



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

ANDRÉ LUÍS NUNES AVELINO

**AÇÕES ANTIOXIDANTE E ANTIGENOTÓXICA DA GOMA ARÁBICA NA
MUCOSA INTESTINAL, FÍGADO, MEDULA ÓSSEA E SANGUE DE
CAMUNDONGOS *SWISS* SUBMETIDOS À CARCINOGENESE COLORRETAL
PELO AZOXIMETANO**

FORTALEZA

2020

ANDRÉ LUÍS NUNES AVELINO

AÇÕES ANTIOXIDANTE E ANTIGENOTÓXICA DA GOMA ARÁBICA NA MUCOSA
INTESTINAL, FÍGADO, MEDULA ÓSSEA E SANGUE DE CAMUNDONGOS *SWISS*
SUBMETIDOS À CARCINOGENESE COLORRETAL PELO AZOXIMETANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *strictu sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Orientadora: Profa. Dra. Conceição Aparecida Dornelas.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A967a Avelino, André Luís Nunes.
Ações antioxidante e antígeno-tóxica da goma arábica na mucosa intestinal, fígado, medula óssea e sangue de camundongos *swiss* submetidos à carcinogênese colorretal pelo azoximetano / André Luís Nunes Avelino. – 2020.
145 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós- Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Conceição Aparecida Dornelas.
1. Goma Arábica. 2. Neoplasias Colorretais . 3. Testes de Mutagenicidade . 4. Estresse Oxidativo. 5. Camundongos. I. Título.

CDD 617

ANDRÉ LUÍS NUNES AVELINO

AÇÕES ANTIOXIDANTE E ANTIGENOTÓXICA DA GOMA ARÁBICA NA MUCOSA
INTESTINAL, FÍGADO, MEDULA ÓSSEA E SANGUE DE CAMUNDONGOS SWISS
SUBMETIDOS À CARCINOGENESE COLORRETAL PELO AZOXIMETANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *strictu sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Aprovada em: 30/06/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto Wagner Bezerra de Araújo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Wesley Lyevertton Correia Ribeiro
Pesquisador NPDM

Profa. Dra. Conceição Aparecida Dornelas (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sempre estar ao meu lado nos melhores e piores momentos, dando força para continuar e acreditar que é possível. Agradeço por se fazer presente no silêncio, na natureza, nas pessoas boas que coloca em meu caminho.

À **família**, que é minha maior torcida e vibra tanto com cada conquista alcançada. Obrigado pela paciência, por escutar, pelos momentos de lazer, por acreditar tanto em mim e ser minha maior inspiração.

À professora doutora **Conceição Aparecida Dornelas**, pelos ensinamentos, paciência e dedicação sem os quais este trabalho não teria se realizado. Obrigado pelo exemplo de amor pela ciência, capaz de conseguir tanto mesmo diante de tantos obstáculos.

Ao amigo **Carlos Gustavo Hirth**, que foi quem mais me incentivou a realizar a pós-graduação e que é um exemplo de profissional dedicado e competente.

Aos estudantes de medicina **Gilson Brito de Oliveira** e **Nina Victória Ribeiro e Silva**, agradeço a gentileza, o bom humor e o companheirismo tão importantes nos momentos de cansaço e que foram indispensáveis na realização deste trabalho.

Aos professores doutores **Francisco Vagnaldo Fachine Jamacaru** e **Bruno Coêlho Cavalcanti**, cuja participação direta e disponibilidade em etapas importantes da pesquisa foram fundamentais na conquista da qualidade obtida.

À **Capes**, pelo suporte financeiro ao longo da realização da pesquisa.

RESUMO

AÇÕES ANTIOXIDANTE E ANTIGENOTÓXICA DA GOMA ARÁBICA NA MUCOSA INTESTINAL, FÍGADO, MEDULA ÓSSEA E SANGUE DE CAMUNDONGOS SWISS SUBMETIDOS À CARCINOGÊNESE COLORRETAL PELO AZOXIMETANO. ANDRÉ LUÍS NUNES AVELINO. Pós-Graduação *strictu sensu*, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (Grau de mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas). 2020. Orientadora: Profa. Dra. Conceição Aparecida Dornelas.

O carcinoma colorretal é uma das neoplasias mais frequentes caracterizada pela formação em seus estágios iniciais de criptas aberrantes. A goma arábica (GA) é um produto natural de propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Objetivou-se avaliar os efeitos da GA na formação de criptas aberrantes, na genotoxicidade e estresse oxidativo locais e sistêmicos de camundongos *Swiss* submetidos à carcinogênese colorretal pelo azoximetano (AOM). O estudo incluiu 3 grupos controle (I-III) e 3 grupos experimentais (IV-VI): GI- água, GII- GA 2,5%, GIII- GA 5%, GIV- AOM+água, GV- AOM+GA 2,5%, GVI- AOM+GA 5%. Uma vez por semana, durante 2 semanas, os animais dos grupos controle receberam solução salina (ip) e os dos grupos experimentais receberam AOM (ip). Ao longo das 12 semanas seguintes, os camundongos receberam água, GA 2,5% ou GA 5% via gavagem. Ao final, o cólon foi avaliado à microscopia estereoscópica para determinação do número de criptas aberrantes, de focos de criptas aberrantes (FCA) e de criptas por foco (multiplicidade) por segmento do cólon, além da coleta de material para estudo da genotoxicidade e estresse oxidativo (cólon proximal e distal, fígado, sangue e medula óssea). O número de criptas observado no grupo GIV ($12,67 \pm 7,05$) foi significativamente maior que nos grupos GV ($5,00 \pm 4,58$; $p=0,03$) e GVI ($5,39 \pm 8,75$; $p=0,04$). O número de FCA no grupo GIV ($8,75 \pm 3,55$) também foi maior que nos grupos GV ($3,18 \pm 2,99$; $p=0,0004$) e GVI ($2,46 \pm 2,79$; $p<0,0001$), assim como o número de FCA com menos de 5 criptas por foco no grupo GIV ($8,42 \pm 3,45$) comparado aos grupos GV ($3,18 \pm 2,99$; $p=0,0006$) e GVI ($2,31 \pm 2,53$; $p<0,0001$). Houve decréscimo da genotoxicidade e espécies reativas de oxigênio (EROS) em cólon proximal, cólon distal e fígado com ambas doses de GA ($p<0,01$). Na medula óssea, houve redução da genotoxicidade com GA 2,5% ($p<0,001$) e 5% ($p<0,01$) e redução da formação de EROS no sangue com GA 5% ($p<0,001$). A GA exerceu ação inibitória da carcinogênese colorretal com redução da formação de criptas aberrantes, genotoxicidade e estresse oxidativo locais e sistêmicos.

Palavras-chave: Goma Arábica. Neoplasias Colorretais. Testes de Mutagenicidade. Estresse Oxidativo. Camundongos.

ABSTRACT

ANTIOXIDANT AND ANTIGENOTOXIC ACTIONS OF GUM ARABIC ON THE INTESTINAL MUCOSA, LIVER, BONE MARROW AND BLOOD OF SWISS MICE SUBJECTED TO COLORECTAL CARCINOGENESIS BY AZOXYMETHANE. ANDRÉ LUÍS NUNES AVELINO. Post-Graduation *strictu sensu*, Department of Surgery, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará (Master's degree in Medical-Surgical Sciences). 2020. Advisor: Profa. Dra. Conceição Aparecida Dornelas.

Colorectal carcinoma is one of the most frequent neoplasms characterized by the formation in its early stages of aberrant crypts. Gum arabic (GA) is a natural product with antioxidant and anti-inflammatory properties. The objective of this study was to evaluate the effects of GA on the formation of aberrant crypts, on the genotoxicity and local and systemic oxidative stress of Swiss mice submitted to colorectal carcinogenesis by azoxymethane (AOM). The study included 3 control groups (I-III) and 3 experimental groups (IV-VI): GI-water, GII-GA 2.5%, GIII-GA 5%, GIV- AOM + water, GV- AOM + GA 2.5%, GVI-AOM + GA 5%. Once a week, for 2 weeks, the animals in the control groups received saline (ip) and those in the experimental groups received AOM (ip). Over the next 12 weeks, the mice received water, GA 2.5% or GA 5% via gavage. At the end, the colon was evaluated by stereoscopic microscopy to determine the number of aberrant crypts, aberrant crypt foci (FCA) and crypts by focus (multiplicity) by colon segment, in addition to the collection of material for the study of genotoxicity and stress oxidative (proximal and distal colon, liver, blood and bone marrow). The number of crypts observed in the GIV group (12.67 ± 7.05) was significantly higher than in the GV (5.00 ± 4.58 ; $p = 0.03$) and GVI (5.39 ± 8.75 ; $p = 0.04$). The number of FCA in the GIV group (8.75 ± 3.55) was also higher than in the GV groups (3.18 ± 2.99 ; $p = 0.0004$) and GVI (2.46 ± 2.79 ; $p < 0.0001$), as well as the number of FCA with less than 5 crypts per focus in the GIV group (8.42 ± 3.45) compared to the GV groups (3.18 ± 2.99 ; $p = 0.0006$) and GVI (2.31 ± 2.53 ; $p < 0.0001$). There was a decrease in genotoxicity and reactive oxygen species (EROS) in the proximal colon, distal colon and liver with both GA doses ($p < 0.01$). In the bone marrow, there was a reduction in genotoxicity with GA 2.5% ($p < 0.001$) and 5% ($p < 0.01$) and a reduction in the formation of EROS in the blood with GA 5% ($p < 0.001$). GA exerted an inhibitory action on colorectal carcinogenesis by reducing the formation of aberrant crypts, genotoxicity and local and systemic oxidative stress.

Keywords: Arabic Gum. Colorectal Neoplasms. Mutagenicity Tests. Oxidative Stress. Mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Anatomia do intestino grosso.....	23
Figura 2	– Exemplos de FCA em mucosa colônica.....	37
Figura 3	– Desenho experimental.....	46
Figura 4	– Gavagem.....	47
Figura 5	– Aplicação do carcinógeno.....	48
Figura 6	– Soluções de água destilada e GA.....	48
Figura 7	– Laparotomia exploradora.....	49
Figura 8	– Coleta de sangue da aorta abdominal.....	50
Figura 9	– Preparo do cólon.....	50
Figura 10	– Cólon corado com azul de metileno.....	51
Figura 11	– Foco de criptas aberrantes.....	51
Figura 12	– Coleta da medula óssea.....	52
Figura 13	– Tipos de cometas corados com brometo de etídio e visualizados ao microscópio de fluorescência.....	54
Figura 14	– Camundongos com rarefação de pelos próximo ao focinho.....	58
Figura 15	– Esteatose hepática em camundongo do grupo GIV.....	66
Figura 16	– Inflamação peritubular em camundongo do grupo GV.....	66
Figura 17	– Ausência de criptas aberrantes na microscopia óptica.....	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Taxas de incidência estimadas por sexo para 2020 no estado de Ceará, Brasil, e na capital Fortaleza.....	19
Gráfico 2	– Número de criptas aberrantes considerando toda extensão do cólon...	61
Gráfico 3	– Número de FCA considerando toda extensão do cólon.....	62
Gráfico 4	– Número de FCA com até 5 criptas aberrantes considerando toda extensão do cólon.....	64
Gráfico 5	– Número de FCA com mais de 5 criptas aberrantes considerando toda extensão do cólon.....	65
Gráfico 6	– Ensaio do cometa neutro em cólon proximal.....	68
Gráfico 7	– Ensaio do cometa alcalino em cólon proximal.....	68
Gráfico 8	– Ensaio do cometa alcalino com hOGG1.....	69
Gráfico 9	– EROS em cólon proximal.....	69
Gráfico 10	– Ensaio do cometa neutro em cólon distal.....	70
Gráfico 11	– Ensaio do cometa alcalino em cólon distal.....	70
Gráfico 12	– Ensaio do cometa alcalino com hOGG1 em cólon distal.....	71
Gráfico 13	– EROS em cólon distal.....	71
Gráfico 14	– Ensaio do cometa neutro no fígado.....	72
Gráfico 15	– Ensaio do cometa alcalino no fígado.....	72
Gráfico 16	– Ensaio do cometa alcalino com hOGG1 em fígado.....	73
Gráfico 17	– EROS em fígado.....	73
Gráfico 18	– Ensaio do cometa alcalino em sangue.....	74
Gráfico 19	– Teste do micronúcleo no sangue.....	74
Gráfico 20	– EROS no sangue.....	75
Gráfico 21	– Ensaio do cometa alcalino em medula óssea.....	76
Gráfico 22	– Teste do micronúcleo na medula óssea.....	76
Gráfico 23	– Relação entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos da medula óssea.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma.....	17
Tabela 2	– Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Nordeste do Brasil estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma.....	18
Tabela 3	– Peso corporal final e ganho de peso percentual por grupo.....	59
Tabela 4	– Peso dos órgãos em percentual do peso corporal total.....	60
Tabela 5	– Número de criptas aberrantes observado nos grupos GIV, GV e GVI, conforme o segmento do cólon: proximal, médio e distal...	61
Tabela 6	– Número de FCA nos grupos GIV, GV e GVI, de acordo com o segmento do cólon: proximal, médio ou distal.....	62
Tabela 7	– Número de FCA com até 5 criptas nos grupos GIV, GV e GVI comparando-se os diferentes segmentos colônicos.....	63
Tabela 8	– Número de FCA com mais de 5 criptas nos grupos GIV, GV e GVI comparando-se os diferentes segmentos colônicos.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS/SÍMBOLOS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
8-oxoGua	8-oxoguanina
Akt	Proteína quinase B
AOM	Azoximetano
BSA	Albumina do soro bovino
CAT	Catalase
CCR	Carcinoma colorretal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Experimentação Animal
DCFH	Diclorofluoresceína
DFC	2'7'- diclorohidrofluoresceína
DMH	1,2-dimetilhidrazina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ENC	Eritrócitos normocromáticos
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FCA	Focos de criptas aberrantes
GA	Goma arábica
GPx	Glutathione Peroxidase
GSK-3β	Quinase 3 Beta glicogênio sintetase
H₂DCFDA	Diacetato 2'7'- diclorodihidrofluoresceína
HE	Hematoxilina e Eosina
HO\cdot	Radical hidroxil
hOGG1	8-oxoguanina-DNA-N-glicosilase 1 humana
ID	Índice de danos
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IL-6	Interleucina 6
Ip	Intraperitoneal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade

MAM	Metilazoximetanol
MNs	Micronúcleos
Na₂EDTA	Etilenodiaminotetra-acetato dissódico di-hidratado
NFκB	Fator nuclear kappa B
Nm	Nanômetro
O6-MEG	O6-metilguanina
ONOO[•]	Peroxinitrito
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCE	Eritrócitos policromáticos
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
ROO[•]	Radical peroxil
Rpm	Rotação por minuto
RSK	Quinase ribossômica S6
SF	Solução salina
SOD	Superóxido dismutase
TCF	Fator de célula T
TNF-α	Fator de necrose tumoral Alfa
TNF-β	Fator de transformação do crescimento Beta
UFC	Universidade Federal do Ceará
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Carcinoma colorretal	15
1.2	Anatomia e histologia do intestino grosso	22
1.3	Anatomia comparada do cólon humano e dos camundongos	24
1.4	Carcinogênese química experimental colorretal e o azoximetano	26
1.5	Estresse oxidativo e Espécies Reativas de Oxigênio	29
1.6	Genotoxicidade	32
1.7	Teste do micronúcleo	34
1.8	Criptas aberrantes	35
1.9	Goma arábica	38
2	JUSTIFICATIVA / RELEVÂNCIA	43
3	OBJETIVOS	44
3.1	Objetivo geral	44
3.2	Objetivos específicos	44
4	MÉTODOS	45
4.1	Considerações éticas	45
4.2	Delineamento do experimento e modelo animal	45
4.3	Carcinógeno	47
4.4	Preparação da Goma arábica	48
4.5	Procedimento cirúrgico e avaliação macroscópica	49
4.6	Estudo das Criptas Aberrantes	51
4.7	Ensaio biológicos	52
4.7.1	Testes de avaliação da genotoxicidade	52
4.7.1.1	<i>Ensaio do cometa (cólon, fígado, sangue e medula óssea)</i>	52
4.7.1.2	<i>Ensaio do cometa alcalino modificado (medição da guanina oxidada)</i>	54
4.7.1.3	<i>Teste do micronúcleo em reticulócitos do sangue</i>	55
4.7.1.4	<i>Teste do micronúcleo da medula óssea e citotoxicidade medular</i>	55
4.7.2	Estresse oxidativo	56
4.7.2.1	<i>Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio intracelular (cólon, fígado e sangue)</i>	56
4.8	Análise estatística	56
5	RESULTADOS	58

