

EVA GLÓRIA ABRÃO SIUFI DO AMARAL

**EXPRESSÃO DE SUPERÓXIDO DISMUTASE EM FOCOS
DE CRIPTAS ABERRANTES INDUZIDAS PELO
AZOXIMETANO EM RATOS WISTAR E INIBIÇÃO PELO
INOSITOL HEXAFOSFATO**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para a obtenção do título de Mestre em Ciência.

SÃO PAULO

2006

EVA GLÓRIA ABRÃO SIUFI DO AMARAL

**EXPRESSÃO DE SUPERÓXIDO DISMUTASE EM FOCOS
DE CRIPTAS ABERRANTES INDUZIDAS PELO
AZOXIMETANO EM RATOS WISTAR E INIBIÇÃO PELO
INOSITOL HEXAFOSFATO**

Tese apresentada à Universidade Federal de São
Paulo – Escola Paulista de Medicina para a
obtenção do título de Mestre em Ciência.

ORIENTADOR: PROF. DR. DJALMA JOSÉ FAGUNDES

SÃO PAULO

2006

Amaral, Eva Gloria Siufi

Expressão de superóxido dismutase em focos de criptas aberrantes induzidas pelo azoximetano em ratos Wistar e inibição pelo inositol hexafosfato/

Eva Glória Abrão Siufi do Amaral – São Paulo, 2006

Xiii, 39f

Tese de (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação.

Superoxide dismutase expression in azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci of Wistar rats and inhibition by inositol hexaphosphate.

1. Inositol Hexafosfato 2. Superóxido dismutase 3. Azoximetano 4. Ratos 5. Cólon 6. Carcinogênese



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

UNIFESP-EPM

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA E EXPERIMENTAÇÃO**

COORDENADOR: Prof. Dr. José Luiz Martins

TESE DE MESTRADO

AUTOR: Eva Glória Abrão Siufi do Amaral

ORIENTADOR: Prof. Dr. Djalma José Fagundes

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Celso Massaschi Inouye

TÍTULO: Expressão de superóxido dismutase em focos de criptas aberrantes induzidas pelo azoximetano em ratos Wistar e inibição pelo inositol hexafosfato.

BANCA EXAMINADORA:

1- Presidente: Prof. Dr. Djalma José Fagundes

Professor Adjunto da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UNIFESP-EPM.

MEMBROS EFETIVOS:

2 – Prof. Dr. João Ricardo Filgueiras Tognini

Professor Titular do Departamento de Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - UFMS

3 – Prof. Dr. Ismael Dale Cotrin Guereiro da Silva

Professor Livre Docente e Assistente da Disciplina de Ginecologia UNIFESP-EPM.

4 – Profa. Dra. Adriane Cristina Bovo.

Professora da Faculdade de Medicina da Universidade para o Desenvolvimento do Pantanal – UNIDERP – MS.

MEMBRO SUPLENTE

1- Prof. Dr. Murched Omar Taha

Professor Afiliado da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UNIFESP-EPM

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **JOÃO** (*in memorian*) e
ASCINA pela formação moral, ética e
profissional.

Ao meu esposo **JOÃO PAULO**, principal
apoio para a realização deste trabalho, por
sua ajuda, carinho e amor sempre presentes.

Aos meus filhos **JOÃO PAULO E**
MARIA LAURA pelo carinho e
compreensão

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. **Djalma José Fagundes**, Professor Adjunto IV da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP-EPM, antigo Coordenador do Programa de Pós – Graduação em Cirurgia e Experimentação da UNIFESP-EPM, orientador deste trabalho pela demonstração de competência e apoio para a realização desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina-UNIFESP-EPM**, por ter me recebido como aluna do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação, possibilitando minha titulação.

À **Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS**, por ter criado condições para seus Professores terem acesso ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação da UNIFESP - EPM.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior - CAPES**, pelo apoio financeiro concedido pela bolsa de mestrado.

Ao Prof. Dr. **Celso Massaschi Inouye**, Professor Titular da Disciplina de Ortopedia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; pelo apoio e incentivo do ensino de Pós-Graduação no Estado de Mato Grosso do Sul

Ao Prof. Dr. **Adalberto Abrão Siufi**, Professor Titular da Disciplina de Oncologia Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo incentivo e ensinamentos.

Ao mestre **Guido Marks**, Professor Auxiliar da Disciplina de Oncologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo apoio e colaboração para a execução deste trabalho.

Ao mestre **Luiz Carlos Takita**, Professor Assistente da Disciplina de Patologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela ajuda na realização da análise imunoistoquímica.

Ao médico patologista **Gustavo Falcão**, pela ajuda na realização da análise imunoistoquímica.

À Srta **Carolina Vieira**, Tecnóloga em processamento de dados, pela paciência e ajuda na digitação da tese.

À Profa. Dra **Elenir Rose Jardim Cury Pontes**, Professora Adjunto do Departamento de Tecnologia em Alimentos e Saúde Pública da Universidade Federal de Mato Grosso do SUL, pelo tratamento estatístico dos dados desta pesquisa.

Aos **Profs. Drs. Olavo de Oliveira Rodrigues, Manoel de Jesus Simões, Edna Frasson de Souza Monteiro, Murched Omar Taha e Mirian Ghiraldini**, pelos ensinamentos e colaboração na formação do pensamento científico durante o programa de pós-graduação.

À **Sra. Rosely de Fátima Pellizzon**, Bibliotecária responsável pela BIREME da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, pelos ensinamentos e colaboração na pesquisa bibliográfica nas principais bases de dados biomédicas.

Às secretárias da UNIFESP-EPM, **Elaine Maria Alves Bazzi Dantas e Valdelice Justiniao Soares**, pela colaboração durante a confecção do presente trabalho e ajuda inestimável nos trâmites burocráticos da pós-graduação.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação que colaboraram com idéias e críticas ao trabalho e incentivaram o seu prosseguimento.

Aos todos os funcionários da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, que em diferentes etapas colaboraram para a execução deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da distribuição dos animais nos diversos grupos de estudo...	07
Figura 2 - Esquema de aplicação das drogas aos animais ao longo das seis semanas de observação.	08
Figura 3 - Foto da peça operatória mostrando: 1) íleo terminal e o ceco direito; 2) segmento de cólon direito e a secção do ceco a partir da válvula íleo cecal e aberto pela borda anti-mesentérica.	09
Figura 5 – Foto de uma imagem capturada para exemplificar a quantificação da área com a expressão SOD1 (área azul).	12
Figura 6 - Identificação de um foco de cripta aberrante segundo o critério de alargamento do eixo maior da abertura do óstio do lúmen (seta). Imunoistoquímica. 400X.	13
Figura 7 - Identificação de um foco de cripta aberrante segundo o critério de espessamento do epitélio (setas). Imunoistoquímica. 400X.	14
Figura 8 - Identificação de um foco de cripta aberrante segundo o critério de extensão do eixo maior da cripta em relação às adjacentes (seta). Imunoistoquímica. 400X.	15
Figura 9 – Fotomicrografia característica de um animal do grupo I (controle) mostrando um foco de cripta aberrante (FCA) com a corresponde expressão de SOD-1 em coloração marrom decorrente do revelador DAB utilizado na imunoistoquímica.(400X).	20
Figura 10 – Fotomicrografia característica de um animal do grupo I (controle) mostrando um foco de cripta aberrante (FCA) com a corresponde expressão de SOD-1 em coloração azul decorrente do processamento de imagem assistida por computador. (400X).	20

Figura 11 – Fotomicrografia característica de um animal do grupo II (AOM) mostrando um foco de cripta aberrante (FCA) com a corresponde expressão de SOD-1 em coloração marrom decorrente do revelador DAB utilizado na imunistoquímica.(400X).	21
Figura 14 – Fotomicrografia característica de um animal do grupo III (IP6) mostrando um foco de cripta aberrante (FCA) com a corresponde expressão de SOD-1 em coloração azul decorrente do processamento de imagem assistida por computador. (400X).	22
Figura 15 – Fotomicrografia característica de um animal do grupo IV (IP6/AOM) mostrando um foco de cripta aberrante (FCA) com a corresponde expressão de SOD-1 em coloração marrom decorrente do revelador DAB utilizado na imunistoquímica.(400X).	23
Figura 16 – Fotomicrografia característica de um animal do grupo IV (IP6/AOM) mostrando um foco de cripta aberrante (FCA) com a corresponde expressão de SOD-1 em coloração azul decorrente do processamento de imagem assistida por computador. (400X).	23

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Distribuição do peso (em gramas) inicial, média da variação ponderal e desvio padrão dos animais no Grupo I (controle), Grupo II (AOM), Grupo III (IP6) e Grupo IV (IP6/AOM). 16
- Tabela 2** - Distribuição dos valores individuais da porcentagem da expressão de SOD em FCA, quantificada por meio de processamento de imagem assistida por computador, nos diversos animais do Grupo I (controle), Grupo II (AOM), Grupo III (IP6) e Grupo IV (IP6/AOM), com respectivas médias, desvio-padrão e coeficiente de variância. 17
- Tabela 3** - Distribuição da média e desvio-padrão da porcentagem de expressão de SOD em FCA, quantificada por meio de processamento de imagem assistida por computador, nos diversos animais do Grupo I (controle), Grupo II (AOM), Grupo III (IP6) e Grupo IV (IP6/AOM). 18

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Distribuição do peso (em gramas) inicial, média da variação ponderal nos animais do Grupo I (controle), Grupo II (AOM), Grupo III (IP6) e Grupo IV (IP6/AOM). 16
- Gráfico 2** – Distribuição dos valores médios e do desvio-padrão da porcentagem da expressão de SOD, quantificada por meio de processamento de imagem assistida por computador, comparando os Grupos entre si, dois à dois, de acordo com a significância estatística encontrada e mostrada na Tabela 2. 18
- Gráfico 3** - Distribuição da média e desvio-padrão da porcentagem de expressão de SOD em FCA, quantificada por meio de processamento de imagem assistida por computador, nos diversos animais do Grupo I (controle), Grupo II (AOM), Grupo III (IP6) e Grupo IV (IP6/AOM). 19

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AOM	Azoximetano
ATP	Adenosina trifosfato
CuZnSOD	Cobre, zinco, superóxido dismutase
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FCA	Foco de cripta aberrante
GSH	Glutationa
HD	Do inglês <i>Hard Disc</i> , disco rígido
IP6	Inositol hexafosfato
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
ml	Mililitro
MnSOD	Manganês superóxido dismutase
RGB	Do inglês <i>Red, Green, Blue</i> , vermelho, azul, verde.
S.F.	Soro fisiológico
SOD	Superóxido Dismutase
SOD1	Superóxido Dismutase-1
UFMS	Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

RESUMO

Objetivo: desenvolver um modelo experimental de carcinogênese em colo de rato induzido pelo azoximetano e estabelecer um padrão de ação protetora do hexafosfato de inositol, pela expressão da enzima superóxido dismutase em foco de cripta aberrante. **Métodos:** 48 ratos Wistar, adultos, machos, foram mantidos em observação por seis semanas. GI (n=12) recebeu injeções de solução salina subcutânea durante a terceira e quarta semanas, enquanto que o GII (n=12), no mesmo período, recebeu azoximetano (AOM) na dose 20mg.Kg^{-1} subcutânea. O GIII (n=12) recebeu inositol hexafosfato 1% (IP6) na água de beber durante as seis semanas, enquanto que o GIV, além do IP6 na água de beber, recebeu também as injeções subcutâneas de AOM durante a terceira e quarta semanas. Ao término da sexta semana os animais sofreram a eutanásia e foram coletados segmentos de intestino grosso à cerca de um centímetro da transição íleo-cólica. Fragmentos foram preparados e submetidos à coloração imunoistoquímica para de anticorpo primário anti-SOD1 (superóxido dismutase1) e anticorpo secundário anti-rato, revelador de cor DAB (diamino-benzidina) com obtenção de expressão SOD1 na coloração marrom. A porcentagem da expressão de SOD em FCA (foco de cripta aberrante) foi quantificada por meio de processamento de imagem assistida por computador (ImageLab). Os resultados foram submetidos aos testes de análise de variância (ANOVA) e estabelecido o nível de 5% ($p \leq 0,05$) para rejeição da hipótese de nulidade. **Resultados:** a porcentagem média da expressão da SOD no GI ($16,0 \pm 3,7$) foi semelhante ao GIII ($16,9 \pm 3,1$) mostrando que a solução salina (controle) e o IP6 não provocaram alterações em FCA; o grupo II ($26,7 \pm 3,5$) mostrou uma significativa porcentagem de expressão da SOD em FCA, demonstrando sua capacidade de provocar lesões pré-malignas em cólon de roedores; por outro lado este estímulo de indução carcinogênica foi protegido pela administração de IP6 representada pelos resultados do GIV ($20,9 \pm 3,3$). **Conclusões:** O estímulo carcinogênico do AOM proporcionou um modelo de carcinogênese em colo de rato Wistar que foi protegido pela administração do IP6, sendo que a expressão da SOD em FCA mostrou-se um parâmetro imunoistoquímico confiável para representar as lesões pré-neoplásicas em FCA.

ABSTRACT

Objective: to develop an experimental model of carcinogenesis in Wistar rats induced by the azoximethane and to establish a pattern of protecting action of the inositol hexafosphate, for the expression of the enzyme superoxide dismutase in foci of aberrant crypts. **Methods:** 48 Wistar male rats, adults, were maintained in observation by six weeks. GI (n=12) received injections of subcutaneous saline solution during the third and fourth weeks, while GII (n=12), in the same period, received 20mg.Kg⁻¹ of subcutaneous azoximetano (AOM). GIII (n=12) received inositol hexafosfato 1% (IP6) in the drinking water during the six weeks, while GIV, besides IP6 in the drinking water, also received the subcutaneous injections of AOM during the third and fourth weeks. At the end of the sixth week large intestine segments were collected to the about a centimeter of the ileo-colic transition. Fragments were prepared and submitted to the imunohistochemical process to antibody primary anti-SOD1 (superoxide dismutase1) and antibody secondary anti-rat, color discloser DAB (diamino-benzidina) with expression obtaining SOD1 in the brown coloration. The percentage of the expression of SOD in FCA (focus of aberrant crypt) was quantified through image processing attended by computer (ImageLab). The results were submitted to the tests of variance analysis (ANOVA) and established the level of 5% ($p \leq 0.05$) for rejection of the nullity hypothesis. **Results:** the medium percentage of the expression of SOD in GI (16.0 ± 3.7) was similar to GIII (16.9 ± 3.1) showing that the saline solution (controls) and IP6 didn't provoke alterations in FCA; the group II (26.7 ± 3.5) showed a significant percentage of expression of SOD in FCA, demonstrating the capacity to provoke preneoplastic lesions in colon of rodents; on the other hand this promotion of carcinogenic induction was protected by the administration of IP6 showed by the results of GIV (20.9 ± 3.3). **Conclusions:** The carcinogenic action of AOM provided a carcinogênese model in colon of Wistar rat that was protected by the administration of IP6, and the expression of SOD in FCA was a histochemical parameter reliable to represent the preneoplastic lesions in FCA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	05
3. MÉTODOS.....	06
4. RESULTADOS.....	18
5. DISCUSSÃO.....	26
6. CONCLUSÕES.....	31
7. REFERÊNCIAS.....	32
8. NORMAS ADOTADAS.....	36
APÊNDICE.....	37

1. INTRODUÇÃO

A prevalência e a incidência do câncer de colo são variáveis entre as diferentes populações humanas. Evidências epidemiológicas indicam que estas diferenças são influenciadas fortemente pela área geográfica, cultura e hábitos alimentares ^{1,2}.

