2016).

Em pacientes com CCR, a sobrevida global é de 64-67% em 5 anos. Pacientes com câncer localizado têm uma taxa de sobrevivência de 89-90%, naqueles com neoplasia regional a taxa de sobrevivência em 5 anos cai para 70-71%, e pacientes com metástases à distância têm uma expectativa de sobrevivência de apenas 14-15% em 5 anos. (MATTIUZZI; SANCHIS-GOMAR; LIPPI, 2019).

2.2 – O câncer colorretal tem etiopatogenia multicausal.

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CCR são: histórico familiar de câncer de intestino, histórico pessoal de câncer de intestino, idade igual ou superior a 50 anos, excesso de peso corporal, dieta rica em gorduras, açúcares, carnes processadas e pobres em fibras, sedentarismo, diabetes mellitus, tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, inflamações intestinais e outros (LEWANDOWSKA *et al.*, 2022). A figura 2 ilustra os diversos fatores de risco conhecidos para o CCR.

Figura 2 – Fatores de risco para o câncer colorretal.



Fonte: Elaboração própria (2023).

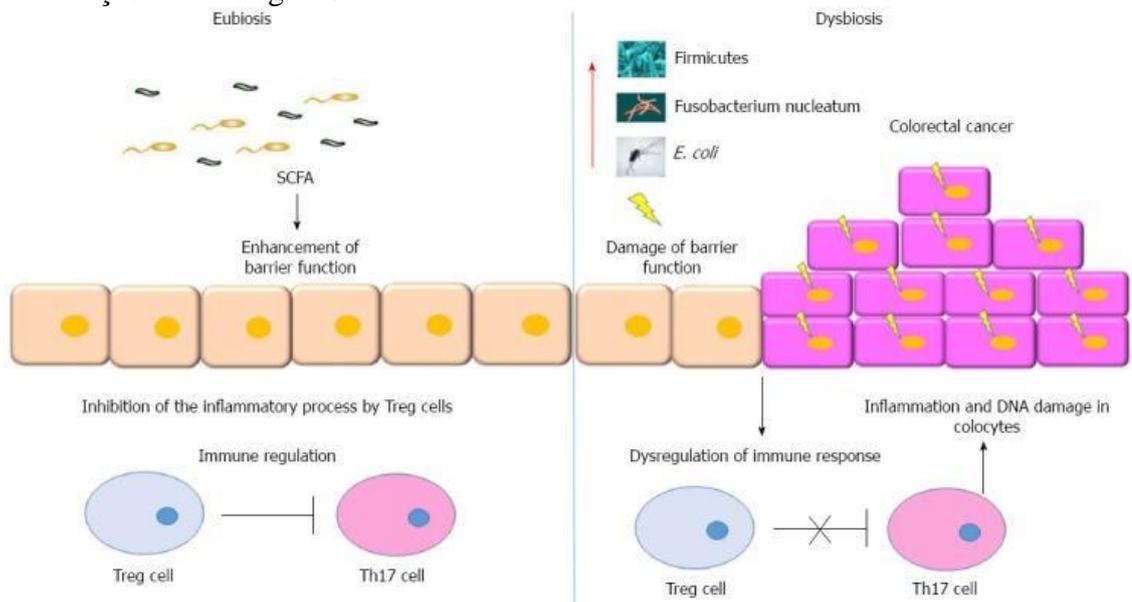
2.3 – Disbiose como fator desencadeador do câncer colorretal.

Evidências imunológicas e bioquímicas relacionadas com a disbiose (Alterações na população de bactérias intestinais com a proliferação de espécies nocivas à saúde, que podem produzir toxinas, proteínas estranhas e inflamação intestinal) permitiram a compreensão geral do mecanismo sobre o qual se baseia o desenvolvimento de CCR. Esses achados sugerem que há uma estreita conexão entre a disbiose, doença inflamatória intestinal e CCR (TOMASELLO *et al.*, 2014).

Até o momento, o papel direto ou indireto das bactérias na indução de danos genômicos em colonócitos não está totalmente elucidado, e vários ensaios clínicos estudaram a ação preventiva e terapêutica dos probióticos no tratamento de doenças digestivas. Sabe-se que os probióticos podem inibir processos inflamatórios e carcinogênicos através de várias vias de sinalização, incluindo o reequilíbrio da resposta imune do hospedeiro e a atividade antiproliferativa em células tumorais (TOMASELLO *et al.*, 2014).

A figura 3 demonstra que quando existe eubiose (equilíbrio da microbiota intestinal), o epitélio intestinal hospeda uma microbiota rica e equilibrada que promove a função de barreira. A disbiose microbiana, por outro lado, favorece a produção de genotoxinas e metabólitos associados à oncogênese. Além disso, a disbiose induz à desregulação das respostas imunes que causam a promoção da inflamação e da carcinogênese intestinal (TOMASELLO *et al.*, 2014).

Figura 3 – Comparação entre a eubiose e disbiose intestinal e sua relação com a inflamação e carcinogênese.

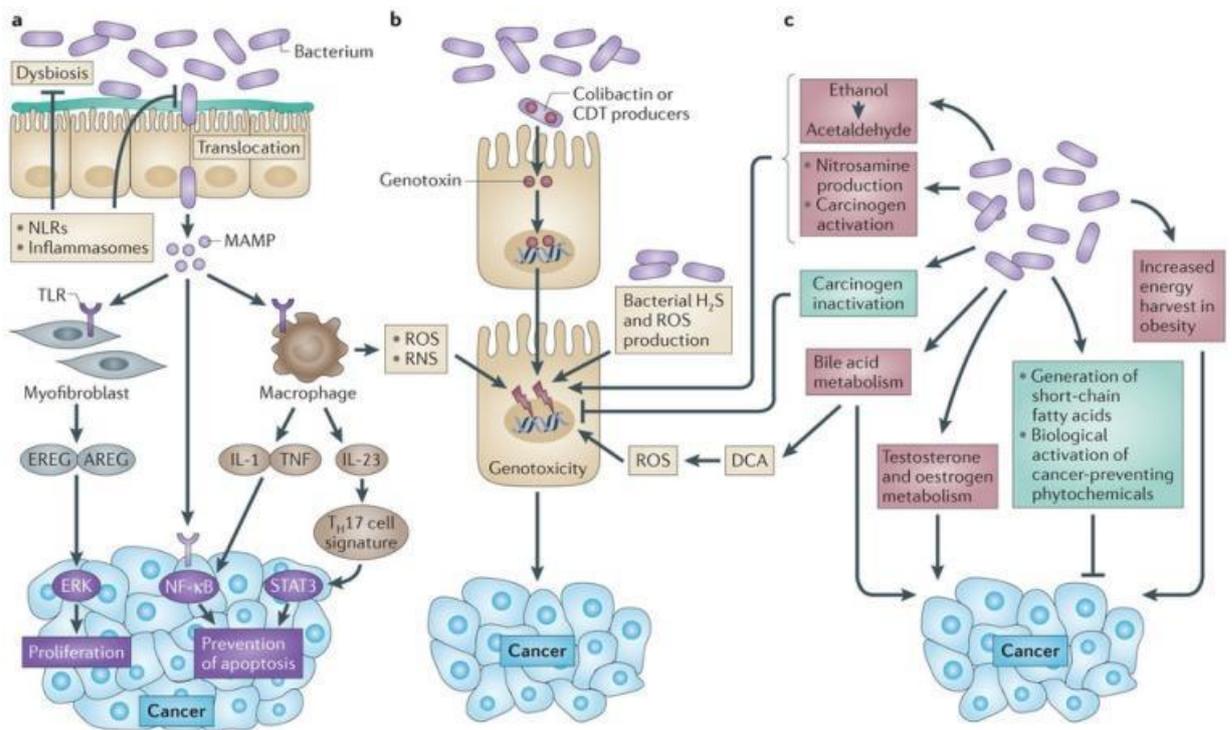


Fonte: Tomasello *et al.* (2014).

A figura 4 mostra que a microbiota intestinal promove a carcinogênese através de diferentes mecanismos. Na seção (a), a disbiose e a inflamação induzidas pelo MAMP (Padrão molecular associado a micro-organismos) ativam os TLR (Toll-like receptor) e os NLR (NOD-like receptor) através de internalização das bactérias para a região da submucosa, que induzem a ativação de macrófagos para produzir espécies reativas de oxigênio (**ROS - Reactive Oxygen Species**) e espécies reativas de nitrogênio (**RNS - Reactive Nitrogen Species**), que possuem comprovada ação genotóxica. Na seção (b) pode-se observar que os efeitos prejudiciais ao DNA das células epiteliais são mediados por toxinas bacterianas como a colibactina e a CDT (Toxina distensora citoletal), por exercerem ação genotóxica direta sobre o DNA das células do epitélio intestinal. Por outro lado, as ROS e RNS produzidas pelos macrófagos envolvidos na inflamação e por H₂S (Ácido sulfídrico) e ROS produzidos pelas bactérias disbióticas, atacam diretamente o DNA epitelial (RASKOV; BURCHARTH; POMMERGAARD, 2017).

Na seção (c) observa-se que as rotas metabólicas de ativação de toxinas como acetaldeídos e nitrosaminas, pelas bactérias danosas, culminam com a genotoxicidade, que é pré-requisito para a carcinogênese. No entanto, a microbiota benéfica (probióticos) pode mediar efeitos preventivos (em verde) através da inativação de agentes cancerígenos e produção de AGCC (Ácidos Graxos de Cadeia Curta), como butirato e propionato, que são utilizados como alimento pelos colonócitos (RASKOV; BURCHARTH; POMMERGAARD, 2017).

Figura 4 – A modulação da carcinogênese pela microbiota intestinal.



Nature Reviews | Cancer

Fonte: Raskov; Burcharth; Pommergaard (2017).

2.4 – A relação entre inflamação do cólon e CCR.

Existe uma estreita relação entre inflamação do cólon e neoplasia, embora haja pouca dúvida que a inflamação crônica promova o câncer de cólon, seus mecanismos celulares e microbianos envolvidos ainda não estão bem elucidados. Evidências experimentais indicam que os sistemas imunológicos inatos e adaptativos têm um papel na patogênese do câncer associado à colite, e que a flora bacteriana também contribui (ULLMAN; ITZKOWITZ, 2011).

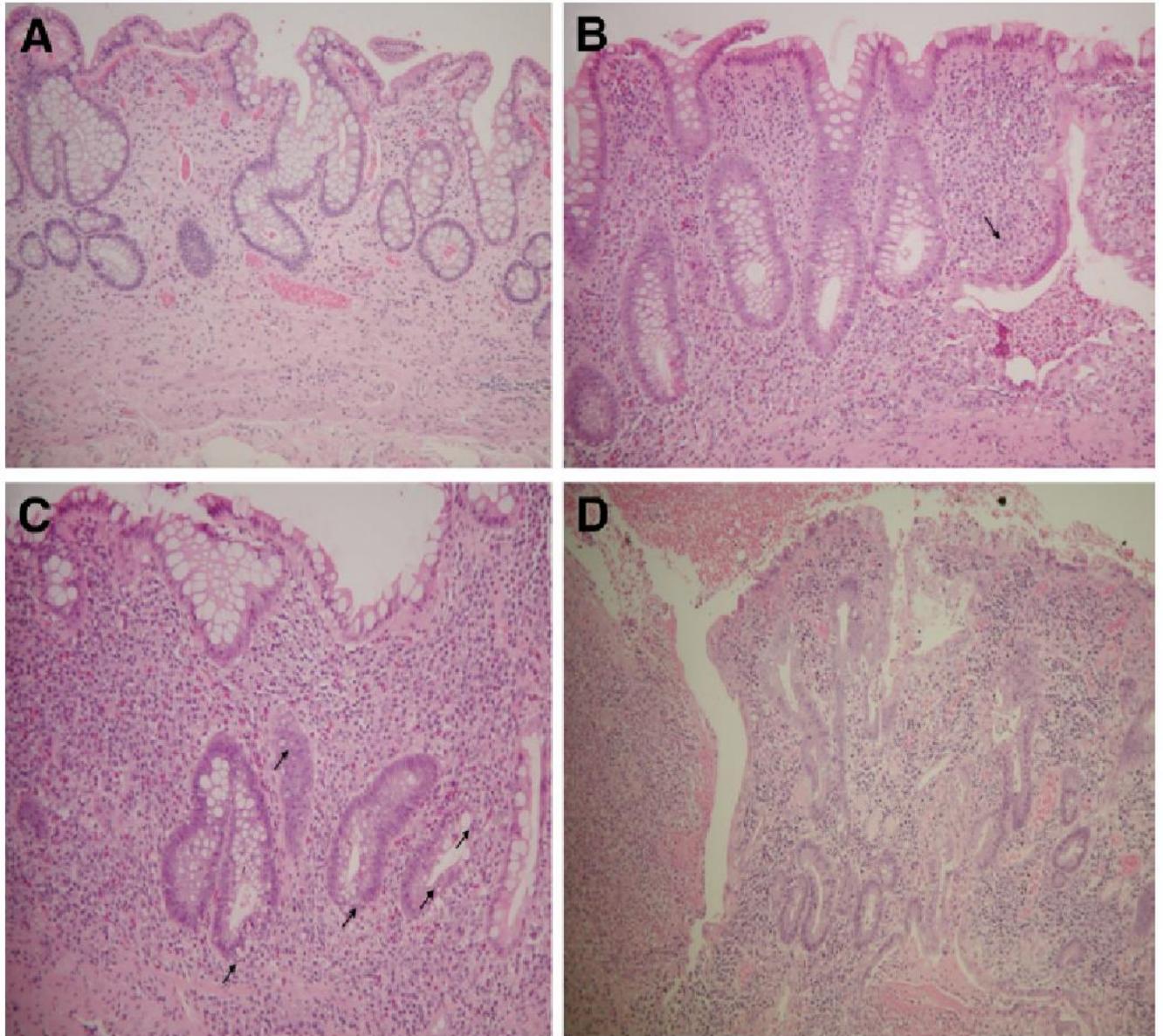
Uma metanálise envolvendo somente estudos de coorte demonstrou que os portadores de retocolite ulcerativa (RCU) tem um risco 2,4 vezes maior de desenvolver um CCR, o que representa uma ocorrência geral de CCR de 1,6% (incluindo casos esporádicos) durante os primeiros 14 anos de acompanhamento (JESS; RUNGOE; PEYRIN-BIROULET, 2012).

Na RCU, o risco cumulativo de CCR é de 2%, 8% e 18% após 10, 20 e 30 anos, respectivamente, de duração da doença (EADEN; ABRAMS; MAYBERRY, 2001).

Esses dados podem ser utilizados com a finalidade de adotar estratégias de enfrentamento e prevenção do CCR nesta população de pacientes, através do rastreamento planejado.

A figura 5 exemplifica o Índice de Atividade Histológica da Retocolite Ulcerativa (RCU). Estas micrografias de cortes histológicos de biópsias de cólon mostram exemplos do grau de inflamação histológica comumente observada na mucosa de pacientes com RCU. A fotomicrografia (A) mostra colite inativa, sem criptite e sem abscessos na cripta. A fotomicrografia (B) mostra colite levemente ativa com infiltração de neutrófilos em 50% das criptas, mas sem úlceras ou erosões. A seta em (B) mostra uma cripta com infiltração neutrofílica. A fotomicrografia (C) mostra colite moderadamente ativa com infiltração de neutrófilos em 50% das criptas ou seções transversais, mas sem úlceras ou erosões. As setas em (C) mostram neutrófilos na cripta. A fotomicrografia (D) mostra colite severamente ativa, com erosão ou ulceração da mucosa, e independentemente de outras características, aqui a colite é considerada severamente ativa devido a presença sangramento intraluminal (ULLMAN; ITZKOWITZ, 2011).

Figura 5 – Índice de Atividade Histológica da Retocolite Ulcerativa (RCU).



Fonte: Ullman; Itzkowitz (2011).

2.5 – Aspectos histológicos e colonoscópicos da lesão pré-neoplásica do CCR.

Os focos de cripta aberrante (ACF) são considerados as primeiras lesões pré-neoplásicas na progressão do CCR. A evolução do carcinoma na mucosa colorretal saudável começa quando alterações genéticas causam diferenciação desregulada e proliferação descontrolada das células das criptas (RONCUCCI *et al.*, 1991; TAKAYAMA *et al.*, 1998).

A figura 6 ilustra as características colonoscópicas e histológicas dos focos de cripta aberrante, e na imagem “A”, a colonoscopia magnificada com coloração em azul de metileno revela um pequeno foco consistindo em quatro criptas com lúmens semicirculares ou ovais, que estão destacadas por um halo amarelo. Na imagem colonoscópica, as criptas aberrantes coraram-se com azul mais escuro, são maiores e tem um revestimento epitelial mais espesso e uma zona peri-críptica maior que as criptas normais.

Histologicamente, há um ligeiro aumento, irregularidade e alongamento dos ductos, que são achatados, coincidindo com as características relatadas anteriormente de focos de criptas aberrantes sem displasia e sem hiperplasia, que estão destacados por um retângulo preto (Fotomicrografia “B”, hematoxilina e eosina, 180 X).

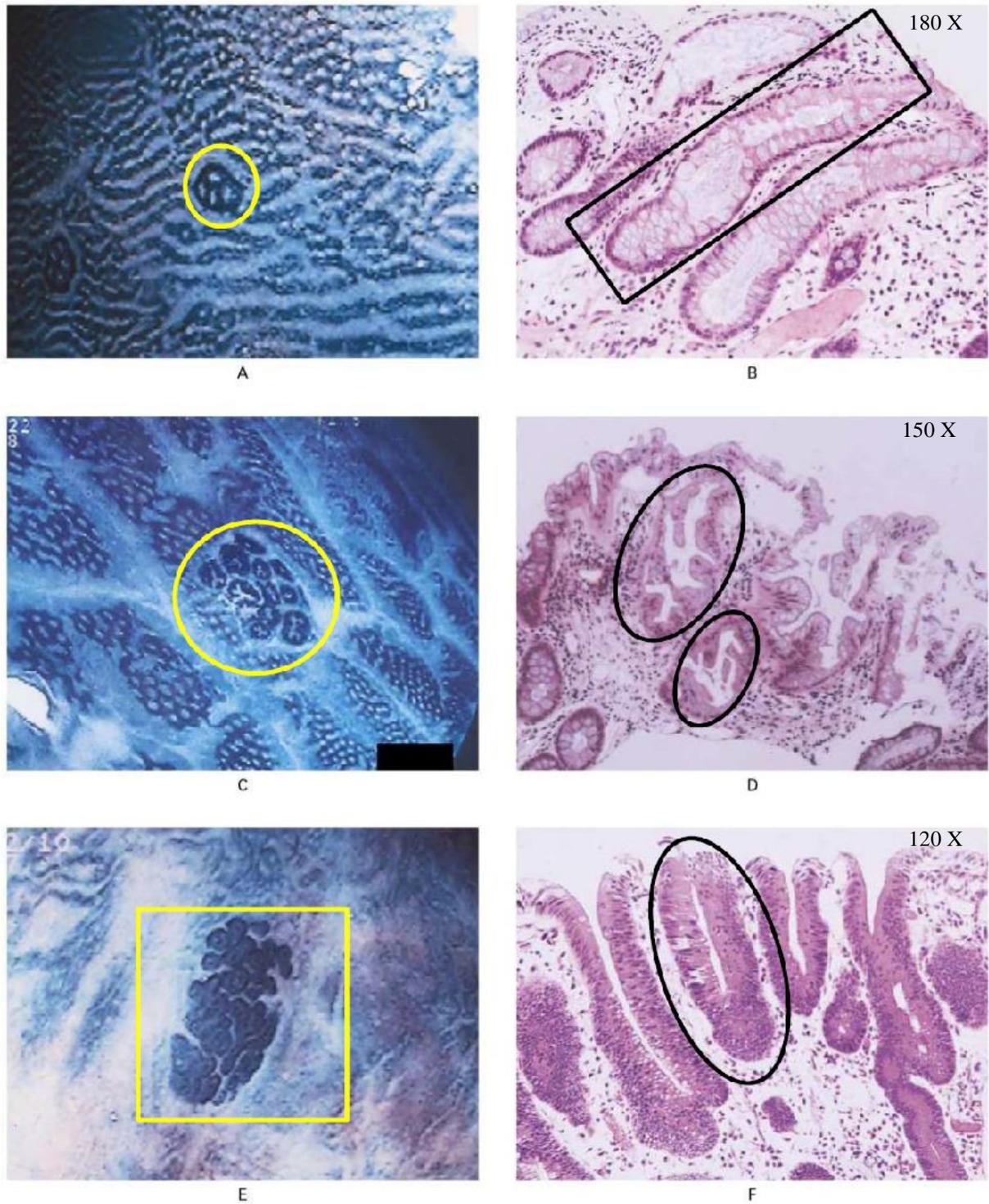
A imagem “C” mostra um foco médio composto por 13 criptas, cada uma com formato de asteroide ou fenda, que estão destacadas por um halo amarelo.

Histologicamente, há um padrão luminal serrilhado, característico de focos de criptas aberrantes com hiperplasia, que estão destacadas por dois halos pretos (Fotomicrografia “D”, hematoxilina e eosina, 150 X).

A imagem “E” mostra um foco grande com aproximadamente 40 criptas deformadas e levemente elevadas na mucosa (Destacado por um quadrado amarelo).

O revestimento epitelial é mais espesso do que o dos focos mostrados nas imagens “A” e “C”, e cada lúmen está colapsado ou não de forma distinta, e o exame histológico demonstra que houve a perda da polaridade nuclear, presença de hiper cromatismo dos núcleos e estratificação dos núcleos do epitélio da cripta, achados concordantes com as características relatadas anteriormente de focos de criptas aberrantes displásicas, que estão destacadas por um halo preto (Fotomicrografia “F”, hematoxilina e eosina, 120 X).

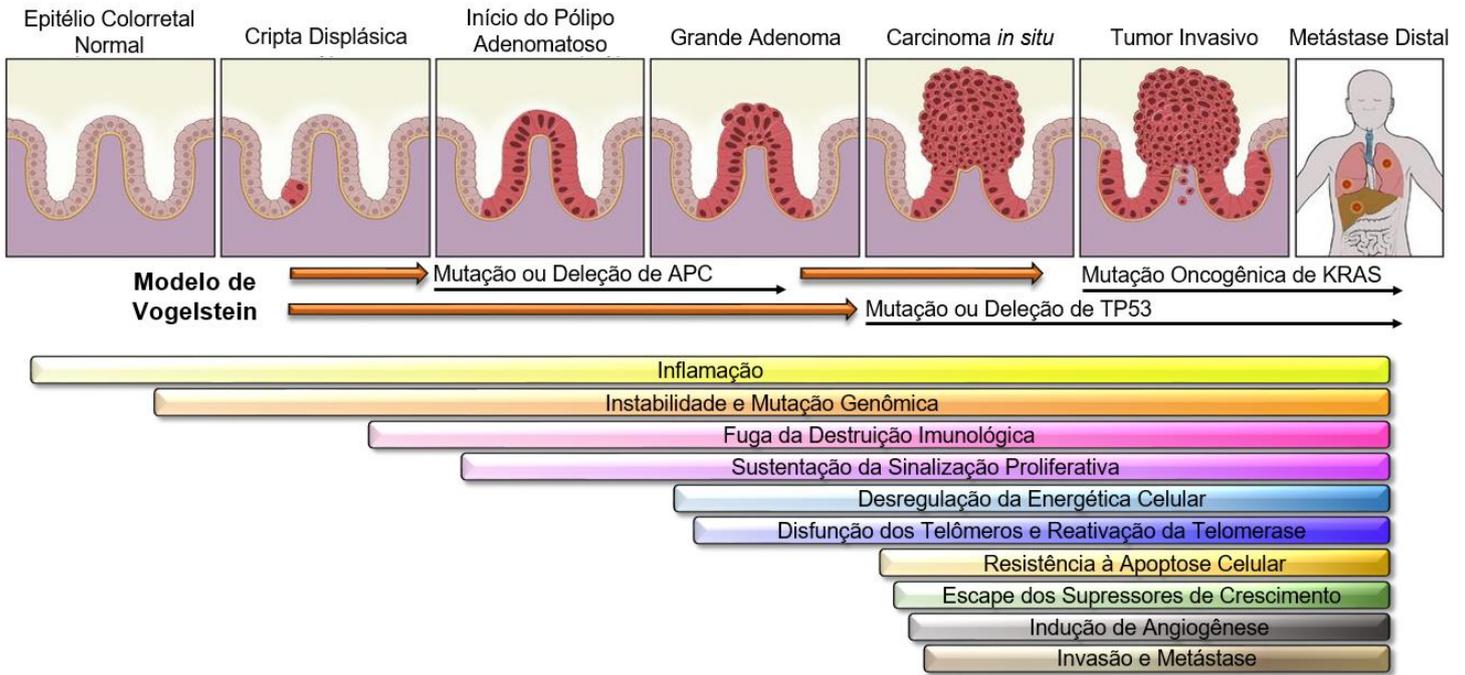
Figura 6 – Características colonoscópicas e histológicas dos focos de cripta aberrante.



Fonte: Adaptado de Takayama *et al.* (1998).

A figura 7 ilustra de maneira simplificada como o epitélio colorretal normal evolui até o CCR metastático após suas células sofrerem uma sequência de mutações gênicas (APC e KRAS), lesões no DNA e outras alterações genéticas como a inativação por mutação ou deleção da expressão gênica da proteína supressora tumoral TP53.