5.1	Avaliação clínica.....	58
5.2	Mortalidade.....	58
5.3	Peso corporal final e ganho de massa corpórea.....	58
5.4	Peso dos órgãos.....	59
5.5	Número de criptas aberrantes.....	60
5.6	Focos de criptas aberrantes	61
5.7	Multiplicidade de criptas.....	63
5.8	Achados morfológicos.....	65
5.9	Ensaio biológicos.....	67
5.9.1	<i>Ensaio do cometa e detecção de EROS</i>	67
5.9.1.1	<i>Cólon proximal</i>	67
5.9.1.2	<i>Cólon distal</i>	69
5.9.1.3	<i>Fígado</i>	71
5.9.2	<i>Sangue (ensaio do cometa, teste do micronúcleo e EROS)</i>	73
5.9.3	<i>Medula óssea (ensaio do cometa e teste do micronúcleo)</i>	75
6	DISCUSSÃO	78
7	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	90
	APÊNDICE A – TABELA DOS PESOS DOS ANIMAIS/GRUPO	107
	APÊNDICE B – TABELA DE PESOS DOS ÓRGÃOS DOS ANIMAIS	108
	APÊNDICE C – TABELA DO NÚMERO DE CRIPTAS ABERRANTES POR SEGMENTO DO CÓLON POR ANIMAL	110
	APÊNDICE D – TABELA DO NÚMERO DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES (FCA) POR SEGMENTO DO CÓLON POR ANIMAL	112
	APÊNDICE E – TABELA DAS DOSES DAS SUBSTÂNCIAS ADMINISTRADAS	115
	ANEXO A – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	116
	ANEXO B – COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DA DIETA PADRÃO	117
	ANEXO C – DECLARAÇÕES DE PERIGO E PRECAUÇÃO DO AZOXIMETANO	118

**ANEXO D - ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO NA
REVISTA ANTICANCER RESEARCH..... 126**

**ANEXO E - DECLARAÇÃO DE RECEBIMENTO DO ARTIGO
PELA REVISTA PARA PUBLICAÇÃO..... 143**

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma colorretal

O câncer é uma desordem genética causada por mutações do *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) adquiridas espontaneamente ou induzidas por agressões do ambiente, comumente apresentando alterações epigenéticas, como a modulação focal da metilação do DNA. As modificações genéticas e epigenéticas alteram a expressão ou função de genes chave que regulam processos celulares fundamentais, entre os quais o crescimento, sobrevivência e senescência (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2018). Essas alterações quando acometem células germinativas são hereditárias e transmitidas para as células-filhas na divisão celular, de forma que o acúmulo de mutações origina as propriedades características do câncer. Estas incluem a autossuficiência nos sinais de crescimento (o crescimento dos cânceres se torna autônomo e não regulado por processos fisiológicos), a ausência de resposta aos sinais inibidores de crescimento que controlam as proliferações celulares fisiológicas, a evasão da morte celular (o que permite que as células neoplásicas resistam a apoptose), o potencial replicativo ilimitado, o desenvolvimento da angiogênese para suprir o crescimento das células, a propriedade de invadir tecidos locais e disseminar-se para sítios distantes, a reprogramação das vias metabólicas e a capacidade de escapar do sistema imune. As modificações genéticas que dão origem a essas características dos cânceres são sustentadas e permitidas pelo desenvolvimento da instabilidade genômica (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2018).

Os cânceres são, portanto, neoplasias malignas com capacidade de invadir, destruir estruturas adjacentes e se disseminar à distância (metástase). Sua nomenclatura depende do tecido do corpo que a originou. Aquelas que surgem em tecidos mesenquimais sólidos ou seus derivados são chamadas de sarcomas, enquanto as derivadas de células mesenquimais sanguíneas são chamadas de leucemias ou linfomas. Os sarcomas são denominados de acordo com o tipo celular de que são compostos, que é presumivelmente sua célula de origem. Assim, um câncer com origem no tecido fibroso é um fibrossarcoma, enquanto uma neoplasia maligna composta por condrócitos é um condrossarcoma (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2018). As neoplasias malignas das células epiteliais são chamadas de carcinomas, os quais por sua vez, são ainda subdivididos. Aqueles que crescem em padrão glandular são os adenocarcinomas, enquanto os que produzem células escamosas são chamados de carcinomas de células escamosas, por exemplo (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2018).

Dados do *Global Cancer Observatory* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018) apontam que o câncer é um problema de saúde pública global e uma das principais causas de morte no mundo. Só em 2018 foram diagnosticados mais de 18 milhões de casos novos e houve mais de 9 milhões de mortes em sua decorrência. A incidência vem crescendo, esperando-se que em 2020 tenha-se um aumento 5% no número de casos novos e de 5,2% nos índices de mortalidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Dentre as neoplasias malignas, excetuando os tumores de pele não melanoma, o carcinoma colorretal (CCR) representou a terceira neoplasia mais incidente no mundo em 2018 (1.849.518 casos novos - 10,2% do total), a segunda mais prevalente (4.789.635 casos - 10,9% do total, atrás apenas do câncer de mama) e a segunda principal causa de morte por câncer (880.792 óbitos - 9,2% do total, sendo superado apenas pelo carcinoma pulmonar) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). A expectativa é que até o final de 2020 tenha-se um aumento de 5,5% em sua incidência e de 5,3% na mortalidade por CCR. Os padrões diferem entre os sexos, com taxa de incidência de 23,6 casos novos para cada 100 mil homens e de 16,3 para cada 100 mil mulheres, prevalência de 19,5 casos entre 100 mil homens, 16 para 100 mil mulheres e índice de mortalidade de 19,7 óbitos para cada 100 mil indivíduos do sexo masculino e 8,9 em 100 mil pessoas do sexo feminino (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Quanto à distribuição do CCR no mundo, as taxas de incidência e mortalidade variam conforme o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), sendo identificados três padrões de distribuição da doença. No primeiro, nota-se aumento da incidência e mortalidade da doença em países que passaram por uma rápida transição econômica, entre eles o Brasil. Outro padrão é o aumento da incidência e diminuição da mortalidade em países com alto IDH, incluindo Canadá, Reino Unido, Dinamarca e outros países da Europa. E por fim, a diminuição de ambas as taxas nos países com IDH muito elevado, como Estados Unidos, Japão e França (ARNOLD *et al.*, 2016). Essa redução observada nesse último grupo de países é atribuída à melhoria no tratamento da doença e utilização de métodos de rastreamento precoce que permitem a remoção de lesões pré-malignas (LEVIN *et al.*, 2008; RENEHAN *et al.*, 2002). Entretanto, mesmo com essas modificações nos padrões de distribuição da doença, os países com maior IDH ainda são os que apresentam maiores taxas de incidência e mortalidade pelo CCR (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Nos Estados Unidos, as taxas de incidência entre homens e mulheres são semelhantes, apresentando declínio a partir do ano 2000 com a popularização dos exames colonoscópicos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020). Naquele país, em 2020, estima-se o

registro de 147.950 casos novos, sendo o CCR o terceiro tipo de neoplasia mais incidente em ambos sexos e representando a terceira maior mortalidade por câncer com 53.200 óbitos, ficando atrás em incidência e mortalidade do câncer de próstata e pulmão entre os homens e superado pela neoplasia de mama e pulmão entre as mulheres (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020).

No Brasil, em 2018, o CCR representou o terceiro tipo de neoplasia mais incidente (51.783 casos novos - 9,3% do total) com 21,1 casos para cada 100 mil homens e 18,6 casos em cada 100 mil mulheres. Além disso, foi o terceiro mais prevalente (126.812 casos - 9,7% do total) e o segundo com maior mortalidade (24.482 óbitos – 10,1% do total), atrás apenas do carcinoma de pulmão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Em 2020, a estimativa é que a incidência de CCR aumente no país, sendo o segundo tipo de neoplasia com maior número de casos novos em homens. A tabela 1 mostra a incidência dos principais tipos de câncer no Brasil.

Tabela 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%


Fonte: BRASIL, 2020

Entre as regiões brasileiras, o CCR em homens é o segundo mais frequente no Sudeste (28,62/100 mil) e Centro-Oeste (15,40/100 mil). Na região sul ocupa a terceira colocação (25,11/100 mil). Nas regiões Nordeste (8,91/100 mil) e Norte (5,27/100mil), está na quarta posição. Entre as mulheres, é o segundo mais frequente nas regiões Sudeste (26,18/100 mil) e Sul (23,65/100 mil). Já nas regiões Centro-Oeste (15,24/100 mil), Nordeste (10,79/100 mil) e Norte (6,48/100 mil) é o terceiro mais incidente (BRASIL, 2020).

Estudo realizado por Oliveira *et al.*, 2018 coletou dados sobre a mortalidade do CCR no Brasil entre 1996 e 2012 e apontou um aumento no número de óbitos pela neoplasia

nesse período especialmente no Norte e Nordeste do país, estando o Ceará entre os três estados com maior avanço da mortalidade nessas regiões. Isso pode se dever a transição demográfica e nutricional nestes locais caracterizada pela redução das desigualdades sociais que possibilitou à população ter mais acesso a alimentos industrializados e adoção de outros hábitos de vida como o sedentarismo. Com isso, houve um aumento da incidência do CCR no Norte e Nordeste e consequente maior mortalidade pela doença nessas regiões (OLIVEIRA *et al.*, 2018). A tabela 2 demonstra a proporção de casos de câncer mais incidentes na região Nordeste do Brasil em 2020.

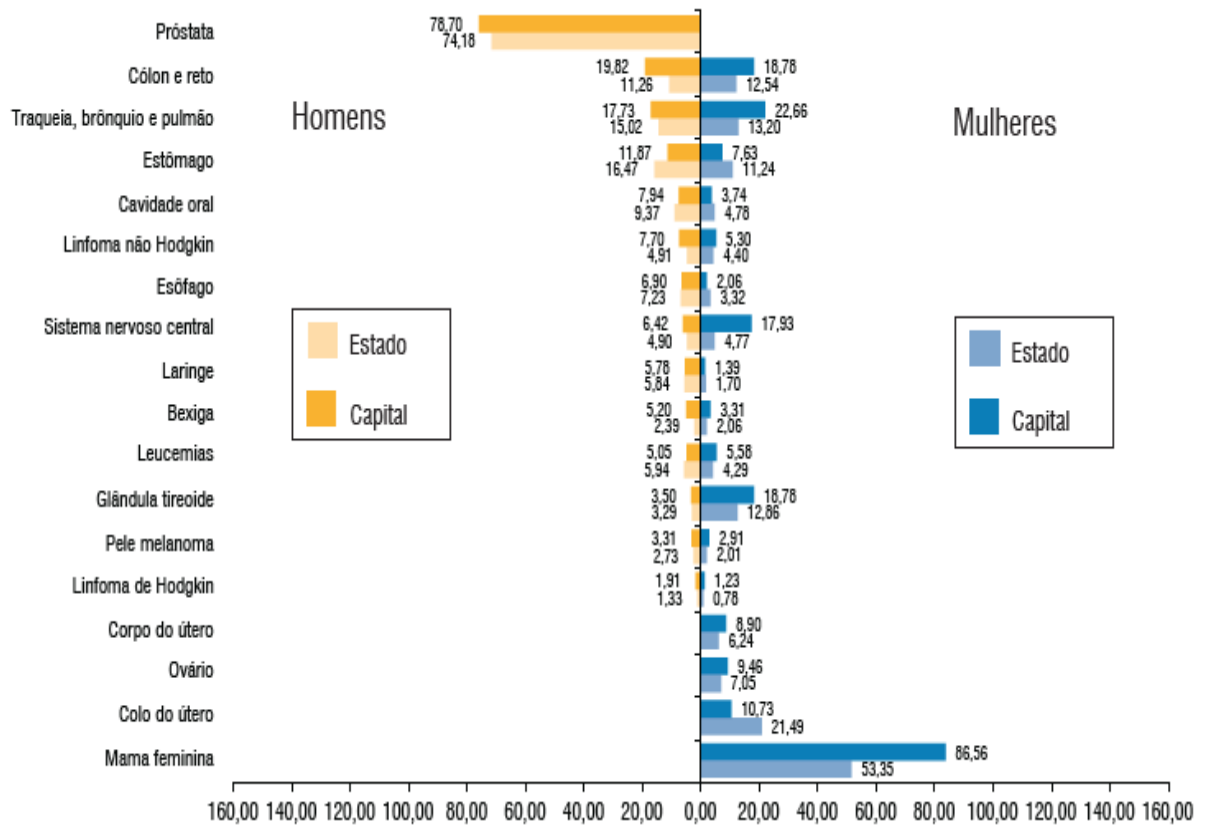
Tabela 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Nordeste do Brasil estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	20.570	40,7%	Homens	Mulheres	Mama feminina	13.190	27,3%
Traqueia, brônquio e pulmão	3.120	6,2%			Colo do útero	5.250	10,9%
Estômago	3.000	5,9%			Cólon e reto	3.220	6,7%
Cólon e reto	2.540	5,0%			Traqueia, brônquio e pulmão	2.640	5,5%
Cavidade Oral	2.180	4,3%			Glândula tireoide	2.360	4,9%
Esôfago	1.580	3,1%			Estômago	2.090	4,3%
Leucemias	1.430	2,8%			Ovário	1.690	3,5%
Laringe	1.420	2,8%			Corpo do útero	1.520	3,1%
Sistema nervoso central	1.340	2,7%			Sistema nervoso central	1.250	2,6%
Linfoma não Hodgkin	1.120	2,2%			Leucemias	1.210	2,5%

Fonte: BRASIL, 2020

No estado do Ceará, a estimativa é de 500 novos casos entre os homens e 590 casos entre as mulheres no ano de 2020 (gráfico 1).

Gráfico 1 - Taxas de incidência estimadas para 2020 por sexo no estado do Ceará, Brasil, e na capital Fortaleza



Legenda: valores por 100 mil habitantes.

Fonte: BRASIL, 2020

No que diz respeito ao tipo histológico da neoplasia colorretal, a maior parte dos cânceres são carcinomas e destes mais de 90% são adenocarcinomas, ou seja, originários das células glandulares da mucosa colorretal (HAMILTON *et al.*, 2010). Outros tipos raros de CCR incluem carcinoma de células neuroendócrinas, carcinoma de células escamosas, carcinoma adenoescamoso, de células fusiformes e carcinomas indiferenciados. O adenocarcinoma convencional é caracterizado por formação glandular, que é a base para a classificação histológica do tumor. No adenocarcinoma bem diferenciado, mais de 95% do tumor é formado por glândulas, o moderadamente diferenciado mostra 50-95% e o adenocarcinoma pouco diferenciado é em grande parte sólido apresentando menos de 50% de formação glandular. Na prática, a maioria dos adenocarcinomas colorretais (aproximadamente

70%) são moderadamente diferenciados. Os bem e pouco diferenciados representam 10% e 20% respectivamente (FLEMING *et al.*, 2012).

Quando se trata de fatores de risco, o CCR é uma doença multifatorial influenciada por aspectos genéticos, ambientais e relacionados ao estilo de vida (BOYLE; LEON, 2002; SANDLER, 1996). Os fatores ligados aos hábitos de vida são modificáveis e incluem o consumo de bebidas alcoólicas, a baixa ingestão de frutas e vegetais, o alto consumo de carnes vermelhas e de alimentos processados, a obesidade, tabagismo e o sedentarismo (BOUVARD *et al.*, 2015; FEDIRKO *et al.*, 2011; HARRISS *et al.*, 2009; WALTER *et al.*, 2014). A adoção desses costumes da vida ocidental em países como o Brasil são importantes no aumento da incidência da doença nas últimas décadas (ARNOLD *et al.*, 2016).