A ocorrência de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas no cólon e reto estão associadas com a biotransformação, bem como a ativação ou detoxicação de produtos químicos exógenos ingeridos na dieta ³.

O entendimento das lesões pré-neoplásicas ou pré-cancerosas do cólon e reto é fundamental para o esclarecimento dos mecanismos da carcinogênese colorretal e a prevenção da ocorrência do câncer colorretal, a maior causa de doença e morte em muitos países ³.

Focos de criptas aberrantes (FCA), inicialmente identificadas na mucosa colorretal de roedores expostos à ação de substâncias carcinogênicas ^{4,5} foram também reconhecidos e identificados em humanos ⁶ e desde então considerados como um marcador biológico confiável de lesões pré-cancerosas ou pré-neoplásicas do intestino grosso ³.

FCA são conceituados como criptas simples ou múltiplas que têm a abertura luminal alterada, epitélio mais espesso e são maiores que as criptas adjacentes ^{7,8}. Os FCA aumentam com os indutores carcinogênicos em mucosa colônica de hamsters e camundongos, mas são praticamente evidenciados no cólon de todos os animais expostos à carcinógenos específicos ⁶⁻¹⁰. O rato da linhagem Fisher 344 é o que mais frequentemente citado na literatura como modelo animal na indução de FCA, pois nestes animais a ocorrência espontânea de FCA é praticamente nula e são mais susceptíveis à indução de carcinogênese colônica por drogas ^{11,12}.

Dentre as drogas associadas à indução de FCA o azoximetano (AOM) é a que mais largamente tem sido referida na literatura pertinente. Tem-se atribuído ao aumento da expressão do gene c-fos e a diminuição do gene c-myc, assim como a mutação do gene K-ras a responsabilidade pelo mecanismo de indução de lesões pré-neoplásicas do AOM ¹³⁻¹⁶. Além disso, há uma relação estabelecida entre o estresse oxidativo e a lesão de estruturas celulares na gênese das neoplasias ¹⁷.

Evidências que apóiam o envolvimento de radicais livres em promoção de tumor incluem: (a) várias combinações geradoras de radicais livres estão associadas aos promotores de tumor em vários modelos de sistemas em animais; (b) sistemas geradores espécies reativas de oxigênio (EROs) podem imitar a ação bioquímica de promotores de tumor, (c) alguns promotores de tumor estimulam a produção de EROs, (d) os promotores de tumor modulam os sistemas de defesa de antioxidantes celulares, e (e) remoção de radicais livres, detoxificadores e antioxidantes inibem o processo de promoção de tumor. O papel de EROs na progressão organizada da carcinogênese é evidente pelo fato que vários radicais livres em diferentes combinações geradoras aumentam a conversão maligna de papiloma benigno para carcinoma e a sua efetividade pode ser relacionada ao tipo de radicais produzido no sistema biológico¹⁷.

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima responsável pela eliminação de radicais superóxido e é considerada enzima antioxidante chave em células aeróbicas. Consumo celular de oxigênio é essencial para fosforilação durante a geração ATP na mitocôndria, já este metabolismo celular leva a produção de espécies reativas oxigênio, incluindo o radical superóxido (O_2^-) e hidrogênio peroxidase (H_2O_2). O acúmulo de Eros resulta em estresse oxidativo, e se não corrigido, pode levar dano biomolecular da membrana lipídica, proteínas citoplasmáticas e do DNA nuclear. Uma vez que a SOD é enzima chave no primeiro degrau da eliminação de superóxido, deficiência de SOD ou inibição da atividade enzimática pode causar acúmulo de radicais livres de oxigênio e levar à morte celular. Então a inibição da SOD pode ser uma nova forma de morte de células cancerosas. Há hipótese de que inibição da SOD pode preferencialmente destruir células malignas através de mecanismo mediado por radicais livres¹⁸.

Está demonstrado tanto *in vivo* quanto *in vitro* que os níveis de enzimas antioxidantes estão alteradas no câncer. O achado mais consistente em estudos bioquímicos têm sido a óxidodismutase-manganês (MnSOD), uma enzima antioxidante mitocondrial, que está diminuída em muitos tipos de cânceres primários e linhagens de células de câncer examinados¹⁸. Entretanto, em outros tumores a SOD encontra-se elevada e o entendimento de sua regulação no câncer é explicado pelo polimorfismo na seqüência do gene MnSOD

As características biológicas, patológicas e bioquímicas do mecanismo de carcinogênese induzida ainda precisam ser melhor esclarecidas^{13-15, 19}.

A análise do FCA na superfície da mucosa intestinal é simples e permite um conveniente estudo *in vivo* da influência de agentes quimioprotetores e de outros parâmetros como a inibição da proliferação celular e apoptose celular. Dentre estes protetores inclui-se uma série de agentes naturais como os ácidos polifenólicos, flavonóides, carotenóides e compostos organo sulfurados, assim como produtos químicos sintéticos como os inibidores da ciclooxigenase2 (COX2), inibidores da enzima óxido nítrico sintetase^{3,20,21}.

Há uma relação inversa entre o consumo de dietas ricas em fibras derivadas de grãos de cereais e o risco do câncer de cólon. Modelos em animais demonstraram que o efeito protetor no desenvolvimento do câncer de cólon depende da fonte e da natureza da fibra. Fibras do trigo inibem a carcinogênese colônica mais eficazmente que as fibras do milho e da aveia²².

A propriedade das fibras de serem moduladoras da gênese tumoral está associada à quantidade de ácido fítico ou hexafosfato de inositol (IP6). O ácido fítico é um constituinte de ocorrência natural nas plantas, sendo encontrado em sua grande maioria nas leguminosas e cereais, em especial no trigo e soja²³.

O IP6 é um carboidrato polifosforilado presente em considerável quantidade em quase todas as plantas e células dos mamíferos. Recentemente foi reconhecido como sendo possuidor de múltiplas funções biológicas²⁴.

Sua natural capacidade de anticancerígena foi demonstrada em diferentes modelos experimentais. Acrescida à capacidade de reduzir a proliferação celular, o IP6 aumenta a diferenciação das células malignas, freqüentemente resultando em reversão ao fenótipo normal. Administrada por via exógena é rapidamente defosforilado em fostatos inusitados de cadeia mais baixa as quais interferem no sinal das vias transdutoras do ciclo de reprodução celular. Estimula as propriedades imunológicas e antioxidantes contribuindo para a destruição das células tumorais. Por ser abundante na dieta regular, ser eficientemente absorvido pelo trato gastrintestinal e seguro, o IP6 tem grandes perspectivas na elaboração de estratégias para a prevenção e tratamento do câncer²⁴.

O IP6 tem sido referido como tendo significantes efeitos inibitórios contra uma variedade de tumores primários incluindo o de mama e de cólon²⁵. Uma revisão na base de dados Medline entre 1996 e 2002 revelou que, em modelos experimentais, o IP6 tem propriedades anticancerígenas na mama, no cólon, no fígado, na próstata, na pele, em leucemia e sarcomas²³. Estas evidências em animal de experimentação dão suporte à extensão da pesquisa em seres humanos nas fases clínicas I e II²³⁻²⁵.

Contudo muitos pontos ainda não esclarecidos do mecanismo de ação do IP6 podem e devem continuar a serem testados em animal de experimentação. Existem na literatura numerosas referências à diferentes tipos de modelos de experimentação animal testando as propriedades do inositol hexafosfato (IP6).

É fundamental para testar-se os efeitos do IP6 a existência de um modelo de carcinogênese *in vivo* que seja simples, confiável, exequível e em situações que exijam pouco recursos tecnológicos. Um modelo de avaliação para estudo de câncer de cólon usando biomarcadores como os FCA podem preencher estes requisitos.

O Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação dentro de uma linha de pesquisa inicial em modelo animal de carcinogênese intestinal, em que tem a intenção de estudar o efeito de drogas indutoras e protetoras de lesões précancerosas, propõe-se a elaborar um modelo animal de carcinogênese que possa ser reproduzível e exequível em nosso meio. Assim, a proposta desta pesquisa é utilizar o rato Wistar (*Rattus norvegicus albino*) que submetido à ação do azoximetano possa produzir lesões colônicas típicas como os FCA. Além disto, a proposta é também verificar a possibilidade de se utilizar a SOD como marcador de estresse oxidativo nestes FCA e estabelecer sua relação com eventuais drogas protetoras tendo como padrão de comparação o IP6.

2. OBJETIVOS

Geral: estudar a carcinogênese intestinal induzida por agentes oxidantes.

Específico: desenvolver um modelo experimental de carcinogênese em colo de rato induzido pelo azoximetano e estabelecer um padrão de ação protetora do hexafosfato de inositol, pela expressão da enzima superóxido dismutase em foco de cripta aberrante.

3. MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética Médica do Hospital São Paulo – UNIFESP-EPM, sob o nº 28/05 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, protocolado sob o nº 61/04.

Amostra

Foram utilizados 48 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com oito semanas de idade, peso médio de (156 ± 26) gramas, originários do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS – Campus de Campo Grande).

Os animais foram alojados no Laboratório de Carcinogênese Experimental, Biotério da UFMS em caixas de polipropileno com tampa de arame galvanizado, tamanho padrão para cinco animais, ficando quatro animais em cada gaiola. A distribuição de animais nas gaiolas foi por sorteio e as gaiolas foram distribuídas aleatoriamente na estante. Observou-se período de sete dias para a adaptação dos animais ao ambiente. Exposição sob luz artificial (130 a 325 lux) e com ciclos claro/escuro de doze horas. Temperatura média de $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$; umidade média entre $(52 \pm 8)\%$. Alimentação com ração própria para a espécie (Nuvilab[®], CR 01) oferecida à vontade; água filtrada oferecida à vontade.

Os animais foram distribuídos em quatro grupos por sorteio e ficaram em observação por seis semanas. A identificação dos animais foi realizada por meio de tatuagem na cauda, utilizando-se caneta de tinta indelével permanente, cor preta, identificando-se os grupos de 1 a 4 e com a numeração alfabética crescente de A até M em cada grupo.

Grupo I (controle): os animais (n=12) receberam a administração semanal de solução salina de cloreto de sódio a 0,9%, via subcutânea, em volume equivalente 10ml.Kg^{-1} iniciando-se na terceira semana e por um período de duas semanas.

Grupo II (AOM): os animais (n=12) receberam a administração semanal de azoximetano (AOM), via subcutânea, em volume equivalente a 10ml.Kg^{-1} iniciando-se na terceira semana e por um período de 2 semanas.

Grupo III (IP6): os animais (n=12) receberam a administração de hexafosfato de

inositol (IP6), iniciando-se na primeira semana por um período de seis semanas. Administração semanal solução salina de cloreto de sódio a 0,9% via subcutânea, iniciando-se na terceira semana e por um período de duas semanas, em volume equivalente a 10ml.Kg^{-1} .

Grupo IV (AOM + IP6): os animais ($n=12$) receberam a administração de hexafosfato de inositol (IP6) iniciando-se na primeira semana por um período de seis semanas. Administração semanal de azoximetano, iniciando-se na terceira semana e por um período de duas semanas, em volume equivalente a 10ml.Kg^{-1} .

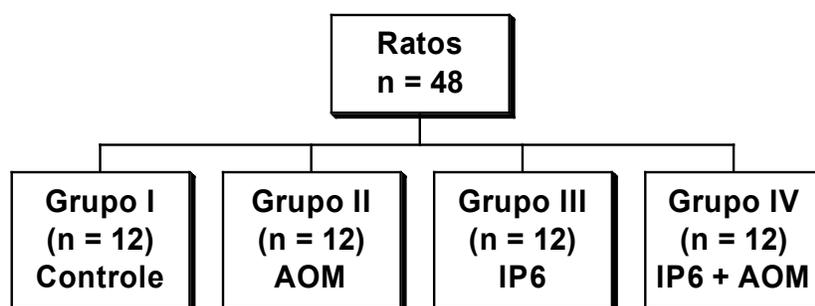


Figura 1 - Fluxograma da distribuição dos animais nos diversos grupos de estudo.

Procedimentos

Administração de drogas (Figura 2)

- 1- Hexafosfato de inositol - o IP6 (Sigma®, P3168) foi administrado em água de beber com solução a 1% e oferecido à vontade aos animais dos grupos III(IP6) e IV(AOM + IP6), durante as seis semanas de observação.
- 2- Azoximetano – o AOM (Sigma®, lote 70K0847) foi administrado na dose de 20mg.Kg^{-1} (tendo-se: 100mg de AOM/ $0,1\text{ml}$ + $49,9\text{ml}$ de solução salina de cloreto de sódio a 0,9%; resultando em 2mg AOM/ml), via subcutânea, nos animais dos grupos II(AOM) e IV(AOM + IP6), iniciando-se na terceira semana e por um período de duas semanas.

- 3- Solução salina de cloreto de sódio a 0,9% - aos animais dos grupos I(controle) e III(IP6) foi administrada solução salina de cloreto de sódio a 0,9% em volume de 10ml.Kg⁻¹, via subcutânea; corresponde ao volume de diluição do AOM nos animais dos grupos II(AOM) e IV(AOM+IP6), iniciando-se na terceira por um período de duas semanas.

		Semanas					
		01	02	03	04	05	06
Administração de substancias	Grupo I			S.F.0,9%	S.F.0,9%		
	Grupo II			AOM	AOM		
	Grupo III	IP6	IP6	IP6	IP6	IP6	IP6
	Grupo IV	IP6	IP6	IP6+AOM	IP6+AOM	IP6	IP6

Figura 2 - Esquema de aplicação das drogas aos animais ao longo das seis semanas de observação.

Período de observação

Os animais dos quatro grupos foram avaliados diariamente pelo tratador e pelo pesquisador. Foram pesados semanalmente e avaliados quanto à capacidade de movimentação espontânea e estimulada na gaiola, aceitação e consumo da dieta e água, aspectos da pelagem, características das fezes e sinais de sofrimento (imobilização, frequência respiratória e presença de secreção ocular).

Eutanásia

Ao final do período de seis semanas, os animais devidamente identificados foram pesados e submetidos a administração de tiopental sódico na dose de 150mg.Kg^{-1} , via intraperitoneal, cuja dose letal causou o óbito de modo rápido e indolor por ação nervosa central com parada cardio-respiratória.