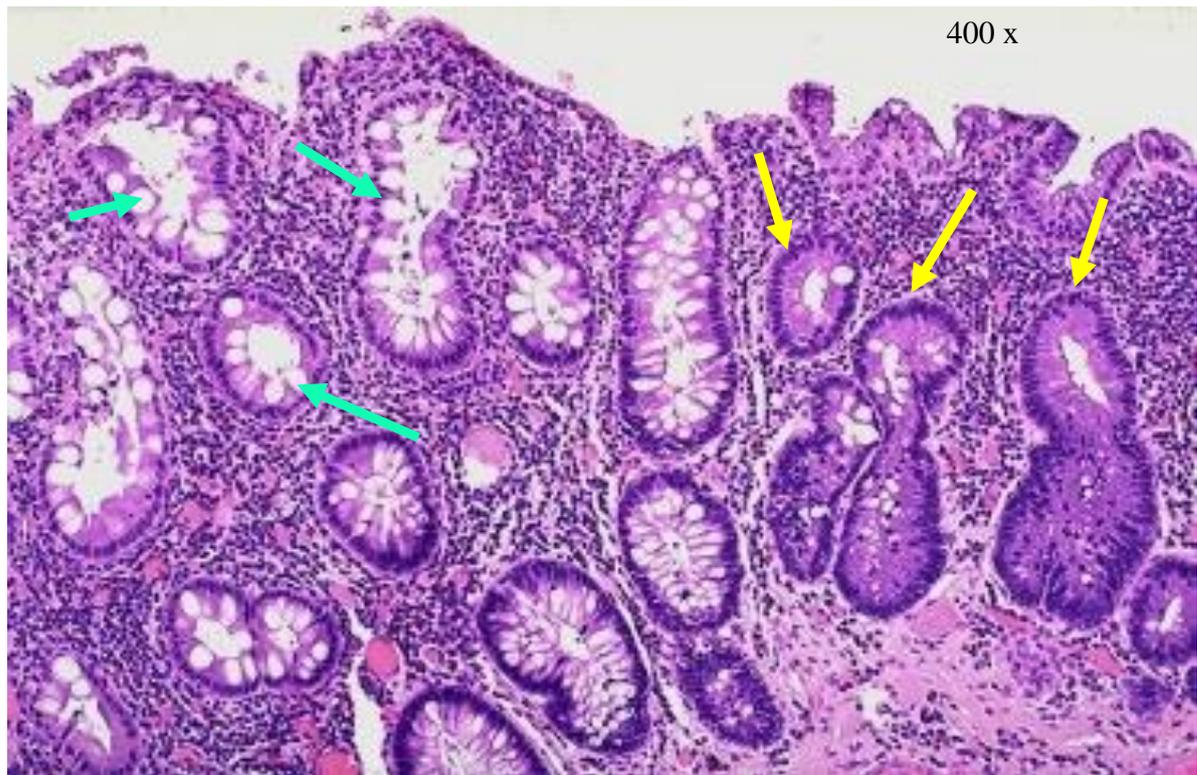
Figura 7 – Evolução da mucosa colônica normal até tumor metastático – Relação com multifatores promotores do CCR.



Fonte: Modificado de Li *et al.* (2021).

A figura 8 é uma fotomicrografia (400 X) de um corte histológico de mucosa colorretal em que coexistem criptas normais (Setas verdes) ao lado de criptas aberrantes (Setas amarelas). As criptas normais têm a luz mais aberta, uma população maior de células caliciformes e núcleos bem polarizados na base da célula, enquanto que as criptas aberrantes demonstram um padrão pseudo-estratificado de suas células, citoplasma mais escuro, escassez de células caliciformes e luz reduzida.

Figura 8 – Aspecto histológico da cripta normal e aberrante.



Fonte: Adaptado de Klatt (2020).

2.6 – Azoximetano e Dextran Sulfato de Sódio como indutores de CCR associado a colite em modelos animais.

As principais vantagens do modelo de indução do CCR associado a colite pelo Azoximetano (AOM) associado ao Dextran Sulfato de Sódio (DSS) incluem um cronograma relativamente curto e precisão de modelagem, visto que as tumorações podem se desenvolver em apenas 10 semanas, além disso, a histopatologia dos tumores induzidos por AOM/DSS guarda estreita relação com aqueles apresentados espontaneamente pelos seres humanos, pois os tumores são localizados distalmente no cólon e podem chegar a adenocarcinomas invasivos. O modelo AOM/DSS tem sido fundamental para desvendar a patogênese do CCR a partir do entendimento das vias de sinalização da carcinogênese (PARANG, BARRET, WILLIAMS, 2017).

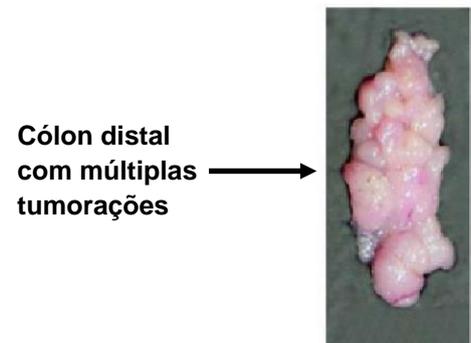
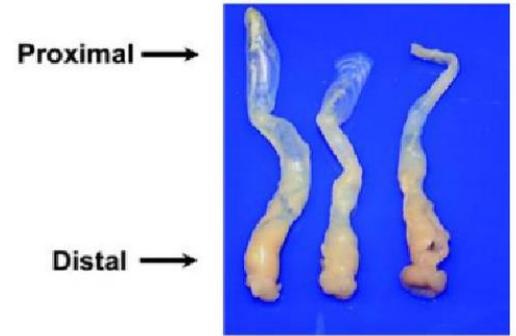
A figura 9 apresenta imagens colonoscópicas obtidas de ratos tratados com AOM/DSS e fotografias dos cólons removidos dos mesmos animais. Na seção (A) o aspecto colonoscópico da mucosa colorretal é normal (Imagem superior), e abaixo observa-se os adenomas. Na seção (B) três intestinos estão abertos (Imagem superior) e exibem mucosa proximal e distal normais, e na imagem inferior, diversas tumorações macroscópicas são observadas no cólon distal aberto.

Figura 9 – Aspecto colonoscópico e anátomo-patológico macroscópico do cancer colorretal.

A)



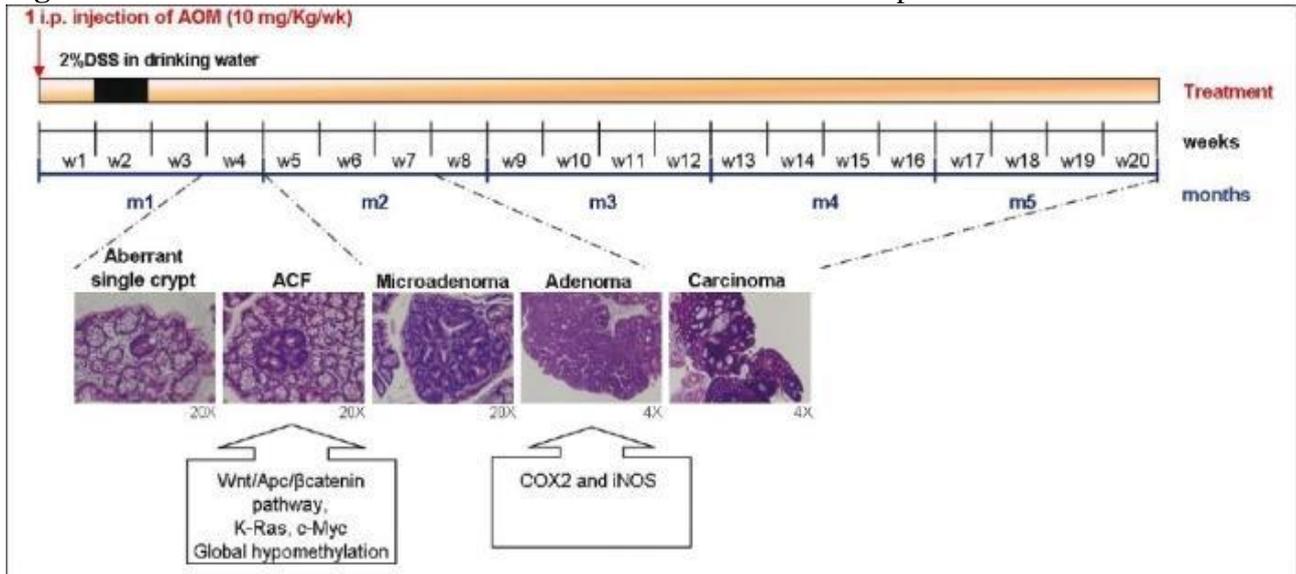
B)



Fonte: Parang, Barret, Williams (2017).

A figura 10 exemplifica o modelo de carcinogênese experimental associada a colite induzida em ratos pelo AOM/DSS realizado por Robertis, Massi e Fasio (2011). Nesse estudo pode-se observar que uma única dose de azoximetano 10 mg/Kg foi administrada no primeiro dia do experimento, e que o DSS a 2% foi oferecido na água de beber por 7 dias na segunda semana do estudo. Nota-se que até a quarta semana só são encontrados criptas aberrantes simples e focos de criptas aberrantes. Da quinta até a sétima semana foram encontrados microadenomas e adenomas, e da oitava até a vigésima semana foram observados carcinomas.

Figura 10 – Modelo de câncer colorretal associado e colite induzido por AOM/DSS.



Fonte: Robertis, Massi, Fasio (2011).

2.7 – O CCR tem relação com o Estresse do Retículo Endoplasmático e Resposta Proteica Desdobrada.

Conhecido por ter uma fisiopatologia multifatorial, o CCR guarda estreita relação com o Estresse do Retículo Endoplasmático (ERE) associado à resposta proteica desdobrada (**UPR** – **Unfolded Protein Response**), esta última, conhecida por conter as principais vias citomoleculares envolvidas na gênese, progressão e invasão de tumores de cólon (HUANG *et al.*, 2021).

Apesar de algumas vias de sinalização já terem sido descritas, ainda há muito a ser descoberto a despeito do ERE e da UPR, além do que, vários mecanismos relacionados à carcinogênese ainda precisam ser esclarecidos.

2.8 – Retículo endoplasmático e as proteínas chaperonas.

As chamadas Proteínas de Choque Térmico (**HSP** - **Heat Shock Proteins**) foram descritas pela primeira vez por Ferruccio Ritossa (RITOSSA, 1962). Ele observou que ao elevar a temperatura de larvas de *Drosophila*, houve um aumento na transcrição gênica para tradução de proteínas, que na época, ainda não eram conhecidas. Anos após, o termo chaperona molecular foi cunhado em 1978 pelo pesquisador Ron Laskey para descrever uma proteína nuclear envolvida na síntese de nucleossomos de histonas e DNA em extratos de ovos de anfíbios. A palavra chaperona é utilizada, em analogia, com o termo *chaperon*, que em francês significa “dama de companhia” (LASKEY *et al.*, 1978).

Estudos subsequentes demonstraram um grande número de chaperonas (HSPs), que estão distribuídas de forma ubíqua nas células eucariotes e formam grandes famílias, que são classificadas conforme seu peso molecular em kilodaltons (kDa). Dessa forma, as principais HSPs estão distribuídas em diferentes famílias, incluindo HSP100s, HSP90s, HSP70s, HSP60s, HSP40s e algumas pequenas HSPs (15–40 kDa), denominadas chaperoninas (HENDRICK; HARTL, 1993).

A depender do seu subtipo, as chaperonas podem ser encontradas em vários compartimentos celulares como o citosol, núcleo e organelas como o retículo endoplasmático e até nas mitocôndrias. Entretanto, as chaperonas de interesse nesse estudo são as HSPs que residem no lúmen do retículo endoplasmático (ER), e nesse espaço desempenham diversas importantes funções relacionadas à proteostase e proteção celular (BUCK; WRIGHT; BRODSKY, 2007).

O retículo endoplasmático (RE) rugoso, organela conectada a membrana nuclear, é sede da maioria dos processos de síntese, tradução, dobramento e controle de qualidade das

proteínas. Esses processos devem ser organizados e harmônicos para que possam processar diversas conformações espaciais de proteínas específicas, mas também devem ser sensíveis o suficiente para reconhecer quando uma proteína irrecuperável deve ser degradada. As HSPs são as responsáveis por organizar e realizar essas funções (BUCK; WRIGHT; BRODSKY, 2007).

Em algumas situações em que as HSPs do retículo endoplasmático não conseguem realizar o processo de dobragem de proteínas defeituosas, essas poderão ser encaminhadas para serem degradadas por um sistema conhecido como ERAD (Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation), tendo como objetivo aliviar a sobrecarga do RE (WORBY; DIXON, 2014; CAO; KAUFMAN, 2012).

O sistema ERAD é ativado utilizando-se de uma complexa interação entre a proteína a ser degradada e outras proteínas transmembranares intermediárias do RE (Hrd1, Doa10, Ubc7, Cue1). Inicialmente, a proteína condenada interage com as proteínas citosólicas (Cdc48, Npl4 e Ufd1), e em seguida recebe uma molécula de ubiquitina das proteínas Uba1 e Ubc7. Na sequência sofre a remoção de uma molécula de glicano pela Png1, e finalmente, é encaminhada para a destruição pelo proteossoma citosólico, auxiliada pelas proteínas Ufd2 e Rad23 (WORBY; DIXON, 2014; CAO; KAUFMAN, 2012; THIBAUT; NG, 2012).

Quando o ERE for intenso e duradouro, ultrapassando a capacidade das HSPs de corrigir as proteínas deformadas ou induzir a ubiquitinação (degradação proteica com reaproveitamento dos aminoácidos), a UPR ativará as proteínas IRE1- α , PERK e ATF6, e uma complexa cascata de sinalização secundária, envolvendo diversas proteínas citoplasmáticas e nucleares, será ativada culminando em apoptose (SZEGEZDI *et al.*, 2006).

Três são os principais grupos de chaperonas que atuam no mecanismo de dobramento e degradação (ubiquitinação) das proteínas do RE: As proteínas de choque térmico (por exemplo, HSP40, HSP60, HSP70 e HSP90), as lectinas do RE (por exemplo, calnexina, calreticulina) e as tiol oxidoredutases (por exemplo, Protein Disulfide Isomerase - PDI) (AHNER; BRODSKY, 2004; VASHIST; NG, 2004).

A fisiopatogenia de diversas doenças está intimamente relacionada a defeitos no funcionamento do controle de qualidade e degradação de proteínas no RE (**ERQC** - **Endoplasmic Reticulum Quality Control**). Como exemplos, podemos citar a fibrose cística, esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer, Parkinson, doença de Huntington, diabetes mellitus, obesidade, doença cardiovascular e até alguns tipos de cânceres. Essas e outras enfermidades são desencadeadas quando proteínas específicas não são adequadamente dobradas e escapam dos mecanismos de degradação, acumulando-se como agregados tóxicos

no RE e induzindo apoptose celular (MCCRACKEN; BRODSKY, 2003; KREPLAK; AEBI, 2006; HAN *et al.*, 2006).

Cada HSP pode desempenhar funções específicas e isoladas, entretanto, em alguns mecanismos de sinalização molecular, algumas chaperonas trabalham em cooperação para realizar tarefas de dobramento e degradação proteica, ou interagindo com outras proteínas citoplasmáticas, nucleares e do RE (BUCK; WRIGHT; BRODSKY, 2003).

As HSP desempenham funções específicas e isoladas, mas em alguns mecanismos de sinalização molecular, cooperam no enovelamento e degradação de proteínas, e até interagem com outras proteínas citoplasmáticas, nucleares e do retículo endoplasmático (BUCK; WRIGHT; BRODSKY, 2007). A figura 11 contém um quadro onde estão descritas as famílias, localização na célula, funções e marcadores prognósticos das principais chaperonas moleculares relacionadas ao CCR (ZAMER *et al.*, 2021).

Figura 11 –Principais características celulares e bioquímico-moleculares das proteínas de choque térmico e potenciais alvos para ferramentas terapêuticas.

Principais famílias	Tipos de HSPs	Compartmentalização celular	Funções e processos bioquímicos	Prognóstico	Referências
HSP90	HSP90	Citoplasma, célula, membrana.	Estabiliza MutS p53, promove o acúmulo de F-FDG, inibe a E-caderina, medeia a EMT.	Mau prognóstico, um fator de risco independente para sobrevivência geral (OS).	ZHANG et al. (2019); Basset et al. (2023).
	GRP94	Reticulo endoplasmático.	Ativa células imunes.	Aumento do tamanho do tumor e estágio pT.	BRZOZOWA-ZASADA et al. (2019); KIM; CHO; LEE (2019).
	TRAP1	Matriz mitocondrial.	Protégé as mitocôndrias do acúmulo de ROS	Invade e reduz a OS.	BRUNO et al. (2022); XIE et al. (2021).
HSP70	HSP70	Citosol.	Ativa RTK, estabiliza β -catenin.	Marcador prognóstico no CCR primário.	JIANG et al. (2021); ZHAO et al. (2023).
	GRP75	Mitocôndria.	Promove a retenção de P53 e a via Wnt/ β -catenina, EMT.	Pobre OS e pobre prognóstico.	FENG et al. (2022); ROZENBERG et al. (2013).
	GRP78	Reticulo endoplasmático.	Ativa a UPR.		HARDY et al. (2013); XI et al. (2018).
sHSP	HSP27	Citosol.	EMT, regula negativamente as moléculas associadas ao ciclo celular, regula o influxo de Ca^{2+} , promove o “efeito Warburg”.	Profundidade do tumor primário do CCR e redução da sobrevida livre de recorrência.	LIU et al. (2020); HUANG et al. (2018).
	HSPB3	Citosol.		Pobre sobrevivência sem recaídas (RFS) and OS.	KALIORAKI et al. (2020);
	HSPB5	Citosol.	Inibe NF- κ B.	Grau do tumor, potencial marcador prognóstico.	LI et al. (2017); ARRIGO; GIBERT (2024).
HSP60	HSP60	Mitocôndria.	Aumenta a atividade do IGFBP7, promove o acúmulo de adenina, ativa a AMPK.	Marcador prognóstico para estágio tardio do CCR e metástase hepática, marcador diagnóstico precoce.	GUO et al. (2021); ZENG et al. (2022).
HSP110		Reticulo endoplasmático, citosol.	Ativa a via STAT3, favorece macrófagos anti-inflamatórios.	Mau prognóstico, pobre OS, metástases.	BERTHENET et al. (2016); CAUSSE et al. (2019).

Fonte: Modificado e adaptado de ZAMER *et al.* (2021).

Para abreviaturas consulte “LISTA DE ACRÔNIMOS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS”.

2.9 – Ativação da resposta proteica desdobrada.

A Resposta Proteica Desdobrada (UPR) é o mecanismo que as células utilizam para manter o equilíbrio do enovelamento das proteínas no RE. A proteína corretamente dobrada atinge seu estado nativo ou funcional, sendo direcionada para destinos intracelulares e respectivas estruturas, ou pode ser secretada para ação à distância (por exemplo, enzimas digestivas, hormônios, proteínas de transporte e outros) (SCHWARZ; BLOWER, 2016).

Quando proteínas mal dobradas se acumulam no RE, a UPR é acionada e a sobrecarga recruta chaperonas para dobrar as proteínas defeituosas. A UPR opera reduzindo a quantidade de proteínas mal dobradas, aliviando a pressão sobre o RE estressado, aumentando a capacidade de dobramento do RE e degradando algumas proteínas defeituosas que demoram mais para serem reparadas. Como *feedback* negativo, uma vez que a ativação da UPR consiga reduzir as proteínas desdobradas, a UPR será inativada e o equilíbrio de dobramento de proteínas da célula retornará ao normal. Caso contrário, a célula pode ser encaminhada para a apoptose. (LIN; WALTER; YEN, 2008).

A UPR compreende três proteínas transmembranares (IRE1- α , PERK e ATF6) que coordenam todas as cascatas de sinalizações direcionadas para o reequilíbrio do RE e para consequente proteção celular. Nos casos de danos irreparáveis às proteínas, e quando os eventos desencadeadores de estresse forem irrecuperáveis, a célula será induzida a entrar em apoptose.

Sabe-se que essas proteínas atuam em cooperação, ativando e bloqueando moléculas entre si, tanto no RE quanto no citosol e núcleo. É importante reconhecer o papel individual e coletivo dessas proteínas para compreender a complexidade dos eventos de controle deste delicado microambiente, visando relacionar essas reações com a fisiopatologia do CCR (WALTER; RON, 2011).

2.10 – A via de ativação e sinalização do IRE1- α reduz a carga proteica.

A ativação de IRE1- α (proteína transmembrana quinase 1 alfa - tipo I) começa quando GRP78, também conhecido como BiP (**B**inding **P**rotein), deixa seu sítio de ligação no domínio luminal de IRE1- α , ponto em que os homodímeros IRE1- α são montados no plano da membrana do retículo endoplasmático (GRAY *et al.*, 2020). Ocorre então uma transautofosforilação que aumenta a atividade da quinase e da RNase, cuja reação remove um íntron de 26 bases do mRNA que codifica a proteína de ligação XBP1 (X-box-binding protein 1), resultando na formação do fator de transcrição XBP1s (*Splicing* da proteína 1 de ligação ao X-box). A XBP1s viaja até o núcleo e ativa um programa de transcrição que estimula a produção de chaperonas e outros fatores de transcrição, que controlam a qualidade do RE, com síntese de fosfolípidos

necessários para a expansão do RE sob estresse e ativação do ERAD (HETZ *et al.*, 2011). Outra via de sinalização originada do IRE1- α ativa a degradação de mRNAs associados ao RE, promovendo RIDD (IRE1- α - Decadência regulada de mRNAs dependente de IRE1- α), reduzindo a carga proteica e promovendo a adaptação metabólica. Numa terceira forma, o IRE1- α também pode modular positivamente a quinase N-terminal c-Jun (JNK), uma proteína citoplasmática responsável por induzir a apoptose (URANO *et al.*, 2000).

2.11 – Ativação da via de sinalização PERK para minimizar a tradução.

PERK é uma proteína transmembrana tipo I, com a extremidade serina/treonina quinase voltada para o espaço citosólico, e que constitui o sensor ERE mais sensível. Em uma situação de ERE, a chaperona GRP78 se desacopla da PERK em sua extremidade luminal no RE, e então sofre oligomerização e trans-autofosforilação (CAO; KAUFMAN, 2012; HARDING *et al.*, 2000).

A ativação de PERK fosforila a serina 51 da subunidade eIF2- α (fator 2 de iniciação da tradução eucariótica) e, conseqüentemente, ocorre atenuação da tradução. A rápida redução global na tradução diminui a quantidade de proteínas recém-sintetizadas que migram para o RE, atenuando o enovelamento das proteínas e aliviando a carga no RE. Entretanto, alguns mRNAs escapam da inibição da tradução e ativam o fator de transcrição 4 (ATF4), que migra para o núcleo e modula a expressão de genes responsáveis pelo metabolismo de aminoácidos, equilíbrio redox, enovelamento de proteínas, sobrevivência celular e autofagia (RON, 2002).

No núcleo, o ATF4 encontra o gene da proteína homóloga C/EBP (CHOP/GADD153) e codifica um fator de transcrição que regula a apoptose. ERE que induz a apoptose (HETZ, 2012). O principal mecanismo que explica a apoptose induzida por CHOP é a produção de ERO induzida pela expressão de ER oxidoredutina-1 alfa (ERO1- α) (MARCINIAK *et al.*, 2004). PERK também sinaliza eIF2- α ativando a transcrição do fator nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) através da repressão translacional do inibidor kappa β ($I\kappa\beta$), induzindo a regulação de apoptose (JIANG *et al.*, 2003). A Figura 1 mostra uma visão geral da sinalização UPR e dos efeitos intranucleares resultantes de sua ativação.

2.12 – Ativação das vias de sinalização UPR.

A UPR é o mecanismo que as células lançam mão para manter o equilíbrio do dobramento de proteínas no retículo endoplasmático. Quando uma proteína é corretamente enovelada, dizemos que ela alcançou seu estado nativo, ou seja, funcional, então ela será endereçada para destinos intracelulares (outras organelas, parede celular, compartimento

nuclear ou mitocondrial), ou poderá ser secretada para atuar à distância, em outras células ou tecidos (por exemplo, enzimas digestivas, hormônios, proteínas transportadoras e outras) (SCHWARZ; BLOWER, 2016).

Quando proteínas desdobradas se acumulam no retículo endoplasmático a UPR é acionada. Essa sobrecarga recruta chaperonas encarregadas de enovelar as proteínas defeituosas, dessa forma, a UPR trabalha para reduzir o número de proteínas não enoveladas presentes no RE (LIN; WALTER; YEN, 2008).

Com a ativação da UPR, vários mecanismos são acionados visando aliviar a pressão no RE estressado, como por exemplo a diminuição do número de proteínas que precisam ser dobradas, o aumento da capacidade de dobramento do RE e a degradação de algumas das proteínas desdobradas que demoram mais para serem corrigidas (LIN; WALTER; YEN, 2008). Caso os mecanismos decorrentes da ativação da UPR consigam reduzir o número de proteínas desdobradas, a UPR será inativada e o equilíbrio do enovelamento de proteínas das células voltará ao normal. Do contrário, a célula poderá ser encaminhada para apoptose (LIN; WALTER; YEN, 2008).

A UPR é formada por três proteínas transmembranares (IRE1- α , PERK e ATF6) que coordenam todas as cascatas de sinalização destinadas ao reequilíbrio do RE e consequente proteção celular ou, apoptose, quando os eventos que desencadearam o estresse forem irrecuperáveis. Sabe-se que essas proteínas, quando ativadas, trabalham em cooperação acionando e bloqueando moléculas umas das outras, tanto no RE quanto no citosol e núcleo. É importante reconhecer o papel individual e coletivo dessas proteínas para entender a complexidade dos eventos de controle desse delicado microambiente, visando o entendimento dessas reações com a fisiopatogenia do CCR (WALTER; RON, 2011).

2.13 – Via de sinalização IRE1- α .

A ativação de IRE1- α (uma proteína transmembranar do tipo I) inicia-se quando o GRP78 (Glucose Regulated Protein – 78), uma chaperona da família da HSP70, também conhecida como BiP (Binding Protein [Proteína de ligação]) abandona seu sítio de ligação no domínio luminal de IRE1- α , momento em que homodímeros de IRE1- α são montados no plano da membrana do RE (GRAY *et al.*, 2020). Na sequência, ocorre a trans-autofosforilação que aumenta a atividade da quinase e RNase, reação essa que remove um íntron de 26 bases do mRNA que codifica a proteína de ligação X-box 1 (XBP1 - X-box-binding protein 1), resultando na formação do fator de transcrição X-box binding protein1 *splicing* (XBP1s). O XBP1s viaja para o núcleo e ativa um programa de transcrição que estimula a produção de

chaperonas e outros fatores transcripcionais, proteínas envolvidas no controle de qualidade do RE, síntese de fosfolipídios necessários para a expansão do RE sob estresse, e ativação de ERAD (HETZ *et al.*, 2011).

Outra via de sinalização oriunda do IRE1- α ativa a degradação de mRNAs associados ao RE, promovendo o decaimento de mRNAs dependente de IRE1- α (**RIDD - Regulated IRE1-Dependent Decay of mRNAs**), reduzindo a carga proteica e promovendo a adaptação metabólica. Numa terceira via, o IRE1- α também pode modular positivamente a quinase N-terminal c-Jun (JNK), uma proteína citoplasmática responsável por induzir apoptose (URANO *et al.*, 2000).

2.14 – Via de sinalização PERK.