Outro ponto relevante é a percepção que o risco de desenvolver CCR aumenta com a idade, sendo a grande maioria diagnosticada após os 50 anos. A idade média de diagnóstico do câncer localizado no cólon é aos 68 anos para homens e 72 para mulheres. Com relação ao sexo, as taxas de incidência e mortalidade são maiores entre os homens. As razões para a disparidade entre gêneros não são totalmente compreendidas, mas refletem diferenças nas exposições a fatores de risco, por exemplo, cigarro e bebida alcoólica e aos hormônios sexuais, bem como interações complexas entre esses fatores. No que diz respeito a grupos étnicos, os negros e hispânicos são os mais e menos afetados, respectivamente (MURPHY *et al.*, 2011).

Quando a doença é descoberta em sua fase inicial, as chances de cura são maiores. Dessa forma, é recomendada a utilização de exames complementares para detecção precoce da neoplasia. Esse rastreio é indicado para a população geral a partir dos 50 anos e para indivíduos de alto risco a partir dos 40 ou menos de 10 anos da idade na qual o parente mais jovem foi diagnosticado. O rastreio termina aos 75 anos ou em pessoas com expectativa de vida menor que 10 anos (QASEEM *et al.*, 2012). De acordo com as últimas diretrizes da *American Cancer Society* em 2019, os principais exames utilizados para rastreio do CCR são a pesquisa de sangue oculto nas fezes (anual), retossigmoidoscopia flexível, colonografia por tomografia computadorizada (a cada 5 anos) ou colonoscopia (a cada 10 anos). Diante de qualquer resultado anormal, deverá ser feita colonoscopia caso este não tenha sido o exame inicial. Em pacientes com risco aumentado de câncer, o rastreio deve seguir protocolos individuais a depender de cada condição predisponente, o que inclui história familiar ou pessoal de câncer de cólon, diagnóstico de pólipos, doença inflamatória intestinal, Polipose Adenomatosa Familiar, síndrome de Lynch ou história de irradiação do abdômen ou pelve

para tratamento de câncer prévio (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

A maioria dos pacientes com CCR em estágio inicial são assintomáticos, diagnosticados como resultado da triagem. Os que apresentam sintomas são tipicamente devidos ao crescimento do tumor no lúmen ou estruturas adjacentes, e como resultado, a apresentação sintomática geralmente reflete uma doença relativamente avançada. Entre os pacientes sintomáticos, as manifestações clínicas também diferem dependendo da localização do tumor (MACRAE; BENDELL, 2018). Os tumores do lado esquerdo estão mais associados a mudança no hábito intestinal e hematoquezia (MACRAE; BENDELL, 2018), enquanto as lesões à direita se relacionam a perda sanguínea não reconhecida pelo paciente e anemia por deficiência de ferro (GOODMAN; IRVIN, 1993). A dor abdominal pode ocorrer com tumores que surgem em todos os locais, podendo ser relacionada a obstrução ou perfuração intestinal. A lesão retal, por sua vez, está principalmente associada a tenesmo, dor retal e calibre diminuído das fezes (MACRAE; BENDELL, 2018). O CCR pode ser suspeitado se houver um ou mais dos sintomas e sinais descritos acima ou pode ser assintomático e descoberto por exames de triagem. Para o diagnóstico definitivo, é necessário que seja feita biópsia com exame histopatológico, a qual é geralmente obtida por colonoscopia (MACRAE; BENDELL, 2018).

Percebe-se que as neoplasias do lado esquerdo do cólon são mais prevalentes, enquanto as do lado direito cursam normalmente com maior tamanho tumoral, maior número de linfonodos comprometidos e maior idade de acometimento. Por consequência, têm pior prognóstico uma vez que, como esse segmento do intestino tem maior diâmetro, o tumor leva mais tempo para causar sintomas, sendo diagnosticado em um estado mais avançado (MIK *et al.*, 2017).

No que diz respeito ao tratamento, conforme o *National Cancer Institute* (2019), a escolha da modalidade terapêutica depende de vários fatores, incluindo a saúde do paciente, o tamanho do tumor e sua localização. A cirurgia é a opção de tratamento mais comum sendo que o tipo de intervenção a ser utilizada depende de variáveis como a localização do câncer e a existência e extensão de metástases (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2019). Se a neoplasia é encontrada apenas em um único pólipó, pode ser removida durante uma colonoscopia, no entanto, se já afetou uma área maior, a ressecção intestinal pode ser necessária. Outras formas de tratamento incluem ablação por radiofrequência, criocirurgia, quimioterapia ou radioterapia (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2019).

Quanto à expectativa de vida, a neoplasia apresenta sobrevida relativa de 5 anos em torno de 65% e 58% em 10 anos após o diagnóstico (HOWLADER *et al.*, 2016). A

sobrevida também varia com base na localização do tumor no cólon, sendo maior em pacientes com tumores distais (69%) quando comparada aqueles com tumores proximais (65%), devido a uma maior dificuldade de diagnóstico nestes últimos. O prognóstico também é melhor em pacientes mais jovens; a sobrevida em 5 anos é de 69% nos menores de 65 anos se comparada a 62% naqueles com 65 anos ou mais (SIEGEL *et al.*, 2017). O CCR diagnosticado em estágio localizado (39% dos pacientes) apresenta taxa de sobrevida em 5 anos de 90%, a qual declina para 71% e 14% entre os pacientes diagnosticados com doença regional e metastática, respectivamente (HOWLADER *et al.*, 2016).

Tendo em vista esses índices de sobrevida e a alta incidência e mortalidade decorrente do CCR, é fundamental que se melhorem as formas de tratamento dos casos não responsivos às modalidades terapêuticas atuais. Além disso, é indispensável a necessidade de se trabalhar a prevenção da doença, por exemplo, por meio do incentivo aos hábitos de vida saudável e da pesquisa por novas substâncias que possam evitar o desenvolvimento desse tipo de câncer.

1.2 Anatomia e histologia do intestino grosso

O intestino grosso constitui a porção terminal do tubo digestivo e têm como principal função absorver água dos restos dos alimentos digeridos e formar a massa fecal. É composto pelo ceco, cólon, reto e canal anal (MOORE; DALLEY, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

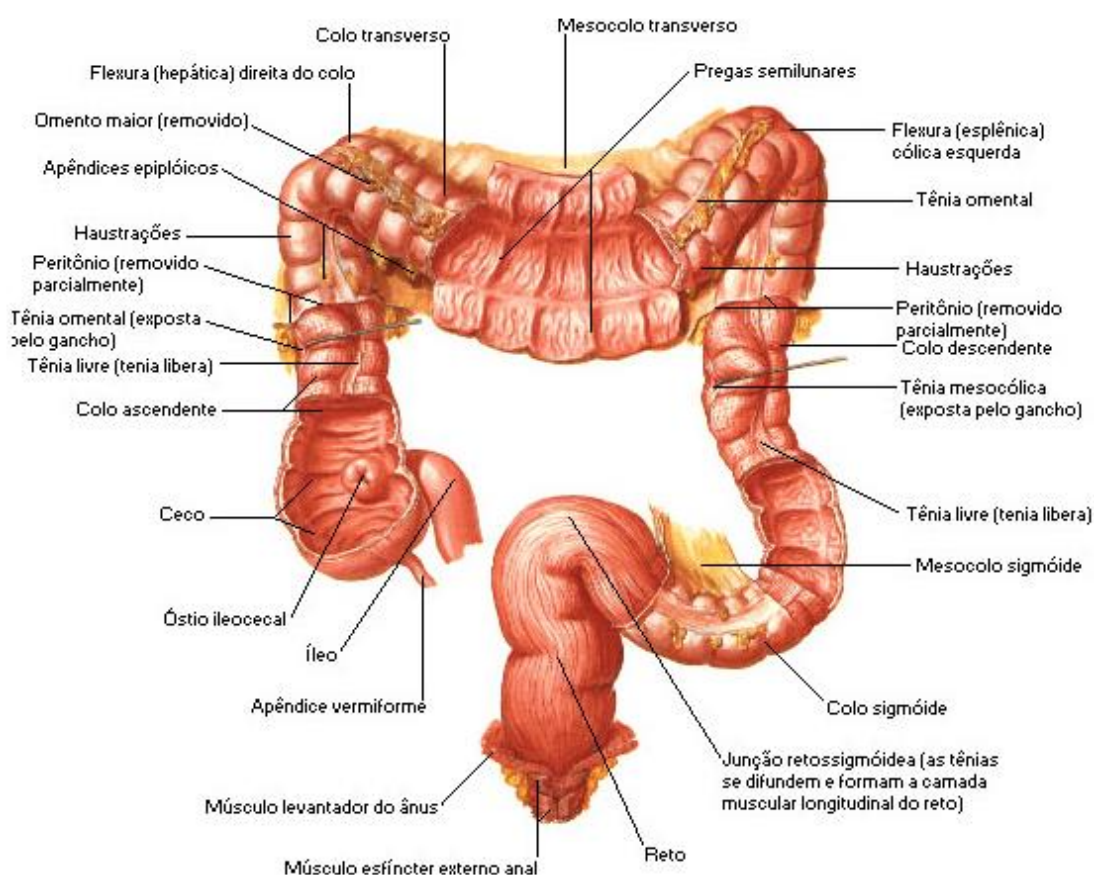
O ceco é a primeira parte do intestino grosso, é uma bolsa cega medindo aproximadamente 7,5 cm situado na fossa ilíaca direita. A ele está aderido o apêndice que é um divertículo do intestino originado na face pósteromedial junto à junção ileocecal, medindo entre 6 e 10 cm (MOORE; DALLEY, 2001).

O cólon é dividido em quatro partes – ascendente, transversa, descendente e sigmoide – que se sucedem em um arco. O cólon ascendente passa para cima no lado direito da cavidade abdominal a partir do ceco até o fígado onde se curva para direita (flexura hepática). Ele é mais estreito que o ceco e está localizado no retroperitônio. O cólon transversa é a parte mais larga e móvel do intestino grosso, cruza o abdômen transversalmente a partir da flexura hepática até a flexura esplênica onde se curva inferiormente para se tornar o cólon descendente. Este, por sua vez, passa retroperitonealmente a partir da flexura esquerda do cólon até a fossa ilíaca esquerda onde se continua com o sigmoide. O cólon sigmoide é caracterizado pela sua alça em formato de “S”, tem comprimento variável (normalmente cerca

de 40 cm), une o cólon descendente ao reto, e estende-se da fossa ilíaca até o nível da terceira vértebra sacral. A terminação das tênias do cólon, aproximadamente a 15 cm do ânus, indica a junção retossigmoide (MOORE; DALLEY, 2001).

O reto representa a junção do sigmoide com o canal anal, é a parte terminal fixa do intestino grosso. Neste ponto, as tênias do cólon sigmoide se espalham para formar uma lâmina longitudinal externa contínua de músculo liso e os apêndices omentais são descontinuados. Ele termina ântero-inferiormente à ponta do cóccix curvando-se para formar a flexura anorretal e à medida que perfura o diafragma pélvico, torna-se o canal anal. Este, por sua vez, é a parte terminal do intestino grosso que começa onde a ampola retal se estreita em forma de “U” formada pelo músculo puborretal e termina no ânus que é a abertura externa do trato gastrointestinal (MOORE; DALLEY, 2001). A figura 1 demonstra a anatomia geral do cólon.

Figura 1 – Anatomia do intestino grosso



Fonte: NETTER, 2003.

Todos os componentes do trato digestivo apresentam certas características estruturais em comum. Trata-se de um tubo formado internamente por uma luz, ou lúmen,

cujo diâmetro é variável, circundado por uma parede composta por quatro camadas que são a mucosa, submucosa, muscular e serosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A mucosa é constituída por três camadas. A mais interna, que é o revestimento epitelial, a intermediária, que é a lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos, linfáticos e células musculares lisas, algumas vezes apresentando também glândulas e por fim, a camada externa que é a muscular da mucosa, a qual separa a mucosa da submucosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A submucosa é formada por tecido conjuntivo ricamente vascularizado e pelo plexo nervoso submucoso (plexo de Meissner). Além de poder conter glândulas e tecido linfoide (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A camada muscular contém células musculares lisas orientadas em espiral, divididas em duas subcamadas. Na subcamada mais interna a orientação é geralmente circular e na externa é longitudinal. Entre elas, observa-se o plexo nervoso mioentérico (ou plexo de Auerbach) e tecido conjuntivo contendo vasos sanguíneos e linfáticos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A serosa é uma camada delgada de tecido conjuntivo frouxo rica em vasos sanguíneos, linfáticos e tecido adiposo, revestida por um epitélio pavimentoso simples, o mesotélio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O revestimento epitelial do trato digestivo tem como principais funções prover uma barreira seletivamente permeável entre o conteúdo do lúmen e os tecidos do organismo, facilitar o transporte e a digestão do alimento, absorver os produtos desta digestão e fabricar hormônios que regulam a atividade do sistema digestivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

As glândulas do intestino grosso são longas e caracterizadas pela presença de células caliciformes e absortivas, essas últimas são colunares apresentando microvilosidades curtas e irregulares. As fibras da camada muscular externa se unem para formar três bandas longitudinais espessas (tênias do cólon) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Tendo em vista esses conceitos básicos relacionados a morfologia do intestino grosso humano, é necessário ressaltar algumas diferenças e semelhanças deste órgão quando comparado ao de camundongos, animais utilizados em pesquisas científicas para estudo do CCR.

1.3 Anatomia comparada do cólon humano e dos camundongos

Sabe-se que os estudos sobre câncer humano são limitados por muitas

considerações éticas e práticas (RIVERA *et al.*, 2006). O modelo animal, por sua vez, representa uma alternativa eficaz por permitir o controle de condições experimentais, o monitoramento do desenvolvimento patológico e a obtenção de materiais suficientes com menores riscos éticos (PAN *et al.*, 2017). Além disso, constitui uma boa forma de estudar a biologia do desenvolvimento de doenças como o carcinoma, uma vez que permite testar hipóteses relacionando fatores ambientais à etiologia e à prevenção do câncer (BIRD; GOOD, 2000). Entre os modelos animais, os que utilizam roedores são os mais utilizados.

Fazendo um paralelo entre o intestino grosso do ser humano com o do camundongo, por exemplo, notam-se várias semelhanças como a estrutura geral do órgão, as camadas histológicas e as células constituintes. Entre as diferenças está o comprimento. Quando comparado relativamente ao peso corporal e tamanho dos indivíduos, o cólon do camundongo é proporcionalmente bem maior. Ambos possuem ceco sendo que nos roedores esta estrutura é relativamente grande, medindo 3 a 4 cm de comprimento, funcionando como um local de fermentação do alimento e podendo ser facilmente diferenciado do restante do órgão, enquanto que o humano mede cerca de 6 cm e tem menor importância na digestão (HUGENHOLTZ; DE VOS, 2018). Ambos possuem apêndice, mas só nos humanos nota-se uma clara identificação dele (SCHOLTENS *et al.*, 2012). Outra diferença é que o cólon humano é dividido em haustrações, diferente do órgão nos roedores que tem superfície externa lisa, ademais a mucosa dos camundongos é revestida por pregas com orientação em diferentes direções, ao passo que as do ser humano têm orientação única ao longo do órgão (TREUTING; VALASEK; DINTZIS, 2012). Também se sabe que a velocidade de trânsito intestinal é cerca de 10 vezes maior nos roedores, os quais também têm o metabolismo aproximadamente 7 vezes mais acelerado (HUGENHOLTZ; DE VOS, 2018). Outro ponto é que a camada de muco que reveste a mucosa dos humanos é mais espessa e se renova mais rapidamente, porém a capacidade de permitir a passagem de substâncias é semelhante nos dois seres (GUSTAFSSON *et al.*, 2011).

Apesar de haver algumas diferenças do aparelho digestivo dos humanos, as vantagens de usar roedores em pesquisas atraíram muitos cientistas, já que são animais pequenos, fáceis de manter em grande número, com anatomia e fisiologia semelhantes a humana e que podem ser usados como modelos para o estudo de doenças. Assim, diante das vantagens apresentadas e semelhanças com o intestino humano, o modelo experimental com camundongos representa uma boa alternativa no estudo da carcinogênese colorretal.