Coleta de material

O rato foi imediatamente posicionado em decúbito dorsal, procedeu-se a incisão longitudinal mediana na pele, estendendo-se do processo xifóide até o púbis; diérese dos planos da parede abdominal; identificação região ileocecal; enterotomia completa em nível do íleo terminal; à cerca de cinco centímetros da transição ileocecal, colectomia direita após secção de toda extensão do meso-cólon direito e retirada da peça operatória.

Preparo da peça operatória para fixação

Abertura do cólon pela borda anti-mesentérica; lavagem da mucosa com solução de Ringer; ressecção de um segmento de cólon direito com extensão de 1cm de comprimento, distal à transição ileocecal (Figura 2); afixação do retalho de cólon pelas suas extremidades entre duas placas de molde plástico duplo e rígido para manter o segmento intestinal retificado em um plano uniforme; colocação da peça em frasco contendo formol tamponado a 10% em volume suficiente para cobri-la completamente, permanecendo assim durante 24 horas.

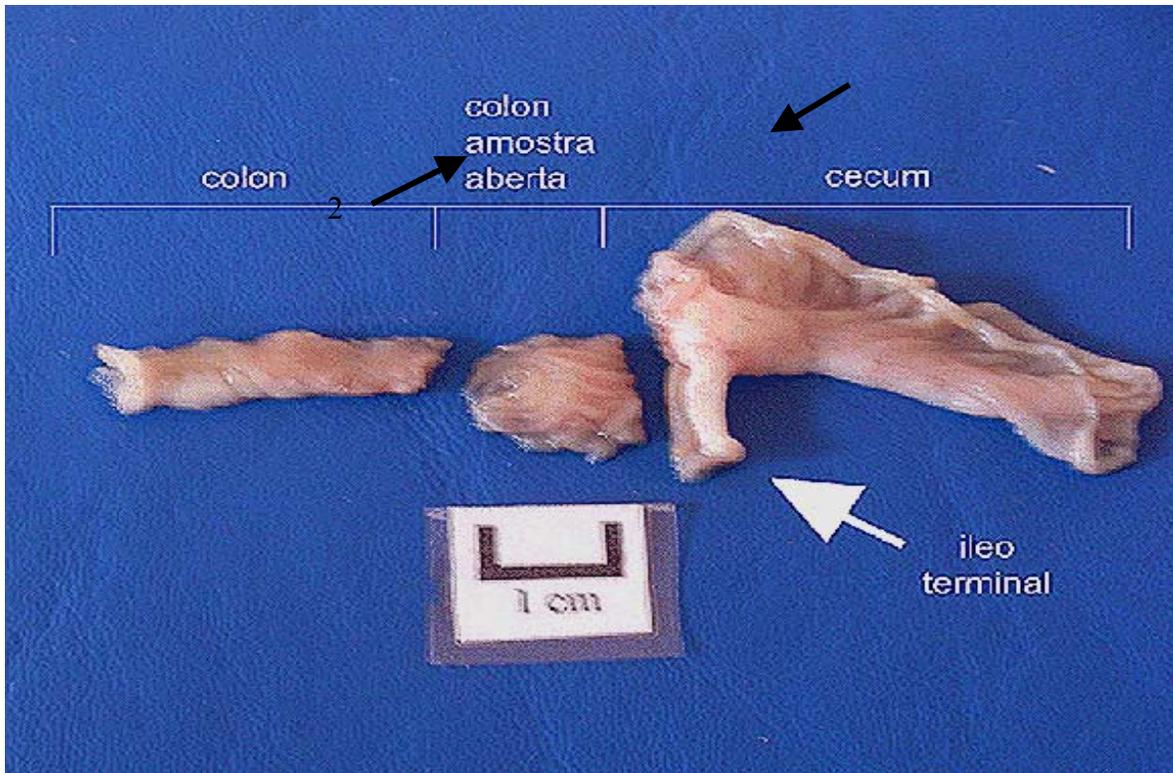


Figura 3 - Foto da peça operatória mostrando: 1) íleo terminal e o ceco direito; 2) segmento de cólon direito e a secção do ceco a partir da válvula íleo cecal e aberto pela borda anti-mesentérica.

Preparo de blocos e lâminas

As peças foram incluídas em parafina (mantendo-se identificação da amostra); seguindo rotina de preparo padronizado dos procedimentos histológicos. As peças emblocadas de modo a manter a forma de um plano retificado, foram seccionadas com micrótomo em corte sagital da parede do cólon, interessando três micrômetros de espessura. Fixação em lâmina de vidro silanizada do corte e identificação do grupo e correspondente animal.

Procedimento de coloração imuno-histoquímica

O processamento imuno-histoquímico foi realizado com a utilização de anticorpo primário anti-SOD1 (SantaCruz Biotechnology Inc®) diluição 1:500. Anticorpo secundário anti-rato. Revelador de cor DAB (diamino-benzidina); e obtenção de expressão SOD1 na coloração marrom.

Seqüência da coloração imuno-histoquímica:

a) Preparação dos cortes histológicos (desparafinização e hidratação):

- Xilol a 60 °C por 15 minutos
- Xilol a temperatura ambiente por 15 minutos
- Etanol 100% (3x) por 30 segundos
- Etanol 95% por 30 segundos
- Etanol 80% por 30 segundos
- Etanol 70% por 30 segundos

b) Recuperação antigênica:

- Incubação das lâminas em solução de recuperação antigênica em panela à vapor a 95 °C na diluição 1:10 durante 20 minutos.

c) Bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol, em dois banhos de 10 minutos cada; após realizar lavagem em água corrente e destilada e tampão TRIS.

d) Diluição de anticorpo primário anti-SOD1 a 1:100 com diluente de anticorpo marca Dako, código K0609-1.

e) Aplicação do anticorpo primário anti-SOD1 (Santa Cruz, código SC11047) nas lâminas por 30 minutos.

f) Lavagem com tampão TRIS.

g) Aplicação do polímero conjugado à peroxidase, por 30 minutos.

h) Lavagem com tampão TRIS.

i) Aplicação da solução de substrato-cromógeno DAB, diluída a 1:10 por 5 minutos.

j) Lavagem em água destilada.

k) Contra coloração das lâminas com hematoxilina de GILL II, por um minuto.

l) Lavagem das lâminas em água destilada por 2 minutos.

m) Hidratação das lâminas em passagem de 30 segundos cada, em etanol, conforme o passo (a) da seqüência de coloração.

n) Montagem com lamínula com resina de Entellan.

Equipamento de captura de imagens da microscopia óptica.

Microscopia óptica realizada utilizando-se Microscópio (Nikon®, modelo Elipse E200), lente binocular com aumento 10X e objetiva aumento 10X/0,25. Acoplado à câmera de vídeo (Samsung®, modelo SCC131); conexão ao microcomputador via placa de vídeo Pinnacle Studio® PCTV – USB; microcomputador Duron® 750 Mhz, 128 Mb Ram, HD 20 Gigabytes e sistema operacional Microsoft Windows® 98 SE.

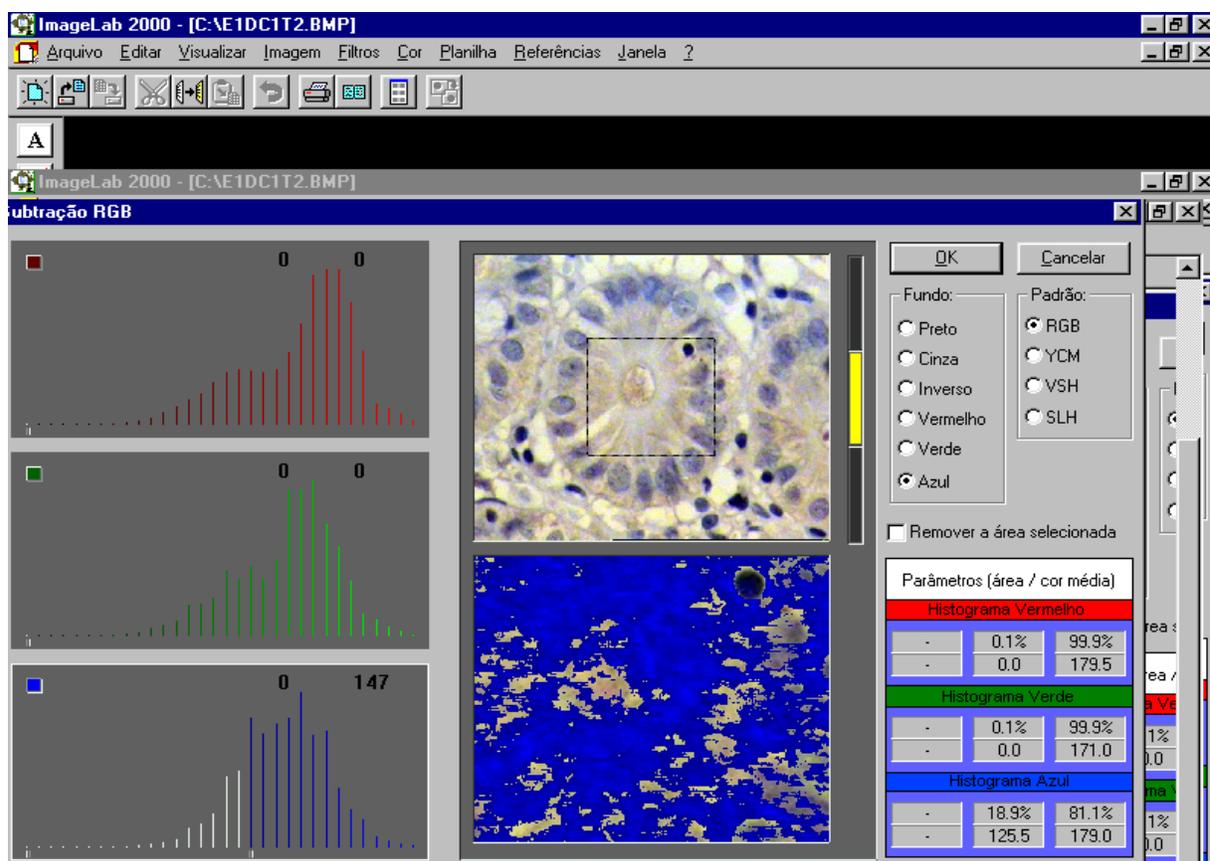


Figura 4 - Foto da imagem da tela de computador onde são identificadas as diversas etapas da captura e cálculo da quantificação da superóxido dismutase.

Procedimento de leitura e quantificação da expressão de SOD.

Realizou-se a quantificação da SOD1 através de processamento de imagem assistida por computador com a utilização do Software ImageLab®, em dez imagens capturadas em cada animal; cada imagem capturada arquivada (para documentação) seguindo-se codificação elaborada²⁶. Quantificação da densidade de cor marrom (utilizando o filtro

RGB, cor de fundo azul, intervalo de cor de 0 a 147) que corresponde à fração de área capturada-T2 com a expressão SOD1, pela área total capturada²⁶ (Figura 3). Para quantificação foram examinadas e selecionadas as criptas e FCA ,dependendo do grupo, (Figura 4), sendo que na presença de vários FCA foram escolhidos os FCA com duas criptas. Na ausência de FCA (com 2, 3 e 4 criptas), foram selecionadas criptas aleatoriamente (cripta ou FCA com uma cripta).

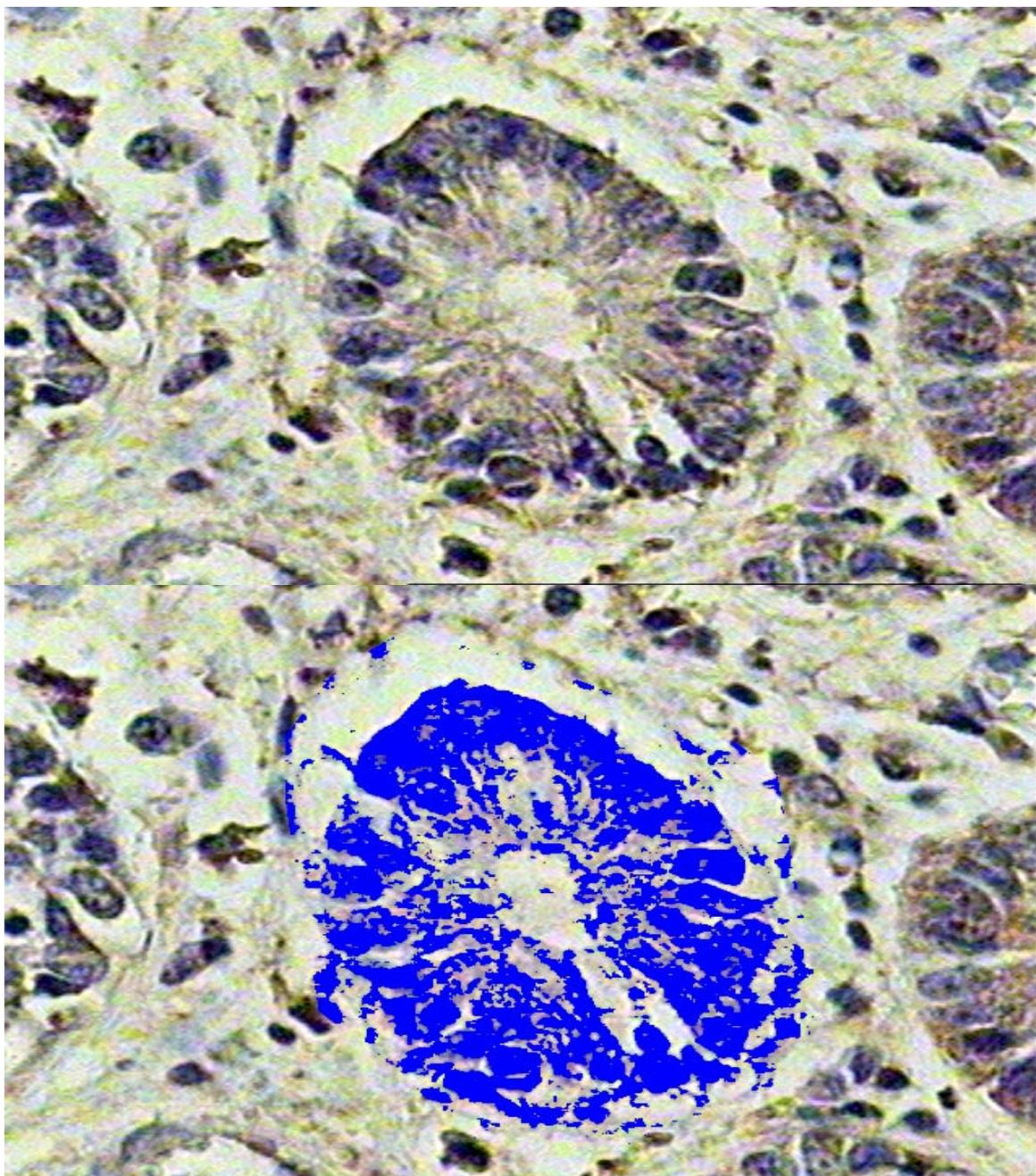


Figura 5 – Foto de uma imagem capturada para exemplificar a quantificação da área com a expressão SOD1 (área azul). Imunoistoquímica. 400X.