PERK é uma proteína transmembranar do tipo I com a extremidade serina/treonina quinase voltada para o espaço citosólico, e constitui-se o sensor mais sensível de ERE. Em situação de ERE, a chaperona GRP78 desacopla de PERK em sua extremidade luminal do RE, e em seguida, sofre oligomerização e trans-auto-fosforilação (CAO; KAUFMAN, 2012; HARDING *et al.*, 2000). A ativação de PERK fosforila a serina 51 da subunidade de eIF2- α (**eIF2- α - Eukaryotic Initiation Factor 2 Alfa**), e como consequência, ocorre a atenuação da tradução. A rápida redução global da tradução diminui a quantidade de proteínas recém-sintetizadas que migram para o RE, atenuando o enovelamento de proteínas e aliviando a sobrecarga sobre o RE. Entretanto, alguns mRNAs escapam da inibição da tradução e ativam o fator de transcrição 4 (**ATF4 - Transcription Factor 4**), que migra para o núcleo e modula a expressão de genes responsáveis pelo metabolismo de aminoácidos, balanço redox, dobramento de proteínas, sobrevivência celular e autofagia (RON, 2002).

No núcleo, o ATF4 encontra o gene da Proteína homóloga C/EBP (CHOP/GADD153) e codifica um fator de transcrição que regula a apoptose, dessa forma o PERK é fundamental para a modulação dos mecanismos de alternância entre a fase adaptativa e crônica do ERE que induz apoptose (HETZ, 2012).

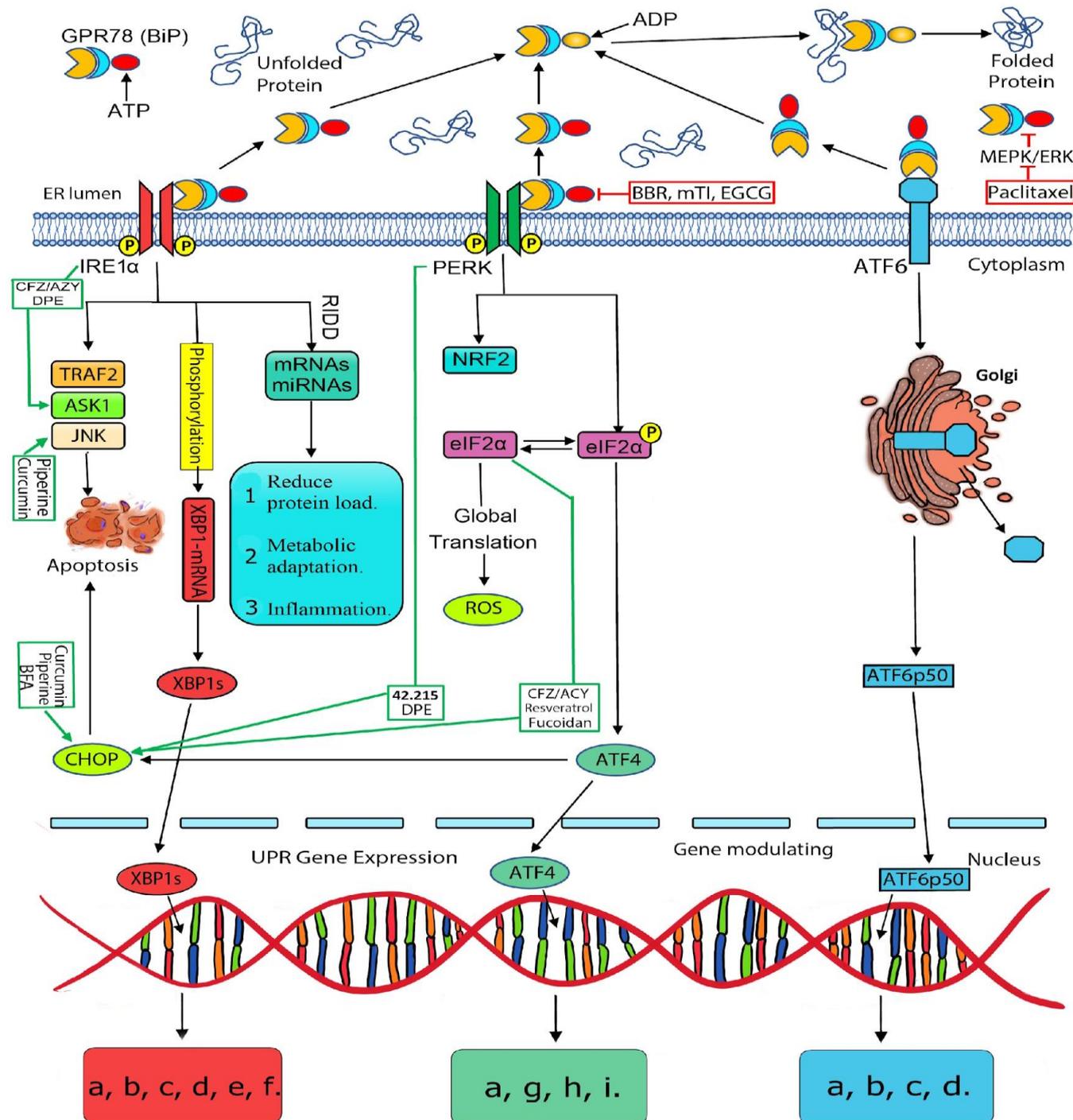
O principal mecanismo que explica a apoptose induzida pelo CHOP é a produção de ROS induzida pela expressão de oxidoredutina-1 alfa (**ERO1- α - Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin-1 Alpha**) no RE (MARCINIAK *et al.*; 2004).

PERK também sinaliza eIF2- α ativando a transcrição do fator nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) através da repressão translacional do inibidor de kappa β ($I\kappa\beta$), induzindo a regulação de apoptose (JIANG *et al.*, 2003).

2.15 – Via de sinalização ATF6.

ATF6 é uma proteína do tipo II ancorada na membrana do RE com um domínio do fator de transcrição CREB/ATF bZip no terminal amino situado na porção luminal da organela. Com o acúmulo de proteínas desdobradas ou mal dobradas no RE, a chaperona GRP78 abandona seu sítio de ligação no ATF6 no lado luminal do RE, libertando o ATF6 para migrar para o aparelho de Golgi, onde é clivado dando origem ao complexo ATF6p50. Este viaja para o núcleo onde ativa genes-alvo de ATF6- α que incluem as chaperonas GRP78, GRP94, componentes ERAD, os genes UPR XBP1, inibidor de proteína quinase de 58 kDa (P58IPK/DNAJC3) e CHOP (YAMAMOTO *et al.*, 2007; ADACHI *et al.*, 2008). A Figura 12 mostra uma visão geral da sinalização UPR e dos efeitos citoplasmáticos e intranucleares resultantes de sua ativação.

Figura 12 - Visão geral da sinalização da Resposta de Proteína Desdobrada no estresse do Retículo Endoplasmático.



Visão geral das vias de sinalização da UPR e eventos intranucleares ativados pela expressão gênica de XBP1s, ATF4 e ATF6p50, e representação esquemática de como as drogas afetam a UPR no CRC (caixas verdes e vermelhas). A ativação de IRE1- α leva a uma ativação em cascata a jusante de XBP1s. A ativação de PERK modula vários mecanismos de expressão gênica nos núcleos. A cascata de ativação PERK gera ATF4 como último agente citoplasmático, que atravessa os poros dos núcleos e ativa diversos genes. A ativação de ATF6 induz sua própria clivagem no complexo

de Golgi onde o segmento terminal do ATF6 é amputado de sua porção proximal, gerando ATF6p50. Este último, migra para o núcleo para interagir com o DNA, modulando a expressão gênica. Efeitos da ativação intranuclear de XBP1s, ATF4 e ATF6p50: [a] - Enovelamento de proteínas no retículo endoplasmático; [b] – Síntese proteica; [c] - Ativação de ERAD; [d] - Biogênese no retículo endoplasmático e proteínas no complexo de Golgi; [e] – Tradução; [f] – Inflamação; [g] – Metabolismo de aminoácidos; [h] – Resposta antioxidante; [i] – Autofagia. Fonte: Modificado e adaptado de HETZ, ZHANG, KAUFMAN (2020). Para abreviações, ver “LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS”.

2.16 – Inter-relação entre os sistemas IRE1- α , PERK e ATF6.

2.16.1 – Via de sinalização ATF6 ativa o ERAD.

A ativação do ATF6 durante o ERE requer a participação integrada das vias de sinalização PERK/eIF2- α /ATF4 (TESKE *et al.*, 2011). Foi demonstrado que o ATF6- α promove a indução de ERAD quando heterodimeriza com XBP1. Este heterodímero ATF6-XBP1 possui oito vezes mais afinidade pelo elemento UPR do que o homodímero XBP1 (YAMAMOTO *et al.*, 2007). Dois são os principais efeitos finais resultantes da interação dos vários constituintes da UPR, adaptação e sobrevivência celular e apoptose. Para alcançar esses efeitos, dezenas de moléculas dos três principais sinalizadores ERE interagem entre si em complexas cascatas envolvendo principalmente a ativação de IRE1- α , PERK e ATF6 (HUANG *et al.*, 2021).

2.16.2 – Caminhos de adaptação e sobrevivência celular.

Quatro caminhos são possíveis para alcançar a adaptação e sobrevivência celular. O primeiro envolve a ativação de PERK, e posteriormente NRF2, ARE e Keap1 e, finalmente, a modulação de enzimas redox. A segunda via de adaptação requer a ativação inicial de PERK, seguida de eIF2- α , ATF4 e finalmente a modulação de genes ERAD e chaperonas. A terceira via começa com a ativação de IRE1- α , seguida por XBP1, XBP1s e finalmente a ativação de genes ERAD e chaperonas. A quarta e última via de sinalização interativa que culmina na adaptação e sobrevivência celular começa quando o ATF6 é ativado, em sequência, o ATF6 viaja até o aparelho de Golgi onde é clivado em ATF6p50, que finalmente modula a ação dos genes ERAD e chaperonas (HUANG *et al.*, 2021).

2.16.3 – Caminhos para ativação de apoptose.

Para que a apoptose ocorra, cinco caminhos são possíveis de serem percorridos. O primeiro requer ativação PERK, seguido por eIF2- α , ATF4 e finalmente CHOP. A segunda via

começa com a ativação de PERK, seguida por eIF2- α fosforilado, GADD34, eIF2- α desfosforilado e finalmente ROS. A terceira via começa com a ativação de IRE1- α seguida por TRAF2, ASK1 e finalmente JNK. A quarta via começa quando o IRE1- α é ativado, seguido pelas moléculas XBP1, XBP1s e CHOP. A quinta e última via de sinalização para apoptose ocorre quando o ATF6 é ativado, e na sequência o ATF6 viaja até o aparelho de Golgi onde é clivado em ATF6p50, que finalmente desencadeia o fator de transcrição CHOP (HUANG *et al.*, 2021).

Estudos recentes demonstram uma nova retrointeração entre XBP1, ATF6 e PERK-eIF2- α , apresentam potencial para ativar ou silenciar vias de sinalização envolvidas na tumorigênese e resistência à quimioterapia. Durante a proliferação tumoral, as células cancerígenas adquirem diversas características adaptativas que lhes permitem sobreviver e prosperar mesmo diante de condições microambientais desfavoráveis, como o ERE (URRA *et al.*, 2016).

Novos conhecimentos mostram que a ativação da UPR é a principal responsável por muitas características tumorais, incluindo instabilidade genômica, angiogênese, invasão, proliferação, dormência celular, sobrevivência e fuga de apoptose. Esses pesquisadores demonstraram uma nova interação cruzada entre XBP1 e ATF6 ativados e PERK-eIF2- α (SPAAN *et al.*, 2019).

Verificou-se que a interação entre XBP1 e PERK-eIF2- α é diretamente responsável pelo efeito antiproliferativo do XBP1. Os resultados deste estudo mostraram a relevância da ação do PERK-eIF2- α na redução da viabilidade das células tumorais. A partir desta pesquisa, podem ser abertas frentes de conhecimento suficientes para potencializar tratamentos utilizando os efeitos da interação XBP1 e PERK-eIF2- α na prevenção ou combate de malignidades intestinais (SPAAN *et al.*, 2019).

2.17 – Mecanismos antagonistas observados na ativação da UPR pelo ERE.

2.17.1 – Sobrevivência de células neoplásicas por ativação da UPR.

Geralmente, as células saudáveis, em circunstâncias homeostáticas, mantêm sua UPR em estado inativo em condições basais, ativando-a apenas em situações de desafios fisiológicos que induzem o RE (HETZ; CHEVET; HARDING, 2013).

A ativação da UPR pode induzir a adaptação e sobrevivência das células tumorais e promover a apoptose dessas células. Além disso, a UPR pode desempenhar um papel inverso no efeito metastático. Existem vários mecanismos que as células neoplásicas utilizam para sobreviver e prosperar no microambiente tumoral hostil e na presença de agentes

quimioterápicos. A ativação de algumas vias de sinalização da UPR é essencial para que as células tumorais se adaptem aos regimes de hipóxia, privação de nutrientes, produção de ERO1- α e ação das células do sistema de defesa antitumoral (URRA *et al.*, 2016).

Ao contrário das células normais, as células cancerígenas comumente expressam a ativação típica da sinalização UPR buscando adaptação, enquanto modulam os sinais anti-apoptóticos. Esses fatos demonstram claramente que as células neoplásicas podem adquirir a capacidade de autosseleção, permitindo-lhes sobreviver em ambientes desfavoráveis (HETZ; CHEVET; HARDING, 2013).

A modulação positiva de IRE1- α induz a expressão de XBP1, XBP1s e ERAD, facilitando ainda mais a sobrevivência da célula maligna (MAUREL *et al.*, 2015). A ativação de PERK via ARE, Keap1 e ATF4 também pode favorecer a sobrevivência de células neoplásicas em ambientes hostis, com deficiência de nutrientes, escassez de ATP, produção de ERO1- α e hipóxia (RANGANATHAN *et al.*, 2006).

2.17.2 – A vida e morte das células neoplásicas são controladas pela via CHOP.

O crescimento do tumor geralmente é interrompido por células mieloides infiltrantes do tumor, como as células dendríticas (**BMDC - Bone Marrow Dendritic Like Myeloid Cells**). Porém, a sinalização emitida pelo tumor, ainda não elucidada, altera o BMDC para um fenótipo que apresenta imunidade antitumoral mediada por células. Desta forma, este mecanismo regula negativamente a apresentação cruzada do antígeno de alta afinidade e falha ao tentar apresentar os antígenos tumorais aos receptores TCD8⁺, determinando assim a ativação de células T sem proliferação, evitando que o sistema imunológico identifique e destrua as células tumorais (MAHADEVAN *et al.*, 2012).

Na via de sinalização PERK, o CHOP é um mediador chave que induz a apoptose na presença de ERE. A sequência PERK-eIF2- α -ATF4-CHOP é uma via determinante de CHOP que culmina em apoptose. Além disso, o ATF6 também dá uma contribuição importante para a produção de CHOP nos primeiros momentos do ERE, e o XBP1 regula o CHOP de forma mais atenuada. Quando o ERE é cronicamente sustentado e intenso, o CHOP induz a danos ao DNA34 (GADD34), aumentando a formação de ERO1- α , que por sua vez, agrava o ERE e determina a morte da célula tumoral (MÁRTON *et al.*, 2022). O NRF2, uma proteína sinalizadora a jusante de PERK, promove a adaptação celular e o crescimento do câncer. A proteína 1 associada a ECH semelhante a NRF2-Kelch (Keap1) e o elemento de resposta antioxidante NRF2 (**ARE - Antioxidant Response Element**), podem neutralizar os efeitos nocivos das ROS nas células tumorais e restaurar o equilíbrio redox do microambiente tumoral,

promovendo a sobrevivência do tumor diante de agentes adversos, como a quimioterapia (KHODAKARAMI *et al.*, 2022).

ATF6p50, ATF4 e XBP1s atuam sinergicamente para estimular o CHOP e induzir a apoptose. A via JNK iniciada pela ativação de IRE1- α , TRAF2 e ASK1 pode desencadear morte celular apoptótica e necrótica. Além disso, a geração de ERO1- α estimulada pela ação do eIF2- α também pode causar apoptose tumoral (IURLARO; MUÑOZ-PINEDO, 2016).

CHOP (um fator de transcrição bZIP de 29 kDa) é um mediador canônico vital de apoptose induzida por ERE. Quando ativado, desencadeia diversos fatores facilitadores de apoptose, incluindo modelagem conformacional de Bim (**B**cl-2-**i**nteracting **m**ediator of cell death), um membro pró-apoptótico da família do linfoma de células B2 (**BCL-2** - **B**2 cell Lymphoma), receptor de morte 5 (**DR5** - **D**eath **R**eceptor **5**) e fator de ligação repetida telômero 3 (**TRB3** - **T**elomere **R**epeat **B**inding factor **3**) (PUTHALAKATH *et al.*, 2007; MCCULLOUGH *et al.*, 2001).

2.17.3 – Via PERK e indução de metástase.

A via predominante da UPR responsável pela metástase é a PERK, pois é através da sua ativação que ocorre o início da angiogênese. Esse mecanismo se deve ao aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (**VEGF** - **V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor), que atua como agente angiogênico e contribui para a sobrevivência das células endoteliais, através da ação de VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFF e fator de crescimento placentário (**PIGF** - **P**lacental **G**rowth **F**actor) (MACARULLA *et al.*, 2020).

A transformação do tecido epitelial em tecido mesenquimal (**EMT** - **E**pithelial to **M**esenchymal **T**ransition) favorece tanto a progressão tumoral quanto a resistência à quimioterapia, porém poucos pontos fracos foram identificados neste mecanismo. Usando pequenas moléculas seletivas como sondas celulares, a indução de EMT demonstrou sensibilizar bastante as células tumorais a agentes que perturbam a função do RE. Notou-se que a sensibilidade às perturbações foi causada pela síntese e secreção de grandes quantidades de proteínas da matriz extracelular pelas células EMT. Assim, observou-se que as células EMT exibiram uma morfologia de RE ramificada e ativaram o eixo PERK-eIF2- α da UPR. Portanto, a ativação da PERK é essencial para que as células EMT invadam e metastatizem (FENG *et al.*, 2014).

2.18 – Interações entre vias UPR e chaperonas em tecidos de câncer colorretal.

GRP78 (BiP) é uma chaperona da família HSP70. Um oligopeptídeo de sinal determina que GRP78 resida no lúmen do RE e lá realize tarefas como dobramento e montagem de proteínas, degradação proteossômica de proteínas defeituosas, ligação de Ca^{2+} e ativação de sensores UPR transmembranares (CAO; KAUFMAN, 2012; ARAP *et al.*, 2004; PFAFFENBACH; LEE, 2011).

Proteínas desdobradas ou mal dobradas se acumulam no lado luminal do RE como substrato para GRP78, que através do domínio de ligação envia um sinal para o domínio ATPase, forçando-o a se desconectar de IRE1- α e PERK, deixando de exercer ação de bloqueio sobre estas duas proteínas. A expressão de GRP78 está aumentada em vários tipos de tumores sólidos, incluindo CCR, e estudos recentes afirmam que GRP78 apresenta características antagônicas em células tumorais. O GRP78 limita o desenvolvimento inicial de tumores através de numerosos mecanismos supressivos, como a indução de dormência (ARAP *et al.*, 2004; DENOYELLE *et al.*, 2006).

Por outro lado, em estágios mais avançados de progressão tumoral, quando as células neoplásicas são expostas ao estresse excessivo do RE, o GRP78 estimula a progressão do câncer através de sua adaptação, sobrevivência e invasão metastática (DONG *et al.*, 2008; DONG *et al.*, 2011).

Na superfície da célula neoplásica, o GRP78 interfere em algumas vias de sinalização da membrana citoplasmática, regulando a proliferação, a apoptose e a imunidade tumoral (LUO; LEE, 2013). O GRP78 também desempenha um papel fundamental na angiogênese tumoral, mecanismo atribuído à indução do VEGF (GONZALEZ-GRONOW *et al.*, 2009).

A expressão do GRP78 já foi bem estudada em tecidos de CCR utilizando-se técnicas imunohistoquímicas. Neste estudo foi comprovado que GRP78 exibe comparativamente uma expressão muito mais pronunciada em cortes histológicos de CCR do que em tecidos normais do cólon (LEE, 2014). Tais evidências, coletivamente, apontam para o fato de que GRP78 é superexpresso em linhagens celulares de CCR cultivadas e também em tecidos de câncer colorretal, e desempenha um papel importante na regulação da sensibilidade das células tumorais à apoptose induzida por quimioterapia (MHAIDAT *et al.*, 2016).

2.18.1 – IRE1- α como protagonista na angiogênese do desenvolvimento do CCR.

O IRE1- α apresenta pelo menos três vias de sinalização de saída: *Splicing* (emenda) de mRNA de XBP1, RIDD de outros mRNAs e interações diretas com mediadores à jusante como TRAF2, ASK1 e JNK (HAN *et al.*, 2009). O aumento do *splicing* da XBP1 foi demonstrado

em vários tipos de câncer e está associado ao comportamento tumoral mais agressivo e à diminuição da sobrevida (FUJIMOTO *et al.*, 2007).

Em um modelo de camundongo, o IRE1- α ativado desencadeou a proteína adaptadora TRAF2, que então interagiu fortemente com JNK, resultando na ativação da Caspase 12 e subsequente apoptose (YONEDA *et al.*, 2001). Por isso, o XBP1 é um biomarcador de invasão e metástase do CCR, e sua expressão acelera a invasão de células cancerígenas, suprimida pelo nocaute de XBP1 usando pequeno RNA interferente (siRNA). Quando a XBP1s é silenciada, os níveis do receptor VEGF2 (VEGF-R2), reconhecidos como indutores da angiogênese tumoral, são drasticamente reduzidos (MHAIDAT; ALZOUBI; ABUSHBAK, 2015).

As XBP1s inibem a expressão do supressor tumoral TAp73 (**TAp73** - **T**ranscription **F**actor **p73**), um membro da família da proteína p53, ligando-se diretamente ao promotor TAp73 e suprimindo a sua atividade transcricional. Além disso, foi observado que a superexpressão de TAp73 anulou o efeito de XBP1s no aumento da proliferação de células CCR e no potencial estímulo de formação de colônias, indicando que TAp73 é um indutor de tumorigênese quando induzido por XBP1s (JI *et al.*, 2019).

No entanto, a angiogênese representa uma fase essencial no desenvolvimento do CCR e o IRE1- α é o protagonista inicial neste contexto. Os tumores sólidos desenvolvem-se inicialmente na ausência de vascularização, mas à medida que crescem, são expostos a várias condições restritivas do crescimento, tais como isquemia, hipóxia e privação de nutrientes (glicose). A ativação de IRE1- α é um determinante comum que desencadeia vias de sinalização dependentes de hipóxia e hipoglicemia, levando à superexpressão de VEGF-A (DROGAT *et al.*, 2007).

Um experimento utilizando um modelo animal sem IRE1- α não conseguiu aumentar a expressão de VEGF-A sob condições de hipóxia e hipoglicemia, provando assim que as vias de sinalização dependentes de IRE1- α desempenham um papel indispensável na resposta à isquemia, indicando que o IRE1- α é um alvo terapêutico potencialmente útil para reduzir a angiogênese e o crescimento tumoral (CHALMERS *et al.*, 2019).

2.18.2 – A via PERK no equilíbrio redox para adaptação celular oncogênica.

ATF4 e NRF2 são os dois fatores de transcrição PERK a jusante que contribuem para a adaptação celular e oncogênese (WANG *et al.*, 2012). NRF2 utiliza ARE e Keap1 para regular a expressão de genes responsáveis pela modulação de enzimas antioxidantes, promovendo adaptação e sobrevivência de células cancerígenas. A proteína 1 associada à ECH semelhante a NRF2-Kelch (NRF2-Keap1), assim como NRF2-ARE, pode neutralizar os efeitos nocivos

das ERO nas células CRC e restaurar o equilíbrio redox para favorecer a progressão neoplásica (KENSLE; WAKABAYASHI; BISWAL, 2007).

Por outro lado, evidências mostram que a PERK pode fosforilar e facilitar a relocação e atividade nuclear do FOXO (Forkhead box O), importante sinalizador antitumoral da via PERKA, também da família FOXO de fatores de transcrição, reconhecidos como supressores de tumor que promovem a parada do ciclo celular e a apoptose, a fim de prevenir o acúmulo de danos genômicos induzidos por agentes genotóxicos e estresse oxidativo. Dessa forma, a inibição da FOXO libera a progressão do câncer e atua como facilitadora de metástases e angiogênese, fatores indispensáveis para progressão e sobrevivência tumoral (JIRAMONGKOL; LAM, 2020). Hipoteticamente, o oposto, ou seja, a estimulação FOXO, seria uma forma interessante de potencial tratamento antitumoral.

2.18.3 – Respostas citoprotetoras da via ATF6 dependentes da microbiota.

Vários estudos sugerem que a ativação do ATF6 não gera efeitos antagônicos óbvios. Sua sinalização induz respostas citoprotetoras, como biogênese do RE, regulação positiva de chaperonas e ativação do sistema ubiquitina/proteassoma, gerando a degradação de proteínas desdobradas/mal dobradas (ADACHI *et al.*, 2008).

O aumento da translocação nuclear do fragmento ATF6, denominado ATF6p50, é observado em diversos tipos de câncer, e sua superexpressão tem sido correlacionada com maior probabilidade de metástase e recidiva (SCHEWE; AGUIRRE-GHISO, 2008). Apesar disso, o ATF6 é considerado um marcador de displasia de baixo grau (**LGD - Low Grade Dysplasia**) do epitélio regenerativo inflamatório em pacientes com colite ulcerativa. Títulos elevados de ATF6 no plasma estão associados à redução da sobrevida livre de doença em pacientes com CCR. Experimentos em camundongos nATF6IEC (**nATF6IEC** – Homozygous *mice* developed spontaneous colon adenomas at 12 weeks of age), mostraram que a ativação sustentada de ATF6 no cólon induziu disbiose e tumorigênese dependente da microbiota (COLEMAN *et al.*, 2018).