1.4 Carcinogênese química experimental colorretal e o azoximetano

A carcinogênese e o desenvolvimento do CCR são processos que se desenvolvem em múltiplos estágios, caracterizados por mudanças progressivas na quantidade ou atividade de proteínas que regulam a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, e que são mediadas por mecanismos genéticos. Uma sequência ordenada de eventos não aleatórios leva ao desenvolvimento do câncer colorretal, no qual o epitélio é submetido a modificações progressivas do tecido intestinal normal para o desenvolvimento do carcinoma invasivo (AGUILAR *et al.*, 2005; BIRD; GOOD, 2000; HISAMUDDIN; YANG, 2006; JUCA *et al.*, 2008; MENEZES *et al.*, 2010).

O estudo da carcinogênese colorretal em roedores tem longa história, datando de quase um século, sendo que, atualmente, os principais carcinógenos utilizados nos modelos experimentais são a 1,2-dimetil-hidrazina (DMH) e o azoximetano (AOM) (CORPET; PIERRE, 2005; MADARA *et al.*, 1983; PERSE; CERAR, 2007; ROSENBERG; GIARDINA; TANAKA, 2009). O AOM é um agente alquilante, metabólito hepático da DMH classificado como um indutor direto da neoplasia e considerado um eficiente carcinógeno colorretal (PÉREZ-HOLANDA *et al.*, 2008).

Na medicina, os compostos alquilantes, como a temozolomida, são utilizados para o tratamento do câncer, entre os quais os gliomas. Têm seu mecanismo de ação baseado na metilação de bases de guanina e indução da apoptose das células tumorais pelos genes de reparo do DNA. Entretanto, seu uso contínuo acaba resultando na mutação desses genes de reparo, reduzindo a apoptose tumoral e levando à resistência ao quimioterápico. Outros agentes alquilantes como o AOM e DMH são utilizados em modelos experimentais com o objetivo oposto ao utilizado no ser humano, ou seja, como indutor tumoral. Esses efeitos bem distintos estão relacionados à diferença na dose utilizada, intervalo entre elas e tempo de uso (READ *et al.*, 2017). A tumorigênese colônica induzida por AOM ou DMH é o modelo de carcinogênese mais usado em animais para estudar o CCR (ROSENBERG; GIARDINA; TANAKA, 2009).

A utilização do AOM como indutor da carcinogênese colorretal de camundongos tem documentação na literatura sendo que sua administração intraperitoneal em roedores causa tumores principalmente no cólon distal. Isto pode ser conseguido com facilidade e confiabilidade em ratos (e menos comumente em camundongos, apesar de também ser utilizado). Com este tratamento, as células epiteliais colônicas sofrem patogênese, desenvolvendo inicialmente focos de criptas aberrantes (FCA), a seguir o adenoma e por fim

o adenocarcinoma (O'TOOLE; PEGG; SWENBERG, 1993; TAKAHASHI; WAKABAYASHI, 2004), de forma que a dose de 10 mg/kg é capaz de induzir a carcinogênese em 80% dos camundongos expostos (BISSAHOYO *et al.*, 2005).

Na década de 80, Bird (1987) demonstrou a formação de criptas aberrantes na mucosa colônica de camundongos C57BL/6J e CFl submetidos ao AOM intraperitoneal na dose de 5 mg/kg, 1 vez por semana, durante 4 semanas. Mais recentemente, Yu *et al.* (2015) também observaram lesões pré-neoplásicas em camundongos A/J que receberam AOM, além do aumento de citocinas pró-inflamatórias, como o *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6). Somados a essas referências, outros estudos atestaram a eficácia do AOM na indução da carcinogênese colorretal em camundongos, principalmente quando administrado por via intraperitoneal nas doses de 5 a 15 mg/kg e por tempo variável de 1 a 8 semanas (CENESIZ *et al.*, 2008; HATA *et al.*, 2004; MADRIGAL-BUJAJIDAR *et al.*, 2013; MCLELLAN; BIRD, 1988; PAPANIKOLAOU *et al.*, 1998).

Esse processo de carcinogênese tem início com o estresse oxidativo provocado pelo AOM levando a formação de peróxidos lipídicos e outras espécies reativas de oxigênio (EROS) (AL-NUMAIR *et al.*, 2011; ANILAKUMAR *et al.*, 2010; WALY *et al.*, 2014) e consequente indução de genotoxicidade e formação do câncer (GOLDMAN; SHIELDS, 2003). A carcinogênese induzida pelo AOM apresenta características moleculares comparáveis e segue a mesma progressão daquela que acontece em humanos (ROBLES-ESPINOZA; ADAMS, 2014).

O AOM não interage diretamente com o DNA, tem que ser ativado “in vivo” para desenvolver a carcinogênese. Ele é metabolizado pelo citocromo P450, especificamente a isoforma 2E1 (SOHN, *et al.*, 2001), sendo o primeiro passo a hidroxilação do grupo metila para formar o metilazoximetanol (MAM), o qual por sua vez, se decompõe em formaldeído e em um agente alquilante altamente reativo, o metildiazônio. Este produto químico, causa alquilação do DNA a O6-MEG e O4-metil-timina (O'TOOLE, PEGG; SWENBERG, 1993). Essas mutações podem iniciar a tumorigênese por meio de vários genes chave nas vias de sinalização intracelular (CHEN; HUANG, 2009).

Vários caminhos de ativação foram revelados para explicar o mecanismo de formação do CCR induzido pelo AOM. Os mais conhecidos incluem o K-ras, β -catenina e o *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β) (CHEN; HUANG, 2009).

Na via K-ras, o AOM demonstrou causar uma mutação de guanina:citosina (G:C) para adenosina:timina (A:T) no códon 12 do gene K-ras (O'TOOLE, PEGG; SWENBERG, 1993). Essa mutação leva a ativação da proteína K-ras, a qual é uma pequena proteína G que

regula as vias de sinalização Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) / *Protein Kinase B* (Akt) e *Mitogen Activated Protein Kinases* (MAPK) relacionadas ao crescimento celular, a proliferação e o metabolismo da glicose intracelular (CHEN; HUANG, 2009).

No câncer de cólon humano a via PI3K / Akt encontra-se ativada em cerca de 20% dos pacientes (BACHMAN, *et al.*, 2004; ZHAO; VOGT, 2008; HAWTHORNE; YU, 2004). Ela aumenta a sobrevivência celular pela fosforilação de alvos moleculares, incluindo o *Nuclear Factor Kappa B* (NF κ B) e o *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-x1) (OZES *et al.*, 1999), além de bloquear o p53 inibindo a apoptose (TROTMAN; PANDOLFI, 2003). A via MAPK, por sua vez, promove carcinogênese através de proteínas alvo, como C-MYC, *Cyclic AMP Response Element-binding Protein* (CREB), *Ribosomal s6 Kinase* (RSK), Mcl1, p16, proteína do retinoblastoma (Rb) e ciclinas, na qual ocorre a superexpressão de promotores do ciclo celular (WANG *et al.*, 2000).

Outra via relacionada à formação do câncer é a da β -catenina, uma proteína oncogênica com importante papel na adesão celular. Ela se associa com a catenina ou alfa-catenina para se ligar ao citoesqueleto de actina, funcionando como um ativador co-transcricional de genes na via de sinalização Wnt. Na forma livre, associa-se às proteínas como axina e Apc, sendo fosforilada pela *Glycogen Synthase Kinase 3* (GSK-3 β) resultando em sua degradação (POLAKIS, 1999).

A mutação do gene Apc (encontrada em até 80% dos pacientes com câncer de cólon esporádico), leva a alteração da proteína correspondente de forma que a Apc não consegue se ligar a β -catenina para que seja degradada (ARNOLD *et al.*, 2004). Assim, a β -catenina livre combina-se ao fator de célula T para formar um complexo que ativa a transcrição de genes e induz a proliferação celular (KORINEK *et al.*, 1997).

Por fim, tem-se a via do TGF- β , o qual é um fator associado à inibição do crescimento celular, proliferação e progressão do ciclo celular, apresentando portanto, efeito antitumoral (EWEN *et al.*, 1993). Ele possui atividade reduzida em animais que foram submetidos ao AOM, uma vez que o carcinógeno inibe o TGF- β (CHEN; HUANG, 2009; GUDA *et al.*, 2003). Defeitos na sinalização TGF- β são encontrados em 20 a 30% dos pacientes com câncer de cólon (BISWAS *et al.*, 2004).

O TGF- β induz a apoptose através de algumas vias de sinalização. Na primeira delas, formam-se dímeros que se ligam ao seu receptor tipo 2. Este complexo então se associa e fosforila seu receptor tipo 1, o qual, por sua vez, causa a apoptose celular (CHACKO *et al.*, 2004; MONTENEGRO *et al.*, 2009). Em outra via, o receptor tipo 2 ativado se liga à proteína 6 de morte celular para induzir apoptose (XU; PASCHE, 2007).

As alterações histopatológicas no cólon dos camundongos induzidas pelo AOM são muito semelhantes às encontradas em seres humanos, incluindo formação de focos de criptas aberrantes (FCA), adenomas e adenocarcinoma (BOIVIN *et al.*, 2003).

Como mencionado anteriormente, o estresse oxidativo é um evento importante na carcinogênese colorretal. Ele faz parte das etapas iniciais desse processo, e caso não seja revertido, poderá induzir a genotoxicidade e consequentemente as alterações morfológicas que caracterizam o câncer (STONE *et al.*, 2014; CARINI *et al.*, 2017). Quanto maior a exposição do indivíduo a fatores de risco como toxinas, cigarro, álcool, estresse, inflamação e dieta rica em gorduras, maior será a produção de espécies reativas (STONE *et al.*, 2014; CARINI *et al.*, 2017).

1.5 Estresse oxidativo e Espécies Reativas de Oxigênio

O oxigênio tem papel fundamental na produção de energia para o metabolismo celular através da oxidação de compostos orgânicos (COMHAIR; ERZURUM, 2002). Na mitocôndria, ele sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água e energia. Essa reação é catalisada pela enzima citocromo oxidase, a qual controla a geração de radicais livres, impedindo sua produção excessiva. No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem às EROS, principalmente o superóxido, o peróxido de hidrogênio e a hidroxila, classe importante de radicais livres (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; KOURY; DONANGELO, 2003; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Além desse mecanismo de formação através das mitocôndrias, as EROS podem ser originadas a partir dos peroxissomos (organelas celulares cujo metabolismo envolve o consumo de oxigênio), citocinas inflamatórias e agentes externos como patógenos, radiações e compostos químicos (KLAUNIG; KAMENDULIS; HOCEVAR, 2010).

Quando em baixas concentrações, as EROS desempenham funções fisiológicas importantes, por exemplo em processos inflamatórios, representando uma significativa defesa contra patógenos, em situações que envolvem adesão celular, como embriogênese, diferenciação, reparo e cicatrização e na morte celular programada que regula o tempo de vida de células normais. Entretanto, quando em altas concentrações (estresse oxidativo) os efeitos das EROS são deletérios (VALKO *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidantes com predomínio da

formação de espécies reativas (BARBOSA *et al.*, 2010). O sistema antioxidante é formado por substâncias que, presentes em menor concentração que o substrato oxidável, são capazes de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz. Os antioxidantes podem agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres e espécies não-radicais, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade. Dessa forma, são capazes de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação dos radicais livres. Algumas importantes enzimas endógenas com função antioxidante são a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx), as quais agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Outro grupo importante de antioxidantes são os compostos de origem dietética, entre os quais destacam-se as vitaminas (α -tocoferol e β -caroteno, precursores das vitaminas E e A e o ácido ascórbico), minerais, compostos fenólicos e alguns minerais (zinco, cobre, selênio e magnésio) (BIANCHI; ANTUNES, 1999; VINCENT; INNES; VICENT, 2007).

Em situações de estresse oxidativo, as EROS em altas concentrações provocam lesões teciduais danificando organelas celulares, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, o que leva a alteração de suas estruturas e disfunção biológica (VALKO *et al.*, 2007). Além de fragmentação do DNA, as EROs podem causar o mau funcionamento do seu sistema de reparo, contribuindo para o desenvolvimento do câncer (SOSA *et al.*, 2013).

O dano oxidativo representa um dos principais mecanismos mutacionais, mas felizmente, a maior parte destas lesões são reparadas pelo próprio DNA sem causar repercussão clínica (FRAGA *et al.*, 1990; LU *et al.*, 2001).

Estudos sobre mutação sugerem que o estresse oxidativo crônico, especialmente o derivado da inflamação está relacionado à carcinogênese (HWANG; BOWEN, 2007). Nessa situação, os estímulos recebidos pelas células inflamatórias ocasionam aumento do metabolismo intracelular e consumo de oxigênio levando a uma maior produção de EROS (KLAUNIG; KAMENDULIS; HOCEVAR, 2010). Uma série de condições inflamatórias estão associadas à transformação celular neoplásica como por exemplo a relação entre a doença inflamatória intestinal e o CCR, a esofagite por refluxo e o adenocarcinoma de esôfago, hepatites virais e carcinoma hepático e infecção por *Helicobacter pylori* e adenocarcinoma gástrico (FEDERICO *et al.*, 2007). Em geral, quanto mais tempo a inflamação persistir, maior o risco de desenvolvimento do câncer. Essa relação se dá porque as células inflamatórias produzem mediadores como citocinas e metabólitos do ácido araquidônico que estimulam a formação de radicais livre recrutando mais células

inflamatórias que irão produzir mais espécies reativas criando um ciclo vicioso. As EROS, por sua vez, agem oxidando diretamente o DNA ou interferindo em seu mecanismo de reparo (FEDERICO *et al.*, 2007). Além disso, podem atuar em outras estruturas celulares como a membrana citoplasmática onde reagem com os fosfolipídios gerando aldeídos tóxicos entre os quais o malondialdeído (MDA), o qual altera a permeabilidade membranar induzindo a aderência de granulócitos ao endotélio que irão potencializar a inflamação. As EROS também ativam fatores nucleares como o NfKB, levando à produção de mais citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez, aumentam a inflamação (MARNETT; RIGGINS; WEST, 2003).

A cicloxigenase 2 (COX-2) é uma das principais enzimas envolvidas na inflamação e que tem relação com a carcinogênese. Ela atua através da síntese de prostaglandinas, encontrando-se superexpressa em vários tipos de câncer incluindo o CCR no qual desempenha papel importante no estímulo à angiogênese e ativação de oncogenes como o *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (HER-2/neu) e Wnt. (GATELY, 2000; GUPTA; DUBOIS, 2001; HOWE *et al.*, 2001).

O dano causado pelas EROS pode resultar em quebra da fita simples ou dupla do DNA, modificações de bases nitrogenadas e translocações. Caso essas alterações não sejam reparadas antes da replicação gênica, teremos como resultado instabilidade genômica, mutações e morte celular (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004; VALKO *et al.*, 2006), de forma que tecidos com alto índice proliferativo estão mais susceptíveis a esse dano genético (REDON *et al.*, 2010). Além disso, os radicais livres promovem a ativação de oncogenes, inativação de genes supressores tumorais e inibição da apoptose (FEDERICO *et al.*, 2007). Outro mecanismo de ação das EROS na carcinogênese é por meio da liberação de cálcio intracelular que leva à ativação de quinases (por exemplo a proteína C quinase e a proteína B quinase), as quais regulam uma variedade de funções celulares como a proliferação tecidual (KLAUNIG; KAMENDULIS; HOCEVAR, 2010).

Uma forma de se avaliar as EROS geradas intracelularmente é por meio da utilização do diacetato 2'7'- diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA). Essa substância entra nas células ao passar através das membranas celulares sendo hidrolisada por esterases intracelulares para formar a diclorofluoresceína (DCFH), não fluorescente. Esta, por sua vez, ao entrar em contato com as EROS é oxidada ao 2'7'- diclorohidrofluoresceína (DFC), altamente fluorescente (CROW, 1997; HEMPEL *et al.*, 1999). Quanto maior a quantidade de EROS formadas intracelularmente, maior a fluorescência do DCF (LEBEL; ISCHIOPOULOS; BONDY, 1992).

Vale lembrar que nesses processos oxidativos está envolvida uma ampla variedade de radicais livres, o que inclui não só moléculas derivadas do oxigênio, como também espécies reativas provenientes do metabolismo do nitrogênio. Entre essas espécies reativas estão os radicais peroxil (ROO^\bullet) e peroxinitrito (ONOO^\bullet), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) e o radical hidroxil (HO^\bullet). Sendo este último altamente reativo e o mais frequentemente encontrado (BARTOSZ, 2006; LU *et al.*, 2001).