Critérios de identificação dos FCA

Focos de cripta aberrante são conceituados como criptas simples ou múltiplas que têm a abertura luminal alterada, epitélio mais espesso e são maiores que as criptas adjacentes. As figuras 6, 7 e 8 são representativas destes critérios de identificação.

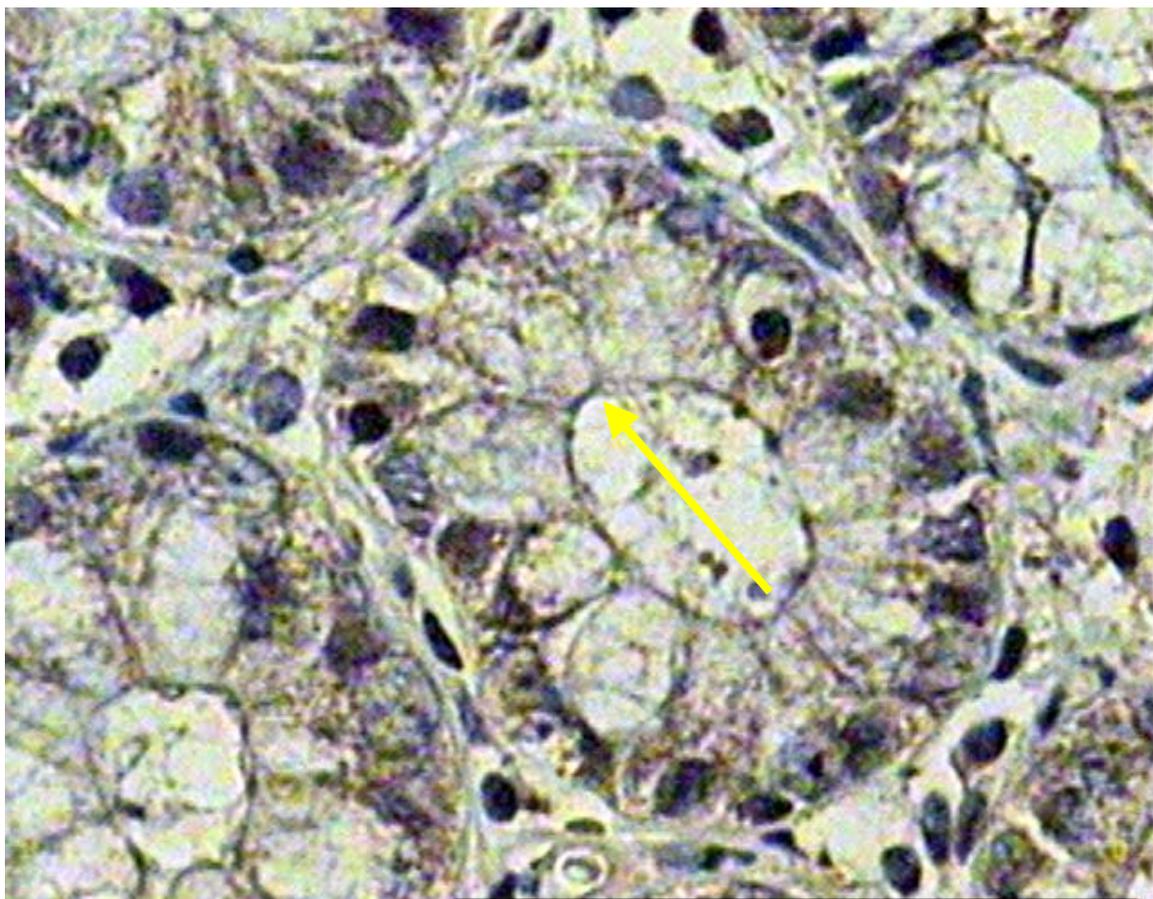


Figura 6 - Identificação de um foco de cripta aberrante segundo o critério de alargamento do eixo maior da abertura do óstio do lúmen (seta). Imunoistoquímica. 400X.

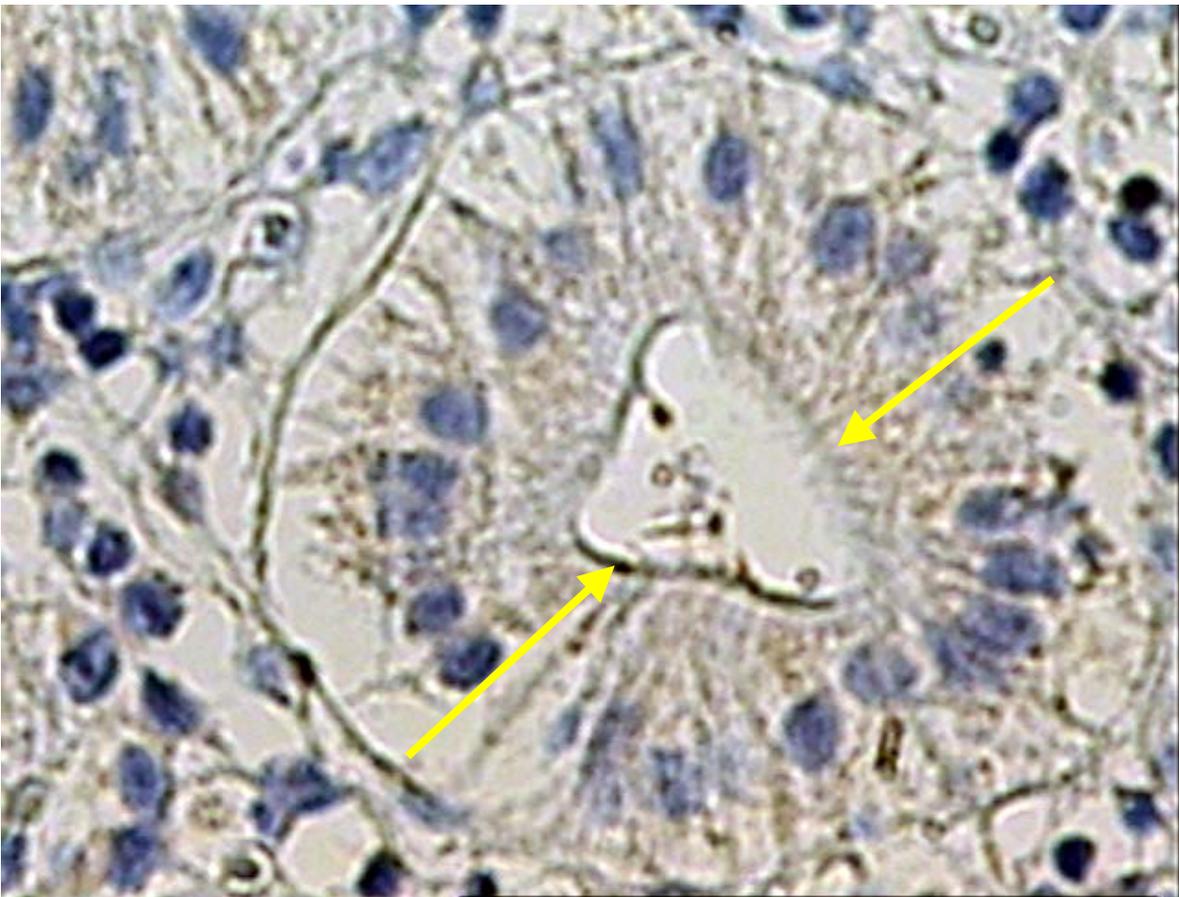


Figura 7 - Identificação de um foco de cripta aberrante segundo o critério de espessamento do epitélio (setas). Imunoistoquímica. 400X.

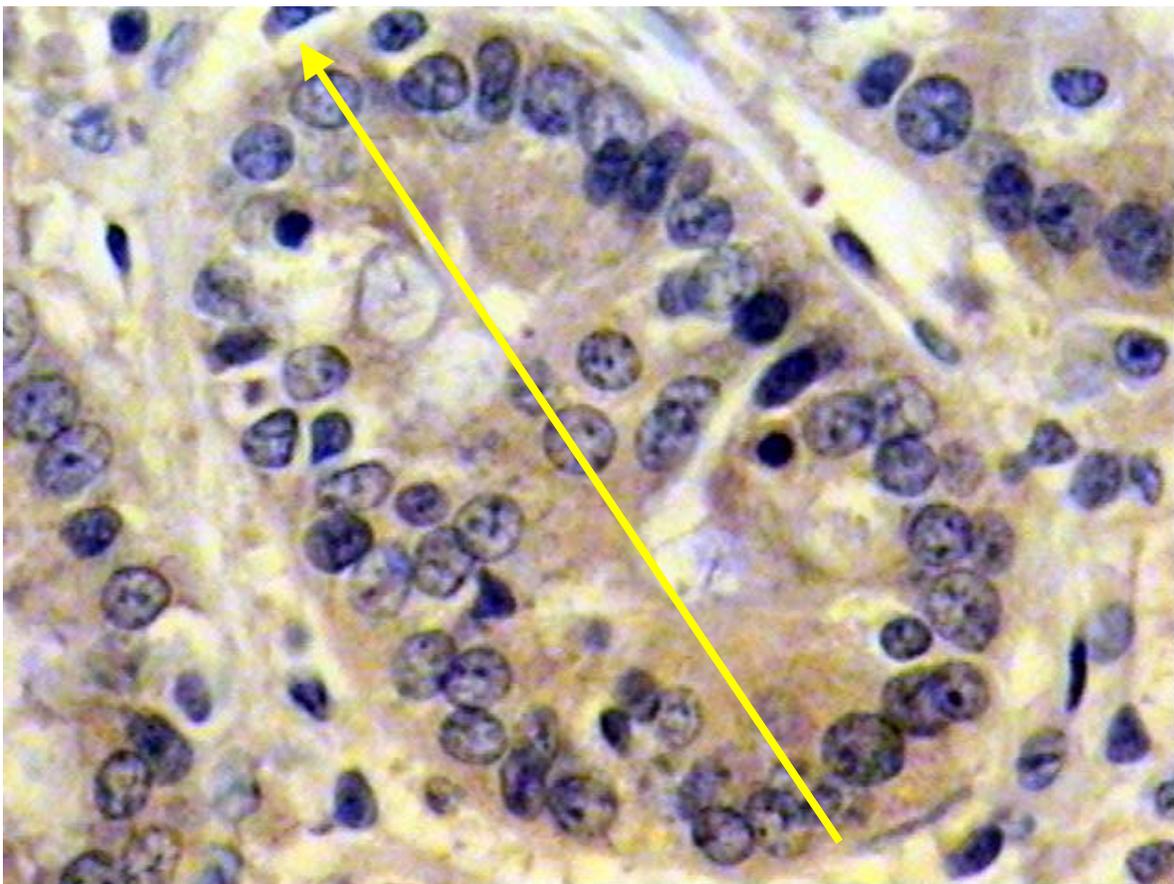


Figura 8 - Identificação de um foco de cripta aberrante segundo o critério de extensão do eixo maior da cripta em relação às adjacentes (seta). Imunoistoquímica. 400X.

Estudo Estatístico

A Análise Estatística desse estudo foi realizado na Disciplina de Bioestatística da UFMS. De acordo com a natureza das variáveis foram usados os testes:

- teste ANOVA para avaliação da média dos pesos por ocasião da distribuição aleatória dos grupos no início do experimento e da diferença do ganho de peso entre os grupos;

- o teste ANÁLISE DE VARIÂNCIA foi usado para avaliar a quantificação da expressão de superóxido dismutase entre os grupos do experimento.

Estabeleceu-se o nível de 5% ($p \leq 0,05$) para rejeição da hipótese de nulidade assinalando com um asterisco os valores significantes.

4. RESULTADOS

Tabela 1 - Distribuição do peso (em gramas) inicial, média da variação ponderal e desvio padrão dos animais no Grupo I (controle), Grupo II (AOM), Grupo III (IP6) e Grupo IV (IP6/AOM).

Grupos	Administração Substâncias	n	Peso (g)				<i>p</i>
			inicial	final	média	desvio padrão	
I	Controle	12	1855	3420	140,3	± 22,8	0,3196
II	AOM	12	2061	3619	129,8	± 13,4	
III	IP6	12	1932	3420	124,0	± 25,5	
IV	IP6/AOM	12	1876	3420	128,7	± 22,9	

Gráfico 1 - Distribuição do peso (em gramas) inicial, média da variação ponderal nos animais do Grupo I (controle), Grupo II (AOM), Grupo III (IP6) e Grupo IV (IP6/AOM).

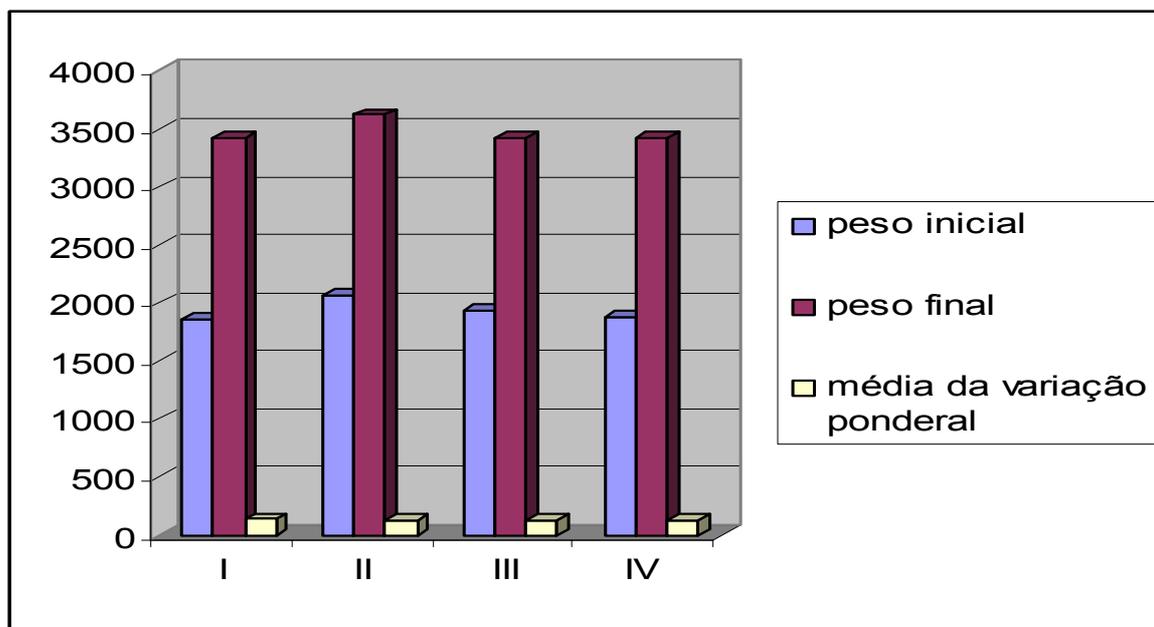


Tabela 2 - Distribuição dos valores individuais da porcentagem da expressão de SOD em FCA, quantificada por meio de processamento de imagem assistida por computador, nos diversos animais do Grupo I (controle), Grupo II (AOM), Grupo III (IP6) e Grupo IV (IP6/AOM), com respectivas médias, desvio-padrão e coeficiente de variância.