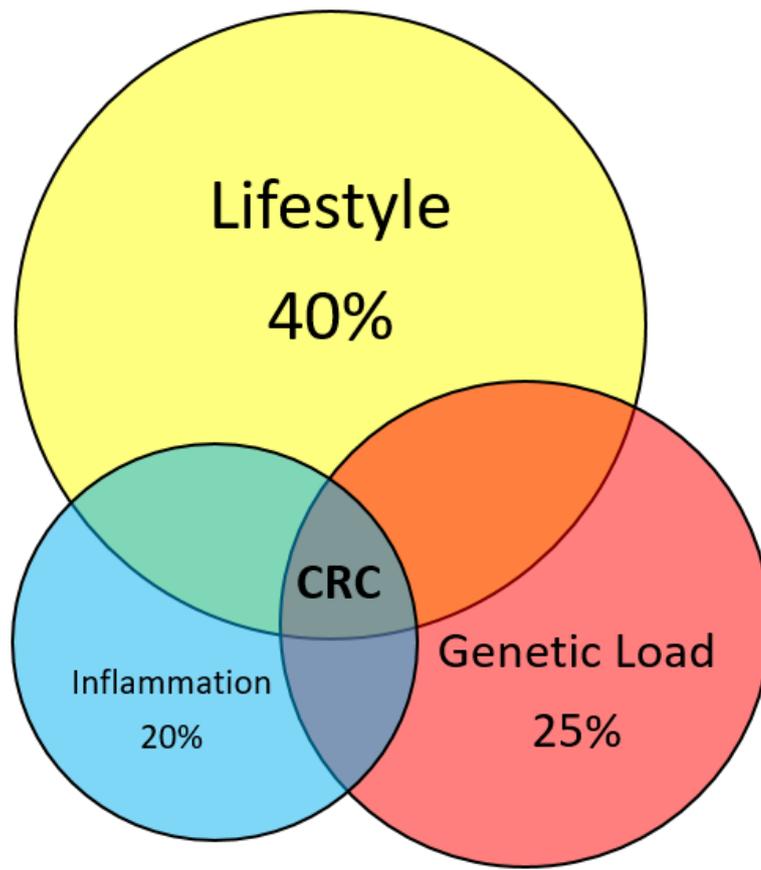
Além disso, estudos em camundongos *germ free* (sem microbiota) demonstraram que a ativação da UPR via ATF6 no epitélio exigia a presença de microbiota intestinal para que ocorresse o desenvolvimento do tumor. Embora o diagnóstico de LGD seja importante para o tratamento da colite ulcerativa, às vezes é difícil distinguir a LGD do epitélio regenerativo inflamatório. Há evidências acumuladas de que os níveis de ATF6 estão elevados em lesões que sofreram alterações histopatológicas pré-neoplásicas típicas no contexto do CCR com ou

sem colite ulcerativa. Portanto, o ATF6 pode ser útil como um biomarcador promissor para distinguir a LGD do epitélio regenerativo inflamatório em pacientes com colite ulcerativa.

2.18.4 – Dieta, microbiota intestinal e câncer colorretal.

Os estágios de iniciação, promoção e progressão do CCR são multifatoriais. Evidências correlacionam o CCR a aspectos socioambientais (alimentação predominantemente consumida, sedentarismo e obesidade), microbiota intestinal e carga genética inata ou adquirida. Estudos epidemiológicos mostram que alguns tipos específicos de dieta podem proteger os seres humanos do CCR e o manejo dietético pode reduzir sua incidência, uma vez que a composição da dieta tem um impacto importante no arranjo intestinal e na função da microbiota, sendo mais relevante para a carcinogênese do que a própria carga genética do indivíduo (ROTHSCHILD *et al.*, 2018). A Figura 13 ilustra os principais fatores de risco para CCR, demonstra que há inter-relação entre eles e mostra seus percentuais individuais (CARETHERS; JUNG, 2015; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016; PUZZONO *et al.*, 2021).

Figura 13 - Inter-relação entre os fatores de risco para CCR.



Fatores de risco para CCR. A inflamação intestinal isolada é responsável pelo surgimento de 20% de todos os CCR, a carga genética congênita por 25% e todos os demais fatores relacionados ao estilo de vida, e portanto modificáveis, como obesidade, tabagismo, alcoolismo, maus hábitos alimentares e sedentarismo compõem 40% dos fatores de risco para todos os tumores colorretais.

Fonte: Elaboração própria (2023).

Liang e colaboradores (2017) descobriram que a organização da microbiota intestinal é perturbada em pacientes com CCR e adenoma, o que não acontece em pacientes saudáveis.

Descobriu-se que substituir uma dieta de origem africana (rica em polissacarídeos vegetais, incluindo fibras e pobre em gordura e carne processada) para uma dieta ocidental típica (pobre em polissacarídeos vegetais/fibras e rica em gordura, carne processada e açúcar), ocasiona uma rápida mudança na composição e densidade populacional da microbiota intestinal (DAVID *et al.*, 2014).

Após a absorção dos nutrientes no intestino delgado, os resíduos, que são basicamente carboidratos complexos (fibras alimentares), resíduos proteicos e ácidos biliares primários, secretados pelo fígado para digerir as gorduras, chegam no cólon. Estes resíduos têm importância crítica na composição e função do microbioma intestinal e desempenham um delicado papel na manutenção da saúde do cólon através da fermentação. Se a dieta for equilibrada e saudável, a fermentação das fibras alimentares produzirá predominantemente ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs). O butirato, é o representante mais importante da família dos AGCCs, e desempenha diversas funções protetivas sobre os colonócitos, incluindo propriedades anti-inflamatórias, antineoplásicas, promotora da homeostase da microbiota, e regulação imunomoduladora genética e epigenética. Ao contrário, uma dieta ocidental desequilibrada, promove a fermentação de proteínas e a desconjugação de ácidos biliares, que causam danos aos colonócitos através da ativação de vias pró-inflamatórias e pró-carcinogênicas e, dessa forma, aumentam o risco de desenvolver CCR (O'KEEFE, 2016).

Disbiose é o fenômeno que ocorre quando há um desbalanço entre a população de bactérias intestinais potencialmente patogênicas e as bactérias probióticas, aquelas que promovem a saúde das células do cólon. O aumento populacional de bactérias como a *Escherichia coli* produtora de colibactina, *Bacteróides fráglis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Providência*, são responsáveis por ativar vias sinalizadoras da carcinogênese colorretal, ao mesmo tempo em que ocorre a redução significativa de bactérias produtoras de butirato, como a *Roseburia* e *Fecalibacterium* (BULTMAN, 2014).

O *Fusobacterium nucleatum* adere e invade colonócitos e promove a carcinogênese por meio de FadA (**FadA** - Adhesin from *Fusobacterium nucleatum*), que se liga à E-caderina, ativa a sinalização de β -catenina e regula positivamente vias sinalizadoras de inflamação e carcinogênese (RUBINSTEIN *et al.*, 2013).

Bacteroides fragilis enterotoxigênicos produzem fragilisina (**BFT** - *Bacteroides fragilis* toxin), uma toxina que ativa a via de sinalização Wnt/ β -catenina e NF- κ B e induz multiplicação celular descontrolada e inflamação (SHIRYAEV *et al.*, 2013). O BFT pode desencadear uma

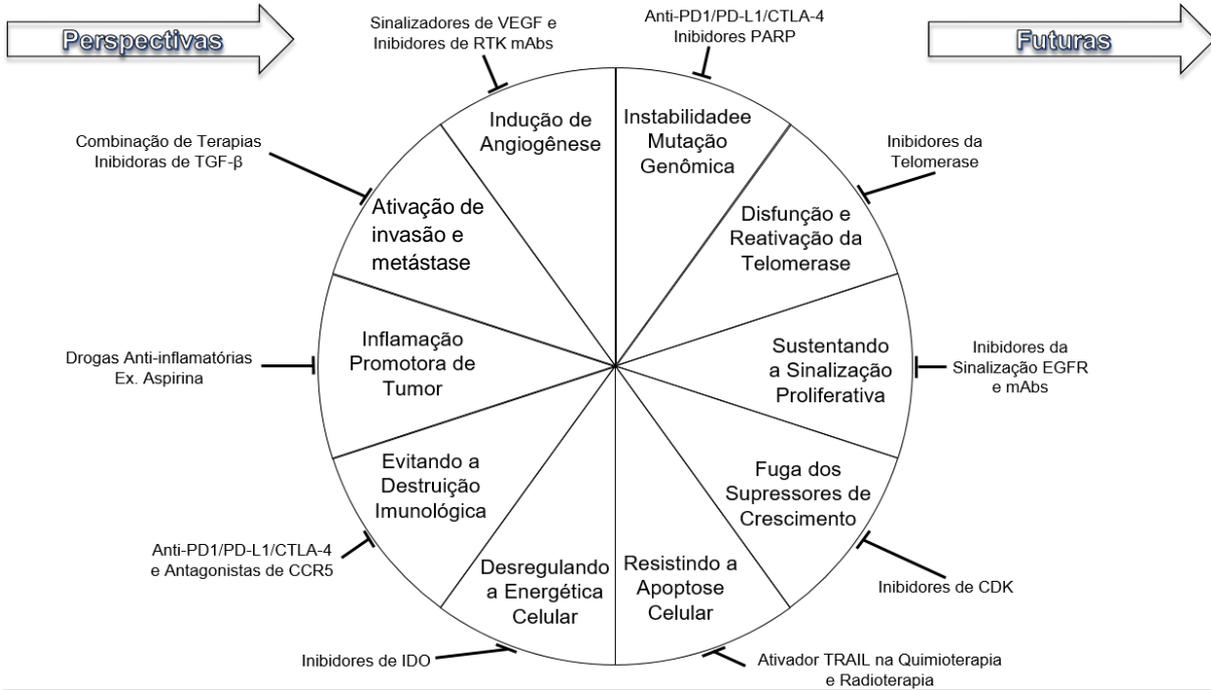
cascata inflamatória pró-carcinogênica multimodal envolvendo a sinalização de IL-17R, NF- κ B e STAT3 em colonócitos e promover a oncogênese no cólon distal (CHUNG *et al.*, 2018).

O estudo clínico randomizado conduzido pela pesquisadora Anna Prizment e colaboradores (2020), descobriu que os participantes que fizeram uso de Aspirina na dose diária de 325 mg, tiveram um aumento populacional das espécies probióticas *Prevotella*, *Akkermansia* e *Ruminococcaceae*, ao mesmo tempo em que houve o declínio na contagem das espécies *Bacteroides*, *Parabacteroides* e *Dorea*, constatação que foi associada à redução do risco de CRC.

2.19 – Perspectivas futuras em pesquisa de sinalizadores moleculares voltados para CCR.

Muitas vias de sinalização e seus receptores ainda não foram bem estudados e, por isso, merecem um olhar atento da ciência em futuras pesquisas pré-clínicas e clínicas. As descobertas decorrentes de novas pesquisas nesse campo carregam um grande potencial de trazer novos tratamentos contra o CCR, aumentar o tempo de vida livre de doença e melhorar a qualidade de vida dos paciente, além é claro, de reduzir os custos com novas terapias permitindo sua ampla disponibilidade no sistema público de saúde. A figura 14 ilustra as possíveis frentes de pesquisa de novos biomarcadores e moléculas anticancerígenas que ainda não foram bem explorados.

Figura 14 - Perspectivas futuras em pesquisa de sinalizadores moleculares voltados para CCR.



Fonte: Modificado de LI *et al.* (2021).

3 – OBJETIVO GERAL

Estudar a evolução molecular do estresse do retículo endoplasmático em modelo animal de experimentação de câncer colorretal associado a Azoximetano e colite induzida por Dextran Sulfato de Sódio.

3.1 – Objetivos específicos.

A - Identificar e quantificar a expressão gênica dos transcritos das proteínas de resposta desdobrada (IRE1- α , PERK e ATF6) e CHOP nas células dos cólons dos animais utilizando a técnica RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa com Transcriptase Reversa).

B - Identificar e analisar se há relação entre a expressão gênica dos transcritos das proteínas IRE1- α , PERK, ATF6 e CHOP comparando com os achados histopatológicos observados durante a indução da carcinogênese.

C - Identificar e analisar se há relação entre a expressão gênica dos transcritos das proteínas IRE1- α , PERK, ATF6 e CHOP com o número de pólipos desenvolvidos durante a indução da carcinogênese.

D - Identificar e analisar se há relação entre a expressão gênica dos transcritos das proteínas IRE1- α , PERK, ATF6 e CHOP com a média da massa corporal (peso em gramas) de cada um dos grupos durante a indução da carcinogênese.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Aspectos éticos.

Todos os 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), tendo recebido aprovação com o número 1.204/2022 na data de 10/02/2022 (Certificado de aprovação no anexo 1). O experimento animal desse estudo foi realizado em parceria com Almeida (2023) e os dados histopatológicos por ele publicados foram aproveitados para as comparações com as análises de biologia molecular realizadas nesse trabalho.

4.2 – Tipo de pesquisa.

Tratou-se de um estudo experimental em modelo animal (pesquisa pré-clínica).

4.3 – Local da pesquisa.

O planejamento e desenvolvimento foi realizado no Laboratório de Carcinogênese Experimental – FAMED/UFMS. A execução do modelo animal foi realizada no Laboratório de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen) – FAMED/UFMS. O processamento e análise das amostras foi realizado no Laboratório de Patologia Molecular da FAMED/UFMS. O estudo foi realizado no período compreendido entre março de 2020 até janeiro de 2024.

4.4 – Animais e ambiente.

Nesse trabalho, foram utilizados 84 camundongos de laboratório da raça *Hairless* machos com idade de 4 semanas e pesando aproximadamente 25 gramas, disponibilizados pelo Biotério Central do Instituto de Biociências da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Antes do início do experimento, os animais foram aclimatados no Laboratório CeTroGen recebendo água e ração padrão à vontade por 14 dias. Durante todo o experimento, os animais permaneceram alojados em duas estantes ventiladas, com controle eletrônico de temperatura em 23°C, e iluminação artificial com luz branca em ciclo claro-escuro de 12 horas.

Cada grupo com 7 animais foi mantido na mesma caixa durante todo o experimento (Caixas de polipropileno medindo 41 x 34 x 16 cm, com grade de inox, com local para comedouro, e bebedouro de vidro com bico de inox). Nestas caixas foram colocadas uma camada de 2 cm de maravalha esterilizada e seca servindo como cama para o conforto dos

animais. As caixas foram lavadas com água corrente e sabão líquido neutro, e em seguida foram desinfetadas com álcool 70% a cada 3 dias. A cama foi trocada a cada 3 dias e substituída por maravalha nova com o objetivo de remover as fezes e urina dos animais, proporcionando conforto e reduzindo a carga de amônia urinária, e, conseqüentemente, a chance de adoecimento por contato prolongado com as fezes e urina. Água fresca de torneira foi trocada a cada 2 dias e a ração oferecida foi a Nuvilab CR-1 (QUIMTIA BRASIL FEED – Colombo – PR - BRASIL).

4.5 – Delineamento da pesquisa experimental em modelo animal.

Os animais foram distribuídos em 3 grupos com 28 animais (4 caixas por grupo com 7 animais em cada caixa).

Grupo 1 (n= 28) – Controle negativo (recebeu apenas água e ração padrão *ad libitum*);

Grupo 2 (n= 28) – Recebeu 1 dose de AOM IP na dose de 10 mg/Kg/dose, no início da 3ª semana e Dextran Sulfato de Sódio (DSS) a 2,5% na água de beber, por 7 dias consecutivos, na 2ª, 5ª e 8ª semanas;

Grupo 3 (n= 28) – Recebeu 2 doses de AOM IP na dose de 10 mg/Kg/dose, no início da 3ª e 4ª semanas e DSS a 2,5% na água de beber, por 7 dias consecutivos, na 2ª, 5ª e 8ª semanas.

Utilizamos dois grupos intervenções (grupos 2 e 3) com o objetivo de observar possíveis diferenças em tempo de aparecimento tumoral, tamanho dos tumores e toxicidade do AOM em diferentes doses totais.

Todos os animais foram identificados por marcações feitas com canetas permanentes coloridas na base de suas caudas:

Animal 1 – 1 traço vermelho + 1 traço azul;

Animal 2 – 1 traço vermelho + 1 traço verde;

Animal 3 – 1 traço vermelho + 1 traço preto;

Animal 4 – 1 traço azul;

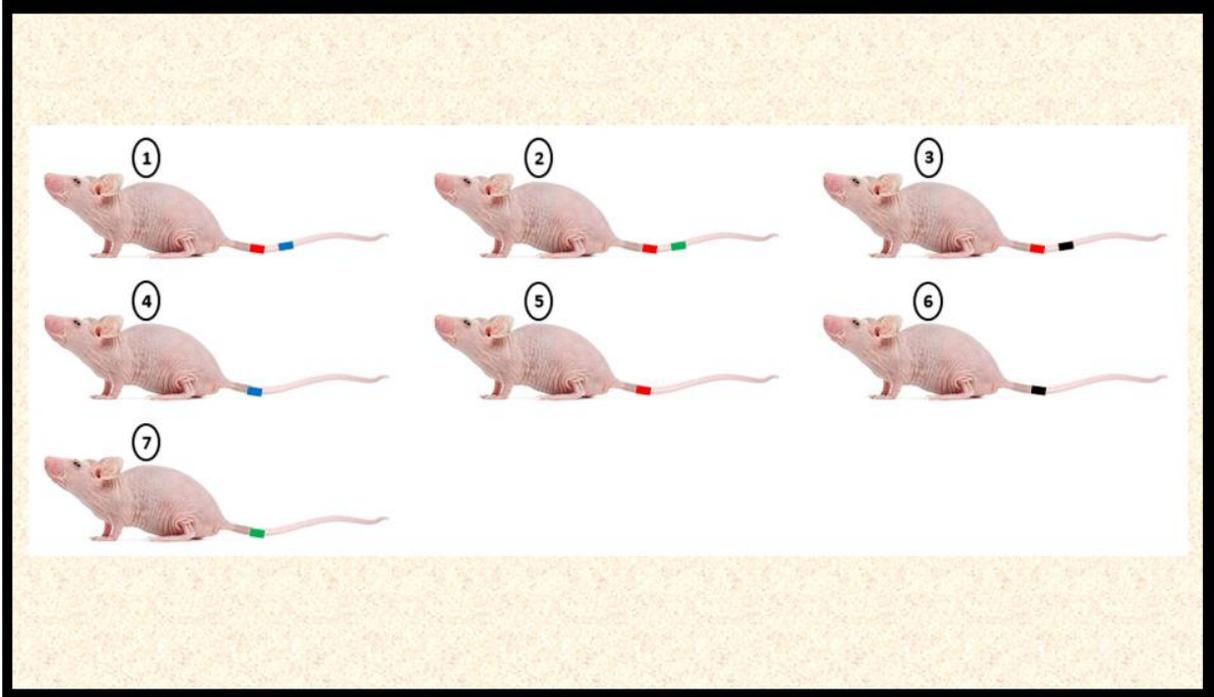
Animal 5 – 1 traço vermelho;

Animal 6 – 1 traço preto;

Animal 7 – 1 traço verde.

Sempre que essas marcações ficavam tênues, eram feitos retoques mantendo-se as mesmas cores. A figura 15 ilustra as marcações realizadas nas caudas dos animais, relacionando as marcações com seu respectivo número.

Figura 15 – Ilustração das marcações de identificação nos animais (7 animais por caixa).



Fonte: Elaboração própria (2023).

Todos os animais foram pesados antes do início do experimento e uma vez por semana (sempre nas segundas-feiras) durante todo o estudo, com o objetivo de reconhecer e acompanhar as alterações capazes de interferir na perda ou ganho ponderal de cada animal. Todos os animais foram examinados todos os dias, uma vez por dia, em busca de sinais de adoecimento ou luta. A figura 16 representa o delineamento da pesquisa experimental e suas diversas fases ao longo do tempo.

4.6 – Caracterização e quantificação genômica.

Os fragmentos de cólon de cada um dos animais foram preservados congelados a -80°C , em criotubos individuais, e a quantificação genômica dos mRNA das proteínas IRE1- α , PERK, ATF6 e CHOP foi realizada visando caracterizar o ERE e a ativação da UPR durante as diferentes fases da carcinogênese colorretal (4 momentos – final da 5^a, 10^a, 15^a e 20^a semanas do experimento).

4.7 – Randomização dos animais para o processamento por RT-qPCR.

Para a caracterização genômica dos animais de cada grupo, G1 (controle), G2 (1 AOM + 3 DSS) e G3 (2 AOM + 3 DSS), foram realizadas análises da expressão gênica dos mRNA das proteínas de interesse (IRE1- α , PERK, ATF6 e CHOP), e S26 (gene normalizador).

A seleção dos animais de cada grupo (amostra) foi realizada utilizando-se do software de randomização automática 4devs.com.br, disponível gratuitamente na internet. A figura 17 é o quadro que mostra os animais selecionados randomicamente e alocados em 3 grupos (G1, G2 e G3), contendo cada grupo 12 animais, ou seja, uma amostra de 3 animais de cada momento da eutanásia (3 animais da 5^a, 10^a, 15^a e 20^a semanas). A terceira coluna de cada grupo representa a identificação final de cada animal, número este que foi utilizado do início ao fim dos ensaios genômicos de RT-qPCR.

Figura 17 – Quadro com os grupos amostrais selecionados randomicamente para os testes de RT-qPCR.

Grupo/Animal	Eutan.	Ident.	Grupo/Animal	Eutan.	Ident.	Grupo/Animal	Eutan.	Ident.
G1 – Animal 2	5ª Sem.	1.1	G2 – Animal 2	5ª Sem.	3.1	G3 – Animal 3	5ª Sem.	4.1
G1 – Animal 7	5ª Sem.	1.2	G2 – Animal 5	5ª Sem.	3.2	G3 – Animal 5	5ª Sem.	4.2
G1 – Animal 1	5ª Sem.	1.3	G2 – Animal 6	5ª Sem.	3.3	G3 – Animal 1	5ª Sem.	4.3
G1 – Animal 12	10ª Sem.	1.4	G2 – Animal 11	10ª Sem.	3.4	G3 – Animal 9	10ª Sem.	4.4
G1 – Animal 10	10ª Sem.	1.5	G2 – Animal 13	10ª Sem.	3.5	G3 – Animal 8	10ª Sem.	4.5
G1 – Animal 8	10ª Sem.	1.6	G2 – Animal 14	10ª Sem.	3.6	G3 – Animal 12	10ª Sem.	4.6
G1 – Animal 17	15ª Sem.	1.7	G2 – Animal 21	15ª Sem.	3.7	G3 – Animal 17	15ª Sem.	4.7
G1 – Animal 21	15ª Sem.	1.8	G2 – Animal 19	15ª Sem.	3.8	G3 – Animal 18	15ª Sem.	4.8
G1 – Animal 18	15ª Sem.	1.9	G2 – Animal 15	15ª Sem.	3.9	G3 – Animal 19	15ª Sem.	4.9
G1 – Animal 23	20ª Sem.	1.10	G2 – Animal 25	20ª Sem.	3.10	G3 – Animal 25	20ª Sem.	4.10
G1 – Animal 28	20ª Sem.	1.11	G2 – Animal 22	20ª Sem.	3.11	G3 – Animal 22	20ª Sem.	4.11
G1 – Animal 25	20ª Sem.	1.12	G2 – Animal 27	20ª Sem.	3.12	G3 – Animal 23	20ª Sem.	4.12

- Animais nas primeiras 5 semanas do experimento.
- Animais nas primeiras 10 semanas do experimento.
- Animais nas primeiras 15 semanas do experimento.
- Animais nas primeiras 20 semanas do experimento.

- G1** – Controle negativo (alimento e água).
- G2** – 1 dose de AOM + 3 doses de DSS.
- G3** – 2 doses de AOM + 3 de DSS.

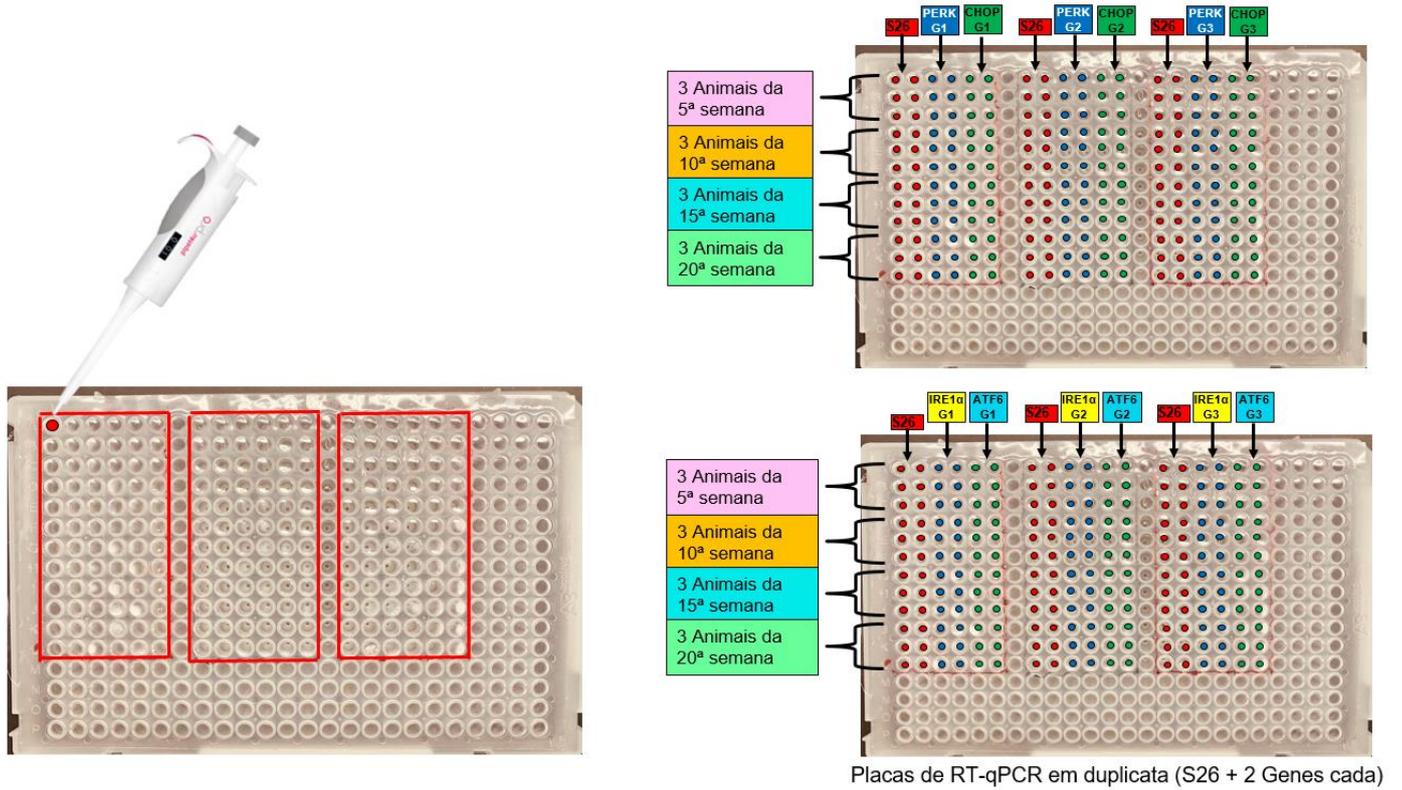
4.8 – Organização das amostras nas placas de RT-qPCR.