Quando se fala nos tipos de lesão oxidativa do DNA, a mais comumente identificada é a 8-hidroxidesoxi-guanosina (8-OHdG), a qual é mutagênica e apresenta níveis elevados em alguns tipos de câncer como adenocarcinoma de próstata, carcinoma hepatocelular e adenocarcinoma colorretal (KONDO, *et al.*, 2000; MIYAKE *et al.*, 2004; TANAKA *et al.*, 2008). Por essas características, a 8-OHdG é usada como biomarcador para avaliar o nível de estresse oxidativo tecidual (KLAUNIG; KAMENDULIS; HOCEVAR, 2010). Além de neoplasias, também há relatos de que a 8-OHdG é encontrada em níveis elevados em pacientes com outras doenças como diabetes mellitus tipo 2, doença inflamatória intestinal e mal de Alzheimer, o que demonstra o papel do estresse oxidativo nessas condições (DING *et al.*, 2005; NAKAMURA; OSONOI; TERAUCHI, 2010; SLIWINSKA, *et al.*, 2016). O reparo da lesão é feito pela enzima DNA-N-glicosilase 1 humana (hOGG1), a qual faz a excisão de bases nitrogenadas alteradas (KORKMAZ; BUTUNER; ROGGENBUCK; 2018).

O AOM é um carcinógeno químico indutor do carcinoma colorretal cujo mecanismo de ação está diretamente envolvido com o estresse oxidativo (AL-NUMAIR *et al.*, 2011). Sua forma de atuação nesse processo está relacionada à geração de espécies reativas como o radical hidroxil que provoca peroxidação das membranas celulares com consequente formação de peróxidos lipídicos e outras EROS (ANILAKUMAR *et al.*, 2010). Além disso, o AOM causa diminuição da atividade de enzimas antioxidantes e possui efeito inflamatório que por si tem ação oxidante (AL-NUMAIR *et al.*, 2011). Ao provocar o estresse oxidativo, o AOM induz a genotoxicidade (WALY *et al.*, 2014).

1.6 Genotoxicidade

Genotoxina é uma substância química ou agente capaz de causar danos ao DNA ou cromossomo. Tal dano em uma célula germinativa tem o potencial de levar a alterações hereditárias (mutação germinativa). A modificação do DNA em uma célula somática pode resultar em uma mutação somática, e por sua vez, a uma transformação maligna (câncer).

Essas alterações do material genético representam um dos passos iniciais no desenvolvimento da carcinogênese e precede qualquer alteração histopatológica detectável (PHILLIPS; ARLT, 2009).

Com o objetivo de avaliar a genotoxicidade, foram desenvolvidos muitos testes “in vitro” e “in vivo” que são capazes de detectar danos no material genético. Estes ensaios são utilizados para avaliar a segurança de produtos químicos e para explorar o mecanismo de ação de substâncias cancerígenas conhecidas ou suspeitas (PHILLIPS; ARLT, 2009). A detecção e caracterização dessas alterações do DNA em tecidos humanos fornece pistas para a etiologia do câncer (PHILLIPS; ARLT, 2009). Entre os principais testes para detecção dessas alterações genômicas estão o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo.

O ensaio do cometa foi descrito pela primeira vez por Ostling e Johanson em 1984. A abordagem consistiu em analisar a migração do DNA de células embebidas em gel de agarose e submetidas a corrente elétrica após a lise das membranas celulares por detergente neutro. Sob tais condições, uma pequena fração do DNA do genoma se estende para o ânodo e forma a faixa eletroforética (a cauda do cometa) que pode ser visualizada com corantes fluorescentes. A imagem resultante se assemelha a um cometa em que a cabeça corresponde ao DNA preservado e a cauda ao material genético danificado que foi deslocado. Assim, a quantidade de DNA deslocado representa uma estimativa dos danos do material genético na célula (OSTLING; JOHANSON, 1984).

Uma modificação desta técnica (eletroforese alcalina, que é aplicada mais frequentemente na atualidade) foi proposta por Singh e colaboradores (1988). Em que, diferente do protocolo original, a lise foi realizada com detergentes, solução de alta força iônica e a eletroforese sob condições alcalinas ($\text{pH} > 13$). Como resultado, a mesma tendência foi observada (deslocamento de DNA lesionado) com uma maior sensibilidade na detecção de mais tipos de danos genômicos (SINGH *et al.*, 1988). Foi notado que o teste do cometa neutro detecta lesões mais severas do DNA (ruptura da dupla fita) (YASUHARA *et al.*, 2003) e o cometa alcalino, pelo pH alto, provoca a desnaturação do DNA, expondo as lesões na cadeia dupla e simples, aumentando a sensibilidade do teste (MOLLER, 2006).

Mesmo assim, certos tipos de danos são difíceis de detectar, já que o DNA pode se romper sem resultar em modificações notadas com o teste alcalino. No caso de dano oxidativo ao DNA, essas alterações podem ser melhor evidenciadas com o auxílio de endonucleases como a 8-oxoguanina DNA-N-glicosilase 1 humana (hOGG1) que reconhecem bases nitrogenadas oxidadas entre as quais a 8-oxoguanina (8-oxoGua), 8-hidroxidesoxi-guanosina (8-OHdG), e metilfapi-guanina do DNA tornando-as detectáveis (KORKMAZ; BUTUNER;

ROGGENBUCK; 2018; SMITH; O'DONOVAN; MARTIN, 2006). Assim, a adição dessa etapa enzimática aumenta ainda mais a sensibilidade e especificidade do ensaio cometa para medir danos oxidativos no DNA (COLLINS, 2014).

As principais vantagens do ensaio cometa são sua aplicabilidade a qualquer tipo de célula eucariótica, avaliação de células individuais, baixo custo de realização e pouco tempo necessário para obter resultados (SILVA *et al.*, 2000).

O ensaio cometa tem sido usado por exemplo, em pesquisas sobre carcinogênese colorretal. Estudos desenvolvidos por Lima *et al.* (2005), Bazo *et al.* (2002) e Moura *et al.* (2018) utilizaram esse teste para quantificação do dano ao DNA a partir da análise de células epiteliais colônicas ou sangue de ratos Wistar que receberam 1,2 dimetil-hidrazina subcutânea.

1.7 Teste do micronúcleo

O micronúcleo foi reconhecido no final do século XIX, quando Howell e Jolly encontraram pequenas inclusões no sangue retirado de gatos e ratos. As pequenas inclusões, denominadas corpos de Howell-Jolly, também são observadas nos eritrócitos do sangue de pacientes com anemia grave (HAYASHI, 2016). Sua quantificação foi descrita pela primeira vez em 1982, onde foi observado que sua frequência era maior na mucosa bucal de indivíduos fumantes (STICH; CURTIS; PARIDA, 1982).

Os micronúcleos são corpos extra-nucleares que contêm fragmentos cromossômicos danificados e/ou cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo após a divisão celular. A sua formação pode ser ocasionada por defeitos na maquinaria de reparo celular, pelo acúmulo de danos no DNA e por aberrações cromossômicas. Uma variedade de agentes genotóxicos pode induzir a formação de micronúcleos levando à morte celular, instabilidade genômica ou desenvolvimento do câncer (LUZHNA; KATHIRIA; KOVALCHUK, 2013). Eles são formados por material genético que foi perdido do genoma durante a mitose e ocorrem antes de qualquer mudança histopatológica tornar-se evidente, servindo portanto, como um marcador biológico que alerta para o risco de desenvolvimento do câncer (BLOCHING *et al.*, 2000). A sua formação resulta de uma lise na molécula de DNA dias ou semanas após a ação de carcinógenos refletindo a incidência de eventos genotóxicos sobre a mucosa (STICH; ROSIN, 1983).

A observação dos micronúcleos é especialmente facilitada em reticulócitos (hemácias jovens formadas após a expulsão do núcleo dos eritroblastos) que, por serem

células anucleadas, tornam os micronúcleos mais visíveis no citoplasma (KRISHNA; HAYASHI, 2000). A técnica do laranja de acridina descrita em 1990 por Hayashi *et al.* é amplamente utilizada para detecção dos micronúcleos. Seu princípio de utilização se dá pelo fato de que o laranja de acridina é um corante de alta afinidade por ácidos nucleicos que ao interagir com o DNA por intercalação emite fluorescência de cor amarela e ao reagir com o RNA emite luz vermelha. Dessa forma, sua utilização permite a identificação de eritrócitos jovens ricos em *Ribonucleic Acid* (RNA) (coloração vermelha) e micronúcleos constituídos por DNA (coloração amarela) (HAYASHI *et al.*, 1990).

A capacidade de identificar células com defeito cromossômico confere ao micronúcleo a propriedade de ser utilizado como marcador biológico da exposição a carcinógenos. Através de sua expressão, pode-se avaliar o grau de comprometimento da mucosa, como também a eficácia de protocolos de prevenção. Uma vantagem desse teste é sua capacidade de verificar, “in vivo”, o estado de uma mucosa que é simultaneamente exposta a carcinógenos, co-carcinógenos e antioxidantes – condição de difícil reprodução “in vitro” (ANDRADE *et al.*, 2005). Outra vantagem é a sua habilidade de mensurar de forma acurada e objetiva a frequência de defeitos no DNA. Além do mais, o micronúcleo aparece após o dano, antes de qualquer alteração pré-maligna clínica ou mesmo histológica (BENNER *et al.*, 1994; MAJER, *et al.*, 2001; STICH; ROSIN, 1983).

A determinação da taxa de micronucleação, mediante análise microscópica, tem proporcionado uma forma simples e rápida de estimar a presença de alterações cromossômicas nas células (MARTINS; BOSCHINI FILHO, 2003).

Na neoplasia colorretal, por exemplo, observa-se que a quantidade de micronúcleos é maior no sangue de pacientes com CCR ou pólipos neoplásicos quando se compara com os grupos controle (KARAMAN *et al.*, 2008). Ohyama *et al.* (2002) observaram aumento de micronúcleos no cólon de camundongos CD-1 que receberam 1,2 dimetil-hidrazina intraperitoneal.

Com o estabelecimento da genotoxicidade e progressão da carcinogênese, tem início o surgimento das alterações morfológicas no tecido. No caso do cólon, as criptas aberrantes (KHARE *et al.*, 2009).

1.8 Criptas aberrantes

A superfície do intestino compreende células epiteliais dispostas em vilosidades, na base das quais estão as criptas, onde se localizam as células-tronco que produzem as células

epiteliais (JANSEN, 2019). Um novo conceito recentemente descoberto relacionado às criptas é que, durante muitos anos, acreditava-se que as células-tronco das criptas originavam novas células, e estas, por sua vez, é que impulsionavam as células epiteliais em direção ao topo dos vilos. Entretanto, o que se percebeu é que, na verdade, as células epiteliais deslocam-se ativamente em direção ao ápice dos vilos por mecanismos de adesão celular (KRNDIJA *et al.*, 2019). As criptas intestinais representam, portanto, estruturas dinâmicas responsáveis pela renovação celular do epitélio intestinal cujo entendimento de sua fisiologia é importante para compreensão dos mecanismos de formação do carcinoma, já que é nelas onde a carcinogênese é iniciada.

A carcinogênese colônica, por sua vez, é caracterizada por um conjunto de eventos moleculares acompanhado por alterações histopatológicas que iniciam a partir de leves anormalidades crípticas arquiteturais e progridem para adenomas e eventualmente cânceres invasivos. Em modelos experimentais de carcinogênese colônica, os FCA são as primeiras anormalidades detectáveis e precedem os adenomas (KHARE *et al.*, 2009).

FCA são lesões focais da mucosa do cólon compostos por uma a várias criptas aumentadas, cuja formação é especificamente induzida por carcinógenos do cólon (BIRD, 1987; MCLELLAN; BIRD, 1988). São facilmente identificados em preparações coradas com azul de metileno sob microscópio de dissecação e são geralmente quantificadas em número por animal ou por cólon (BIRD, 1987, 1995; MCLELLAN; MEDLINE; BIRD, 1991). Os FCA foram descritos pela primeira vez por Bird (1987), a partir do exame da mucosa colônica de camundongos submetidos ao AOM sendo caracterizados pela presença de criptas maiores e mais escuras, epitélio espesso ligeiramente elevado, lúmen em forma de fenda e aumento do espaço pericríptico.

Em modelos animais experimentais, com o aumento da dose do carcinógeno, há aumento da quantidade de FCA, enquanto a maioria dos agentes quimiopreventivos reduz a incidência ou o crescimento deles (KHARE *et al.*, 2009). Os FCA são considerados, portanto, uma lesão precursora do carcinoma (lesão pré-neoplásica), servindo como marcador biológico do desenvolvimento da doença, teoria reforçada pela presença de displasia (SIU *et al.*, 1997; TAKAYAMA *et al.*, 1998), monoclonalidade (SIU *et al.*, 1999) e mutações genéticas (K-RAS, APC) (SMITH *et al.*, 1994).

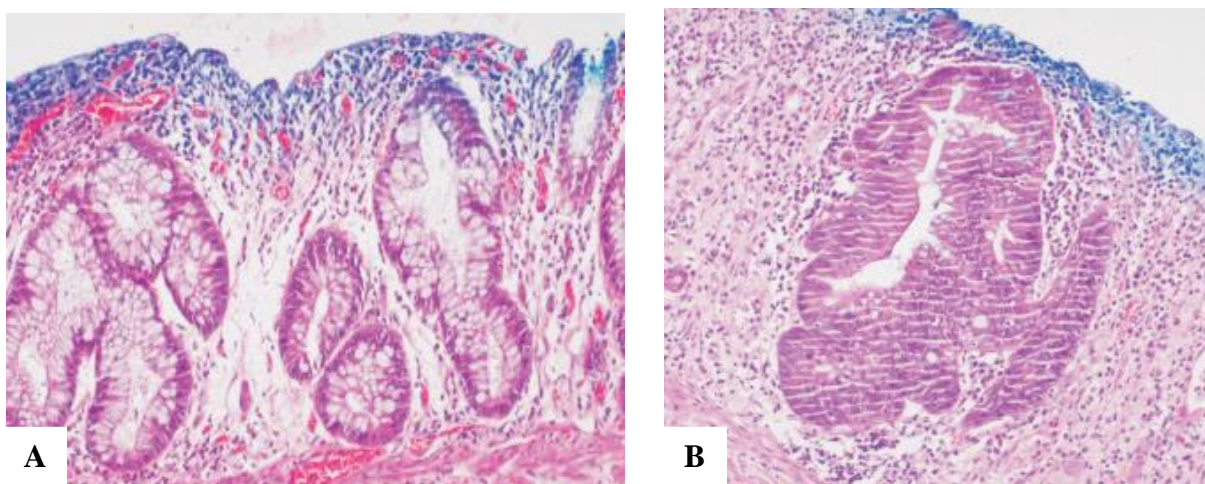
As alterações morfológicas das criptas aberrantes são compreendidas em dois grupos principais:

- FCA sem displasia: criptas maiores ou mais largas que o normal, com tendência ao agrupamento de glândulas, lúmen serrilhado, alguma depleção de mucina, mas sem

displasia e sem estratificação nuclear (figura 2A).

- FCA com displasia: criptas ampliadas e alongadas, por vezes fusionadas, com hipercromasia e estratificação nuclear, aumento da quantidade de mitoses, redução de mucina e de células caliciformes (figura 2B) (DiGREGORIO *et al.*, 1997; SHPITZ *et al.*, 1998; SIU *et al.*, 1997).

Figura 2 – Exemplos de FCA em mucosa colônica



Fonte: Ghosh *et al.*, 2018.

Legenda: Figura 2A: FCA sem displasia composta por glândulas maiores e mais largas que o normal, aglomeradas, de lúmen tortuoso e discreta depleção de mucina (aumento de 100x, coloração: Hematoxicilina e Eosina). Figura 2B: FCA com displasia caracterizado por glândulas alongadas, irregulares, fusionadas, apresentando núcleos hipercromáticos, estratificados e acentuada redução da mucoprodução (aumento de 100x, coloração: Hematoxicilina e Eosina).