AMOSTRA	GRUPOS			
	I	II	III	IV
A	13,3	24,8	18,9	20,7
B	22,8	21,2	14,3	21,4
C	14,6	24,9	19,7	23,3
D	9,9	24,7	16,9	19,9
E	12,4	24,2	16,7	22,8
F	21,7	32,6	15,1	17,1
G	16,0	33,1	15,5	25,1
H	15,8	24,5	21,4	23,9
I	17,0	26,5	17,3	16,4
J	15,5	26,8	20,7	23,3
L	13,5	30,2	16,0	14,7
M	18,9	25,4	10,2	22,1
Média + Desvio Padrão	16,0 ± 3,7	26,7 ± 3,5	16,9 ± 3,1	20,9 ± 3,3
Coefficiente de variância	13,3	23,5	18,2	15,7

G I < G II*

G I = G III

G I < G IV*

G II > G III*

G II > G IV*

G III < G IV*

Gráfico 2 – Distribuição dos valores médios e do desvio-padrão da porcentagem da expressão de SOD, quantificada por meio de processamento de imagem assistida por computador, comparando os Grupos entre si, dois à dois, de acordo com a significância estatística encontrada e mostrada na Tabela 2.

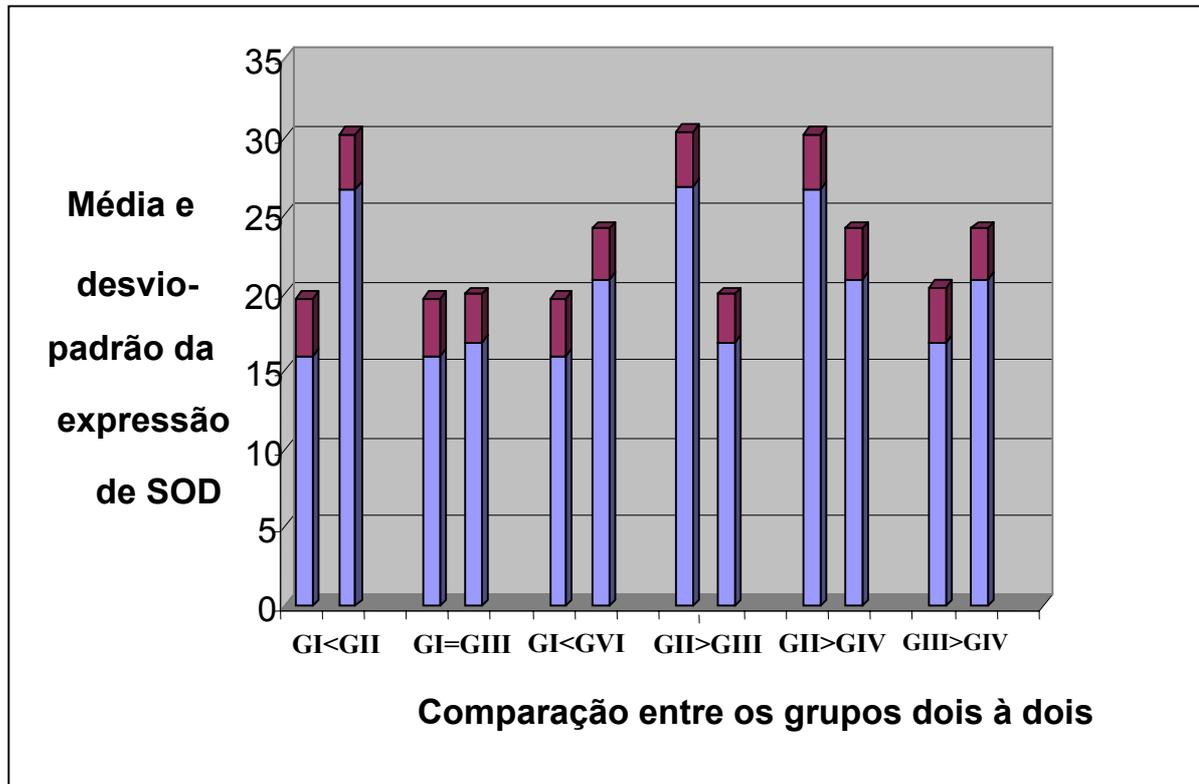
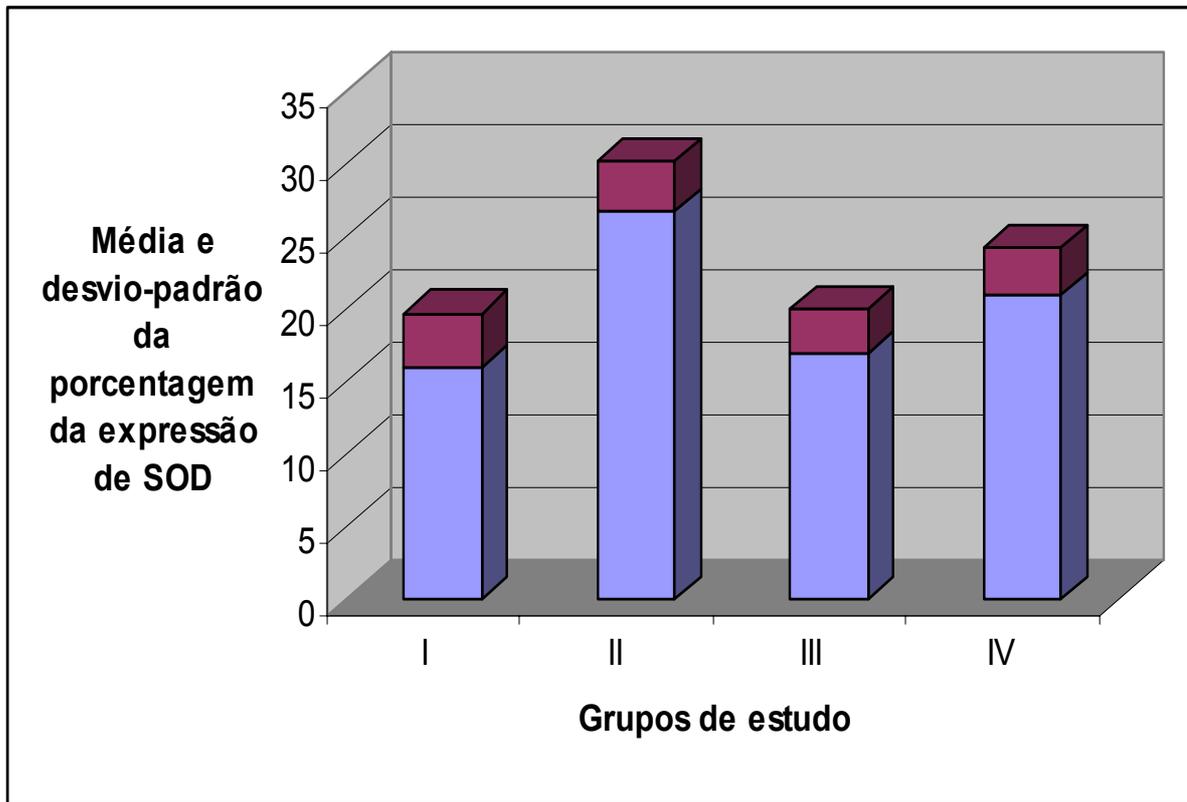


Tabela 3 - Distribuição da média e desvio-padrão da porcentagem de expressão de SOD em FCA, quantificada por meio de processamento de imagem assistida por computador, nos diversos animais do Grupo I (controle), Grupo II (AOM), Grupo III (IP6) e Grupo IV (IP6/AOM).

Variáveis de estudo	Expressão SOD1		<i>p</i> *
	Média		
Grupo I	16,0 ± 3,7		0,0078
Grupo II	26,7 ± 3,5		
Grupo III	16,9 ± 3,1		
Grupo IV	20,9 ± 3,3		

F= 4,5085. * significância, $p \leq 0,05$

Gráfico 3 - Distribuição da média e desvio-padrão da porcentagem de expressão de SOD em FCA, quantificada por meio de processamento de imagem assistida por computador, nos diversos animais do Grupo I (controle), Grupo II (AOM), Grupo III (IP6) e Grupo IV (IP6/AOM).



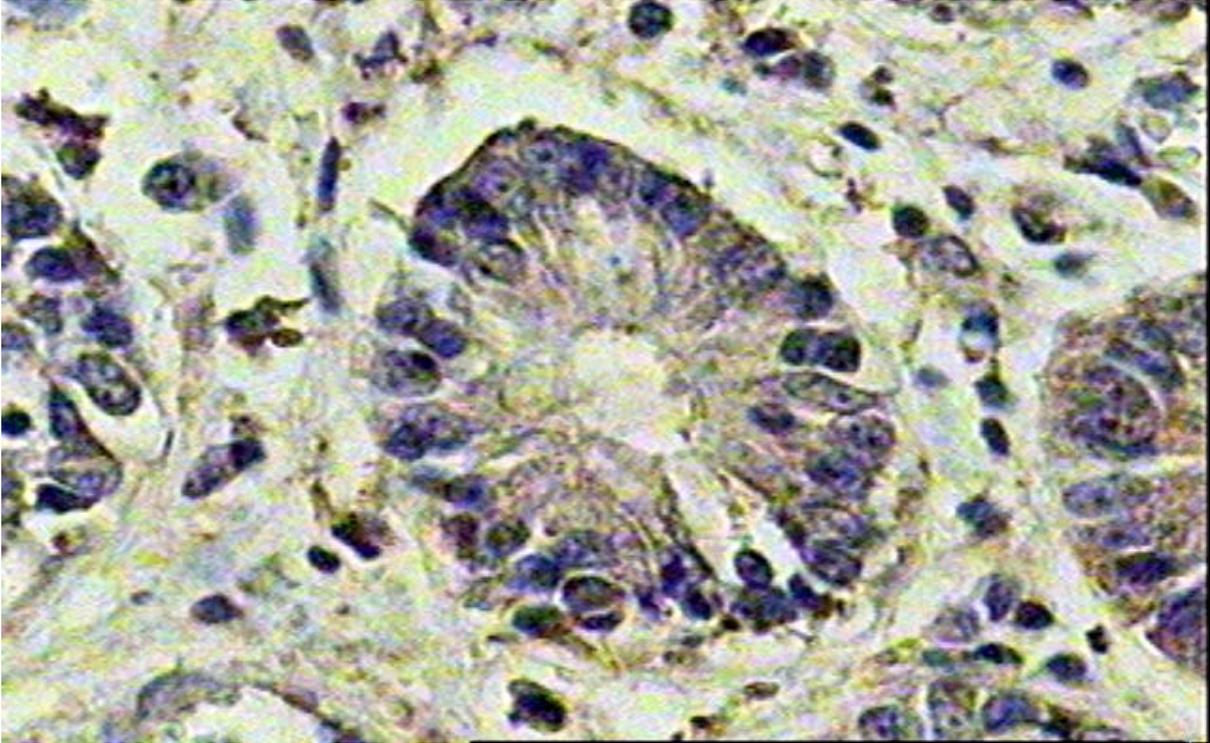


Figura 9 – Fotomicrografia característica de um animal do grupo I (controle) mostrando um foco de cripta aberrante (FCA) com a corresponde expressão de SOD-1 em coloração marrom decorrente do revelador DAB utilizado na imunohistoquímica.(400X).

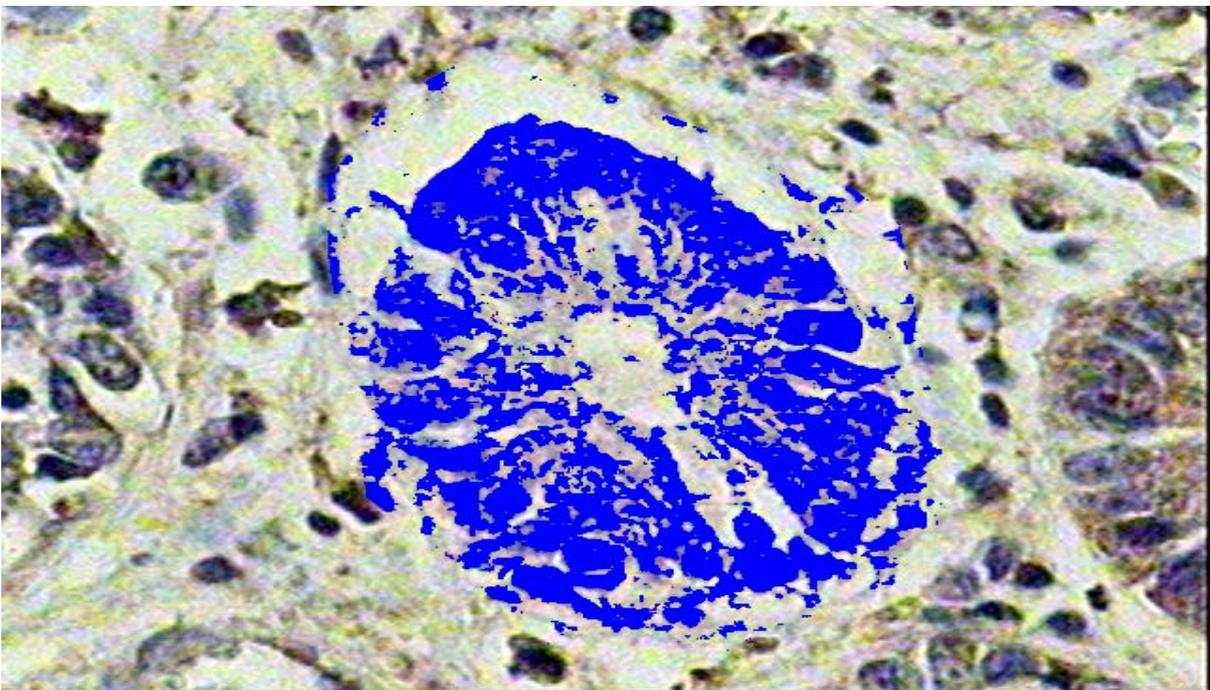


Figura 10 – Fotomicrografia característica de um animal do grupo I (controle) mostrando um foco de cripta aberrante (FCA) com a corresponde expressão de SOD-1 em coloração azul decorrente do processamento de imagem assistida por computador. (400X).