As 36 amostras (12 de cada grupo), foram cuidadosamente pipetadas em duas placas de RT-qPCR. Cada placa recebeu o gene normalizador S26 e mais 2 genes de interesse do estudo. A primeira placa ficou com os genes S26, PERK e CHOP. A segunda placa ficou com os genes S26, IRE1- α e ATF6. Cada placa foi pipetada com os genes em duplicidade, visando ao final da leitura, detectar alguma amplificação gênica espúria, facilitando assim a interpretação segura e fiel da amplificação gênica dos alvos selecionados.

Nota-se que as colunas foram identificadas com três cores e cada cor está em duas colunas adjacentes (duplicidade). Na primeira placa, a 1^a e 2^a colunas contém o gene normalizador S26, a 3^a e 4^a colunas contém o gene PERK do G1 e a 5^a e 6^a colunas contém o gene CHOP do G1. Pulando-se uma coluna temos na 8^a e 9^a colunas o gene normalizador S26, a 10^a e 11^a colunas contém o gene PERK do G2 e a 13^a e 14^a colunas contém o gene CHOP de G2. Pulando-se mais uma coluna, temos a coluna 16^a e 17^a que contém o gene normalizador S26, as colunas 18^a e 19^a contém o gene PERK do G3 e as colunas 20^a e 21^a contém o gene CHOP de G3.

Semelhantemente, na segunda placa, a 1^a e 2^a colunas contém o gene normalizador S26, a 3^a e 4^a colunas contém o gene IRE1- α do G1 e a 5^a e 6^a colunas contém o gene ATF6 do G1. Pulando-se uma coluna temos na 8^a e 9^a colunas o gene normalizador S26, a 10^a e 11^a colunas contém o gene IRE1- α do G2 e a 13^a e 14^a colunas contém o gene ATF6 de G2. Pulando-se mais uma coluna, temos a coluna 16^a e 17^a que contém o gene normalizador S26, as colunas 18^a e 19^a contém o gene IRE1- α do G3 e as colunas 20^a e 21^a contém o gene ATF6 de G3. Dessa forma, o gene normalizador S26 e os genes de interesse de cada animal selecionado (PERK, CHOP, IRE1- α e ATF6) foram testados isoladamente e em duplicidade. A figura 18 ilustra detalhadamente a organização utilizada para a pipetagem das amostras, explicada anteriormente.

Figura 18 – Disposição das amostras dos genes S26, PERK, CHOP, IRE1- α e ATF6 nas placas de qPCR.



Fonte: Elaboração própria (2023).

4.9 – Técnica de processamento das amostras em RT-qPCR.

4.9.1 – Extração de RNA total.

Fragmentos de amostras teciduais de ~200 mg, obtidas cirurgicamente de segmento colorretal distal de camundongos *Hairless* controles (G1) e intervenções de CCR experimental (G2 e G3), foram removidas após eutanásia, manipuladas em gelo seco e armazenadas em ultra freezer a -80°C. Posteriormente as amostras foram divididas em fragmentos de aproximadamente 100 mg e colocadas em *RNAlater™ Stabilization Solution*, armazenadas em freezer a -20°C por curto período (1 a 3 dias) e então submetidas à extração de RNA total pelo método do TRIZOL, baseado no protocolo do fabricante, com algumas modificações.

Resumidamente, o tecido em RNA later foi centrifugado previamente a 700g/4°C/10 minutos (microcentrífuga refrigerada Eppendorf 5427 R de bancada); o estabilizador *RNAlater™* foi removido e substituído por 1 ml de Trizol, e o tecido foi triturado com esferas magnéticas *MagMAX*, segundo protocolo do fabricante. O RNA total foi ressuspensão em 25 µl de água DEPC, quantificado a 260 nm em espectrofotômetro Thermo *Scientific™ NanoDrop™*. As alíquotas foram armazenadas a -20°C para posterior processamento em RT-PCR.

4.9.2 – Primers (iniciadores) de oligonucleotídeos.

Os oligonucleotídeos inicializadores (Primers; senso - FOR e antisenso – REV; Figura 19) para transcrição reversa (RT) e PCR em tempo real (qPCR) foram desenvolvidos utilizando-se sequências de mRNA públicas do GenBank, com auxílio do software BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) e do software qPCR Assay Design–PrimerQuest™ tool da IDT (Integrated DNA technologies; <http://www.idtdna.com>), onde também foram mandados para síntese e posteriormente recebidos liofilizados, ressuspensos em H₂O filtrada estéril (0,22 µm; q.s.p. 100pmol/µl) e armazenados em alíquotas de 100 ou 10 pmol/µl a -20°C. O alvo de mRNA S26 foi utilizado como o normalizador endógeno.

Figura 19 – Iniciadores para IRE1- α , PERK, ATF6, CHOP e S26.

Iniciadores	Sequência de nucleotídeos (nt)	Tamanho	Fragmento Amplificado
MMIRE1-αFOR MMIRE1-αREV	5' – CCA GCA CAG ACC TCA AGT TT – 3' 5' – GAG GAG TTT CAT GGT GTC CTA TG – 3'	20 nt 23 nt	99 pb
MMPERKFOR MMPERKREV	5' – ACC GGG TGG AAA CAA AGA A – 3' 5' – CTT CCA ATC AGC AAC GGA AAC – 3'	19 nt 21 nt	103 pb
MMATF6FOR MMATF6REV	5' – CAG AGA ACC AGA GGC TCA AA – 3' 5' – GGG CCC ATA GTT CAG CAT TA – 3'	20 nt 20 nt	92 pb
MMCHOPFOR MMCHOPREV	5' – TCA CAC GCA CAT CCC AAA – 3' 5' – CCT AGT TCT TCC TTG CTC TTC C – 3'	18 nt 22 nt	93 pb
MMS26FOR MMS26REV	5' – CGT GCT TCC CAA GCT CTA TGT – 3' 5' – CGT GCT TCC CAA GCT CTA TGT – 3'	21 nt 21 nt	75 pb

Fonte: Elaboração própria (2023).

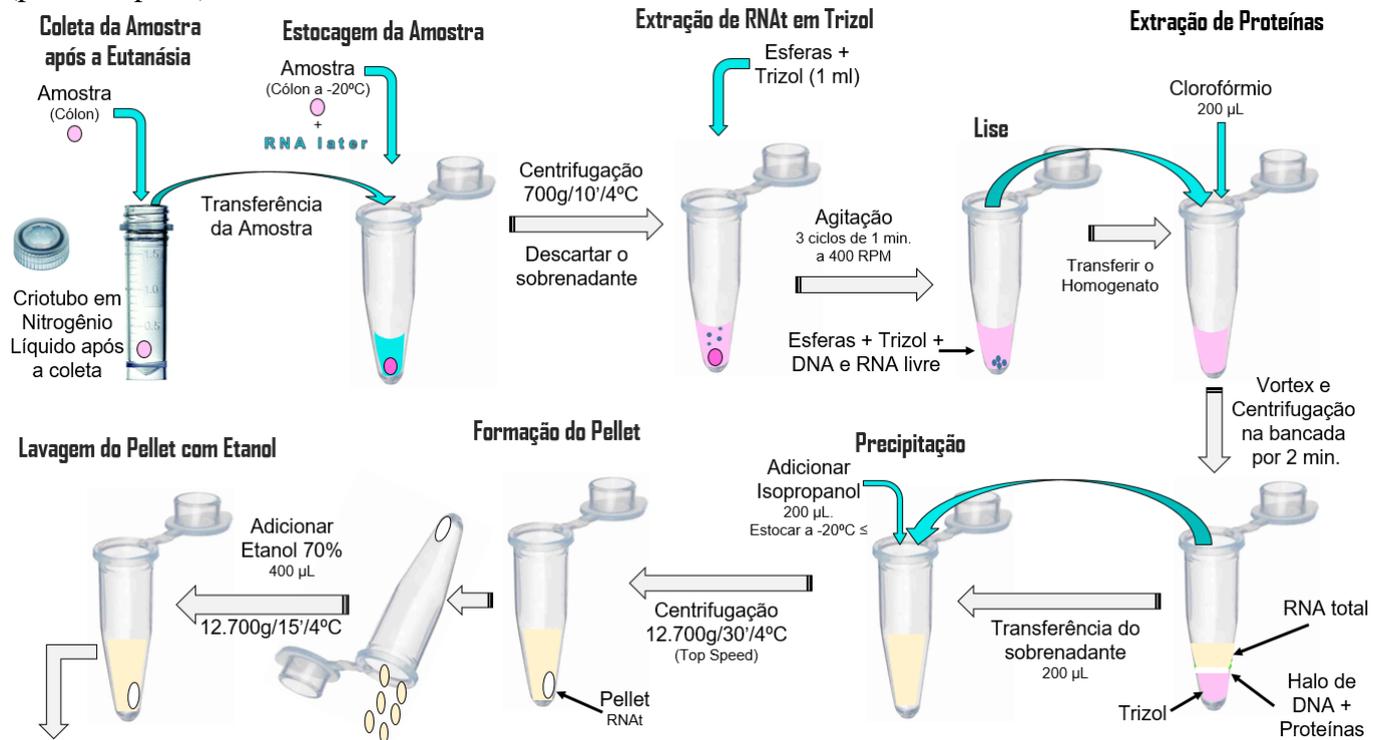
4.9.3 – Transcrição reversa (RT) e PCR em tempo real (qPCR).

A síntese de DNA complementar de fita simples (sscDNA) foi realizada por RT. Resumidamente, 700 ng de RNA (DNase I pré-tratado; protocolo kit TURBO DNA-free, Ambion Inc., Foster, Califórnia, EUA), foi pré-incubado a 70° C por 10 minutos com 10 pmol de cada *primer* reverso com 10 pmol de *primer* oligo dT20 (Invitrogen), seguido de armazenamento em gelo na bancada. Em seguida, 40 U (11 µl) de mistura de enzima transcriptase reversa em tampão RT (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4) contendo 2 µl de mistura de dNTP (10 mM cada) foram incubados a 45°C/1 hora com RNA e solução de *primers*. A RT foi terminada a 4°C e imediatamente utilizada em qPCR.

Todos os reagentes eram da Invitrogen™ (SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR). Amostras de sscDNA foram utilizadas em qPCR realizado no QuantStudio 6 Flex Real-Time System® (ThermoFisher Scientific), usando o protocolo de reação descrito pelo fabricante (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA; SYBR Green PCR Master Mix Kit). Amostras duplicadas foram aplicadas em placas de 384 poços (ABI PRISM® 384-Well Optical Reaction Plate with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), em um volume de reação final de 10 µl cada. Alíquotas de 2 µl de sscDNA das amostras foram pipetadas em cada microcanaleta da placa mais 8 µl de SYBR Mix (5 µl do SYBR Green PCR Master Mix Kit, 0,6 µl de cada primer (sense e antisense; 10 pmol/ul) e 1,8 µl de água filtrada estéril). A placa foi selada com adesivo óptico (ABI PRISM® Optical Adhesive Covers, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

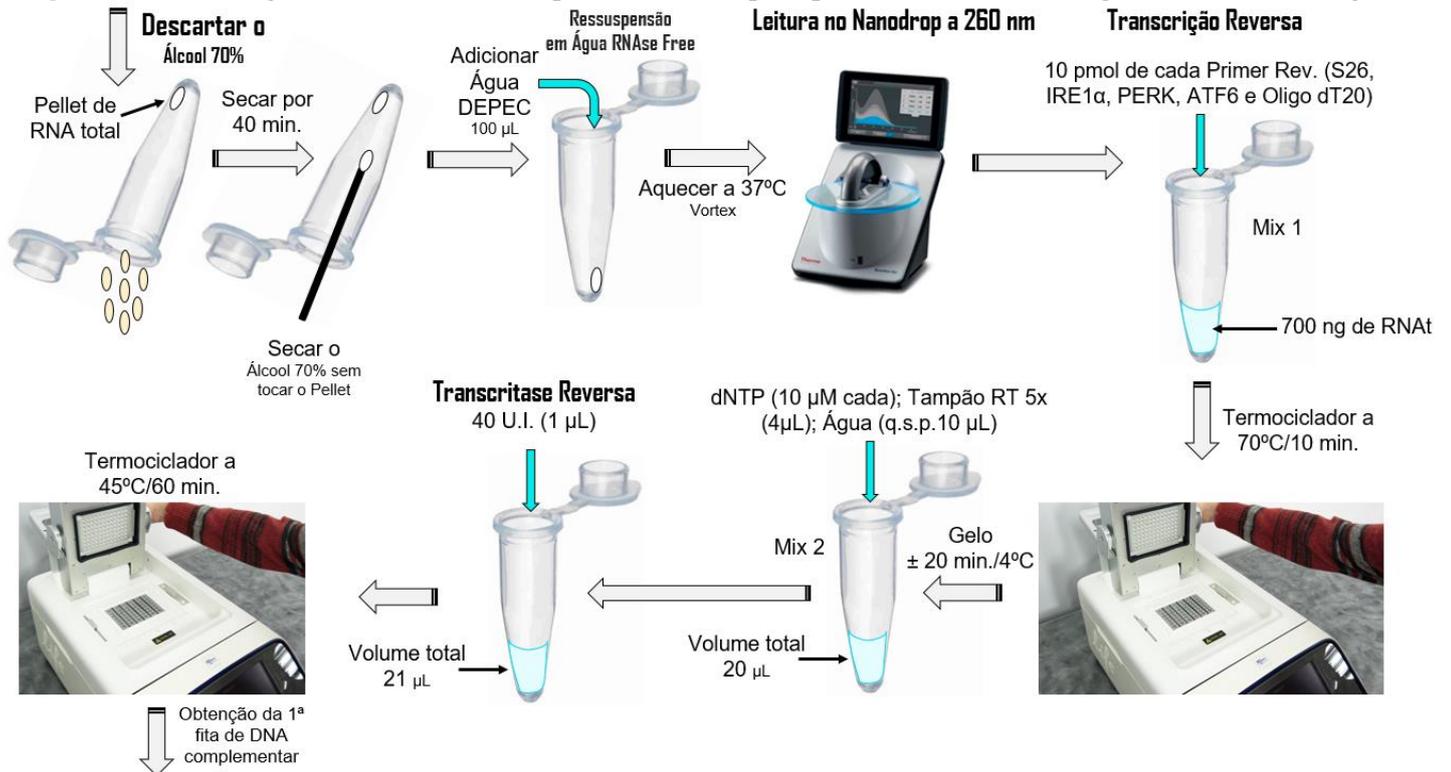
Para a quantificação relativa comparou-se a expressão dos transcritos dos genes-alvo (IRE1- α , PERK, ATF6 e CHOP) com o controle endógeno (S26), adotando-se o método CT comparativo, onde o controle endógeno foi utilizado para normalizar a expressão dos genes-alvo (média do CT gene-alvo – média do CT controle endógeno) gerando o Δ CT. Utilizando-se o Δ CT calculou-se o $\Delta\Delta$ CT [Δ CT amostra – Δ CT do calibrador [amostra de referência]]. Ao final, foi aplicada a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ para chegarmos aos níveis relativos de expressão (Fold change in gene expression) de cada gene-alvo. Os resultados foram lançados no programa GraphPad Prism, versão 5, para obtenção dos cálculos estatísticos necessários, sendo aplicados os Teste-T pareado, não pareado e ANOVA e os resultados foram considerados estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As figuras 20 e 21 ilustram as etapas da técnica de RT-qPCR descritas anteriormente.

Figura 20 – Ilustração da técnica de RT-qPCR utilizada para processar as amostras genéticas (primeira parte).



Fonte: Elaboração própria (2023).

Figura 21 – Ilustração da técnica de RT-qPCR utilizada para processar as amostras genéticas (continuação).



Estocar o sscDNA a 4°C ou a -20°C

Fonte: Elaboração própria (2023).

Abaixo, apresentamos, na figura 22, o quadro de oligonucleotídeos específicos para o estudo da expressão de mRNA dos genes que codificam IRE1- α , PERK, ATF6, CHOP e S26 (normalizador). As curvas de dissociação (Melting) são apresentadas, respectivamente, para cada *amplicon* específico.

Figura 22 - Quadro de oligonucleotídeos codificadores de IRE1- α , PERK, ATF6, CHOP e S26 e e suas curvas de Melting.

Iniciadores	Sequência de nucleotídeos (nt)	Tamanho	Fragmento amplificado	Curva de Melting
MMIRE1-αFOR	5' – CCA GCA CAG ACC TCA AGT TT – 3'	20 nt	99 pb	
MMIRE1-αREV	5' – GAG GAG TTT CAT GGT GTC CTA TG – 3'	23 nt		
MMPERKFOR	5' – ACC GGG TGG AAA CAA AGA A – 3'	19 nt	103 pb	
MMPERKREV	5' – CTT CCA ATC AGC AAC GGA AAC – 3'	21 nt		
MMATF6FOR	5' – CAG AGA ACC AGA GGC TCA AA – 3'	20 nt	92 pb	
MMATF6REV	5' – GGG CCC ATA GTT CAG CAT TA – 3'	20 nt		
MMCHOPFOR	5' – TCA CAC GCA CAT CCC AAA – 3'	18 nt	93 pb	
MMCHOPREV	5' – CCT AGT TCT TCC TTG CTC TTC C – 3'	22 nt		
MMS26FOR	5' – CGT GCT TCC CAA GCT CTA TGT – 3'	21 nt	75 pb	
MMS26REV	5' – CGT GCT TCC CAA GCT CTA TGT – 3'	21 nt		

nt= nucleotídeos; pb= pares de bases

Fonte: Elaboração própria (2023).

4.10 – Estatística.

Foi aplicado o teste T-Student não pareado unicaldal para as seguintes análises: 1] Expressão gênica relativa de IRE1- α – Grupo 1 (controle) versus G2; 2] Expressão gênica relativa de IRE1- α – Grupo 1 (controle) versus G3; 3] Expressão gênica relativa de PERK – Grupo 1 (controle) versus G2; 4] Expressão gênica relativa de PERK – Grupo 1 (controle) versus G3; 5] Expressão gênica relativa de ATF6 – Grupo 1 (controle) versus G2; 6] Expressão gênica relativa de ATF6 – Grupo 1 (controle) versus G3; 7] Expressão gênica relativa de CHOP – Grupo 1 (controle) versus G2 e 8] Expressão gênica relativa de CHOP – Grupo 1 (controle) versus G3.

Os demais resultados das variáveis não paramétricas avaliadas neste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism, versão 5. Para a avaliação estatística, considerou-se o nível de significância de 5% (SHOTT, 1990).

5 – RESULTADOS

5.1 – Resultados da expressão dos genes alvos avaliados.

Os resultados dos estudos de expressão gênica dos genes alvos que codificam as proteínas de resposta desdobrada IRE1- α , PERK e ATF6, e a proteína sinalizadora da apoptose CHOP nas células dos cólons dos animais dos grupos 1, 2 e 3, utilizando-se a técnica RT-qPCR, são apresentados nas figuras 23-26. Todos os genes apresentaram padrões distintos de expressão para cada grupo experimental específico (Neste estudo de expressão foram avaliados os grupos G1- controle; G2- 1 AOM + 3 DSS e G3- 2 AOM + 3 DSS), dentro das semanas avaliadas (5, 10, 15 e 20 semanas).

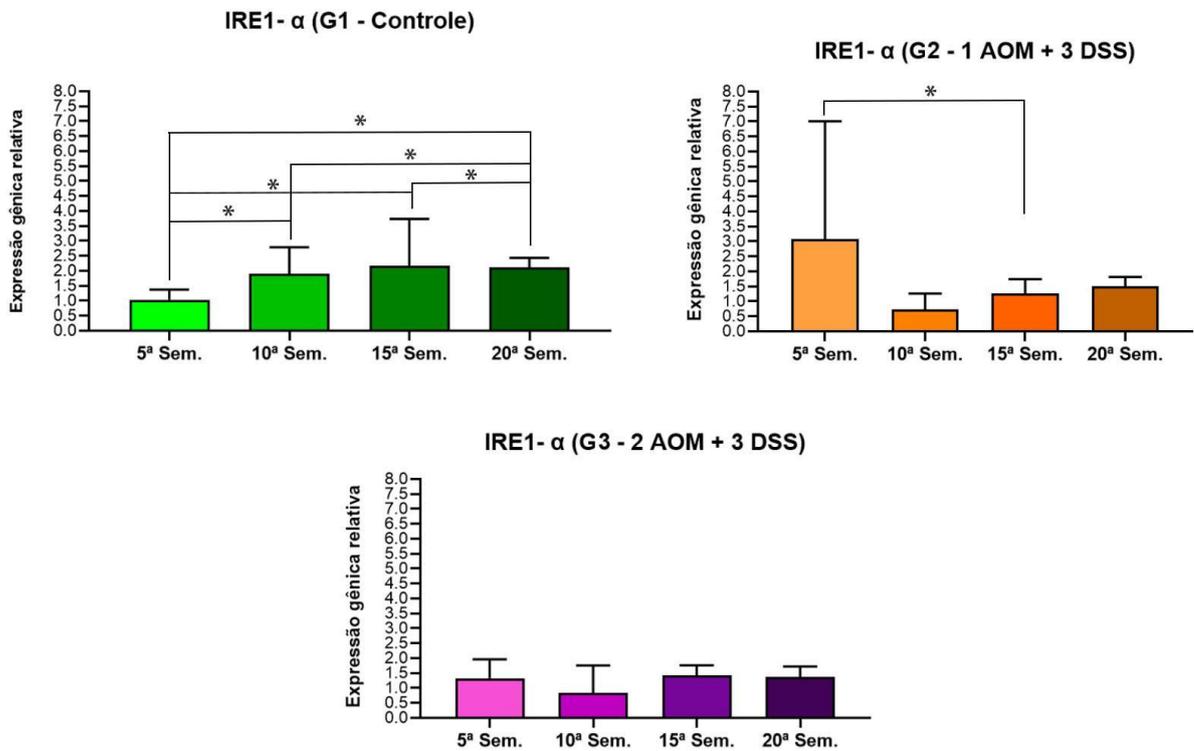
Pode-se observar que no grupo controle (G1), sem tratamento, todos os genes avaliados, demonstraram um aumento progressivo nas suas expressões relativas, no decorrer das semanas estudadas (Figuras 23 A, 24 A, 25 A e 26 A). Os dados sugerem aumento da expressão destes genes ligados ao estresse do retículo endoplasmático, respondendo fisiologicamente ao envelhecimento normal dos animais controles em relação às semanas estudadas. Embora alguns valores nas curvas de semanas não tenham espessado significância estatística, deve-se considerar as tendências individuais de cada gráfico.

Este mesmo fenômeno aconteceu também nos animais do grupo G2 tratados com 1 AOM + 3 DSS (Figuras 23 B, 24 B, 25 B e 26 B), sempre a partir das semanas 10, 15 e 20 do tratamento, exceto na semana 5, que sempre ocorreu uma superexpressão de todos os genes avaliados, seguido de subexpressão na semana 10 pós-tratamento com 1 AOM + 3 DSS com conseqüente progressão da modulação gênica nas semanas subseqüentes. Mostrando uma inibição na semana 10 seguida de tendências à recuperação de expressão de cada gene estudado. Não obstante, este fenômeno não ocorreu para os animais tratados com 2 AOM + 3 DSS do grupo G3, sugerindo que a dosagem de tratamento deste grupo foi excedente, não permitindo recuperação dos quatro genes IRE1- α , PERK, ATF6 e CHOP principais reguladores do estresse do retículo endoplasmático e ativação da apoptose.

No estudo de qPCR de expressão relativa do gene IRE1- α nos grupos, foi observado no grupo G1 diferença significativa no comparativo entre as semanas, os valores de “*p*” para “teste *t*” não pareado, uni-caudal na comparação de cada semana de tratamento mostrou diferença significativa entre a 5^a e 10^a semana ($p=0,0410$), a 5^a e 15^a semana ($p=0,0137$), a 5^a e 20^a semana ($p=0,0041$), a 10^a e 15^a semana ($p=0,0927$), a 10^a e 20^a semana ($p=0,0131$) e entre a 15^a e 20^a

semana ($p=0,0114$); No grupo G2 foi observado diferença significativa apenas entre a 5ª e 15ª semana ($p=0,0137$) e em G3 não foram observadas diferenças entre os grupos (figura 23).

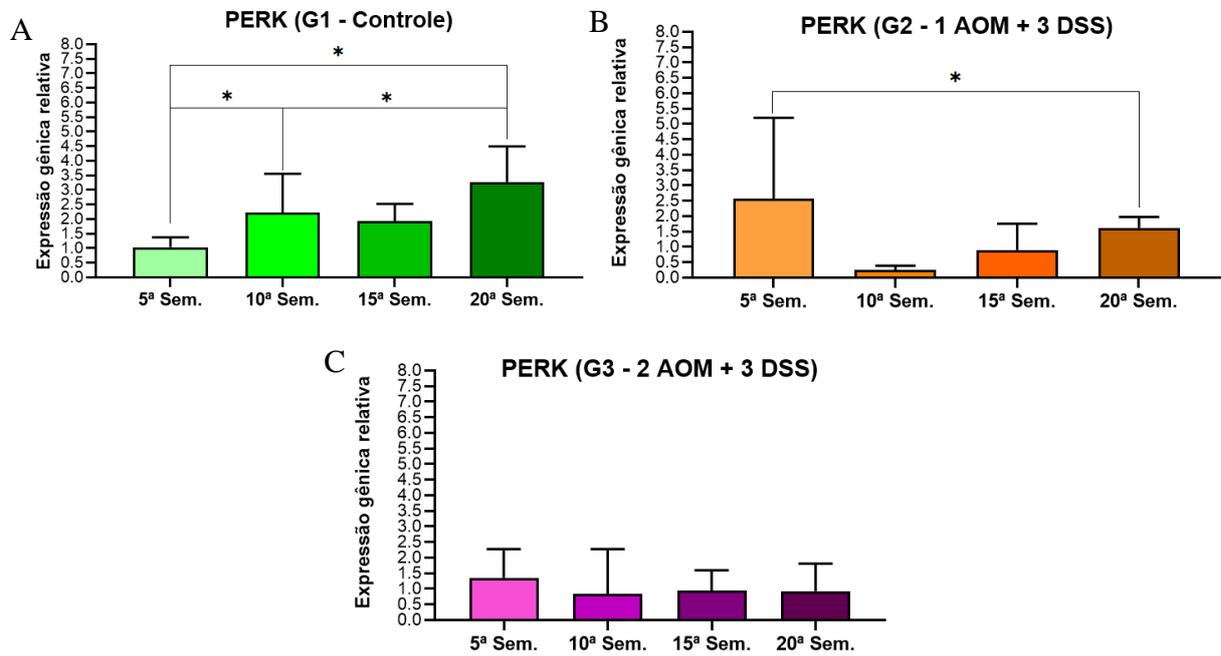
Figura 23 – Expressões relativas dos mRNAs para o gene IRE1- α de camundongo, através de RT-qPCR.