As criptas aberrantes surgem a partir de 2 semanas da inoculação do carcinógeno. Inicialmente os FCA são formados por criptas únicas e, com o passar do tempo, as células se multiplicam e se expandem formando criptas maiores, mais irregulares originando FCA com várias criptas. Dessa forma, a quantidade de criptas por foco (multiplicidade) tem relação com o prognóstico, ou seja, quanto mais criptas houver por foco, mais agressivo seu comportamento e maior a chance de se desenvolver o câncer, principalmente os FCA com mais de 5 criptas (BIRD, 1995; BOATENG *et al.*, 2007; LASKO; BIRD, 1995; SHIRTLIFF; BIRD, 1996).

A distribuição dos FCA não é uniforme ao longo do intestino, predominando em cólon médio e distal em modelos com ratos e camundongos (GHIRARDI *et al.*, 1999; MCLELLAN; BIRD, 1988; PAPANIKOLAOU *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2002). Em humanos, as criptas aberrantes foram descritas pela primeira vez em 1991 a partir do estudo da mucosa colônica de pessoas com CCR ou Polipose Adenomatosa Familiar, apresentando

características morfológicas muito semelhantes às observadas anteriormente em animais (RONCUCCI *et al.*, 1991). São também consideradas lesões pré-neoplásicas no ser humano e apresentam maior concentração nas porções distais do cólon (SHPITZ, 1998).

Como os FCA são as lesões mais precocemente observadas no desenvolvimento do carcinoma, a análise das criptas aberrantes pode ser tomada como base para o estudo de substâncias com possível utilidade na prevenção do CCR, entre as quais está a goma arábica (GA).

1.9 Goma arábica

Sabe-se o impacto que o câncer tem na população, já que muitas neoplasias não apresentam boa resposta aos tratamentos atuais principalmente quando em estágio avançado, além dos frequentes efeitos adversos experimentados pelos pacientes que se submetem a essas terapias. Diante disso, tem se tornado cada vez mais importante a prevenção do câncer, com destaque nos últimos anos para o desenvolvimento de novas formas de quimioprevenção (BENETOU; LAGIOU; LAGIOU, 2015).

A quimioprevenção do câncer se refere ao uso de agentes capazes de inibir, atrasar ou reverter os efeitos da carcinogênese antes que a neoplasia se torne invasiva. A utilização dessas substâncias é especialmente interessante já que evitaria o sofrimento causado pela neoplasia incluindo o diagnóstico, a doença em si e seu tratamento. Entre esses agentes, tem destaque os compostos naturais como fibras alimentares que apresentam poucos riscos relacionados ao seu consumo e geralmente são de mais fácil acesso pela população por seu baixo custo (BENETOU; LAGIOU; LAGIOU, 2015).

A ingestão nutricional de várias fibras alimentares é reconhecida por conferir proteção contra o câncer colônico e retal. No entanto, o efeito dos nutrientes individuais presentes nas fibras no que diz respeito a incidência de câncer de cólon tem sido questionado. Uma dessas fibras que parece ter influência na carcinogênese é a GA.

A GA, fibra dietética solúvel em água (TISS; CARRIÈRE; VEGER, 2001), é obtida a partir dos exsudatos de caules e ramos de vegetais do gênero *Acacia*, dentre os quais existem mais de mil espécies, sendo as mais utilizadas para a produção da goma a *Acacia senegal* e *Acacia seyal* (ISLAM *et al.*, 1997). Ela é a goma vegetal mais antiga e mais conhecida pelo homem, sendo utilizada há mais de 5000 anos (WHISTLER; BEMILLER, 1993), inicialmente pelos egípcios que a usavam como um adesivo em pigmentos de pinturas e em envoltórios de linho que serviam para embalsamar múmias (ISLAM *et al.*, 1997).

Chegou à Europa a partir dos portos árabes, daí a origem de seu nome (ISLAM *et al.*, 1997).

A GA consiste em um polissacarídeo complexo de cadeia ramificada, neutro ou ligeiramente ácido, encontrado como um sal misto de cálcio, magnésio e potássio. Seu eixo principal e as cadeias laterais são compostos por unidades de 1,3- β -D-galactopiranosil. Ambas cadeias principal e laterais contêm ainda unidades de α -L-arabinofuranosil, α -L-ramnopiranosil, β -D-glucuronopiranosil e 4-O-metil- β -D-glucuronopiranosil, sendo as duas últimas encontradas principalmente como unidades terminais (ANDERSON; STODDART, 1966; ISLAM *et al.*, 1997; VERBEKEN; DIERCHX; DEWETTINCK, 2003). Entretanto, a composição química não é uniforme variando de acordo com a idade do vegetal, clima e condições do solo (AL-ASSAF; PHILLIPS; WILLIAMS, 2005; ISLAM *et al.*, 1997; VERBEKEN; DIERCHX; DEWETTINCK, 2003).

A substância não é digerível e, quando administrada por via oral, sofre fermentação bacteriana lenta no cólon, principalmente em sua porção distal (MACFARLANE; GIBSON; CUMMINGS, 1992), levando à modificação da microbiota colônica. Com a chegada da GA no intestino grosso, observa-se o crescimento da população de bactérias fermentadoras como *Bifidobacterium spp* e *Lactobacilli spp* que são benéficas ao hospedeiro, uma vez que reduzem o pH do meio tornando o ambiente desfavorável ao crescimento de patógenos (ALARIFI; BELL; WALTON, 2018). Além dessas bactérias, nota-se o crescimento de colônias de *Bacteroides spp.* e *Prevotella spp.* (organismos associados à melhoria do metabolismo lipídico) e diminuição da população de *C. histolyticum*, grupo de bactérias relacionado ao aumento da inflamação local (ALARIFI; BELL; WALTON, 2018). A partir de sua fermentação, a GA origina ácidos graxos de cadeia curta como o acetato, butirato e predominantemente o propionato (KISHIMOTO *et al.*, 2006; PHILLIPS, 1998). Esses ácidos desempenham função importante na regulação do metabolismo local, sistema imune e proliferação celular. O acetato, por exemplo, exerce papel relevante no controle da inflamação e resistência à invasão de patógenos (RIGOTTIER-GOIS *et al.*, 2003). O butirato é usado como fonte de energia pelas células epiteliais e aumenta a produção de muco no cólon, sendo sua concentração menor em indivíduos com CCR (ALARIFI; BELL; WALTON, 2018; MAKKI *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2012) e o propionato tem importância na regulação central do apetite, saciedade e redução da ingesta alimentar, auxiliando no controle do peso (CHAMBERS *et al.*, 2015). Além disso, esses ácidos graxos derivados do metabolismo da goma parecem ter efeito inibitório na carcinogênese colorretal, já que estão associados a redução da proliferação epitelial, diminuindo a aderência e motilidade dessas células em matriz colágena, reduzindo a expressão de proto-oncogenes como o C-MYC e

diminuindo a inflamação local (BASSON; EMENAKER; HONG, 1998), principalmente o butirato que está relacionado a diminuição da síntese de DNA e indução da apoptose (CHEN; FALLER; SPANJAARD, 2003).

A GA é uma das fibras dietéticas mais seguras (ANDERSON, 1986) não tendo sido observados efeitos tóxicos ou adversos significativos relacionados ao seu uso (ALI; ZIADA; BLUNDEN, 2009). Um estudo realizado por Doi *et al.* (2006) mostrou que quando administrada até o nível de 5% da dieta de ratos F344 não provocou mudanças em sinais clínicos, sobrevivência, peso corporal ou alterações histopatológicas. Além disso, a segurança da GA (5, 10, 20 ou 40 g administrada com água durante 4 semanas) foi confirmada em homens saudáveis, observando-se inclusive o aumento da população de bactérias intestinais benéficas ao ser humano (CALAME *et al.*, 2008).

A GA tem amplo uso industrial como agente estabilizador, espessante e emulsificante, principalmente na indústria alimentar (por exemplo na fabricação de refrigerantes e doces), mas também no setor têxtil, indústria cosmética e farmacêutica (VERBEKEN; DIERCHX; DEWETTINCK, 2003). Na medicina popular, tem sido relatada para o tratamento da inflamação da mucosa intestinal e para cobrir superfícies cutâneas inflamadas (GAMAL EL-DIN *et al.*, 2003).

Apesar do fato de que a goma é amplamente utilizada como veículo para drogas em experimentos fisiológicos e farmacológicos e por isso considerada uma substância "inerte", trabalhos desenvolvidos por Rehman *et al.* (2001), Gamal el-din *et al.* (2003) e Ali *et al.* (2008) afirmam que possui efeito antioxidante, hepatoprotetor e nefroprotetor em modelos animais.

Em camundongos 129S1/SvImJ saudáveis, a adição de 10% de GA à água potável durante 2 semanas de tratamento revelou aumento na depuração de creatinina, na excreção intestinal e renal de magnésio e cálcio, bem como na eliminação de fosfato. Além disso, aumentou a excreção urinária de hormônio antidiurético causando redução significativa do volume de urina, apesar da ingestão constante de líquidos (NASIR *et al.*, 2008). Outro efeito observado em ratos Wistar que receberam GA a 7,5% na dieta por 17 dias foi o aumento da absorção intestinal de ureia, ocasionando redução de sua concentração sanguínea e maior disponibilidade no ceco para depuração intestinal, além de aumento da espessura do epitélio colônico (YOUNES *et al.*, 1995) e da taxa de renovação celular (HOWARD *et al.*, 1995). No intestino de ratos *Sprague-Dawley* também se notou maior absorção intestinal de sódio e água naqueles que recebem a GA quando administrada junto com sais de reidratação oral (WAPNIR *et al.*, 1996).

Observa-se ainda que a GA possui efeito anti-inflamatório e nefroprotetor em ratos F344, com função relevante na proteção renal da lesão induzida por gentamicina (GILBERT *et al.*, 1989), sendo importante em evitar a insuficiência renal. Estes efeitos podem estar relacionados a sua atuação como ligante capaz de remover a creatinina e ureia do sangue sem alterar parâmetros fisiológicos importantes como a taxa de filtração glomerular (MAHMOUD; DIAAI; AHMED, 2012).

Clinicamente, foi utilizada em pacientes com insuficiência renal crônica, referindo-se que ajuda a diminuir as concentrações plasmáticas de ureia e creatinina, melhorando a função renal (ALI; ZIADA; BLUNDEN, 2009) e os níveis de pressão arterial (AL-MOSAWI, 2002). Em seres humanos também é relatada sua atividade anti-inflamatória em pacientes com artrite reumatoide que tomaram 30 g/dia de GA durante 12 semanas. Foi observada redução dos níveis séricos de TNF- α , da dor e do edema articular relacionados à inflamação. Esse efeito está relacionado à propriedade anti-inflamatória do butirato, ácido graxo derivado da fermentação da GA (KAMAL *et al.*, 2018). O butirato, por sua vez, atua reduzindo a expressão de citocinas inflamatórias por meio da inibição do NF κ B (LÜHRS *et al.*, 2001).

Quanto ao metabolismo lipídico, estudo desenvolvido por Sharma em 1985 mostrou que pessoas que ingeriram 15 g de GA duas vezes ao dia nas refeições durante 30 dias apresentaram redução do colesterol sérico em aproximadamente 10,4%, com diminuição do *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) e *Low Density Lipoprotein* (LDL), mas tiveram pouco efeito sobre o *High Density Lipoprotein* (HDL) e triglicérides (SHARMA, 1985). Por outro lado, Haskell *et al.* (1992) observaram que o consumo de GA na dose mais baixa de 15 g/dia por 4 semanas por pessoas saudáveis não teve efeito significativo sobre as concentrações plasmáticas de lipídios.

Outros trabalhos mostram ainda que a GA tem efeito antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo induzido por espécies reativas de oxigênio (EROS) (AHMED *et al.*, 2016; NEMMAR *et al.*, 2019), e efeito protetor contra a cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina em camundongos *Swiss* (ABD-ALLAH *et al.*, 2002) e contra a nefrotoxicidade provocada pela cisplatina em ratos Wistar (AL-MAJED *et al.*, 2003).

Mesmo sabendo que o estresse oxidativo desempenha papel importante na carcinogênese colorretal, e que a goma tem efeito antioxidante, existem poucos trabalhos que investigaram o papel da GA na inibição da carcinogênese. Um deles foi o desenvolvido por Nasir *et al.* (2010) que mostrou que a GA tem efeito importante em reduzir o crescimento de tumores do cólon de camundongos BALB/c principalmente por diminuir a expressão das

angiogeninas, compostos importantes na angiogênese tumoral. A carcinogênese química experimental induzida pela injeção de dose única intraperitoneal de 20 mg/kg de 1,2-dimetilhidrazina resultou no desenvolvimento de adenomas e adenocarcinomas do cólon, um efeito significativamente bloqueado pelo uso da GA a 10% administrada na água durante 14 semanas (redução de 70% na formação desses tumores). Foi observada ainda a redução dos níveis transcripcionais no epitélio colônico de vários genes importantes para a proliferação celular e/ou crescimento tumoral, como o antígeno CD38, ubiquitina D, oncogene *vav 3* e ligante de quimiocina 5. Além disso, notou-se diminuição da abundância proteica de β -catenina, um poderoso oncogene em tumores do cólon (NASIR *et al.*, 2010).

Estudo desenvolvido por Braga *et al.* (2019) também evidenciou efeito protetor da goma na carcinogênese colorretal. Na ocasião, foi observada redução na formação de criptas aberrantes do cólon de ratos Wistar que receberam AOM (15 mg/kg, intraperitoneal, semanalmente por 2 semanas) e que receberam GA a 1% na dose de 5 ml/kg administrada por gavagem durante 16 semanas. Essas observações poderiam ser exploradas para profilaxia do carcinoma do cólon.

2 JUSTIFICATIVA / RELEVÂNCIA

O câncer é um problema de saúde pública no mundo, representando uma das maiores causas de mortalidade. Sua incidência na população vem crescendo sendo esperado um aumento de até 5% em 2020 se comparado a 2018 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Dentre as neoplasias malignas, o CCR representa uma das mais importantes no que diz respeito ao acometimento da população, sendo a segunda mais prevalente a nível mundial e a terceira a nível nacional (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Dessa forma, é fundamental o estudo de novas substâncias principalmente compostos naturais que tenham efeito em prevenir ou pelo menos reduzir a incidência do CCR. Um desses compostos é a GA, polissacarídeo que pode desempenhar papel anticarcinogênico na mucosa colônica por possuir efeito anti-inflamatório da mucosa intestinal (GAMAL EL-DIN *et al.*, 2003), efeito citoprotetor e antioxidante em modelos animais (ALI *et al.*, 2008; GAMAL EL-DIN *et al.*, 2003; NEMMAR *et al.*, 2019). Apesar dessas propriedades da GA, existem poucas pesquisas dedicadas a elucidar sua possível contribuição no CCR.

Uma forma eficaz de se estudar esse tipo de câncer e melhor entender os fatores relacionados a sua prevenção, incluindo a participação da GA nesse processo, é por meio de modelos animais. Entre os quais, estão os estudos com camundongos, que é um modelo documentado na literatura (OTOOLE; PEGG; SWENBERG, 1993; TAKAHASHI; WAKABAYASHI, 2004), mas que não é muito utilizado apesar da semelhança com a carcinogênese humana e de gerar menor custo relacionado a insumos comparado aos ratos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da goma arábica na mucosa de cólon e reto assim como na genotoxicidade e estresse oxidativo locais e sistêmicos de camundongos *Swiss* submetidos à carcinogênese colorretal pelo azoximetano.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar os seguintes aspectos em camundongos submetidos à carcinogênese colorretal pelo azoximetano e que receberam goma arábica:

- a) A quantidade e distribuição de criptas aberrantes, focos de criptas aberrantes e a multiplicidade desses focos em cólon e reto;
- b) A genotoxicidade em cólon (proximal e distal), fígado, medula óssea e sangue;
- c) O estresse oxidativo por meio da quantificação das espécies reativas de oxigênio em cólon (proximal e distal), fígado e sangue.

4 MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

O protocolo do estudo seguiu as normativas do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) (protocolo nº 3925060318) na reunião de 30 de maio de 2018, conforme os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009 (anexo A).

4.2 Delineamento do experimento e modelo animal

Foram utilizados 55 camundongos albinos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, machos, com peso entre 25 e 30 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFC, em gaiolas de polipropileno forradas com maravalha autoclavada, a 24°C em ciclo luz-escuro de 12 horas, com umidade relativa do ar em torno de 50% e dispondo de água e alimento padrão à vontade (NUVILAB CR-1 irradiada) (anexo B).