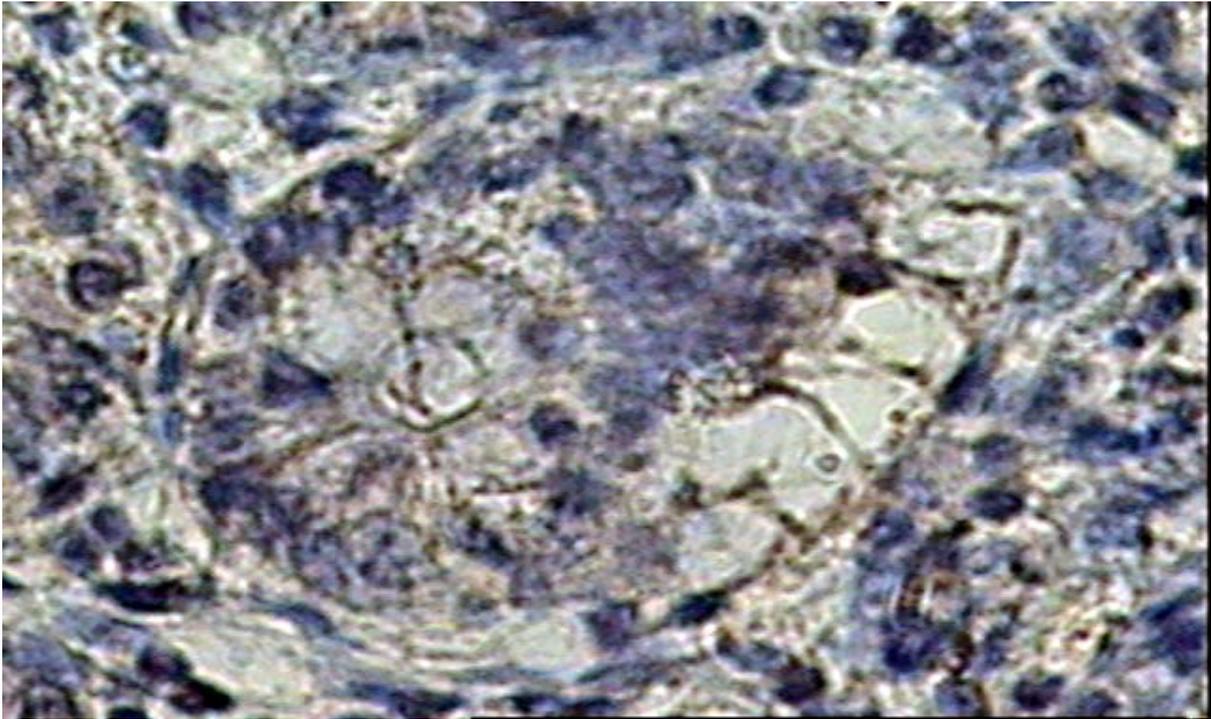


Figura 11 – Fotomicrografia característica de um animal do grupo II (AOM) mostrando um foco de cripta aberrante (FCA) com a correspondente expressão de SOD-1 em coloração marrom decorrente do revelador DAB utilizado na imunohistoquímica.(400X).

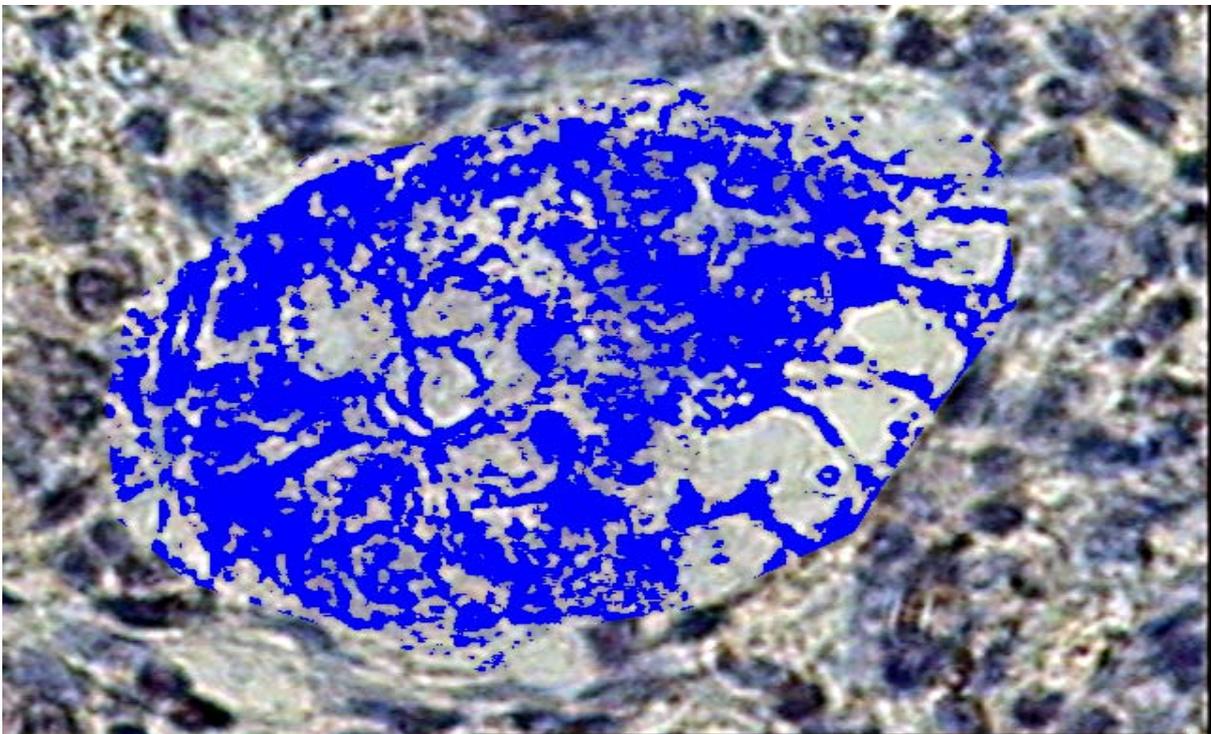


Figura 12 – Fotomicrografia característica de um animal do grupo II (AOM) mostrando um foco de cripta aberrante (FCA) com a correspondente expressão de SOD-1 em coloração azul decorrente do processamento de imagem assistida por computador. (400X).

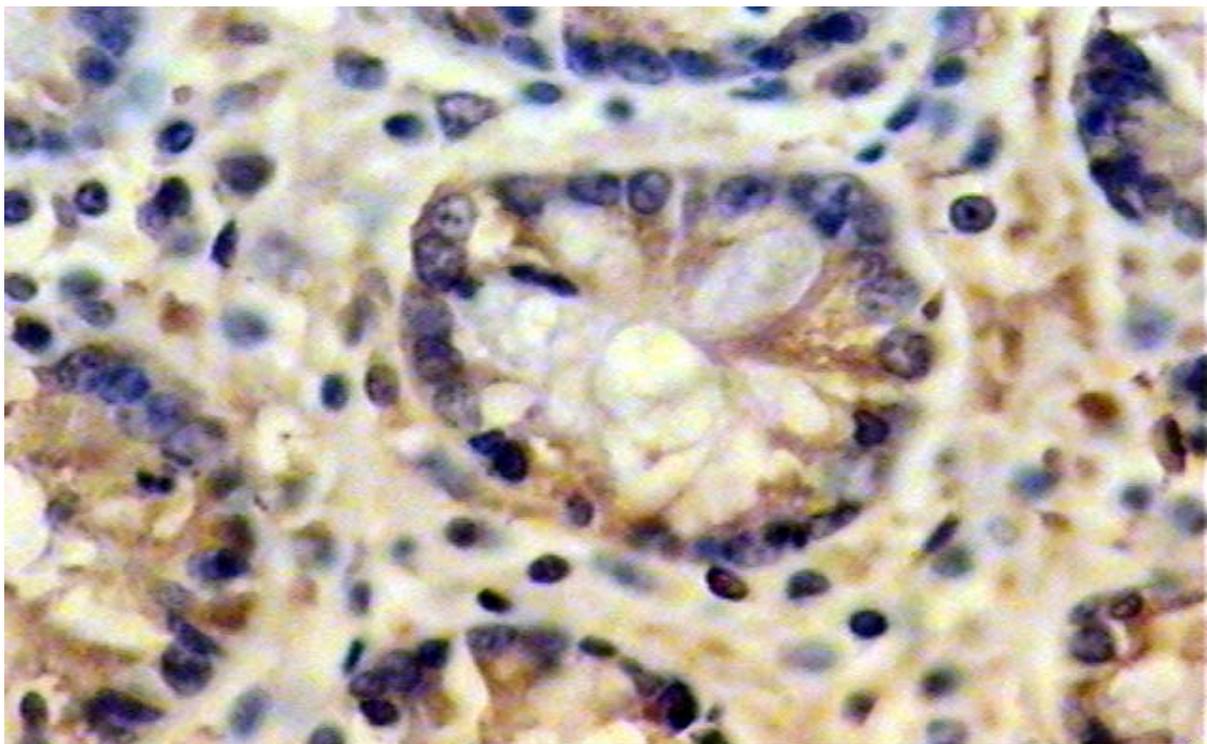


Figura 13 – Fotomicrografia característica de um animal do grupo III (IP6) mostrando um foco de cripta aberrante (FCA) com a correspondente expressão de SOD-1 em coloração marrom decorrente do revelador DAB utilizado na imunohistoquímica.(400X).

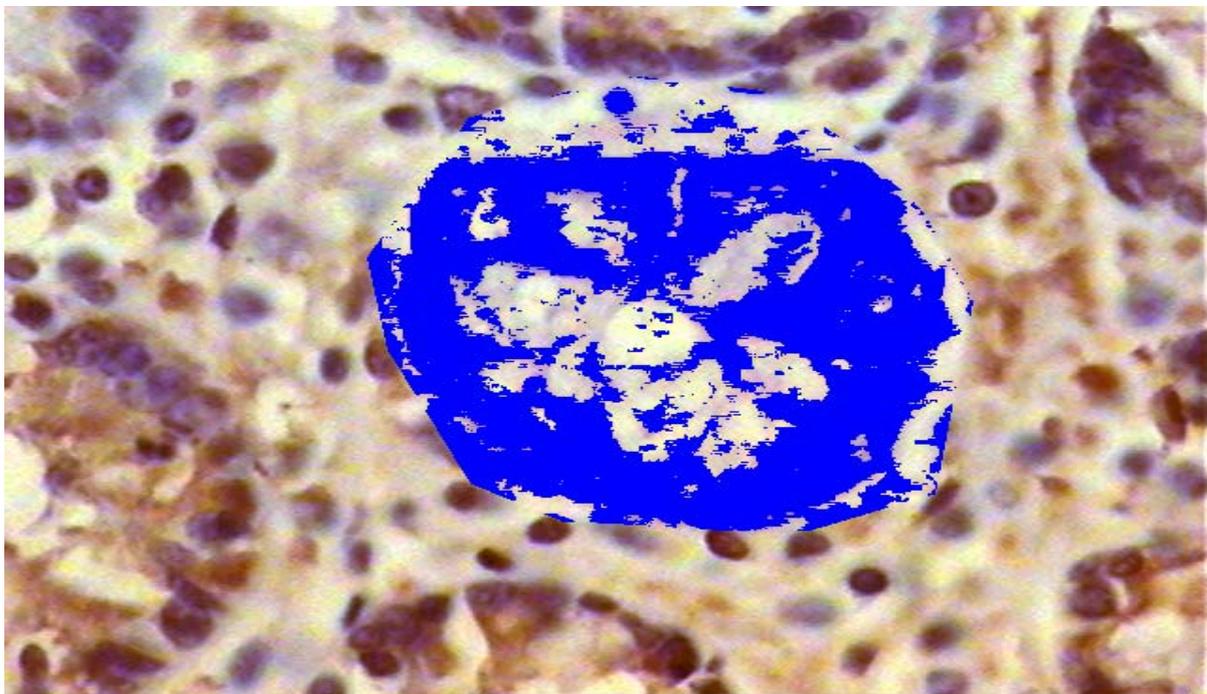


Figura 14 – Fotomicrografia característica de um animal do grupo III (IP6) mostrando um foco de cripta aberrante (FCA) com a correspondente expressão de SOD-1 em coloração azul decorrente do processamento de imagem assistida por computador. (400X).

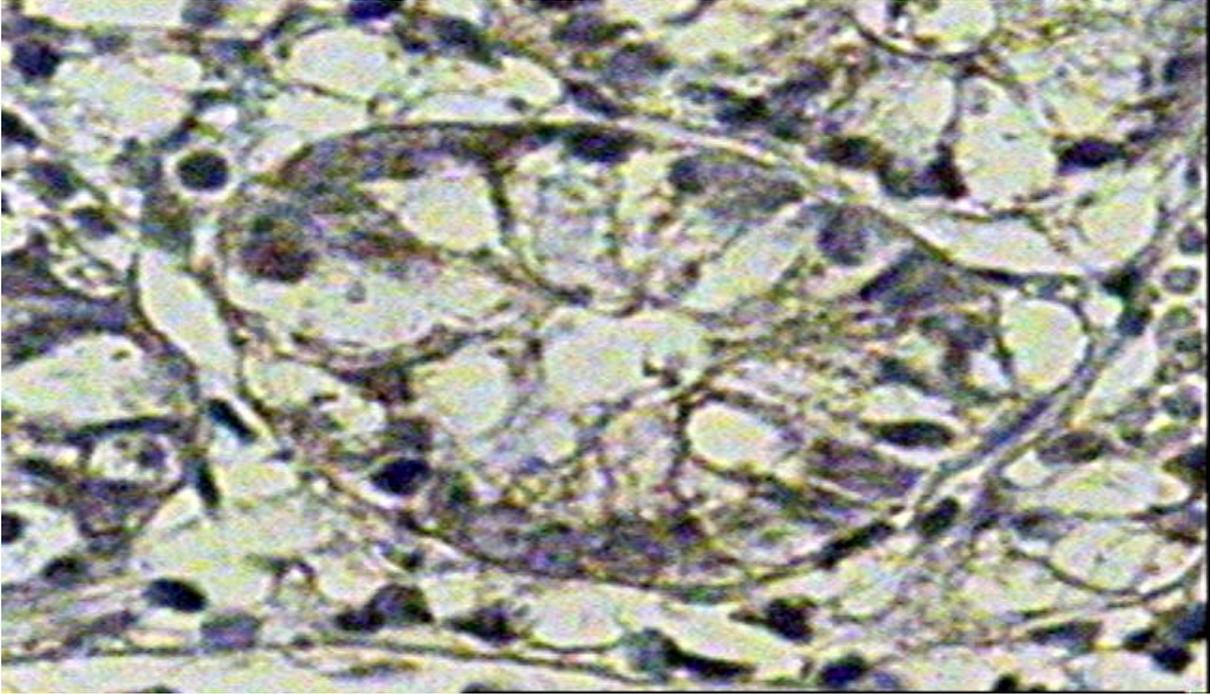


Figura 15 – Fotomicrografia característica de um animal do grupo IV (IP6/AOM) mostrando um foco de cripta aberrante (FCA) com a corresponde expressão de SOD-1 em coloração marrom decorrente do revelador DAB utilizado na imunohistoquímica.(400X).