Os gráficos representam as comparações de expressão gênica para as quatro fases de tratamento (5ª, 10ª, 15ª e 20ª semanas) nos grupos (A) controle (G1), (B) 1 AOM + 3 DSS (G2) e (C) 2 AOM + 3 DSS (G3). As barras representam os valores relativos de expressão obtidos pelo método estatístico de $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ após correção com o RNA normalizador endógeno S26. (* = $p < 0,05$; $n=3$).

No Estudo de qPCR de expressão relativa do gene PERK nos grupos, foi observado no grupo G1 diferença significativa no comparativo entre as semanas, os valores de “*p*” para “teste t” não pareado, uni-caudal na comparação de cada semana de tratamento mostrou diferença significativa entre a 5ª e 10ª semana ($p=0,0500$), a 5ª e 20ª semana ($p=0,0184$) e entre, a 10ª e 20ª semana ($p=0,0249$); No grupo G2 foi observado diferença significativa apenas entre a 10ª e 20ª semana ($p=0,0135$), e em G3 não foram observadas diferenças entre os grupos (figura 24).

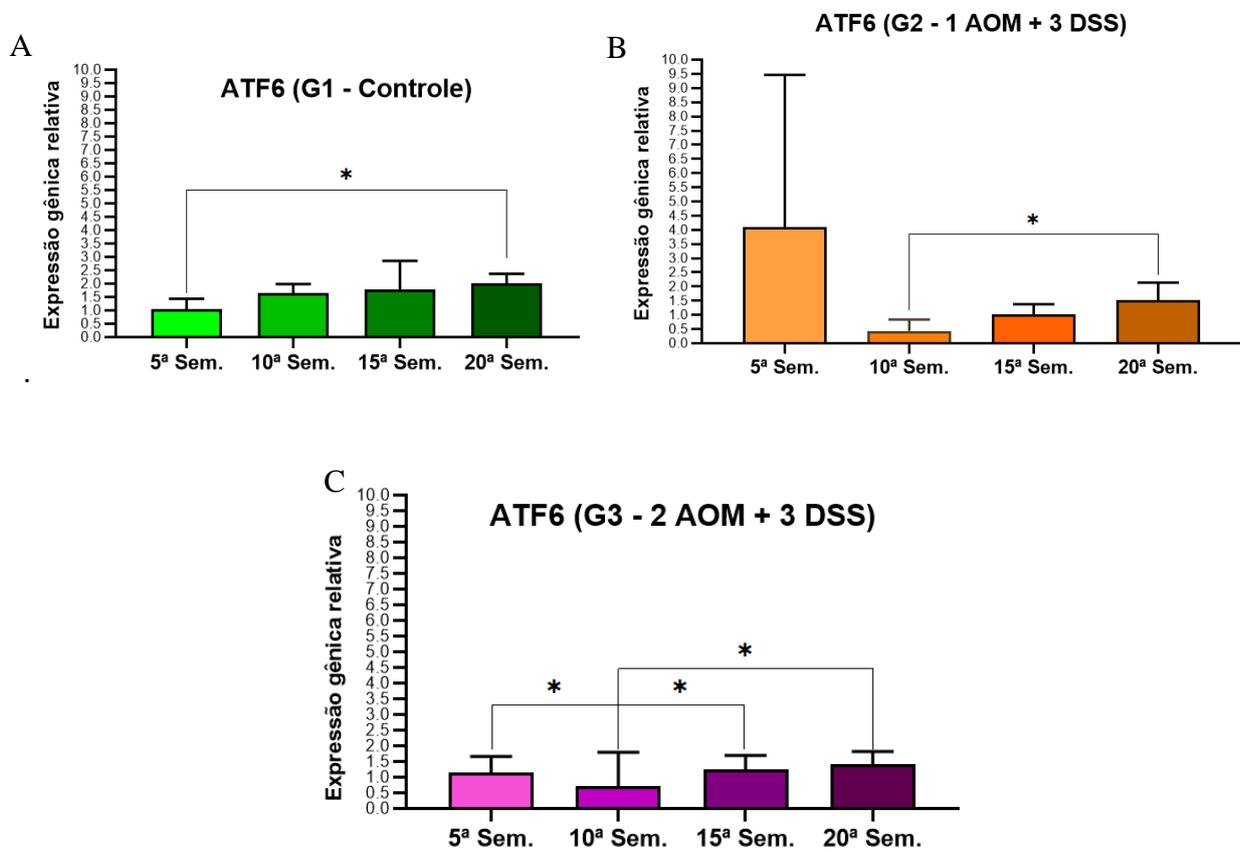
Figura 24 – Expressões relativas dos mRNAs para o gene PERK de camundongo, através de RT-qPCR.



Os gráficos representam as comparações de expressão gênica para as quatro fases de tratamento (5, 10, 15 e 20 semanas) nos grupos (A) controle (G1), (B) 1 AOM + 3 DSS (G2) e (C) 2 AOM + 3 DSS (G3). As barras representam os valores relativos de expressão obtidos pelo método estatístico de $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ após correção com o RNA normalizador endógeno S26. (* = $p < 0,05$; $n = 3$).

No Estudo de qPCR de expressão relativa do gene ATF6 nos grupos, foi observado no grupo G1 diferença significativa no comparativo entre as semanas, os valores de “*p*” para “teste t” não pareado, uni-caudal na comparação de cada semana de tratamento mostrou diferença significativa apenas entre a 5ª e 20ª semana ($p=0,0189$). No grupo G2 foi observado diferença significativa apenas entre a 10ª e 20ª semana ($p=0,0307$), e em G3 foi observado diferença significativa entre a 5ª e 10ª semana ($p=0,0364$), a 10ª e 15ª ($p=0,0216$) e entre a 10ª e 20ª semana ($p=0,0104$) (figura 25).

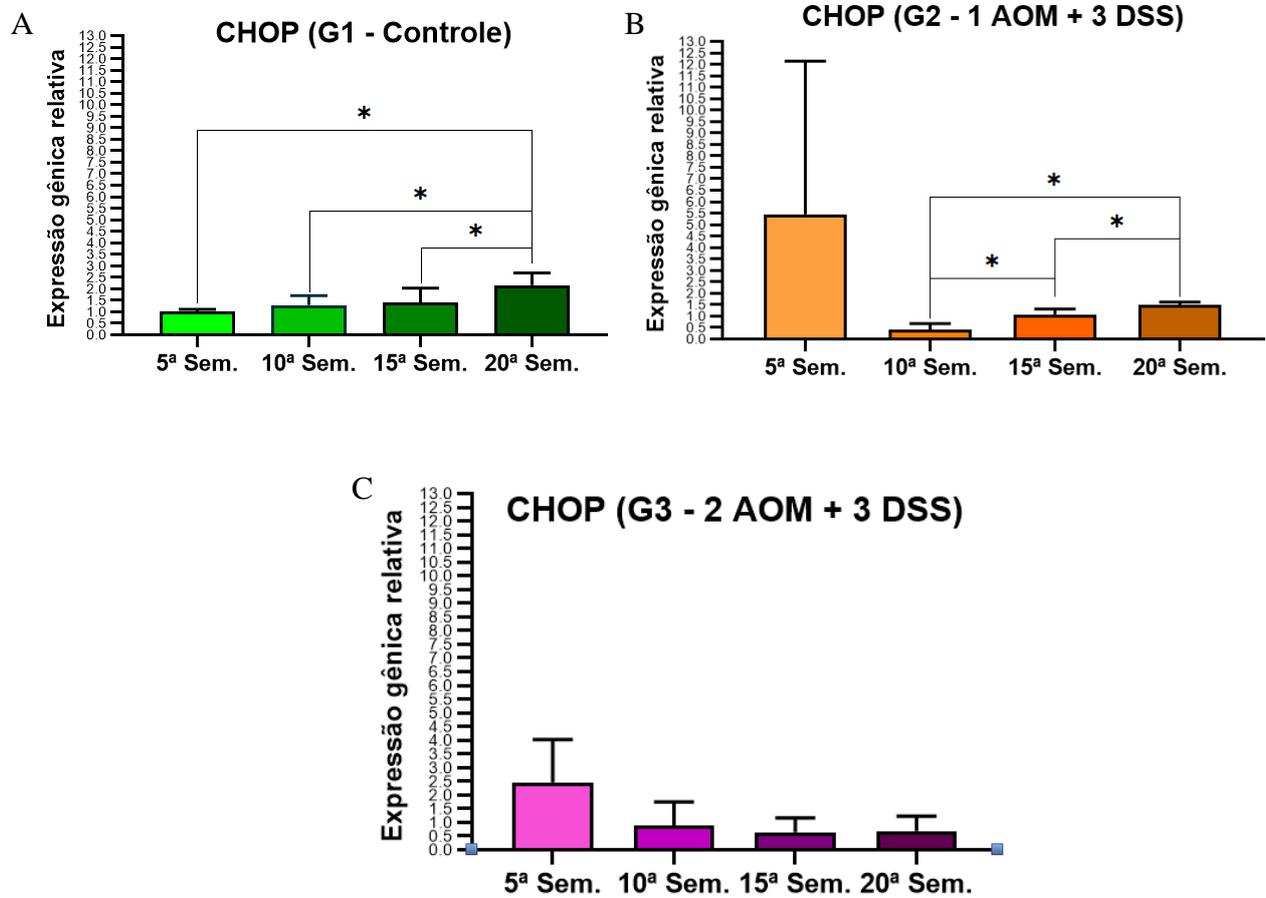
Figura 25 – Expressões relativas dos mRNAs para o gene ATF6 de camundongo, através de RT-qPCR.



Os gráficos representam as comparações de expressão gênica para as quatro fases de tratamento (5, 10, 15 e 20 semanas) nos grupos (A) controle (G1), (B) 1 AOM + 3 DSS (G2) e (C) 2 AOM + 3 DSS (G3). As barras representam os valores relativos de expressão obtidos pelo método estatístico de $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ após correção com o RNA normalizador endógeno S26. (* = $p < 0,05$; $n = 3$).

No estudo de qPCR de expressão relativa do gene CHOP nos grupos, foi observado no grupo G1 diferença significativa no comparativo entre as semanas, os valores de “*p*” para “teste t” não pareado, uni-caudal na comparação de cada semana de tratamento mostrou diferença significativa entre a 5ª e 20ª semana ($p=0,0103$), a 10ª e 20ª semana ($p=0,0105$) e entre a 15ª e 20ª semana ($p=0,0391$); No grupo G2 foi observado diferença significativa entre a 10ª e 15ª semana ($p=0,0176$), a 10ª e 20ª ($p=0,0021$) e entre a 15ª e 20ª ($p=0,0351$) e em G3 não foram observadas diferenças entre os grupos (figura 26).

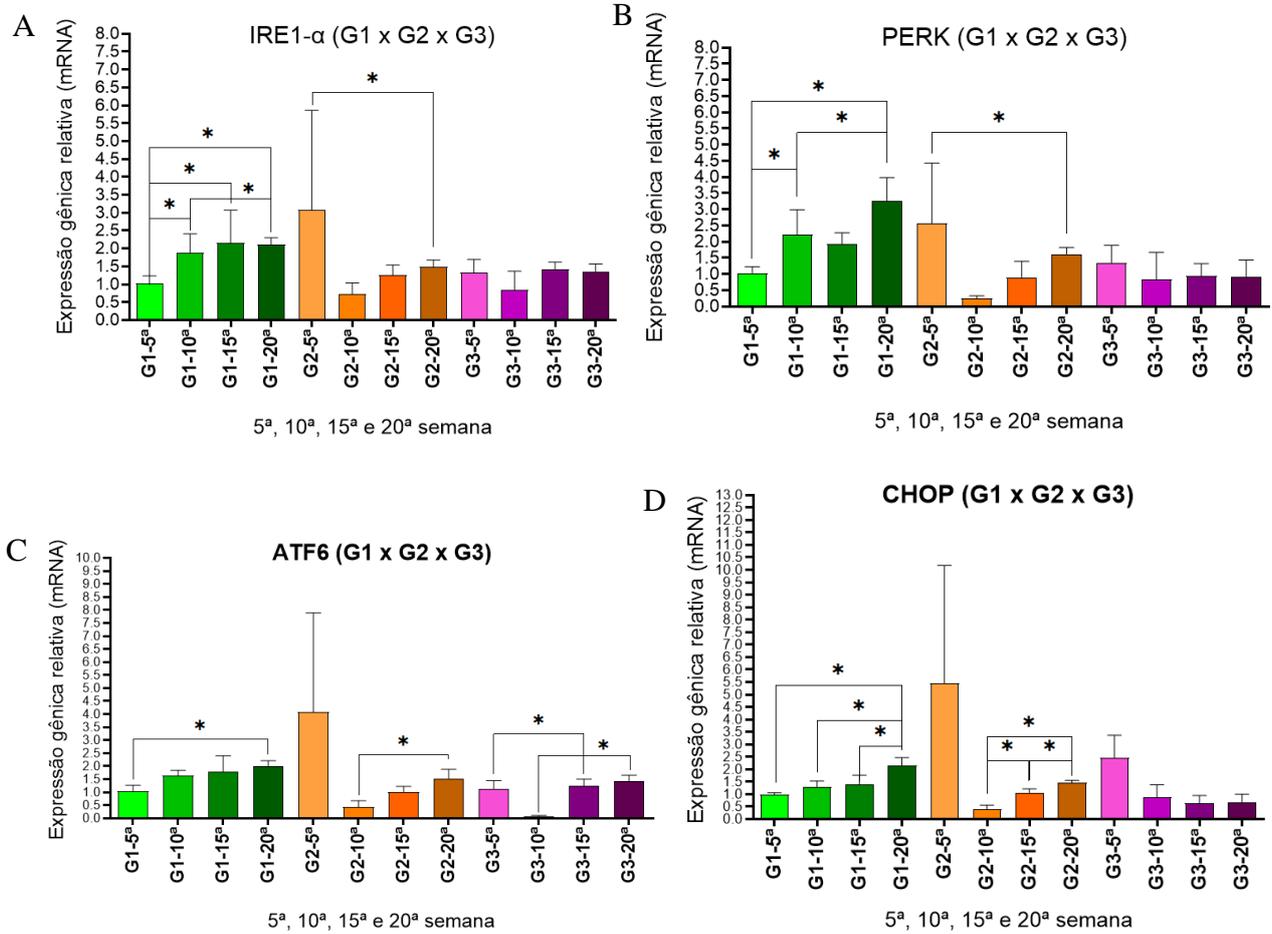
Figura 26 – Expressões relativas dos mRNAs para o gene CHOP de camundongo, através de RT-qPCR.



Os gráficos representam as comparações de expressão gênica para as quatro fases de tratamento (5, 10, 15 e 20 semanas) nos grupos (A) controle (G1), (B) 1 AOM + 3 DSS (G2) e (C) 2 AOM + 3 DSS (G3). As barras representam os valores relativos de expressão obtidos pelo método estatístico de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ após correção com o RNA normalizador endógeno S26. (* = $p < 0,05$; $n=3$).

Uma apresentação das expressões relativas dos mRNAs para todos os genes, nas quatro fases de tratamento (5, 10, 15 e 20 semanas) comparando-se os respectivos grupos (G1-controle; G2- 1 AOM + 3 DSS e G3- 2 AOM + 3 DSS) de forma sintetizada, é demonstrada na figura 27. As barras representam os valores relativos de expressão obtidos pelo método estatístico de $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ após correção com o RNA normalizador endógeno S26. (* = $p < 0,05$; $n=3$).

Figura 27 – Expressão dos genes agrupados.



Os gráficos representam as comparações de expressão gênica para as quatro fases de tratamento (5ª, 10ª, 15ª e 20ª semanas) nos grupos controle (G1), 1 AOM +3 DSS (G2) e 2 AOM + 3 DSS (G3). IRE1- α (A), PERK (B), ATF6 (C) e CHOP (D). As barras representam os valores relativos de expressão obtidos pelo método estatístico de $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ após correção com o RNA normalizador endógeno S26. (* = $p < 0,05$; $n=3$).

Tabela 1 – Expressão gênica agrupada de IRE1- α , PERK, ATF6 e CHOP nas quatro fases de tratamento (5^a, 10^a, 15^a e 20^a semanas).

		5 ^a Semana	10 ^a Semana	15 ^a Semana	20 ^a Semana	5 ^a x 10 ^a Sem	5 ^a x 15 ^a Sem	5 ^a x 20 ^a Sem	10 ^a x 15 ^a Sem	10 ^a x 20 ^a Sem	15 ^a x 20 ^a Sem
		Média±DP (Desvio Padrão)				<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
IRE1- α	G1 (Controle)	1,03±0,35	1,89±0,90	2,16±1,57	2,12±0,32	0,058	0,126	0,003	0,281	0,291	0,478
	G2 (1AOM+3DSS)	3,09±3,92	0,73±0,53	1,27±0,48	1,49±0,33	0,173	0,225	0,250	0,227	0,106	0,272
	G3 (2AOM+3DSS)	1,33±0,63	0,84±0,91	1,43±0,33	1,36±0,36	0,049	0,392	0,480	0,172	0,261	0,439
PERK	G1 (Controle)	1,03±0,34	2,23±1,33	1,93±0,60	3,28±1,21	0,085	0,032	0,025	0,319	0,025	0,038
	G2 (1AOM+3DSS)	2,57±2,63	0,26±0,13	0,90±0,85	1,62±0,35	0,097	0,177	0,275	0,147	0,014	0,093
	G3 (2AOM+3DSS)	1,36±0,92	0,83±1,44	0,95±0,65	0,93±0,88	0,114	0,173	0,353	0,428	0,473	0,487
ATF6	G1 (Controle)	1,04±0,40	1,65±0,34	1,79±1,06	2,00±0,37	0,001	0,097	0,006	0,383	0,037	0,333
	G2 (1AOM+3DSS)	4,09±5,37	0,44±0,40	1,02±0,36	1,53±0,61	0,145	0,180	0,219	0,069	0,031	0,140
	G3 (2AOM+3DSS)	1,14±0,52	0,71±1,08	1,24±0,46	1,42±0,40	0,210	0,206	0,248	0,209	0,172	0,311
CHOP	G1 (Controle)	1,00±0,10	1,30±0,41	1,40±0,63	2,16±0,53	0,135	0,176	0,010	0,278	0,011	0,039
	G2 (1AOM+3DSS)	5,46±6,68	0,40±0,28	1,07±0,25	1,48±0,14	0,124	0,151	0,170	0,018	0,002	0,035
	G3 (2AOM+3DSS)	2,46±1,56	0,88±0,87	0,65±0,52	0,69±0,54	0,100	0,064	0,068	0,191	0,382	0,463

Dados apresentados sob a forma de Média±DP. Nas comparações entre as semanas dentro de cada grupo, as células em negrito contém dados que apresentaram significância estatística com $p < 0,05$.

6 – DISCUSSÃO

No nosso estudo, utilizamos 1 e 2 doses de AOM de 10 mg/Kg e 3 ciclos de DSS a 2,5%, também nas 2^a, 5^a e 8^a semanas, e observamos um comportamento semelhante na perda de peso e na adaptação ao DSS no decorrer do experimento. Diversamente ao que foi descrito no estudo anterior, não encontramos nenhum carcinoma nos nossos espécimes, provavelmente devido a carga menor de DSS oferecida aos nossos animais. Consideramos, pois, que a dose ideal de DSS é a de 3% (3 ciclos) associada a dose de AOM acima de 12,5mg/Kg, necessárias para a indução de lesões neoplásicas, e que doses abaixo dessas, induzem apenas lesões pré-neoplásicas.

Almeida *et al.* (2023) observaram focos de criptas aberrantes e displasia de alto grau nos grupos de animais induzidos com AOM/DSS a partir da 10^a semana. Os grupos que receberam AOM associado ao DSS foram os que mais desenvolveram pólipos e lesões pré-neoplásicas, indicando que a colite associada a indução tumoral é um método eficaz em desenvolver um modelo rápido para estudos de CCR.

Um estudo recente, com duração de 12 semanas, induziu CCR em camundongos Balb/C and C57/Bl6 utilizando uma única dose de AOM de 12,5 mg/Kg no início do experimento, seguida de três doses de DSS nas 2^a, 5^a e 8^a semanas. O DSS foi oferecido em três diferentes concentrações, 1%, 2% e 3% na água de beber, por 1 semana cada ciclo, intercalado por um período de recuperação de 2 semanas com água pura. As duas espécies de camundongos apresentaram perda de peso maior de 2-5 gramas apenas após o 1^o ciclo de DSS 3%, e uma perda menor de 1-2 gramas nos 2^o e 3^o ciclos, demonstrando uma clara adaptação dos animais ao DSS nos ciclos 2 e 3. A dose de DSS a 1% e 2% não induziram perda de peso nos animais Balb/C, e a dose de DSS a 2% induziu uma menor perda de peso, somente após o 1^o ciclo nos camundongos C57/Bl6. Alterações histológicas como criptas aberrantes e displasia foram reportados nos animais que receberam DSS a 2%, e poucos carcinomas *in situ* foram encontrados apenas nos animais que receberam DSS a 3% (SCHEPELMANN *et al.*, 2022).

Em nosso estudo, a expressão de IRE1- α no tecido de cólon dos animais induzidos a ter CCR, e que desenvolveram adenomas mas não adenocarcinomas, mostrou-se, inicialmente em declínio no grupo G2 (1 AOM + 3 DSS), e subsequentemente com discreta recuperação no grupo G3 (2 AOM + 3 DSS), demonstrando uma clara adaptação e sobrevivência ao estímulo carcinogênico de AOM e adaptação celular ao ambiente microtumoral.

Fujimoto *et al.* (2007) demonstraram, através de RTq-PCR (mRNA de XBP-1) e Imuno-histoquímica (hipercoloração citoplasmática), que a proteína XBP-1 (via final de IRE1- α , e fator transcricional de diversos processos de modulação do ERE) está superexpressa em linhagens celulares de câncer de cólon obtidas de 11 tumores e adenomas de cólon humano (4 amostras positivas em carcinomas primários e 4 amostras positivas em adenomas). Nesse mesmo estudo,

células epiteliais normais obtidas dos mesmos pacientes não apresentaram expressão gênica e coloração imuno-histoquímica positiva (FUJIMOTO *et al.*, 2007).

Em nossa pesquisa, o estresse de RE, supostamente leve ou moderado, uma vez que o tempo de observação não foi suficiente para observarmos o desenvolvimento de adenocarcinomas, induziu, inicialmente, a redução da expressão de IRE1- α , PERK e CHOP, e posterior parcial recuperação dos níveis de IRE1- α e PERK, mas não de CHOP, que após a queda, permaneceu em níveis bem reduzidos. Por outro lado, a expressão de ATF6, inicialmente reduzida com 1 AOM + 3 DSS, e com recuperação incompleta, aumentou para níveis superiores ao basal após 2 AOM + 3 DSS. O comportamento diverso desses sinalizadores da UPR diante do estímulo de AOM + DSS demonstra, primeiramente, a complexa e ainda não bem compreendida interação entre essas proteínas e suas ações indutoras de adaptação e sobrevivência de células pré-neoplásicas/neoplásicas.

Foi demonstrado que o estresse do retículo endoplasmático induzido em linhagens de células epiteliais de câncer de cólon, pela Tunicamicina e Tapsigargina (Tg), determinou autofagia. Células HT29 tratadas com 0,5 μ M Tg apresentaram aumento da fosforilação dos níveis de proteína PERK, IRE1- α , BiP e CHOP e diminuição dos níveis de proteína ATF6, demonstrados por PCR semiquantitativa (SHIMODAIRA *et al.*, 2014).

Em nosso estudo, foi observada a redução da expressão de CHOP, nos tecidos de cólon dos camundongos submetidos a estímulo carcinogênico de AOM + DSS, mas sem recuperação de seus níveis. Paralelamente, a análise histopatológica dos cortes obtidos dos segmentos de cólon dos animais estudados não observou muitas figuras apoptóticas, fato que corrobora o mecanismo de adaptação caracterizada pela fuga da apoptose, mesmo diante de estímulos nocivos.

O Ciclopirox (CPX), um fungicida tópico, demonstrou possuir efeito anticancerígeno ao induzir diretamente a produção de EROs mitocondriais e celulares, promovendo a ativação do estresse do RE via UPR, o que levou a ativação da via PERK-eIF2 α -ATF4, promovendo a apoptose celular associada ao estresse do RE em células de CCR (HCT-8 e DLD-1) inoculadas em camundongos Balb C nude. Paralelamente, verificou-se que a apoptose induzida por CPX poderia ser inibida pela N-Acetilcisteína (NAC) eliminador de ROS (JIANJUN *et al.*, 2020).

O nosso trabalho obteve como resultado a atenuação da expressão gênica de mRNA de PERK com uma recuperação parcial diante de 1 AOM + 3 DSS, e a redução da expressão sem recuperação com o uso de 2 AOM + 3 DSS. O racional teórico para esse comportamento de sinalização recai sobre os mecanismos de economia ativados pelas células estressadas levando manutenção da produção de proteínas oncogênicas, supressão de EROS e redução da apoptose, culminando, em última análise, em sobrevivência e adaptação celular.

A inibição seletiva de PERK (GSK2656157) reduz o tamanho de tumores oriundos de células de CCR humano (SW620) injetadas em camundongos NOD/SCID e facilita a ação do 5-Fluorouracil (quimioterápico para CCR tardio) reduzindo ainda mais o crescimento tumoral por atuação sinérgica. A redução do crescimento tumoral se deu pelo reforço da apoptose, fato observado através da utilização de métodos de análise de citometria de fluxo (SHI *et al.*, 2019).

O estresse do retículo endoplasmático ativa o TAp73 α (um homólogo de p53) para promover a apoptose das células de câncer de cólon (HEK-293T e HCT116) através da sinalização PERK-ATF4. A determinação da expressão gênica de PERK, ATF4 e Tap73 α , nas linhagens celulares neoplásicas, foi realizada pelo método de quantificação RTq-PCR e a avaliação da apoptose estudada por citometria de fluxo. Portanto, estudos de quantificação de PERK-ATF4 e TAp73 α podem ser úteis como uma estratégia terapêutica alvo-específica contra o câncer de cólon (SUN *et al.*, 2023).