Os camundongos foram distribuídos em 6 grupos assim constituídos (figura 3):

Grupo I (GI) (N=6): os animais receberam injeção de 0,5 ml de solução salina 0,9% estéril (SF), intraperitoneal (ip), 1 vez por semana, durante 2 semanas. Após isso, seguiram recebendo água destilada por gavagem 1 vez ao dia até a data estabelecida para a eutanásia. Os camundongos foram mortos na 12^a semana após a segunda injeção de solução estéril de SF.

Grupo II (GII) (N=6): os animais foram submetidos a injeção de 0,5 ml de SF, ip, 1 vez por semana, durante 2 semanas. A seguir, receberam solução de GA 2,5% por gavagem, 1 vez ao dia, ao longo de 12 semanas após a segunda injeção de solução estéril de SF.

Grupo III (GIII) (N=6): os animais foram submetidos a injeção de 0,5 ml de SF, ip, 1 vez por semana, durante 2 semanas. Em seguida, receberam solução de GA 5% via gavagem, 1 vez ao dia, por 12 semanas após a segunda injeção de solução estéril de SF.

Grupo IV (GIV) (N=12): os animais foram submetidos a injeção de AOM na dose de 10 mg/kg, ip, 1 vez por semana, durante 2 semanas. Feito isso, receberam água

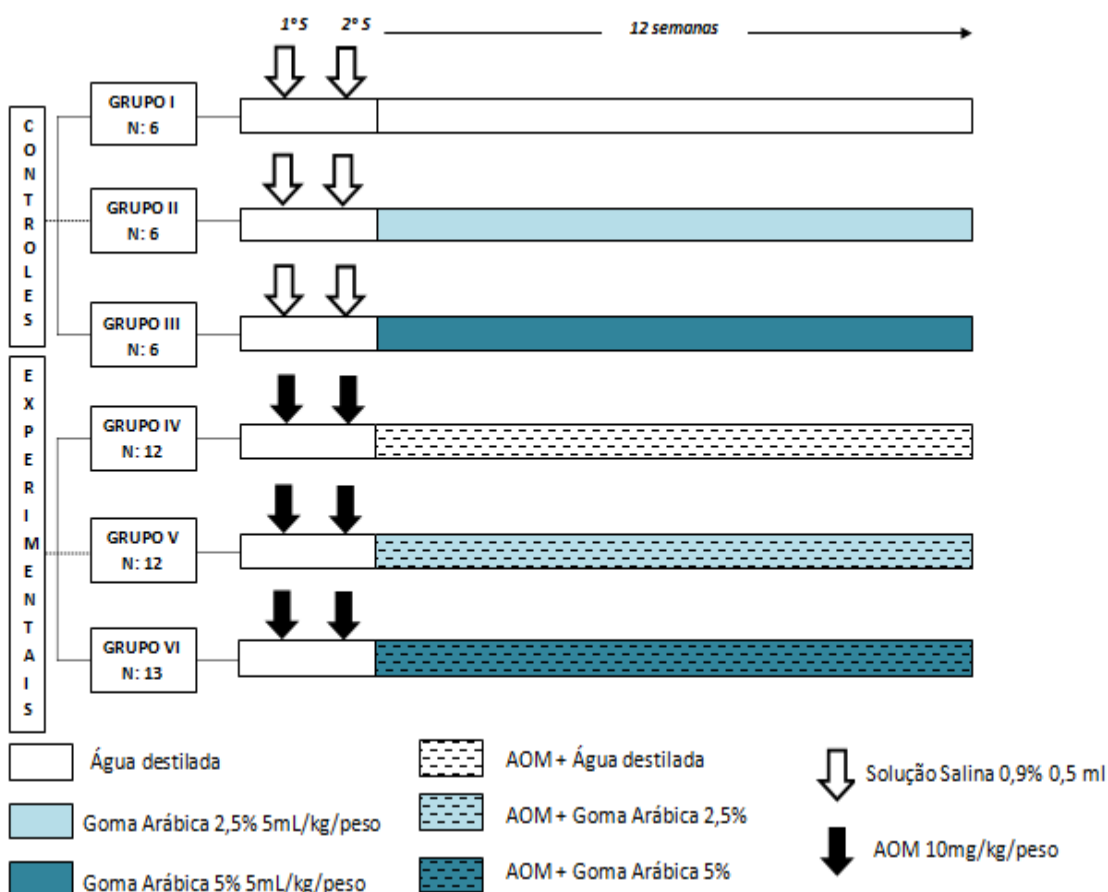
destilada por gavagem, 1 vez ao dia, até os dias estabelecidos para a eutanásia. Os camundongos foram mortos na 12ª semana após a segunda injeção de AOM.

Grupo V (GV) (N=12): os animais foram submetidos a injeção de AOM na dose de 10 mg/kg, ip, 1 vez por semana, por 2 semanas. A seguir, receberam GA 2,5% via gavagem, 1 vez ao dia, até os dias estabelecidos para a eutanásia.

Grupo VI (GVI) (N=13): os animais foram submetidos a injeção de AOM na dose de 10 mg/kg, ip, 1 vez por semana, por 2 semanas. Em seguida, receberam solução de GA 5% via gavagem, 1 vez ao dia, durante 12 semanas após a segunda injeção de AOM.

Os grupos experimentais (IV, V e VI) têm uma quantidade maior de indivíduos comparados aos grupos controle (I, II e III) por apresentarem maior risco de mortalidade já que receberam o carcinógeno.

Figura 3 – Desenho experimental



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: AOM: Azoximetano; 1ªS: primeira semana; 2ªS: segunda semana.

As substâncias administradas (água destilada, GA 2,5% e GA 5%) foram fornecidas via gavagem oral na dose de 5 ml/kg, uma vez ao dia, durante 12 semanas imediatamente após a última aplicação do carcinógeno (figura 4).

Figura 4 - Gavagem



Fonte: Elaborada pelo autor.

Antes do início da administração das substâncias, os animais foram vermifugados com Ivomec® (ivermectina) 2 mg/kg por via subcutânea.

As soluções de GA foram preparadas em diluição com água destilada.

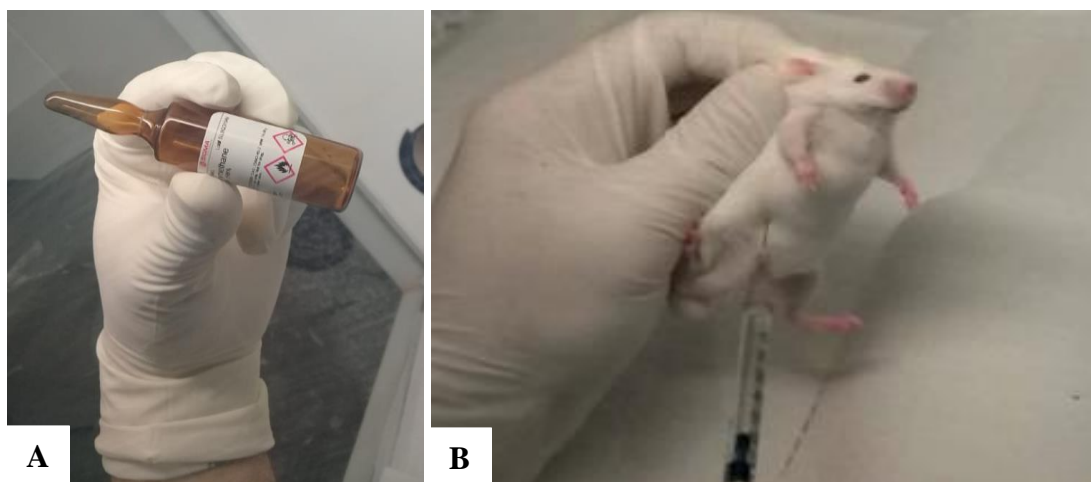
Os camundongos foram pesados no dia da administração dos vermífugos, no dia da aplicação do AOM e em todas semanas, antes de serem calculadas as doses das substâncias administradas, até o final do experimento.

4.3 Carcinógeno

Foram utilizadas ampolas de 100 mg de AOM (Sigma-Aldrich Corporation®) (anexo C). O mesmo foi aplicado por via intraperitoneal na dose de 10 mg/kg de peso corporal após diluição em solução salina estéril.

Os animais que receberam o carcinógeno foram os dos grupos IV a VI, uma vez por semana, durante 2 semanas (figura 5).

Figura 5 - Aplicação do carcinógeno



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Figura 5A: frasco do AOM antes da aplicação. Figura 2B: inoculação do carcinógeno em cavidade peritoneal.

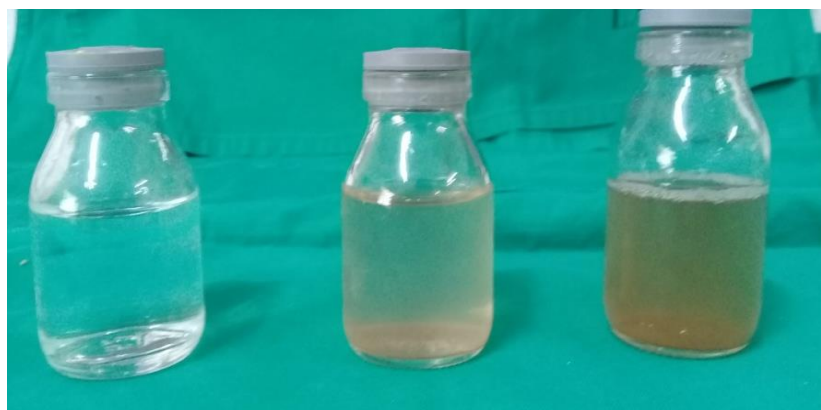
4.4 Preparação da goma arábica

Foi utilizada GA, na forma de pó (Para Análise - PA, da empresa Dinâmica Química Contemporânea Ltda®).

Antes de sua utilização, a GA foi diluída em água destilada sendo a seguir administrada via gavagem. Os grupos II e V receberam solução de GA a 2,5% na dose de 5 ml/kg de peso corporal e os grupos III e VI, GA a 5%, também na dose de 5 ml/kg.

A diluição foi preparada uma vez por semana, levando em consideração as alterações no peso dos animais e mantida em refrigerador a 4 °C (figura 6).

Figura 6 - Soluções de água destilada e GA



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Da esquerda para direita: água destilada, GA 2,5% e GA 5%.

4.5 Procedimento cirúrgico e avaliação macroscópica

Na 12ª semana após a segunda injeção de AOM, os animais foram sacrificados.

Os camundongos foram anestesiados por injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg). Após a anestesia, foram postos em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica com campos estéreis, seguido de laparotomia por incisão na linha média xifopubiana interessando a cavidade abdominal (figura 7).

Figura 7 - Laparotomia exploradora



Fonte: Elaborada pelo autor.

Aberta a cavidade abdominal, foi puncionada a aorta para a coleta de sangue para análise (figura 8), após a qual ocorreu a morte dos animais por exsanguinação. A seguir, foi realizada ressecção do reto e cólon até o ceco (proctocolectomia), retirada dos pulmões, rins, baço, fígado e fêmur direito.

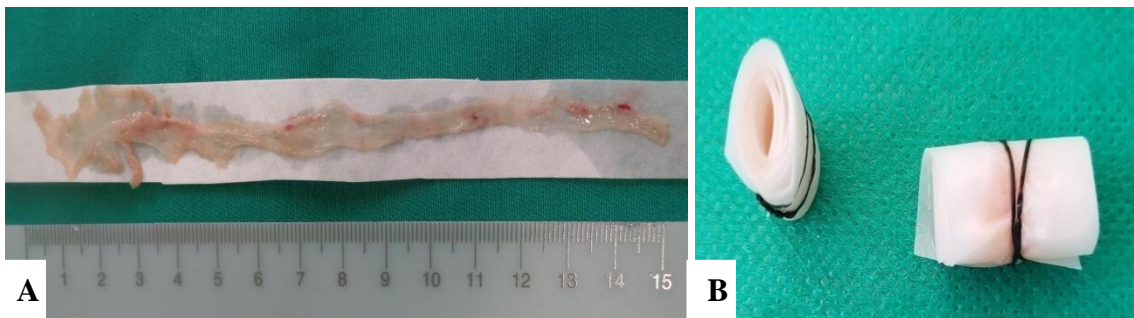
Figura 8 - Coleta de sangue da aorta abdominal



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os intestinos foram abertos na borda anti-mesentérica, lavados, irrigados com solução salina de forma contínua, pesados e retirado pequeno fragmento do cólon proximal e distal para ensaios biológicos. Em seguida, foram medidos e colocados estendidos em papel filtro para fazer um formato de “rocambolé”. Após isso, foram imersos em formol tamponado a 10% (figura 9).

Figura 9 – Preparo do cólon



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Figura 9A: cólon estendido sobre papel filtro após ter sido aberto e lavado. Figura 9B: cólons enrolados com papel filtro em formato de “rocambolé”.

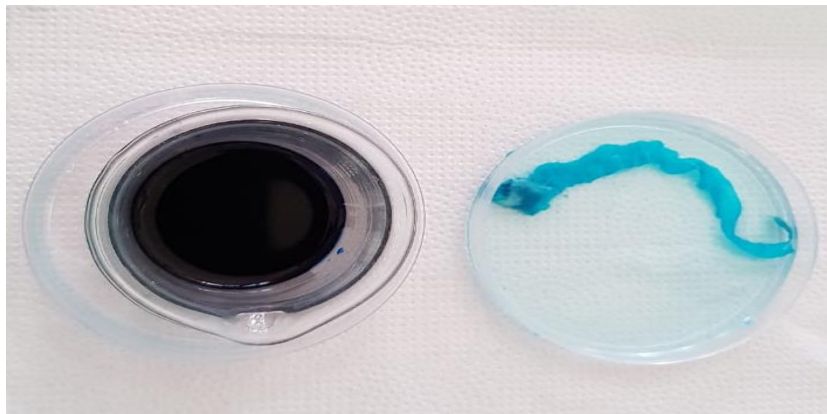
Os demais órgãos também foram pesados, medidos, avaliados quanto à presença de tumoração ou outra alteração e acondicionados em solução formolizada tamponada a 10%. Do fígado, também foi retirado pequeno fragmento para estudo biológico.

Posteriormente, após 24 h de fixação em formol, os órgãos foram clivados, processados e incluídos em parafina. A seguir, foram cortados e corados com hematoxilina e eosina para estudo histopatológico.

4.6 Estudo das Criptas Aberrantes

Após 24 h de fixação, cada cólon foi corado com azul de metileno a 0,1% e solução tamponada fosfatada (*phosphate buffered saline* - PBS) por 1 min (figura 10). A seguir, foi examinado ao microscópio estereoscópico (M90 VASCONCELLOS da DF VASCONCELOS S.A. com magnificação de 40x) por um patologista para contagem e registro dos focos de criptas aberrantes (FCA) e do número de criptas por foco, ou seja, sua multiplicidade por segmento do intestino (proximal, médio e distal) e em toda sua extensão (figura 11) conforme técnica descrita por Bird (1987) e por Burlamaqui *et al.* (2010).

Figura 10 – Solução de azul de metileno e cólon corado com a mesma substância



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 11 – Foco de criptas aberrantes



Fonte: Elaborada pelo autor.

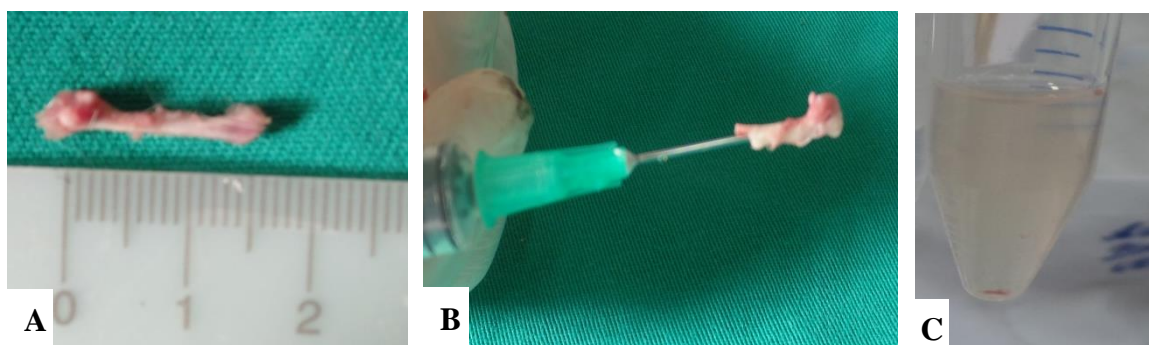
Legenda: Foco de várias criptas aberrantes (seta branca) observado em microscópio estereoscópico. Aumento de 40x (azul de metileno).