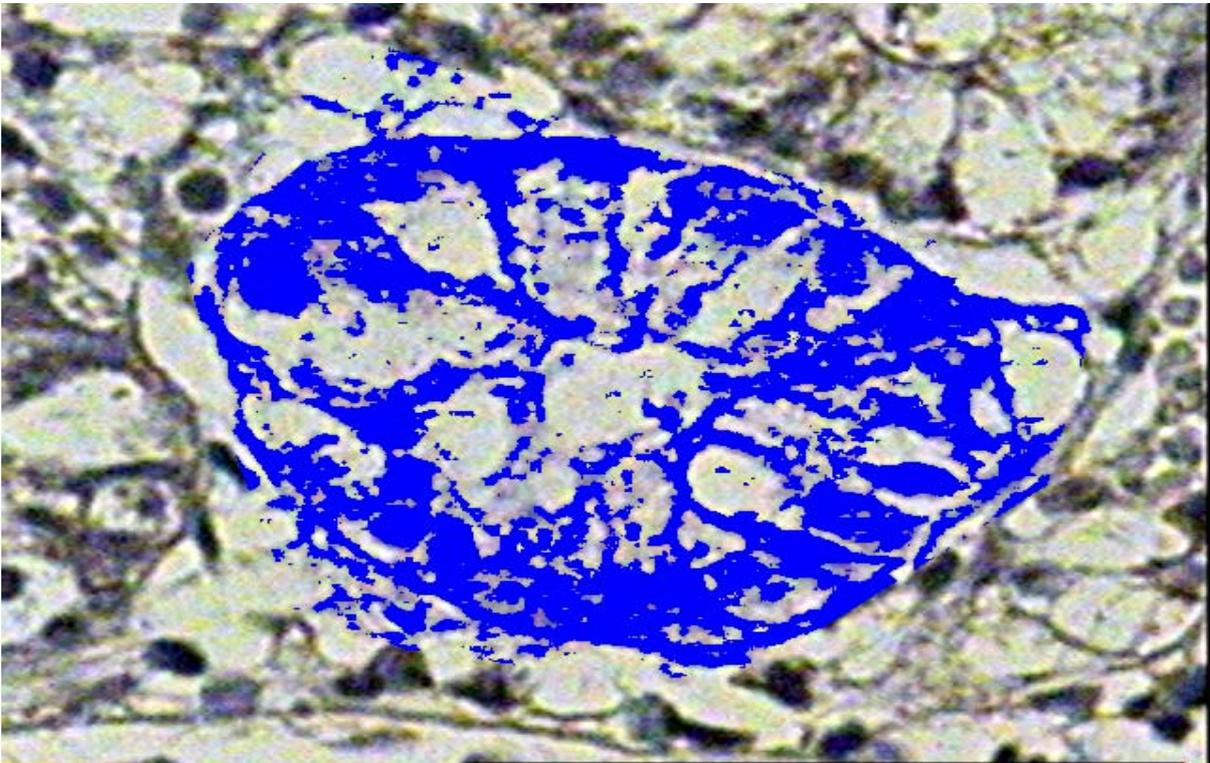


Figura 16 – Fotomicrografia característica de um animal do grupo IV (IP6/AOM) mostrando um foco de cripta aberrante (FCA) com a corresponde de expressão SOD-1 em coloração azul decorrente do processamento de imagem assistida por computador. (400X).

5. DISCUSSÃO

O entendimento sobre a natureza e desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas ou pré-cancerosas que ocorrem na mucosa do cólon e reto são fundamentais para o esclarecimento dos mecanismos da carcinogênese colorretal⁴.

O intestino delgado e o grosso são importantes barreiras contra agentes exógenos incluindo as substâncias carcinogênicas. A ocorrência de lesões pré-neoplásicas está relacionada à biotransformação, ativação ou detoxicação e ingestão de substâncias químicas exógenas⁴.

A lesão pré-neoplásica ou pré-cancerosa do cólon pode ser caracterizada em termos morfológicos e pelo fenótipo histoquímico. Entretanto, a histogênese e as relações das diversos tipos de lesões malignas ainda não estão inequivocamente determinadas. Focos de cripta aberrante (FCA) identificados na mucosa do cólon de roedores e seres humanos é frequentemente usado como um confiável biomarcador para detecção experimental de agentes quimiopreventivos contra câncer colorretal, embora a natureza da instalação da FCA e sua valorização como biomarcador em roedores e humanos ainda seja motivo de maiores esclarecimentos⁴⁻⁶.

A ocorrência espontânea de FCA em ratos tem uma frequência baixa^{19,27,28}, mas existe uma clara associação do aumento do número de criptas isoladas ou múltiplas com alterações morfológicas após a exposição à substâncias carcinogênicas⁷⁻¹⁰.

Considerando a relevância da doença neoplásica e a importância das propostas preventivas, assim como da necessidade de maiores informações sobre o mecanismo de instalação e manifestação das lesões pré-neoplásicas, procurou-se estabelecer um modelo experimental em ratos com o intuito de iniciar uma linha de pesquisa em carcinogênese.

O rato da linhagem Fisher 344 é o que mais frequentemente citado na literatura como modelo animal na indução de FCA, pois nestes animais a ocorrência espontânea de FCA é praticamente nula e são mais susceptíveis à indução de carcinogênese colônica por drogas^{11,12}. Há poucos relatos utilizando o rato Sprague-Dawley^{29, 30} ou o rato Wistar³¹. Para desenvolver um modelo experimental foi escolhido o rato Wistar, pelo seu uso difundido e fácil obtenção adequando-se assim às condições do nosso meio. Os resultados, que serão analisados detalhadamente mais adiante, mostraram que

foi possível identificar os focos de cripta aberrante na mucosa do cólon distal e passíveis de diferenciar os grupos de indução por droga carcinogênica e os grupos controle e sob ação de drogas quimioprotetoras.

O modelo estudado deu enfoque para a indução de curta duração com o emprego do azoximetano recomendado pela Organização Mundial de Saúde (*Internacional Agency for Research on Cancer – IARC*)³² também já estabelecido como um procedimento padrão para estudos de carcinogênese de cólon³³. A manifestação de criptas únicas ou múltiplas com características morfológicas aberrantes já está também plenamente referendada pela literatura pertinente como um parâmetro confiável para avaliação da indução de lesões pré-neoplásicas e seu controle por substâncias quimioprotetoras³³⁻³⁸.

O desenvolvimento de estratégias para quimioprevenção do câncer colorretal tem sido facilitado pelos relevantes modelos em animais de experimentação que mimetizam os processos neoplásicos que ocorrem em humanos, incluindo similaridades na histopatologia e nas lesões moleculares e genéticas durante os estágios iniciais e de promoção e manutenção da carcinogênese³³.

Estudos com o azoximetano em ratos têm mostrado que determinadas substâncias naturais ou sintéticas podem influir de modo decisivo na manifestação de lesões pré-neoplásicas, diminuindo ou abolindo suas manifestações³³. Estas substâncias devem combinar benefícios clínicos com mínima toxicidade. A história natural do câncer colorretal, desde as criptas aberrantes displásicas até adenomas e adenocarcinomas, oferece múltiplas oportunidades para avaliar e intervir. É preciso identificar os alvos moleculares que são críticos no crescimento e sobrevivência da célula maligna colorretal e os fatores que modulam este mecanismo³³.

Há uma vasta gama de agentes que foram identificados no desenvolvimento de câncer de cólon em animais. Isto sugere que o câncer de cólon em humanos pode ser consequência de diversos tipos de deficiências no estilo de vida, uma vez que determinadas substâncias presentes na dieta quando suprimidas aumentam o aparecimento de displasia em criptas do cólon. Por outro lado dietas contendo gordura ômega 3 (3 fatty acids -3 PUFAs), antiinflamatórios não hormonais, inibidores da COX2 e inibidores da óxido nítrico sintetase (iNOS) e curcumin podem reduzir a incidência de câncer colorretal³³.

O inositol hexafosfato (IP6) é um carboidrato polifosforilado encontrado em fontes alimentícias naturais ricas em fibras, embora esteja praticamente presente em

todas as espécies de plantas em quantidades variáveis. Também é identificável em várias células animais. O IP6 tem sido associado com efeitos inibitórios sobre uma grande variedade de tumores inclusive de mama, pâncreas e cólon. O IP6 age reduzindo a proliferação celular e aumentando a diferenciação de células malignas, o que frequentemente resulta em regressão ao fenótipo normal. Estimula as propriedades imunológicas do organismo contribuindo para a destruição das células tumorais. Tem ação antioxidante uma vez que o IP6 exógeno uma vez administrado é desfosforilado em inositol fosfatos, o que interfere no sinal de transdução e no ciclo vital da célula. Uma vez que é abundante na dieta regular, é eficazmente absorvido pelo trato gastrointestinal e é seguro, quase isento de toxicidade, figura como uma opção atraente nas estratégias de prevenção e tratamento do câncer ou na melhora da qualidade de vida em pacientes com metástases e/ou em tratamento com quimioterapia²⁴.

Contudo para a consecução do modelo experimental a identificação e contagem dos focos de criptas aberrantes mostrou-se um procedimento trabalhoso e sujeito à variações e vieses comuns às contagens que dependem de uma caracterização qualitativa. Informações da literatura sugerem que o estresse oxidativo é um evento precoce na carcinogênese e que a expressão da superóxido dismutase (SOD) está alterada em diversos tecidos com neoplasia⁴⁰. Deste modo procurou-se inovar o processo de identificação e quantificação dos focos de criptas aberrantes à partir de um projeto piloto que mostrou haver correlação entre a expressão da SOD, marcada por imunistoquímica e a mensuração por colorização computacional das áreas correspondentes a imunomarcção.

A contagem de dez campos aleatórios com arquivamento e contagem total de cada animal permitiu um tratamento estatístico confiável para os resultados obtidos. A padronização do filtro RGB (*red-blue-green*) e da intensidade da imunocoloração permitiu uma uniformidade dos resultados minimizando ou impedindo as eventuais falhas na mensuração das áreas e no cálculo dos percentuais da expressão da SOD²⁶.

As figuras 5 à 12 apresentam fotomicrografias características de cada grupo de animais, tanto na fase de imunocoloração quanto na fase de marcação colorimétrica para a leitura computacional. É possível identificar as criptas aberrantes e a coloração marrom permite verificar a expressão da SOD nestas mesmas criptas.

Os resultados referentes à evolução ponderal dos animais mostraram que houve um ganho de peso em todos os grupos, uma vez que se tratava de animais adultos jovens (três meses de idade) e que normalmente ganham peso até por volta do sexto mês de

vida. A média da variação ponderal foi semelhante para todos os grupos, sem diferença estatisticamente significativa (Tabela 1 e Gráfico1). Deste modo pode-se inferir que o IP6 ou mesmo o azoximetano (AOM), nas doses empregadas não apresentaram efeitos tóxicos, o que certamente influiria na ingestão alimentar destes animais e consequentemente no peso corporal.

A expressão da SOD nos animais do grupo I ($16,0 \pm 3,7$), em que nenhuma droga foi ministrada permite verificar que a superóxido dismutase é uma enzima presente nas células das criptas intestinais do cólon e que podem estar relacionadas com a atividade exercida por este tecido de funcionar como uma barreira aos fatores agressivos exógenos em que existem em quantidade variável no lúmen intestinal. Devido ao processo de mensuração empregado não foi possível comparar estes achados com os de outros na literatura que usam metodologia diversa. No entanto, é referida na literatura alta atividade de SOD em diversos tecidos em condições fisiológicas tais como tecido hepático, células do miocárdio, células de músculos estriados, células acinares do pâncreas, células epiteliais do túbulo renal, células epiteliais do intestino delgado e cólon.⁴¹⁻⁴³

Os animais do grupo III, que receberam o IP6 ($16,9 \pm 3,1$) na água de beber, não mostraram diferença estatisticamente significativa na expressão da SOD em relação aos animais do grupo I ($16,0 \pm 3,7$). Isto significa que o IP6 em condições fisiológicas não interfere na manifestação da SOD e, portanto não interfere nos processos do estresse oxidativo em condições fisiológicas.

Por outro lado os animais do grupo II ($26,7 \pm 3,5$) que receberam o azoximetano em duas doses subcutâneas mostraram uma diferença estatisticamente significativa na expressão da SOD em relação aos grupos I ($16,0 \pm 3,7$) e II ($16,9 \pm 3,1$), identificando que o processo de lesão pré-neoplásica, caracterizado pela presença do foco de cripta aberrante está associado ao estresse oxidativo de forma marcante. Assim para o desenvolvimento do modelo experimental mostrou-se que há uma relação entre a presença de cripta aberrante e a expressão da SOD e que esta relação pôde ser estabelecida pela metodologia proposta por esta pesquisa.

A expressão da SOD nos animais do grupo IV ($20,9 \pm 3,3$), que receberam a injeção de azoximetano (AOM) e concomitante ingestão oral de IP, mostrou diferença estatisticamente significativa em comparação com os animais do grupo II ($26,7 \pm 3,5$), que não receberam o IP6. Deste modo ficou demonstrado que o IP6 tem ação

antioxidativa, diminuindo a expressão da SOD nas criptas aberrantes e, portanto favorecendo uma ação protetora contra as lesões pré-neoplásicas.

De acordo com a estratégia de organizar um modelo experimental para estudo da carcinogênese em mucosa de cólon de rato mostraram-se pertinentes as escolhas realizadas para o tipo de animal (rato Wistar), para o tipo de indutor carcinogênico (azoximetano), para o tipo de critério de avaliação do mecanismo de carcinogênese (focos de cripta aberrante) e o tipo de substância inibidora (IP6) para testar a eficácia do modelo. A inovação ficou por conta da medição da expressão da superóxido dismutase tanto na sua concepção de associação com o estresse oxidativo e carcinogênese como pelo método de associar a imunistoquímica com a coloração e medição por computador

Os resultados encontrados mostraram que o modelo proposto é factível e confiável, reforçando o uso do rato Wistar como animal de experimentação na pesquisa de focos de cripta aberrante, e que estes resultados se sobrepõe à outros trabalhos referidos na literatura.

O modelo proposto, no entanto precisa ser testado mais vezes e aprimorado em alguns aspectos práticos de sua execução, mas contribuiu para estabelecer um modelo adaptado às condições do nosso meio. Deverá ser aplicado para esclarecer os relevantes mecanismos envolvidos no desencadeamento e manutenção das lesões pré-neoplásicas e nos fatores protetores e inibidores destas lesões.

6. CONCLUSÕES

1 – O rato Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) mostrou ser um modelo viável e confiável de indução de foco de cripta aberrante (FCA) induzido pelo azoximetano (AOM).

2- O azoximetano (AOM) induziu a formação de focos de cripta aberrantes (FCA) em proporção estatisticamente significativa em colo distal de ratos Wistar.