Em nosso estudo, a expressão de IRE1- α e ATF6 tiveram uma redução inicial com 1 AOM + 3 DSS seguido de uma elevação após o uso de 2 AOM + 3 DSS, mais pronunciado com ATF6 que ultrapassou os valores iniciais, confirmando os achados do estudo de Bruno e colegas (2022), demonstrando dessa forma, que IRE1- α e ATF6 desencadeiam todos os desdobramentos descritos na adaptação do CCR.

A análise de dados de coorte de 83 pacientes portadores de CCR mostrou que a expressão de ATF6 em seus tumores foi associada com a redução do tempo de sobrevida livre de doença. Paralelamente, estudos de análise metagenômica em camundongos transgênicos nATF6IEC, demonstrou que a ativação intestinal sustentada de ATF6 no cólon promoveu disbiose e facilitou a tumorigênese dependente da microbiota (COLEMAN *et al.*, 2018).

O diagnóstico de displasia de baixo grau (LGD) é fundamental para delinear o tratamento da Colite Ulcerativa (CU), mas, frequentemente, é difícil distinguir LGD do epitélio regenerativo inflamatório. Sabendo-se que a UPR é ativada em doenças inflamatórias intestinais e malignidades, a pesquisadora Dra. Marie Hanaoka e seus colegas (2018) verificaram que ATF6 estava expresso em tecidos obtidos de tumores ressecados cirurgicamente e endoscopicamente. Esses espécimes continham alterações atípicas pré-neoplásicas tanto no CCR não-CU quanto no CCR associado à CU, e dessa forma, validou-se o ATF6 como marcador útil para distinguir LGD do epitélio regenerativo inflamatório em pacientes com CU (HANAOKA *et al.*, 2018).

Apesar de nossa pesquisa não ter estudado o desenvolvimento de invasão peritumoral e metástases, motivo já explicado anteriormente, admite-se que em estágios mais avançados de carcinogênese induzida pela AOM + DSS, através de novos estudos, poder-se-á observar a superexpressão de IRE1- α e VEGF-R2 como promotores de invasão e angiogênese.

Um estudo, utilizando testes imuno-histoquímicos, western blotting e ensaios de invasão em linhagens celulares de CCR, comprovou que a proteína 1 de ligação ao X-box (XBP-1), um splicing de IRE1- α , atua como fator de sinalização do receptor-2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-R2), estimulando a invasão de células tumorais. Os resultados mostraram que a XBP-1 está superexpressa em amostras de tecidos metastáticos e pouco diferenciados, e pouco expressa em amostras de tecidos bem diferenciados e normais de cólon. O escore de imunorreatividade da XBP-1 foi positivamente associado ao aumento da invasão tumoral, e a superexpressão de XBP-1 promoveu a invasão de células neoplásias, que foi suprimida pela inibição de XBP-1 quando utilizado moléculas de RNA silenciadores (siRNA). A inibição da expressão de XBP-1 reduziu significativamente os níveis de VEGF-R2, fazendo com que o primeiro seja considerado um novo biomarcador preditivo de invasão e metástase do CCR (MHAIDAT; ALZOUBI; ABUSHBAK, 2015).

Apesar de no nosso estudo, a carcinogênese não ter sido acompanhada até as fases mais avançadas do desenvolvimento tumoral (adenocarcinoma e metástase linfonodal), o comportamento da expressão gênica de CHOP é consistente em acompanhar os achados de Piton e colegas (2016), pois apesar de ter apresentado uma discreta recuperação após 1 AOM + 3 DSS, declinou definitivamente após 2 AOM + 3 DSS. Esse achado confirma a hipótese de que diante de estímulos capazes de induzir a apoptose, as células submetidas a estímulos tumorigênicos e inflamatórios lançam mão de mecanismos adaptativos de sobrevivência e adaptação, reduzindo a expressão de CHOP.

Um estudo envolvendo 81 pacientes portadores de CCR tratados entre jan/2003 até jan. 2013 quantificou a expressão de BiP e CHOP por coloração imuno-histoquímica de um microarranjo tecidual gerado a partir de núcleos de cólon coletados de biópsias (tecido normal, adenoma de baixo e alto grau, adenocarcinoma invasivo de cólon e metástase linfonodal de adenocarcinoma de cólon). À medida que o epitélio do cólon mostrava evidências crescentes de alterações pré-malignas e depois malignas, a expressão de BiP aumentou significativamente, enquanto a expressão de CHOP foi atenuada. Dessa forma, identificou-se uma relação positiva entre a expressão de BiP e a carcinogênese do cólon, e uma correlação negativa para a expressão de CHOP. Estas descobertas são consistentes com o racional teórico no qual o estresse do RE acompanha a carcinogênese de cólon e, paralelamente, a perda de proteínas que medeiam a toxicidade do estresse do RE, como o CHOP, pode facilitar a tumorigênese. Estas considerações reforçam a excitante possibilidade de que a restauração do ciclo de *feedback* negativo da UPR, quando possível, possa antagonizar o processo carcinogênico (PITON *et al.*, 2016).

O nosso estudo corroborou os resultados encontrados na literatura pois mostrou a expressão progressivamente maior de todos os genes do grupo controle, demonstrando haver uma

relação direta entre o envelhecer e o aumento do ERE, incluindo suas inexoráveis consequências que é a apoptose, cujo objetivo nada mais é que tentar poupar as células filhas de receber material genético defeituoso.

Um estudo utilizando técnica de RTq-PCR demonstrou elevação do ERE no tecido adiposo de camundongos C57BL idosos (18 a 20 meses) em comparação com animais jovens (4 a 6 meses). Nesse mesmo estudo foi observado níveis elevados de BIP (GRP78), CHOP, ATF-6, IRE1- α e XBP-1 apenas nos camundongos idosos (GHOSH *et al.*, 2015).

Em nosso estudo, a expressão de todos os genes da UPR (IRE1- α , PERK e ATF6) e mais o CHOP se elevou na 5ª semana nos grupos G2 e G3, momento inicial do efeito do DSS na mucosa colônica dos animais. Entretanto, nas semanas seguintes, apresentaram redução importante da expressão, com tendência a recuperação, mas sem atingir os níveis iniciais de expressão. Apesar de no nosso experimento não termos quantificado as interleucinas, os achados confirmam que a inflamação aguda induzida pelo DSS é um bom modelo de colite que pode ser utilizado para estudar o ERE/UPR, pois se correlaciona bem com a inflamação encontrada nos tecidos humanos.

Um estudo brasileiro recente, utilizando técnica RTq-PCR e imuno-histoquímica em biópsias de cólon, demonstrou que PERK e IRE1- α , mas não a via ATF6, são ativadas na mucosa de pacientes com colite ulcerativa. Esse mesmo estudo deixou claro que as interleucinas pró-inflamatórias estão significativamente elevadas nesses tecidos inflamados (IL1- β , IL6, IL17, IL22, IL23p19, IFN- γ , TNF- α), ao passo que IL10 (anti-inflamatória) está suprimida (RODRIGUES *et al.*, 2022).

7 – LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O número de estudos que exploraram as vias de sinalização no ERE e UPR ainda são escassos, especialmente aqueles que avaliaram tumores humanos. A explicação para esse fato recai sobre os limitados conhecimentos existentes sobre as intrincadas relações entre os diversos protagonistas das cascatas de sinalização e o CCR, além dos custos elevados para se realizar estudos rotineiros de sinalização em escala clínica.

Por isso, quando se fala em ERE e UPR em CCR, muitas perguntas ainda permanecem no ar. Além disso, estudos independentes e sem financiamento, são incapazes de investigar as interconexões da proteômica completa, disponível nos bancos de dados atualmente, com as vias de sinalização ainda não esclarecidas do CCR. Isso se deve ao fato de que o número de marcadores, receptores e estruturas a serem mapeados e compreendidos, são inúmeros.

Por isso, a unificação de esforços em pesquisa no campo do CCR são necessários e podem gerar avanços significativos na compreensão dos mecanismos moleculares capazes de descortinar novos tratamentos contra essa doença. Esta melhor compreensão das características genéticas, biológicas e moleculares do CCR, deverá, doravante, impulsionar novas pesquisas em direção ao progresso contínuo e a descoberta de novas moléculas alvo-específicas com potencial de serem utilizadas na prática clínica.

À medida que explorarmos o poder das tecnologias de criação de perfis, sistemas de modelos genéticos e novas terapias direcionadas, poderemos almejar, realmente, atingir resultados cada vez mais animadores no enfrentamento ao CCR, e dessa forma, entregar aumento de expectativa de vida com qualidade aos pacientes.

Mais estudos são necessários para que haja avanços nos conhecimentos das vias de sinalizações moleculares do ERE e UPR. Quando novas informações geradas pelos próximos estudos forem trazidas à luz do conhecimento científico, talvez seja possível adotar o paradigma dos ensaios de precisão capazes de acelerar a detecção, prevenção e tratamento de muitas formas de CCR.

8 – CONCLUSÃO

O presente modelo experimental em camundongo *Hairless* apresentou parâmetros biométricos e histopatológicos, característicos de lesões inflamatórias e pré-neoplásicas, com apresentação de pólipos pré-carcinogênicos, típicos de evolução experimental de CCR, pelo uso combinado de AOM/DSS.

As expressões relativas de mRNAs para os genes IRE1- α , PERK, ATF6 e CHOP apresentaram um perfil de aumentos progressivos, sucessivamente, para cada respectiva semana do protocolo experimental no grupo controle, o que sugere uma influência fisiológica natural do envelhecimento animal sobre a expressão destes genes reguladores do ERE.

A expressões relativas dos mRNAs-alvo foram moduladas negativamente na maioria dos grupos experimentais CCR associados à colite sob tratamento com AOM/DSS.

Nossos achados são compatíveis com a ativação de mecanismos adaptativos de regulação de proliferação celular e de apoptose, aplicados ao modelo animal do presente estudos.

9 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente modelo experimental em camundongo *Hairless* apresentou parâmetros biométricos e histopatológicos, característicos de lesões inflamatórias e pré-neoplásicas, com apresentação de pólipos pré-carcinogênicos, típicos de evolução experimental de CRC, pelo uso combinado de AOM/DSS, servindo assim como potencial ferramenta para estudos futuros dos mecanismos e vias moleculares envolvidos na progressão e evolução do CCR experimental e de outros tipos de cânceres.

Não obstante, o conhecimento da genômica funcional que compreende a modulação dos complexos componentes do ERE, dentre estes os transcritos de IRE1- α , PERK, ATF6, que culminam com a definição da proliferação celular ou apoptose, principalmente na finalização promovida pela proteína pró-apoptótica CHOP *downstream* desta cascata de regulação fundamental do ERE, poderá nos lançar luz para futuros alvos e ferramentas terapêuticas para o CCR.

Em nosso estudo verificou-se um fenômeno inédito quanto ao perfil molecular das expressões dos genes-alvos, observados principalmente no G1, onde ocorreram significativos aumentos de expressões pareadas progressivamente ao envelhecimento dos animais, sugerindo que a modulação dos genes reguladores do ERE acompanha a necessidade de apoptose fisiológica neste processo.

Interessantemente, as expressões relativas dos mRNAs-alvo foram moduladas negativamente ou suprimidas na maioria dos grupos experimentais CCR associados à colite sob tratamento com AOM/DSS, sugerindo que o sistema regulatório fisiológico estava definitivamente comprometido pelo efeito agressor dos componentes inflamatórios e lesivos da composição de AOM/DSS.

Nossos achados corroboram a ideia de ativação de mecanismos adaptativos de sobrevivência, proliferação celular ou apoptose, mediante estímulos inflamatórios e carcinogênicos, verificados no presente estudo, que mostrou uma relação entre evolução histopatológica das lesões pré-neoplásicas e o correspondente aumento das expressões relativas dos genes do ERE.

10 – REFERÊNCIAS

- ADACHI, Y.; YAMAMOTO, K.; OKADA, T.; YOSHIDA, H.; HARADA, A.; MORI, K. ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. **Cell Structure and Function**, v. 33, n. 1, p. 75-89, Mar. 2008. DOI: 10.1247/csf.07044.
- AHNER, A.; BRODSKY, J. L. Checkpoints in ER-associated degradation: excuse me, which way to the proteasome? **Trends in Cell Biology**, v. 14, n. 9. p. 474–478, Sep. 2004. DOI: 10.1016/j.tcb.2004.07.013.
- 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.
- ARAP, M. A.; LAHDENRANTA, J.; MINTZ, P. J.; HAJITOU, A.; SARKIS, A. S.; ARAP, W.; PASQUALINI, R. Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. **Cancer Cell**, v. 6, n. 3, p. 275-284, Sep. 2004. DOI: 10.1016/j.ccr.2004.08.018.
- ARNOLD, M.; SIERRA, M. S.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Frontline Gastroenterology - BMJ**, v. 66, n. 4, p. 683-691, Jan. 2016. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-310912.
- BRUNO, G.; LI, BERGOLIS, V.; PISCAZZI, A.; CRISPO, F.; CONDELLI, V.; ZOPPOLI, P.; MADDALENA, F.; PIETRAFESA, M.; GIORDANO, G.; MATASSA, D. S.; ESPOSITO, F.; LANDRISCINA, M. TRAP1 regulates the response of colorectal cancer cells to hypoxia and inhibits ribosome biogenesis under conditions of oxygen deprivation. **International Journal of Oncology**, v. 60, n. 6, Jun. 2022. DOI: 10.3892/ijo.2022.5369.
- BUCK, T. M.; WRIGHT, C. M.; BRODSKY, J. L. The Activities and Function of Molecular Chaperones in the Endoplasmic Reticulum. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 18, n. 6, p. 751–761, Dec. 2007. DOI: 10.1016/j.semcd.2007.09.001.
- BULTMAN, S. J. Emerging roles of the microbiome in cancer. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 2, p. 249-255, Feb. 2014. DOI: 10.1093/carcin/bgt392.
- CAO, S. S.; KAUFMAN, R. J. Unfolded protein response. **Current Biology**, v. 22, n. 16, p. 622-626, Aug. 2012. DOI: 10.1016/j.cub.2012.07.004.
- CARETHERS, J. M.; JUNG, B. H. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, v. 149, n. 5, p. 1190.e3, Oct. 2015. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.06.047.
- CHALMERS, F.; MOGRE, S.; SON, J.; BLAZANIN, N.; GLICK, A. B. The multiple roles of the unfolded protein response regulator IRE1 α in cancer. **Molecular Carcinogenesis**, v. 58, n. 9, p. 1623-1630, Sep. 2019. DOI: 10.1002/mc.23031.

CHUNG, L.; THIELE ORBERG, E.; GEIS, A. L.; CHAN, J. L.; FU, K.; DESTEFANO SHIELDS, C. E.; DEJEA, C. M.; FATHI, P.; CHEN, J.; FINARD, B. B.; TAM, A. J.; MCALLISTER, F.; FAN, H.; WU, X.; GANGULY, S.; LEBID, A.; METZ, P.; VAN MEERBEKE, S. W.; HUSO, D. L.; WICK, E. C.; PARDOLL, D. M.; WAN, F.; WU, S.; SEARS, C. L.; HOUSSEAU, F. Bacteroides fragilis Toxin Coordinates a Pro-carcinogenic Inflammatory Cascade via Targeting of Colonic Epithelial Cells. **Cell Host & Microbe**, v. 23, n. 2, p. 203-214.e5, Feb. 2018. DOI: 10.1016/j.chom.2018.01.007.

COLEMAN, O. I.; LOBNER, E. M.; BIERWIRTH, S.; SORBIE, A.; WALDSCHMITT, N.; RATH, E.; BERGER, E.; LAGKOUVARDOS, I.; CLAVEL, T.; MCCOY, K. D.; WEBER, A.; HEIKENWALDER, M.; JANSSEN, K. P.; HALLER, D. Activated ATF6 Induces Intestinal Dysbiosis and Innate Immune Response to Promote Colorectal Tumorigenesis. **Gastroenterology**, v. 155, n. 5, p. 1539-1552, Nov. 2018, DOI: 10.1053/j.gastro.2018.07.028.

DAVID, L. A.; MAURICE, C. F.; CARMODY, R. N.; GOOTENBERG, D. B.; BUTTON, J. E.; WOLFE, B. E.; LING, A. V.; DEVLIN, A. S.; VARMA, Y.; FISCHBACH, M. A.; BIDDINGER, S. B.; DUTTON, R. J.; TURNBAUGH, P. J. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 559-563, Jan. 2014. DOI: 10.1038/nature12820.

DENOYELLE, C.; ABOU-RJAILY, G.; BEZROOKOVE, V.; VERHAEGEN, M.; JOHNSON, T. M.; FULLEN, D. R.; POINTER, J. N.; GRUBER, S. B.; SU, L. D.; NIKIFOROV, M. A.; KAUFMAN, R. J.; BASTIAN, B. C.; SOENGAS, M. S. Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. **Nature Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 1053-1063, Oct. 2006. DOI: 10.1038/ncb147.

DONG, D.; NI, M.; LI, J.; XIONG, S.; YE, W.; VIRREY, J. J.; MAO, C.; YE, R.; WANG, M.; PEN, L.; DUBEAU, L.; GROSHEN, S.; HOFMAN, F. M.; LEE, A. S. Critical role of the stress chaperone GRP78/BiP in tumor proliferation, survival, and tumor angiogenesis in transgene-induced mammary tumor development. **Cancer Research**, v. 68, n. 2, p. 498-505, Jan. 2008. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2950.

DONG, D.; STAPLETON, C.; LUO, B.; XIONG, S.; YE, W.; ZHANG, Y.; JHAVERI, N.; ZHU, G.; YE, R.; LIU, Z.; BRUHN, K. W.; CRAFT, N.; GROSHEN, S.; HOFMAN, F. M.; LEE, A. S. A critical role for GRP78/BiP in the tumor microenvironment for neovascularization during tumor growth and metastasis. **Cancer Research**, v. 71, n. 8, p. 2848-2857, Apr. 2011. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3151.

DROGAT, B.; AUGUSTE, P.; NGUYEN, D. T.; BOUCHECAREILH, M.; PINEAU, R.; NALBANTOGLU, J.; KAUFMAN, R. J.; CHEVET, E.; BIKFALVI, A.; MOENNER, M. IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo. **Cancer Research**, v. 67, n. 14, p. 6700-6707, July 2007. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3235.

EADEN, J. A.; ABRAMS, K. R.; MAYBERRY, J. F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. **Gut**, v. 48, n. 4, p. 526-535, Apr. 2001. DOI: 10.1136/gut.48.4.526.

FENG, Y. X.; SOKOL, E. S.; DEL VECCHIO, C. A.; SANDUJA, S.; CLAESSEN, J. H.; PROIA, T. A.; JIN, D. X.; REINHARDT, F.; PLOEGH, H. L.; WANG, Q.; GUPTA, P. B. Epithelial-to-mesenchymal transition activates PERK-eIF2 α and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress. **Cancer Discovery**, v. 4, n. 6, p. 702-715, Jun. 2014. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0945.

FUJIMOTO, T.; YOSHIMATSU, K.; WATANABE, K.; YOKOMIZO, H.; OTANI, T.; MATSUMOTO, A.; OSAWA, G.; ONDA, M.; OGAWA, K. Overexpression of human X-box binding protein 1 (XBP-1) in colorectal adenomas and adenocarcinomas. **Anticancer Research**, v. 27, n. 1, p. 127-131, Jan. 2007.

GHOSH, A. K.; GARG, S. K.; MAU, T.; O'BRIEN, M.; LIU, J.; YUNG, R. Elevated Endoplasmic Reticulum Stress Response Contributes to Adipose Tissue Inflammation in Aging. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 70, n. 11, p. 1320-1329, Nov. 2015. DOI: 10.1093/gerona/glu186.

GONZALEZ-GRONOW, M.; SELIM, M. A.; PAPALAS, J.; PIZZO, S. V. GRP78: A Multifunctional Receptor on the Cell Surface. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 9, p. 2299-2306, Aug. 2009. DOI: 10.1089/ars.2009.2568.

GRAY, M. J.; CLOOTS, E.; SIMPSON, M. S.; LEDUC, N.; SEREBRENIK, Y. V.; DE LUCA, H.; DE SUTER, D.; LUONG, P.; THIAGARAJAH, J. R.; PATON, A. W.; PATON, J. C.; SEELIGER, M. A.; EYCKERMAN, S.; JANSSENS, S.; LENCER, W. I. IRE1 β negatively regulates IRE1 α signaling in response to endoplasmic reticulum stress. **Journal of Cell Biology**, v. 219, n. 2, p. 1-17, Jan. 2020. DOI: 10.1083/jcb.201904048.

HAN, S.; LIANG, C-P.; DEVRIES-SEIMON, T.; RANALLETTA, M.; WELCH, C. L.; COLLINS-FLETCHER, K.; ACCILI, D.; TABAS, I.; TALL, A. R. Macrophage insulin receptor deficiency increases ER stress-induced apoptosis and necrotic core formation in advanced atherosclerotic lesions. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 4, p. 257-266, Apr. 2006. DOI: 10.1016/j.cmet.2006.02.008.

HANAOKA, M.; ISHIKAWA, T.; ISHIGURO, M.; TOKURA, M.; YAMAUCHI, S.; KIKUCHI, A.; UETAKE, H.; YASUNO, M.; KAWANO, T. Expression of ATF6 as a marker of pre-cancerous atypical change in ulcerative colitis-associated colorectal cancer: a potential role in the management of dysplasia. **Journal of Gastroenterology**, v. 53, n. 5, p. 631-641, May 2018. DOI: 10.1007/s00535-017-1387-1.

HARDING, H. P.; ZHANG, Y.; BERTOLOTTI, A.; ZENG, H.; RON, D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. **Molecular Cell**, v. 5, n. 5, p. 897-904, May 2000. DOI: 10.1016/s1097-2765(00)80330-5.

HENDRICK, J. P.; HARTL, F. U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 349-84, July 1993. DOI: 10.1146/annurev.bi.62.070193.002025.

HETZ, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 2, p. 89-102, Jan. 2012. DOI: 10.1038/nrm3270.

HETZ, C.; CHEVET, E.; HARDING, H. Targeting the unfolded protein response in disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 9, p. 703–719, Aug. 2013. DOI: 10.1038/nrd3976.

HETZ, C.; MARTINON, F.; RODRIGUEZ, D.; GLIMCHER, L. H. The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1 α . **Physiological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 1219-1243, Oct. 2011. DOI: 10.1152/physrev.00001.2011.

HETZ, C.; ZHANG, K.; KAUFMAN, R. J. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 8, p. 421-438, Aug. 2020. DOI: 10.1038/s41580-020-0250-z.

HUANG, J. J.; PAN, H.; WANG, J.; WANG, T.; HUO, X.; MA, Y.; LU, Z.; SUN, B.; JIANG, H. Unfolded protein response in colorectal cancer. **Cell & Bioscience**, v. 11, n. 26, p. 1-16, Jan. 2021. DOI: 10.1186/s13578-021-00538-z.

IURLARO, R.; MUÑOZ-PINEDO, C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. **FEBS Journal**, v. 283, n. 14, p. 2640-2652, July 2016. DOI: 10.1111/febs.13598.

JESS, T.; RUNGOE, C.; PEYRIN-BIROULET L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 6, p. 639–645, June 2012. DOI: 10.1016/j.cgh.2012.01.010.

Jl, H.; HUANG, C.; WU, S.; KASIM, V. XBP1-s promotes colorectal cancer cell proliferation by inhibiting TAp73 transcriptional activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 508, n. 1. p. 203-209, Jan. 2019. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.11.112.

JIANG, H. Y.; WEK, S. A.; MCGRATH, B. C.; SCHEUNER, D.; KAUFMAN, R. J.; CAVENER, D. R.; WEK, R. C. Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 16, p. 5651-5663, Aug. 2003. DOI: 10.1128/MCB.23.16.5651-5663.2003.

JIANJUN, Q.; NINGNING, Z.; LIYI, L.; SHOUYONG, M.; YIDAN, Z.; YAO, D.; TING, C.; CHANGLIANG, S.; QIN, C.; BIN, L. Ciclopirox activates PERK-dependent endoplasmic reticulum stress to drive cell death in colorectal cancer. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 582, July 2020. DOI: 10.1038/s41419-020-02779-1.

JIRAMONGKOL, Y.; LAM, E. W. FOXO transcription factor family in cancer and metastasis. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 39, n. 3, p. 681-709, Sep. 2020. DOI: 10.1007/s10555-020-09883-w.

KENSLER, T. W.; WAKABAYASHI, N.; BISWAL, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 89-116, Feb. 2007. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046.

KHODAKARAMI, A.; ADIBFAR, S.; KARPISHEH, V.; ABOLHASANI, S.; JALALI, P.; MOHAMMADI, H.; NAVASHENAG, J. G.; HOJJAT-FARSANGI, M.; JADIDI-NIARAGH, F. The molecular biology and therapeutic potential of Nrf2 in leukemia. **Cancer Cell International**, v. 22, n. 1, p. 1-24, July 2022. DOI: 10.1186/s12935-022-02660-5.

KLATT, E. C. The Internet pathology laboratory for medical education hosted by **The University of Utah Eccles Health Sciences Library - EUA**, 1994-2020.

KREPLAK, L.; AEBI, U. From the polymorphism of amyloid fibrils to their assembly mechanism and cytotoxicity. **Advances in Protein Chemistry**, v. 73, p. 217–233, 2006. DOI: 10.1016/S0065-3233(06)73007-8.

LASKEY, R. A.; HONDA, B. M.; MILLS, A. D.; FINCH, J. T. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. **Nature**, v. 275, n. 5679, p. 416–420, Oct. 1978. DOI: 10.1038/275416a0.

LEWANDOWSKA, A.; RUDZKI, G.; LEWANDOWSKI, T.; STRYJKOWSKA-GÓRA, A.; RUDZKI, S. Risk Factors for the Diagnosis of Colorectal Cancer. **Cancer Control**, v. 29, p. 1-15, Jan. 2022. DOI: 10.1177/10732748211056692.

LI, J.; MA, X.; CHAKRAVARTI, D.; SHALAPOUR, S.; DEPINHO, R. A. Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. **Genes & Development**, v. 35, p. 787-820, Jun. 2021. DOI: 10.1101/gad.348226.120.

LIN, J. H.; WALTER, P.; YEN, T. S. B. Endoplasmic Reticulum Stress in Disease Pathogenesis. **Annual Review of Pathology**, v. 3, n. 1, p. 399-425, Feb. 2008. DOI: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151434.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec. 2001. DOI: 10.1006/met.2001.1262.

MACARULLA, T.; MONTAGUT, C.; SÁNCHEZ-MARTIN, F. J.; GRANJA, M.; VERDAGUER, H.; SASTRE, J.; TABERNERO, J. The role of PIGF blockade in the treatment of colorectal cancer: overcoming the pitfalls. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 20, n. 1, p. 15-22, Jan. 2020. DOI: 10.1080/14712598.2020.1677603.

MAHADEVAN, N. R.; ANUFREICHIK, V.; RODVOLD, J. J.; CHIU, K. T.; SEPULVEDA, H.; ZANETTI, M. Cell-extrinsic effects of tumor ER stress imprint myeloid dendritic cells and impair CD8⁺ T cell priming. **PLOS One**, v. 7, n. 12, p. e51845, Dec. 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0051845.

MARCINIAK, S. J.; YUN, C. Y.; OYADOMARI, S.; NOVOA, I.; ZHANG, Y.; JUNGREIS, R.; NAGATA, K.; HARDING, H. P.; RON, D. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. **Genes & Development**, v. 18, n. 24, p. 3066-3077, Dec. 2004. DOI: 10.1101/gad.1250704.

MÁRTON, M.; BÁNHEGYI, G.; GYÖNGYÖSI, N.; KÁLMÁN, E. É.; PETTKÓ-SZANDTNER, A.; KÁLDI, K.; KAPUY, O. A systems biological analysis of the ATF4-

GADD34-CHOP regulatory triangle upon endoplasmic reticulum stress. **FEBS Open Bio**, v. 12, n. 11, p. 2065-2082, Nov. 2022. DOI: 10.1002/2211-5463.13484.

MATTIUZZI, C.; SANCHIS-GOMAR, F.; LIPPI, G. Concise update on colorectal cancer epidemiology. **Annals of Translational Medicine**, v. 7, n. 21, p. 1-5, Nov. 2019. DOI: 10.21037/atm.2019.07.91.

MAUREL, M.; MCGRATH, E. P.; MNICH, K.; HEALY, S.; CHEVET, E.; SAMALI, A. Controlling the unfolded protein response-mediated life and death decisions in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 33, p. 57-66, Aug. 2015. DOI: 10.1016/j.semcancer.2015.03.003.

MCCRACKEN, A. A.; BRODSKY, J. L. Evolving questions and paradigm shifts in endoplasmic-reticulum-associated degradation (ERAD). **Bioessays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, v. 25, n. 9, p. 868–877, Sep. 2003. DOI: 10.1002/bies.10320.

MCCULLOUGH, K. D.; MARTINDALE, J. L.; KLOTZ, L. O.; AW, T. Y.; HOLBROOK, N. J. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 4, p. 1249-1259, Feb. 2001. DOI: 10.1128/MCB.21.4.1249-1259.2001.

MENEZES, C. C. S.; FERREIRA D. B. B.; FARO F. B. A.; BOMFIM M. S.; TRINDADE, L. M. D. F. Câncer colorretal na população brasileira: taxa de mortalidade no período de 2005-2015. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 29, n. 2, p. 172-179, abr./jun. 2016. DOI: 10.5020/18061230.2016.p172.

MHAIDAT, N. M.; ALZOUBI, K. H.; ABUSHBAK, A. X-box binding protein 1 (XBP-1) enhances colorectal cancer cell invasion. **Journal of Chemotherapy**, v. 27, n. 3, p. 167-173, Jun. 2015. DOI: 10.1179/1973947815Y.0000000006.

MHAIDAT, N. M.; ALZOUBI, K. H.; KHABOUR, O. F.; BANIHANI, M. N.; AL-BALAS, Q. A.; SWAIDAN, S. GRP78 regulates sensitivity of human colorectal cancer cells to DNA targeting agents. **Cytotechnology**, v. 68, n. 3, p. 459-467, May 2016. DOI: 10.1007/s10616-014-9799-8.

O'KEEFE, S. J. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. **Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, n. 12, p. 691-706, Dec. 2016. DOI: 10.1038/nrgastro.2016.165.

PARANG, B.; BARRET, C. W.; WILLIAMS, C. S. AOM/DSS Model of colitis-associated cancer. **Methods in molecular biology**, v. 1422, p. 297-307, Jan. 2017. DOI: 10.1007/978-1-4939-3603-8_26.

PFÄFFENBACH, K. T.; LEE, A. S. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 23, n. 2, p. 150-156, Apr. 2011. DOI: 10.1016/j.ceb.2010.09.007.

PITON, N.; WASON, J.; COLASSE, E.; CORNIC, M.; LEMOINE, F.; LE PESSOT, F.; MARGUET, F.; SABOURIN, J-C. Endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response

and development of colon adenocarcinoma. **Virchows Archiv: an international journal of pathology**, 469, n. 2, p. 145-154, Aug. 2016. DOI: 10.1007/s00428-016-1961-6.

PUTHALAKATH, H.; O'REILLY, L. A.; GUNN, P.; LEE, L.; KELLY, P. N.; HUNTINGTON, N. D.; HUGHES, P. D.; MICHALAK, E. M.; MCKIMM-BRESCHKIN, J.; MOTOYAMA, N.; GOTOH, T.; AKIRA, S.; BOUILLET, P.; STRASSER, A. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1337-1349, Jun. 2007. DOI: 10.1016/j.cell.2007.04.027.

PUZZONO, M.; MANNUCCI, A.; GRANNÒ, S.; ZUPPARDO, R. A.; GALLI, A.; DANESE, S.; CAVESTRO, G. M. The Role of Diet and Lifestyle in Early-Onset Colorectal Cancer: A Systematic Review. **Cancers (Basel)**, v. 13, n. 23, Nov. 2021. DOI: 10.3390/cancers13235933.

RANGANATHAN, A. C.; ADAM, A. P.; ZHANG, L.; AGUIRRE-GHISO, J. A. Tumor cell dormancy induced by p38SAPK and ER-stress signaling: an adaptive advantage for metastatic cells? **Cancer Biology & Therapy**, v. 5, n. 7, p. 729-735, July 2006. DOI: 10.4161/cbt.5.7.2968.

RASKOV, H.; BURCHARTH, J.; POMMERGAARD, H-C. Linking gut microbiota to colorectal cancer. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 17, p. 3378–3395, Sep. 2017. DOI: 10.7150/jca.20497.

RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. **Experientia**, v. 18, n. 12, p. 571–573, Dec. 1962. DOI: 10.1007/BF02172188.

ROBERTIS, M.; MASSI, E.; FASIO, 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.

RODRIGUES, B. L.; DOTTI, I.; PASCOAL, L. B.; MORARI, J.; ESTELLER, M.; COOPE, A.; AYRIZONO, M. L. S.; SALAS, A.; LEAL, R. F. Endoplasmic Reticulum Stress in Colonic Mucosa of Ulcerative Colitis Patients Is Mediated by PERK and IRE1 Pathway Activation. **Mediators of Inflammation**, v. 2022, p. 6049500, Feb. 2022. DOI: 10.1155/2022/6049500.

RON, D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 10, p. 1383-1388, Nov. 2002. DOI: 10.1172/JCI16784.

RONCUCCI, L.; STAMP, D.; MEDLINE, A.; CULLEN, J. B.; BRUCE, R. Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. **Human Pathology**, v. 22, n. 3, p. 287-294, Mar. 1991. DOI: 10.1016/0046-8177(91)90163-j.

ROTHSCHILD, D.; WEISSBROD, O.; BARKAN, E.; KURILSHIKOV, A.; KOREM, T.; ZEEVI, D.; COSTEA, P. I.; GODNEVA, A.; KALKA, I. N.; BAR, N.; SHILO, S.; LADOR, D.; VILA, A. V.; ZMORA, N.; PEVSNER-FISCHER, M.; ISRAELI, D.; KOSOWER, N.; MALKA, G.; WOLF, B. C.; AVNIT-SAGI, T.; LOTAN-POMPAN, M.; WEINBERGER, A.; HALPERN, Z.; CARMİ, S.; FU, J.; WIJMENGA, C.; ZHERNAKOVA, A.; ELINAV, E.; SEGAL, E. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. **Nature**, v. 555, n. 7695, p. 210-215, Mar. 2018. DOI: 10.1038/nature25973.

- RUBINSTEIN, M. R.; WANG, X.; LIU, W.; HAO, Y.; CAI, G.; HAN, Y. W. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. **Cell Host & Microbe**, v. 14, n. 2, p. 195-206, Aug. 2013. DOI: 10.1016/j.chom.2013.07.012.
- SCHEPELMANN, M.; KUPPER, N.; GUSHCHINA, V.; MESTERI, I.; MANHARDT, T.; MORITSCH, S.; MÜLLER, C.; PIATEK, K.; SALZMANN, M.; VLASATY, A.; EFERL, R.; KALLAY, E. AOM/DSS Induced Colitis-Associated Colorectal Cancer in 14-Month-Old Female Balb/C and C57/Bl6 Mice-A Pilot Study. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 9, p. 5278, May 2022. DOI: 10.3390/ijms23095278.
- SCHEWE, D. M.; AGUIRRE-GHISO, J. A. ATF6 α -Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A**, v. 105, n. 30, p.10.519-10.524, July 2008. DOI: 10.1073/pnas.0800939105.
- SCHWARZ, D. S.; BLOWER, M. D. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 1, p. 79–94, Jan. 2016. DOI: 10.1007/s00018-015-2052-6.
- SHI, Z.; YU, X. F.; YUAN, M.; LV, W.; FENG, T.; BAI, R.; ZHONG, H. Activation of the PERK-ATF4 pathway promotes chemo-resistance in colon cancer cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 3210, Mar. 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-39547-x.
- SHIMODAIRA, Y.; TAKAHASHI, S.; KINOUCI, Y.; ENDO, K.; SHIGA, H.; KAKUTA, Y.; KUROHA, M.; SHIMOSEGAWA, T. Modulation of endoplasmic reticulum (ER) stress-induced autophagy by C/EBP homologous protein (CHOP) and inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α) in human colon cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 445, n. 2, p. 524-533, Mar. 2014. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.02.054.
- SHIRYAEV, S. A.; REMACLE, A. G.; CHERNOV, A. V.; GOLUBKOV, V. S.; MOTAMEDCHABOKI, K.; MURANAKA, N.; DAMBACHER, C. M.; CAPEK, P.; KUKREJA, M.; KOZLOV, I. A.; PERUCHO, M.; CIEPLAK, P.; STRONGIN, A. Y. Substrate cleavage profiling suggests a distinct function of Bacteroides fragilis metalloproteinases (fragilysin and metalloproteinase II) at the microbiome-inflammation-cancer interface. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 48, p. 34.956-34.967, Nov. 2013. DOI: 10.1074/jbc.M113.516153.
- SHOTT, S. Statistics for health professionals. London: W.B. **Saunders Company**, 1990.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 1, p. 7-30, Jan-Feb. 2016. DOI: 10.3322/caac.21332.
- SPAAN, C. N.; SMIT, W. L.; DE JEUDE, J. F. L.; MEIJER, B. J.; MUNCAN, V.; VAN DEN BRINK, G. R.; HEIJMANS, J. Expression of UPR effector proteins ATF6 and XBP1 reduce colorectal cancer cell proliferation and stemness by activating PERK signaling. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 490, p. 1-10, Jun. 2019. DOI: 10.1038/s41419-019-1729-4.
- SUN, S.; YI, Y.; XIAO, Z. J.; CHEN, H. ER stress activates TAp73 α to promote colon cancer cell apoptosis via the PERK-ATF4 pathway. **Journal of Cancer**, v. 14, n. 11, p. 1946-1955, July 2023. DOI: 10.7150/jca.84170.

SZEGEZDI, E.; LOGUE, S. E.; GORMAN, A. M.; SAMALI, A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. **EMBO Reports**, v. 7, n. 9, p. 880-885, Sep. 2006. DOI: 10.1038/sj.embor.7400779.

TAKAYAMA, T.; KATSUKI, S.; TAKAHASHI, Y.; OHI, M.; NOJIRI, S.; SAKAMAKI, S.; KATO, J.; KOGAWA, K.; MIYAKE, H.; NIITSU, Y. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. **New English Journal Medicine**, v. 339, n. 18, p. 1277-1284, Oct. 1998. DOI: 10.1056/NEJM199810293391803.

TANAKA, T.; KOHNO, H.; SUZUKI, R.; YAMADA, Y.; SUGIE, S.; MORI, H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. **Cancer Science**, v. 94, n. 11, p. 965-973, Nov. 2003. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2003.tb01386.x.

TESKE, B. F.; WEK, S. A.; BUNPO, P.; CUNDIFF, J. K.; MCCLINTICK, J. N.; ANTHONY, T. G.; WEK, R. C. The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 22, p. 4390-4405, Nov. 2011. DOI: 10.1091/mbc.E11-06-0510.

THIBAUT, G.; NG, D. T. W. The endoplasmic reticulum-associated degradation pathways of budding yeast. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 12, p. 1-16, Dec. 2012. DOI: 10.1101/cshperspect.a013193.

TOMASELLO, G.; TRALONGO, P.; DAMIANI, P.; SINAGRA, E.; DI TRAPANI, B.; ZEENNY, M. N.; HUSSEIN, I. H.; JURJUS, A.; LEONE, A. Dismicrobism in inflammatory bowel disease and colorectal cancer: Changes in response of colocytes. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 48, p. 18.121-18.130, Dec. 2014. DOI: 10.3748/wjg.v20.i48.18121.

ULLMAN, T. A.; ITZKOWITZ, S. H. Intestinal Inflammation and Cancer. **Gastroenterology**, v. 140, n. 6, p. 1807-1816, May 2011. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.01.057.

URANO, F.; WANG, X.; BERTOLOTTI, A.; ZHANG, Y.; CHUNG, P.; HARDING, H. P.; RON, D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. **Science**, v. 287, n. 5453, p. 664-666, Jan. 2000. DOI: 10.1126/science.287.5453.664.

URRA, H.; DUFEY, E.; AVRIL, T.; CHEVET, E.; HETZ, C. Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer. **Trends Cancer**, v. 2, n. 5, p. 252-262, May 2016. DOI: 10.1016/j.trecan.2016.03.007.

WALTER, P.; RON, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. **Science**, v. 25, n. 6059, p. 1081-1086, Nov. 2011. DOI: 10.1126/science.1209038.

WANG, Y.; ALAM, G. N.; NING, Y.; VISIOLI, F.; DONG, Z.; NÖR, J. E.; POLVERINI, P. J. The unfolded protein response induces the angiogenic switch in human tumor cells through the PERK/ATF4 pathway. **Cancer Research**, v. 72, n. 20, p. 5396-5406, Oct. 2012. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0474.

WORBY, C. A.; DIXON, J. E. Unpacking the unfolded protein response. **Cell**, v. 158, n. 6, p. 1221-1224, Sep. 2014. DOI: 10.1016/j.cell.2014.08.025.

YAMAMOTO, K.; SATO, T.; MATSUI, T.; SATO, M.; OKADA, T.; YOSHIDA, H.; HARADA, A.; MORI, K. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. **Developmental Cell**, v. 13, n. 3, p. 365-376, Sep. 2007. DOI: 10.1016/j.devcel.2007.07.018.

YONEDA, T.; IMAIZUMI, K.; OONO, K.; YUI, D.; GOMI, F.; KATAYAMA, T.; TOHYAMA, M. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 17, p. 13.935-13.940, Apr. 2001. DOI: 10.1074/jbc.M010677200.

ZAMER, B. A.; EL-HUNEIDI, W.; ELADL, M. A.; MUHAMMAD, J. S. Ins and Outs of Heat Shock Proteins in Colorectal Carcinoma: Its Role in Carcinogenesis and Therapeutic Perspectives. **Cells**, v. 10, n. 11, p. 1-18, Oct. 2021. DOI: 10.3390/CELLS10112862.

11 – ANEXOS

ANEXO A – Certificado de aprovação do experimento em modelo animal no CEUA/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



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**.

12 – APÊNDICES

APÊNDICE A – Avaliação da consistência e sangue fecal dos animais durante os ciclos de DSS.
Os valores são expressos em frequência absoluta.

Grupo	Consistência da fezes			Sangramento	Consistência da fezes			Sangramento	Consistência da fezes			Sangramento
	Normal	Mole	Diarreia	Sangue oculto	Normal	Mole	Diarreia	Sangue oculto	Normal	Mole	Diarreia	Sangue oculto
G1	27	1	0	0	28	0	0	0	28	0	0	0
G2	0	13	15	19	1	3	24	12	1	3	24	17
G3	0	4	24	19	1	1	26	14	0	1	27	15

APÊNDICE B – Média da massa corporal dos grupos de animais durante os 3 ciclos (DSS).

GRUPOS	CICLO 1		CICLO 2		CICLO 3	
	Média da massa corporal inicial					
Grupo 1	31,43g	32,71 g	32,64g	34,86	36,10g	36,10g
Grupo 2	33,14g	33,64g	35,71g	34,04g	36,95g	36,10g
Grupo 3	31,18g	31,86g	34,32g	32,79g	36,00g	35,71g

g = gramas.

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

	5ª Semana	10ª Semana	15ª Semana	20ª Semana
Grupo 1	0±0	0±0	0,28 ± 0,48	0,14±0,37
Grupo 2	0,85±0,69	2,29±0,75	5,14 ±1,57	12,28±2,87
Grupo 3	1±1,15	4,14±1,21	12,14 ±5,58	20,42±7,04

Os resultados são mostrados como média±DP. DP= Desvio Padrão.

APÊNDICE D – Tabelas de pesagem (gramas), numeração e marcação dos animais dos grupos G1, G2 e G3, ao longo das 20 semanas do experimento.

	Animal	Marcação nas caudas	1ª Sem (Se) (29/08/22)	2ª Sem (Se) (05/09/22)	3ª Sem (Se) (12/09/22)	4ª Sem (Se) (19/09/22)	5ª Sem (Se) (26/09/22)	6ª Sem (Se) (03/10/22)	7ª Sem (Se) (10/10/22)	8ª Sem (Se) (17/10/22)	9ª Sem (Se) (24/10/22)	10ª Sem (Se) (31/10/22)	
GRUPO 1	1	Vm● + Az●	29	31	33	34	33	34	35	33	36	36	
	2	Vm● + Vd●	28	32	34	34	35	34	35	33	36	37	
	3	Vm● + Pr●	30	29	29	31	32	32	34	34	32	36	39
	4	Az●	33	35	35	36	35	35	38	37	39	38	
	5	Vm●	33	36	37	35	35	36	37	36	39	40	
	6	Pr●	30	32	35	34	34	35	37	35	38	38	
	7	Vd●	30	33	33	32	34	35	36	36	38	37	
GRUPO 2	1	Vm● + Az●	32	36	35	35	30	36	36	33	37	38	
	2	Vm● + Vd●	35	34	35	34	30	36	36	35	37	37	
	3	Vm● + Pr●	31	35	34	34	29	34	35	32	36	37	
	4	Az●	34	34	35	35	29	36	37	36	39	41	
	5	Vm●	35	34	35	34	27	35	36	32	36	38	
	6	Pr●	35	32	37	37	30	37	37	34	38	39	
	7	Vd●	36	37	37	39	32	38	39	36	40	41	
GRUPO 3	1	Vm● + Az●	36	34	36	36	30	37	38	36	40	40	
	2	Vm● + Vd●	32	31	33	34	27	35	36	35	38	38	
	3	Vm● + Pr●	37	37	37	37	32	36	39	35	39	39	
	4	Az●	26	27	29	29	23	30	32	29	34	34	
	5	Vm●	29	30	32	32	27	34	36	34	36	37	
	6	Pr●	32	34	33	34	30	36	37	36	38	39	
	7	Vd●	28	31	32	32	24	32	33	30	34	35	

	Animal	Marcação nas caudas	11ª Sem (Se) (07/11/22)	12ª Sem (Se) (14/11/22)	13ª Sem (Se) (21/11/22)	14ª Sem (Se) (28/11/22)	15ª Sem (Se) (05/12/22)	16ª Sem (Se) (12/12/22)	17ª Sem (Se) (19/12/22)	18ª Sem (Se) (26/12/22)	19ª Sem (Se) (02/01/22)	20ª Sem (Se) (09/01/22)
GRUPO 1	1	Vm● + Az●	36	38	37	37	38	39	39	39	39	38
	2	Vm● + Vd●	36	38	36	39	38	39	39	40	40	41
	3	Vm● + Pr●	37	39	38	39	39	41	40	43	40	41
	4	Az●	37	39	39	38	38	39	38	39	39	39
	5	Vm●	39	41	42	42	43	44	44	43	44	45
	6	Pr●	39	39	41	42	44	44	42	43	42	41
	7	Vd●	38	39	40	39	39	42	41	41	42	42
GRUPO 2	1	Vm● + Az●	37	39	39	38	38	39	38	39	40	39
	2	Vm● + Vd●	37	39	39	39	38	41	40	40	41	41
	3	Vm● + Pr●	36	37	37	37	36	38	38	39	38	39
	4	Az●	42	43	43	43	44	45	45	44	46	37
	5	Vm●	35	37	37	37	37	38	38	39	39	40
	6	Pr●	38	39	39	38	39	40	40	41	41	41
	7	Vd●	41	42	42	43	41	43	42	43	43	41
GRUPO 3	1	Vm● + Az●	40	41	41	40	41	41	41	42	43	42
	2	Vm● + Vd●	37	39	39	39	39	40	39	42	41	42
	3	Vm● + Pr●	38	40	39	40	42	42	41	42	42	42
	4	Az●	34	35	34	35	35	37	34	37	36	32
	5	Vm●	38	40	40	40	41	41	39	42	41	42
	6	Pr●	39	41	39	40	41	41	41	41	43	44
	7	Vd●	35	37	36	37	37	37	33	37	38	38

APÊNDICE E – Tabela com o número de pólipos encontrados em cada animal ao longo do experimento

		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
5ª Semana	Animal 1	0	1	2
	Animal 2	0	1	0
	Animal 3	0	2	1
	Animal 4	0	0	0
	Animal 5	0	0	1
	Animal 6	0	1	1
	Animal 7	0	1	0
10ª Semana	Animal 1	0	3	5
	Animal 2	0	3	6
	Animal 3	0	1	3
	Animal 4	0	3	4
	Animal 5	0	2	3
	Animal 6	0	2	5
	Animal 7	0	2	3
15ª Semana	Animal 1	0	5	6
	Animal 2	0	8	14
	Animal 3	0	5	23
	Animal 4	0	6	13
	Animal 5	0	5	12
	Animal 6	1	3	9
	Animal 7	1	4	8
20ª Semana	Animal 1	0	12	25
	Animal 2	0	18	14
	Animal 3	0	12	15
	Animal 4	1	13	27
	Animal 5	0	10	12
	Animal 6	0	9	20
	Animal 7	0	12	30

APÊNDICE F – Tabela com os achados histopatológica dos grupos de animais.

		Lesões pré – neoplásicas/câncer			Sinais Inflamatórios		Lesões pré – neoplásicas/câncer			Sinais Inflamatórios		
		Criptas aberrantes	Displasia de baixo grau	Displasia de alto grau	Tecido linfóide reacional	Discreto grau de inflamação		Criptas aberrantes	Displasia de baixo grau	Displasia de alto grau	Tecido linfóide reacional	Discreto grau de inflamação
G1	5S n=7	0	0	0	0	0	5S n=7	0	0	0	0	0
	10S n=7	0	0	0	0	0	10S n=7	0	0	0	0	0
	15S n=7	0	0	0	0	0	15S n=7	0	0	0	0	0
	20S n=7	0	0	0	0	0	20S n=7	0	0	0	0	0
G2	5S n=7	1	1	0	7	5	5S n=7	14	14	0	100	71
	10S n=7	7	7	0	7	7	10S n=7	100	100	0	100	100
	15S n=7	5	4	0	7	7	15S n=7	71	57	0	100	100
	20S n=7	7	6	2	7	7	20S n=7	100	86	29	100	100
G3	5S n=7	2	2		7	6	5S n=7	29	29	0	100	86
	10S n=7	6	7		7	6	10S n=7	86	100	0	100	86
	15S n=7	7	7		7	7	15S n=7	100	100	0	100	100
	20S n=7	7	7		6	6	20S n=7	100	100	0	86	86

APÊNDICE G – Tabela com o registro das coletas de fezes para pesquisa de sangue oculto nos grupos que receberam DSS (G2 e G3).

G	Animal	1ª Coleta 29/09	2ª Coleta 14/10	3ª Coleta 20/10	4ª Coleta 27/10	5ª Coleta 10/11	6ª Coleta 17/11	7ª Coleta 27/11	8ª Coleta 08/12	9ª Coleta 18/12	10ª Coleta 20/12
GRUPO 2	1 Vm● + Az●	P	P	P	P	P	P	P	P	N	P
	2 Vm● + Vd●	P	P	P	N	N	P	P	P	N	P
	3 Vm● + Pr●	P	P	P	P	P	N	P	P	P	P
	4 Az●	P	P	N	P	P	P	P	P	N	P
	5 Vm●	P	N	N	P	P	P	P	N	P	P
	6 Pr●	P	N	N	N	P	P	P	P	P	P
	7 Vd●	P	N	P	P	P	N	P	P	N	P
GRUPO 3	1 Vm● + Az●	P	P	N	N	N	P	P	P	N	P
	2 Vm● + Vd●	P	P	P	P	N	N	P	N	P	P
	3 Vm● + Pr●	P	P	N	N	P	P	P	P	P	P
	4 Az●	P	P	P	P	P	N	P	N	N	P
	5 Vm●	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	6 Pr●	P	N	P	P	P	P	P	N	P	P
	7 Vd●	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P

APÊNDICE H – Artigo aceito pela revista e em fase final de adequações para prosseguir para a publicação.



**Journal of Pre-Clinical
and Clinical Research**

18/2024 vol. 1

“ Get citation

© CC BY-NC 3.0 Poland

Stats

REVIEW PAPER



Colorectal cancer and endoplasmic reticulum stress – potential targets for therapeutic compounds

César Augusto Sobrinho ¹ , Alexandre Moreira Almeida ¹ , Michele Selzler ¹ , Almir Sousa Martins ^{1,2}  ,
Rondon Tosta Ramalho ¹ , Durval Batista Palhares ¹ 

▼ [More details](#)

J Pre Clin Clin Res. 2024;1(18):54-66

> DOI: <https://doi.org/10.26444/jpccr/186030>

 **Article (PDF)**

[References \(113\)](#)

KEYWORDS

[colorectal cancer](#) • [endoplasmic reticulum stress](#) • [unfolded protein response](#) • [CRC signaling pathways](#)