3- O fosfato de inositol (IP6) mostrou ser uma substância capaz de inibir a manifestação de focos de cripta aberrantes em colo de ratos Wistar, induzidas pelo azoximetano.

4- A expressão da enzima superóxido dismutase (SOD) por marcação imunohistoquímica mostrou ser um método confiável para marcação biológica de estresse oxidativo em focos de cripta aberrantes (FCA) induzidos pelo azoximetano (AOM).

7. REFERÊNCIAS

- 1- Furtunato DMN, Trigueiro, INS, Góes JAW. Fitatos na alimentação humana: uma visão abrangente. *Hig Aliment*. 2003;17(107):16-20.
- 2 - Domínguez, BM, Gómez MVI, León FR. Phytic acid: nutritional aspects and analytical implications *Arch Latinoam Nutr*. 2003;52(3):219-231.
- 3 -Mori H, Yamada Y, Toshiya K, Yoshinobu H. Aberrant crypt foci and β -catenin accumulated crypts; significance and roles for colorectal carcinogenesis *Mut Res*. 2004;566 (3):191-208.
- 4 - Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett*. 1987;37:147–151.
- 5 – Bird RP, McLellan EA, Bruce WR. Aberrant crypts, putative precancerous lesions, in the study of the role of diet in the aetiology of colon cancer. *Cancer Surv*.1989;8:189–200.
- 6 - Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, O’Riordan MA, Pretlow TG, Jurcisek JA, Stellato TA. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res*. 1991;51:1564–7.
- 7 - Pretlow TP, O’Riordan MA, Somich GA, Amini SB, Pretlow TG. Aberrant crypts correlate with tumor incidence in F344 rats treated with azoxymethane and phytate. *Carcinogenesis*. 1992;13:1509–12.
- 8 - Pretlow TP, Cheyer C, O’Riordan MA. Aberrant crypt foci and colon tumors in F344 rats have similar increases in proliferative activity. *Int J Cancer*. 1994;56: 599–602.
- 9 - Feng Y, Wagner RJ, Fretland AJ, Becker WK, Cooley AM, Pretlow TP, Lee KJ, Hein DW. Acetylator genotype (NAT2)-dependent formation of aberrant crypts in congenic Syrian hamsters administered 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl. *Cancer Res*. 1996;56: 527–31.
- 10- Paulsen JE, Steffensen IL, Namork E, Hein DW, Alexander J. Effect of acetylator genotype on 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl induced aberrant crypt foci in the colon of hamsters. *Carcinogenesis*. 1996;17:459–65.
- 11- Nozawa H, Nakao W, Zhao F, Kondo K. Dietary supplement of isohumulones inhibits the formation of aberrant crypt foci with a concomitant decrease in prostaglandin E2 level in rat colon. *Mol Nutr Food Res*. 2005;49(8):772-8.

- 12- Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Sasaki K, Yoshimura T, Wada K, Tanaka T. Preventive effects of extract of leaves of ginkgo (*Ginkgo biloba*) and its component bilobalide on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. [Cancer Lett.](#) 2004;210(2):159-69.
- 13- Stopera SA, Davie JR, Bird RP. Colonic aberrant crypt foci are associated with increased expression of c-fos: the possible role of modified c-fos expression in preneoplastic lesions in colon cancer. *Carcinogenesis*. 1992;13:573–578.
- 14- Stopera SA, Bird RP. Effects of all-trans retinoic acid as a potential chemopreventive agent on the formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci: differential expression of c-myc and c-fos mRNA and protein. *Int J Cancer*. 1993;53:798–803.
- 15- Stopera SA, Murphy LC, Bird RP. Evidence for a ras gene mutation in azoxymethane-induced colonic aberrant crypts in Sprague-Dawley rats: earliest recognizable precursor lesions of experimental colon cancer. *Carcinogenesis*. 1992;13:2081–85.
- 16- Tachino N, Hayashi R, Liew C, Bailey G, Dashwood R. Evidence for ras gene mutation in 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced colonic aberrant crypts in the rat. *Mol Carcinog*. 1995;12:187–192.
- 17- Athar M. Oxidative stress and experimental carcinogenesis. *Indian J Exp Biol*. 2002 Jun;40(6):656-67.
- 18- Hileman EA, Achanta G, Huang P. Superoxide dismutase: an emerging target for cancer therapeutics. *Expert Opin Ther Targets*. 2001;5(6): 697-710.
- 19- Tanakamaru Z, Mori I, Nishikawa A, Furukawa F, Takahashi M, Mori H. Essential similarities between spontaneous and MeIQx-promoted aberrant crypt foci in the F344 rat colon. *Cancer Lett*. 2001;172:143–9.
- 20- Zheng Y, Kramer PM, Lubet RA, Steele VE, Kelloff GJ, Pereira MA. Effect of retinoids on AOM-induced colon cancer in rats: modulation of cell proliferation, apoptosis and aberrant crypt foci. *Carcinogenesis*. 1999;20:255–60.
- 21- Magnuson BA, Bird RP. Reduction of aberrant crypt foci induced in rat colon with azoxymethane or methylnitrosourea by feeding cholic acid. *Cancer Lett*.1993;68:15–23.
- 22- Reddy BS, Hirose Y, Cohen LA, Simi B, Cooma I, Rao CV. Preventive potential of wheat bran fractions against experimental colon carcinogenesis: implications for human colon cancer prevention. [Cancer Res](#). 2000;60(17):4792-7.
- 23- Fox CH, Eberl M. Phytic acid (IP6), novel broad spectrum anti-neoplastic agent: a systematic review. [Complement Ther Med](#).2002;10(4):229-34.
- 24- Vucenik I, Shamsuddin AM. Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP6) and inositol: from laboratory to clinic. [J Nutr](#). 2003;133(11):3778S-84S.

- 25- Somasundar P, Riggs DR, Jackson BJ, Cunningham C, Vona-Davis L, McFadden DW. Inositol hexaphosphate (IP6): a novel treatment for pancreatic cancer. [J Surg Res](#). 2005; 126(2):199-203.
- 26- Borra RC, Pizarro PJ. [ImageLab98](#). Acessado em março de 2006. Disponível em [http://www.brasil.terravista.pt/PraiaBrava/1563/imagelab.html](http://www.brasil.terraviva.pt/PraiaBrava/1563/imagelab.html)
- 27- Kawamori T, Tanaka T, Hara A, Yamahara J, Mori H. Modifying effects of naturally occurring products on the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane in F344 rats. *Cancer Res*. 1995;55(6):1277-82.
- 28- Furukawa F, Nishikawa A, Kitahori Y, Tanakamaru Z, Hirose M. Spontaneous development of aberrant crypt foci in F344 rats. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2002;21: 197-201.
- 29- Marotta F, Naito Y, Minelli E, Tajiri H, Bertuccelli J, Wu CC, Min CH, Hotten P, Fesce E. Chemopreventive effect of a probiotic preparation on the development of preneoplastic and neoplastic colonic lesions: an experimental study. [Hepatogastroenterol](#). 2003;50(54):1914-8.
- 30- Corpet DE, Parnaud G, Delverdier M, Peiffer G, Taché S. Consistent and fast inhibition of colon carcinogenesis by polyethylene glycol in mice and rats given various carcinogens. [Cancer Res](#). 2000;60(12):3160-4.
- 31- Metz N, Lobstein A, Schneider Y, Gossé F, Schleiffer R, Anton R, Raul F. Suppression of azoxymethane-induced preneoplastic lesions and inhibition of cyclooxygenase-2 activity in the colonic mucosa of rats drinking a crude green tea extract. [Nutr Cancer](#). 2000;38(1):60-4.
- 32- [Corpet DE, Tache S](#). Ranking chemopreventive agents on rat colon carcinogenesis. *IARC Sci Publ*. 2002;156:381-4.
- 33- Reddy BS. Studies with the azoxymethane-rat preclinical model for assessing colon tumor development and chemoprevention. *Environ Mol Mutagen*. 2004;44(1):26-35.
- 34- [Bruce WR](#). Counterpoint: From animal models to prevention of colon cancer. Criteria for proceeding from preclinical studies and choice of models for prevention studies. *Cancer Epid Biom Prev*. 2003;12(5):391-400.
- 35- Tache S, Parnaud G, Van Beek E, Corpet DE. Polyethylene glycol, unique among laxatives, suppresses aberrant crypt foci, by elimination of cells. *Scand J Gastroenterol*. 2006;41(6):730-6.
- 36- [Corpet DE, Pierre F](#). Point: From animal models to prevention of colon cancer. Systematic review of chemoprevention in min mice and choice of the model system. *Cancer Epid Biom Prev*. 2003;12:391-400.

- 37- [Corpet DE, Pierre F.](#) How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. *Eur J Cancer.* 2005;41(13):1911-22.
- 38-Corpet DE, Tache Most Effective Colon Cancer Chemopreventive Agents in Rats: A Systematic Review of Aberrant Crypt Foci and Tumor Data, Ranked by Potency. [Nutr Cancer.](#) 2002;43(1):1-21.
- 39- Wargovich MJ, Chen CD, Jimenez A, Steele VE, Velasco M, Stephens LC, Price R, Gray K, Kelloff GJ. Aberrant crypts as a biomarker for colon cancer: evaluation of potential chemopreventive agents in the rat. *Cancer Epid Biom Prev.* 1996;5(5):355-360.
- 40- Bostwick DG, Alexander EE, Singh R, Shan A, Qian J, Santella RM, Oberley LW, Yan T, Zhong W, Jiang X, Oberley TD. Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. [Cancer.](#) 2000;89(1):123-34.
- 41-Miyamoto S, Kuwata G, Imai M, Nagao A, Terao J. Protective effect of phytic acid hydrolysis products on iron-induced lipid peroxidation of liposomal membranes. *Lipids.* 2000;35(12):1411-3.
- 42-Muraoka S, Miura T. Inhibition of xanthine oxidase by phytic acid and its antioxidative action. *Life Sci.* 2004;13;74(13):1691-700.
- 43-Owen RW, Spiegelhalter B, Bartsch H. Phytate, reactive oxygen species and colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev.* 1998;7 (Suppl 2): S41-54.

8. NORMAS ADOTADAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Apresentação de originais:NB-1139. Rio de Janeiro, 2000.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE - nº. 01/88: Normas de pesquisas em saúde. Bioética 1955, 3:137-54.

DeCS – Descritores em Ciências de Saúde. 3^a. ed. São Paulo. Bireme; 1992.

FAGUNDES DJ. NORMAS PARA ELABORAÇÃO DE RELATÓRIO DE PESQUISA. São Paulo: UNIFESP-EPM-TOCE; 2001. Disponível em <http://www.unifesp.br/dcir/toce/pg>.

FAGUNDES DJ. NORMAS PARA CITAÇÕES E REFERÊNCIAS. São Paulo: Unifesp-EPM-TOCE, 2001. Disponível em <http://www.unifesp.br/dcir/toce/pg>.

UNIFORM REQUIREMENTS FOR MANUSCRIPTS SBMITTED TO BIOMEDICAL JOURNALS. INTERNATIONAL COMMITTEE OF MEDICAL EDITORS. Ann Intern Med 1997, 126:36-47.

9. APÊNDICE

PROTOCOLO

Data de início de administração de drogas: / /

Grupo (sorteio): GI GII GIII GIV

Animal Número (sorteio): 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Sexo: Peso: gramas Idade:

Droga: Solução salina IP6 Azoximetano

Semanas:

1 / / 2 / / 3 / /

4 / / 5 / / 6 / /

Volume: Dose:

Coleta de segmento intestinal Data: / /

Anestésico: Volume: Dose:

Número do frasco de coleta:

Processamento da Microscopia Óptica – Data: / /

Descrição do FCA:

.....

Porcentagens da Expressão da SOD:

.....

Observações :

Figura 14 –Apêndice – Cópia do ficha padronizada para as anotações pertinentes a cada animal em cada grupo de estudo.

**PLANILHAS DOS RESULTADOS DA IMUNOISTOQUÍMICA EM 10 FOCOS DE
CRIPTAS ABERRANTES DE CADA ANIMAL**

Grupo III – IP6

Grupo 3											
RATO	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	Média G3
A	24,4	18,8	20	23,9	23,8	21,1	13,9	16,4	13,7	12,9	18,9
B	27,1	10,7	14	11,6	13,4	13,8	13,2	12,6	15,1	11,1	14,3
C	15,7	19,5	17,4	17,7	22,8	24,1	18,4	21,9	21,1	18,2	19,7
D	23,2	13,1	10,2	9,4	15,2	12,6	12,1	23	24,9	25,3	16,9
E	16,9	18,7	21,2	20,1	12,9	16,2	13,7	15	16,6	16	16,7
F	22,6	17,8	18,6	12	12,3	12,9	12,6	14,3	15,4	12,1	15,1
G	22	9,5	10,6	11	12,6	10,9	10,9	23,4	20,8	23,3	15,5
H	19,9	19,2	21,2	18,2	29,4	22,5	31,2	13,5	20,4	18	21,4
I	22,4	16,3	15,3	14,1	15,6	19,9	12,5	21,4	14,8	20,2	17,3
J	25,4	20,1	29,2	20,7	20,7	19,9	22,4	16,1	16,3	15,9	20,7
L	17,1	12,9	15,6	15,6	12,7	13,8	11,6	19,1	21,8	20,2	16,0
M	20,2	9,1	9,1	6	7,2	11,9	5,9	9,5	10,1	12,5	10,2
1										Média	16,9

**PLANILHAS DOS RESULTADOS DA IMUNOISTOQUÍMICA EM 10 FOCOS DE
CRIPTAS ABERRANTES DE CADA ANIMAL**

Grupo IV – AOM/IP6

Grupo 4											
RATO	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	Média G4
A	11,6	18	22,6	29,1	14,4	17,4	21,2	26,1	21	25,6	20,7
B	20,1	28,7	22,2	18,2	37,7	19,1	21,6	10,8	18,9	16,4	21,4
C	22,2	30,6	27,6	23,7	21,7	21,6	24,4	17,5	20,3	23,8	23,3
D	25,4	24,9	16,8	13,6	9,5	24	18,7	15,7	25,1	25,3	19,9
E	20,2	20,6	17,8	12,9	34,5	23,4	28,6	27,1	27	16,1	22,8
F	25	17,7	9	16,6	26,3	13,1	9,9	15,8	16,7	20,8	17,1
G	31,5	19,7	24,4	21,1	21,2	30,9	25,6	30	25	31,4	25,1
H	28	18,9	21,5	22,5	17,9	25,7	21,6	26	29,9	27	23,9
I	16,5	20,7	18,3	13,6	15,8	15,2	18,1	16,9	15,2	13,8	16,4
J	28,6	26,7	17,4	12,9	17,2	27,8	33,7	16,9	26,5	25	23,3
L	18,6	13,4	10,6	15,1	14,5	16	17,5	13,7	13,6	13,6	14,7
M	23,7	29,3	26,2	20,4	22,3	15,3	26,5	18	19,5	20	22,1
	Média										20,9