4.7 Ensaios biológicos

Para realização dos ensaios biológicos, foi colhido sangue da aorta abdominal (0,5 ml), fragmento do fígado, fragmento do cólon proximal, fragmento do cólon distal e aspirado de medula óssea.

Os fragmentos do cólon e fígado foram individualmente macerados em PBS gelado (4 °C) e posteriormente filtrados. As células foram obtidas da suspensão após a filtração. A medula óssea foi obtida a partir do fêmur direito dos animais. Com esse objetivo, o fêmur de cada camundongo foi retirado, limpo e as epífises seccionadas. Para a retirada da medula, foram utilizadas seringas de 1 ml previamente preenchidas com 0,5 ml de soro fetal bovino. A agulha da seringa foi firmemente inserida em uma das aberturas do fêmur e o soro foi injetado de modo a deslocar a medula para dentro de um tubo de centrífuga previamente preenchido com o mesmo material (3 ml de soro fetal) (figura 12).

Figura 12 - Coleta da medula óssea



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Figura 12A: fêmur logo após ter sido retirado e limpo. Figura 12B: inserção da agulha no fêmur para coleta da medula óssea. Figura 12C: medula óssea coletada em tubo de centrífuga.

Após coletadas, as amostras foram transportadas para o laboratório em recipientes com gelo e processadas em até de 2 h após o procedimento.

4.7.1 Testes de avaliação da genotoxicidade

4.7.1.1 Ensaio do cometa (cólon, fígado, sangue e medula óssea)

O estudo de dano ao DNA por meio do ensaio do cometa foi realizado em condições alcalinas e neutras conforme descrito por Hartmann e Speit (1997) e Wojewodzka, Buraczewska e Kruszewski (2002), respectivamente.

A partir de amostras do cólon proximal, cólon distal, fígado, sangue e medula óssea, foram separados 20 µl da suspensão de células com uma densidade aproximada de 10⁶ células/ml. A seguir, a suspensão foi dissolvida em agarose de baixo ponto de fusão na concentração de 0,5% e espalhada sobre uma lâmina pré-tratada também com agarose de baixo ponto de fusão, mas numa maior concentração, 1% em 37 °C.

As suspensões foram então colocadas em contato com uma solução de lise celular (5 M NaCl, 100 mL EDTA, 10mM Tris, 1% N-Lauroyl sarcosine, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10,0) por pelo menos 1 h a 4 °C.

Em seguida, foram dispostas de forma horizontal na cuba de eletroforese, a qual foi preenchida com tampão de corrida (1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH) em pH > 13 para o ensaio do cometa em condições alcalinas (HARTMANN; SPEIT, 1997) ou em pH 8,5 para o ensaio do cometa em condições neutras (WOJEWODZKA; BURACZEWSKA; KRUSZEWSKI, 2002), durante 60 min para permitir o equilíbrio do pH com o tampão de corrida.

A eletroforese foi então conduzida a baixa temperatura (4 °C) durante 20 min na versão alcalina (25 V; 300 mA) e por 60 min (14 V; 12 mA) na versão neutra (todos passos foram conduzidos na ausência de luz, uma vez que a luminosidade pode danificar o DNA).

Feito isso, as lâminas foram retiradas e mergulhadas na solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) durante 15 min. A seguir, foram postas em contato com 30 µl de solução de brometo de etídeo (20 µg/ml) para coloração, cobertas com lâminulas e vistas em microscópio para estudo (microscópio de fluorescência [Zeiss] equipado com um filtro de excitação de 515-560 nm, filtro de barreira de 590 nm e objetiva de 40x).

A investigação do dano ao DNA foi realizada de acordo com o tamanho e intensidade da cauda do cometa analisados visualmente conforme padrão de escores previamente conhecido (COLLINS *et al.*, 1997) (figura 13).

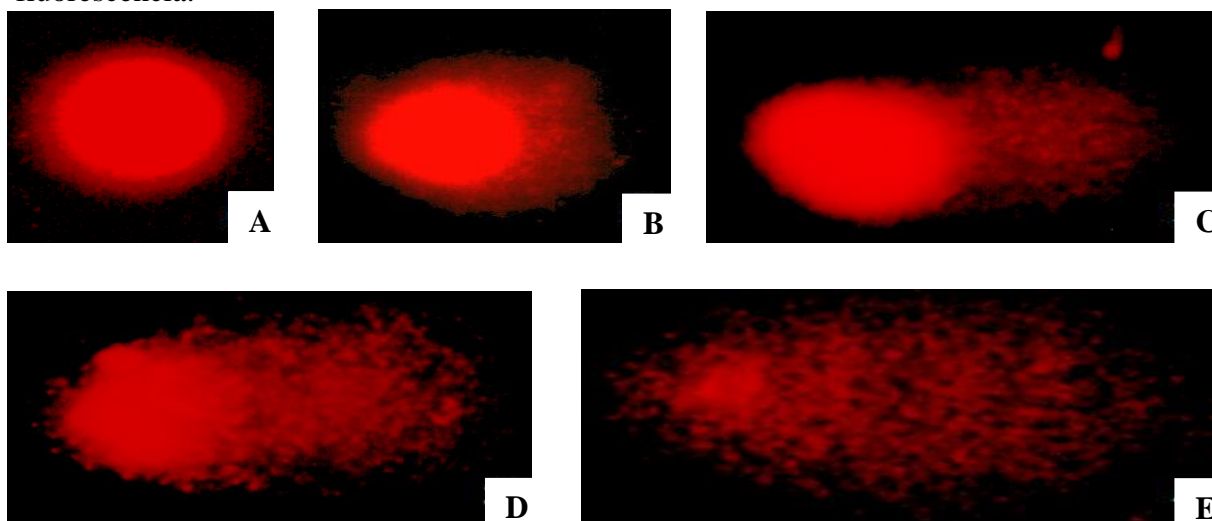
Foram contados 100 cometas em cada lâmina, os quais foram classificados de acordo com a porcentagem de DNA na cauda do cometa, de forma que o grau de quebra do DNA foi variável com índices baixos (<5%) a altos (>95%) (COLLINS *et al.*, 1997).

A quantificação do dano ao DNA foi feita através do índice de dano (ID), que corresponde a uma medida sensível da lesão do material genético baseado na sua migração, o qual variou de 0 (sem dano: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4) (COLLINS *et al.*, 1997).

O ID foi obtido pela seguinte fórmula: $ID = \sum_{i=0}^4 n_i \times i$, no qual n_i é o número de

células com nível de dano i (0, 1, 2, 3 ou 4).

Figura 13 - Tipos de cometas corados com brometo de etídio e visualizados ao microscópio de fluorescência.



Fonte: Adaptada de Hartmann; Speit (1997).

Legenda: Figura 13A: sem danos (<5%). Figura 13B: baixo nível de danos (5-20%). Figura 13C: médio nível de danos (20-40%). Figura 13D: alto nível de danos (40-95%). Figura 13E: dano total (95%).

4.7.1.2 Ensaio do cometa alcalino modificado (medição da guanina oxidada)

Nas amostras do cólon proximal, cólon distal e fígado, além do ensaio do cometa neutro e alcalino, foi realizado o ensaio do cometa alcalino modificado, que é feito conforme descrito anteriormente com pequenas modificações.

As lâminas foram retiradas da solução de lise e lavadas em tampão enzimático três vezes (4 mM HEPES, 100 mM KCl, 0,5 mM Na₂EDTA, 0,2 mg/ml BSA, pH 8,0). A seguir, foram escorridas e postas em contato com 50 µl de 8-oxoguanina DNA N-glicosilase 1 (hOGG1) durante 30 min na temperatura de 37 °C. Feito isso, analisaram-se visualmente as imagens de 100 células escolhidas de forma aleatória (50 células de cada uma das duas lâminas replicadas) de cada grupo. A quantidade de guanina oxidada (sítios sensíveis a hOGG1) foi então determinada a partir da diferença entre a quantidade de quebras de cadeia (amostras incubadas apenas com tampão) e a quantidade total de quebras obtidas após incubação com hOGG1.

4.7.1.3 *Teste do micronúcleo em reticulócitos do sangue*

O teste do micronúcleo foi feito a partir da análise da frequência de micronúcleos em reticulócitos do sangue utilizando o corante laranja de acridina conforme descrito por Hayashi *et al.* (1990).

O corante foi dissolvido em água destilada para se obter uma solução com concentração de 1 mg/ml. A partir de 10 µl dessa solução, foi realizado esfregaço em lâminas pré-aquecidas a ± 70 °C. As lâminas foram então estocadas em caixa escura à temperatura ambiente por pelo menos 24 h.

Sobre essas lâminas previamente preparadas com o corante, foram adicionados 50 µl de sangue e cobertas com lamínula. As lâminas foram então guardadas no refrigerador (-20 °C), no escuro, por pelos menos 10 h.

Após isso, as preparações foram examinadas com um microscópio de fluorescência apresentando filtro de excitação azul (488 nm) e filtro de emissão (barreira) amarelo (575 nm), utilizando lentes objetivas de imersão.

Os reticulócitos foram identificados por sua coloração vermelha e os micronúcleos pela sua cor amarelada, sendo então contabilizada a quantidade de micronúcleos para cada 1000 reticulócitos por lâmina (HAYASHI *et al.*, 1990).

4.7.1.4 *Teste do micronúcleo da medula óssea e citotoxicidade medular*

Obtido o material medular, o mesmo foi submetido a centrifugação (1000 rpm por 5 min), após a qual o sobrenadante foi descartado e o precipitado homogeneizado. A seguir, foi realizado o esfregaço a partir de uma gota da suspensão colocada em uma lâmina limpa e seca sendo obtidas duas lâminas para cada animal.

Posteriormente, as lâminas foram coradas pelo método de Leishman (SCHMID, 1975) e analisadas ao microscópio óptico binocular nos aumentos de 20x e 40x para identificação dos micronúcleos pelos critérios de Schmid (1976) e Heddle *et al.* (1983). Foi então contabilizado o total de micronúcleos para cada 1000 eritrócitos policromáticos (EPC) por animal (HEDDLE *et al.*, 1983).

Quanto à citotoxicidade, a mesma foi representada pela razão entre EPC e eritrócitos normocromáticos (ENC) com base em 1000 eritrócitos (EPC ou ENC) por animal (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

4.7.2 Estresse oxidativo

4.7.2.1 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio intracelular (cólon, fígado e sangue)

As preparações celulares foram postas em contato com 20 μ M de diacetato 2'7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) na ausência de luz e a 37 °C durante 30 min. O H₂DCFDA ao entrar em contato com as EROS intracelulares é oxidada ao DCF (2'7'-diclorohidrofluoresceína), altamente fluorescente (CROW, 1997; HEMPEL *et al.*, 1999), de maneira que quanto maior a quantidade de EROS presentes nas células, maior a fluorescência emitida pelo DCF (LEBEL; ISCHIOPOULOS; BONDY, 1992). Entre as EROS envolvidas neste processo, estão os radicais hidroxil (HO[•]), peróxil (ROO[•]) e peroxinitrito (ONOO[•]), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o oxigênio singlete (¹O₂) (BARTOSZ, 2006).

Posteriormente, as preparações foram lavadas, ressuspensas em PBS e analisadas por meio de citometria de fluxo. Em cada amostra, a fluorescência emitida pelas EROS foi detectada e quantificada pelo citômetro (Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, EUA), sendo então determinada a porcentagem de espécies reativas presente. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes feitos em triplicatas de forma que dez mil eventos foram analisados em cada amostra.

4.8 Análise estatística

Os dados foram inicialmente submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade de distribuição. Como tal requisito foi obtido, os dados foram então tabulados no Microsoft Excel[®] e expressos na forma de média e desvio-padrão, incluindo o peso dos animais, ganho de massa corporal, peso dos órgãos, número de criptas aberrantes, número de FCA, multiplicidade das criptas e os dados referentes aos ensaios biológicos (ensaio do cometa, teste do micronúcleo e EROS). A seguir, para cada parâmetro, foram feitas comparações entre os grupos pela análise de variância (ANOVA) associando-se o teste de comparações múltiplas de Tukey para verificar diferenças entre os grupos.

Para estudo do número de criptas aberrantes, número de FCA e multiplicidade de criptas (número de FCA com até 5 criptas e número de FCA com mais de 5 criptas observadas) foi usada análise de variância (ANOVA) para dois fatores de classificação. Um

deles para avaliar o efeito dos tratamentos (fator 1) e o outro dos segmentos do cólon (fator 2), sendo complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (comparações entre os segmentos que passaram pelo mesmo tratamento e comparações entre os segmentos que passaram por tratamentos diferentes).

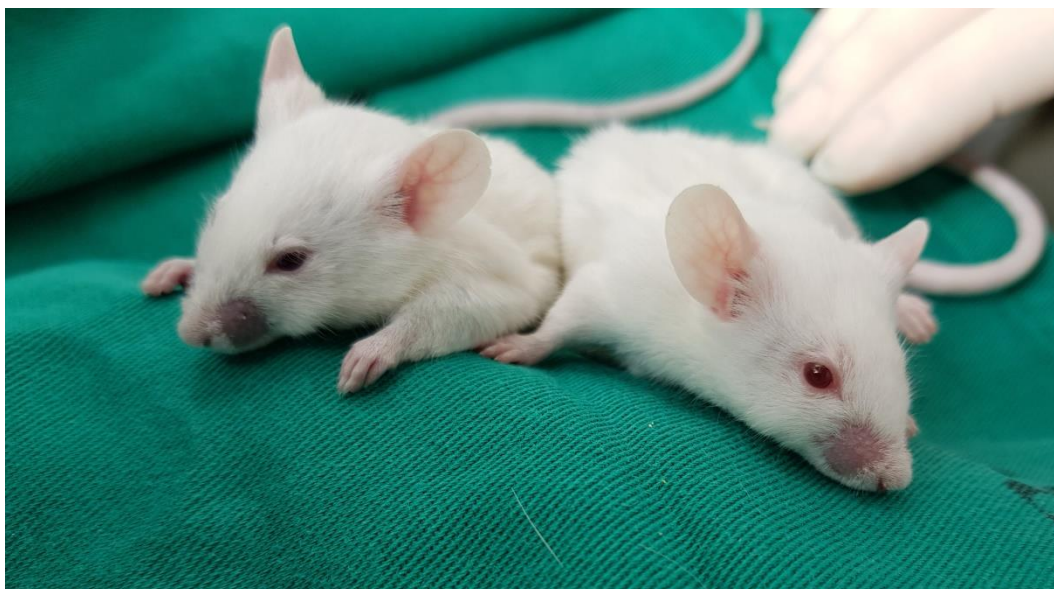
O *software* GraphPad Prism 8.0[®] (GraphPad Software, La Jolla, California, USA) foi utilizado para realização dos procedimentos estatísticos e elaboração dos gráficos, adotando-se um nível de significância de 5% em todos ensaios ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação clínica

Foi observada rarefação de vibrissas e pelos próximo ao focinho da maior parte dos animais em todos grupos (figura 14), não se notando outras alterações como mudança no comportamento, motricidade, padrão respiratório ou características das fezes.

Figura 14 - Camundongos com rarefação de pelos próximo ao focinho



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Mortalidade

Ao longo do experimento, morreu um camundongo do grupo III e outro do grupo V. Não foi realizada necrópsia porque os corpos foram encontrados em franco estado de decomposição.

5.3 Peso corporal final e ganho de massa corpórea

Na avaliação do peso corporal final e do ganho de massa corpórea entre os grupos, não foi observada diferença estatística significativa (ANOVA associada a Tukey, tabela 3).

Tabela 3 – Peso corporal final e ganho de peso percentual por grupo

Grupos	Peso corporal final (g) Média ± DP	Ganho de peso (%) Média ± DP
GI (n=6)	38,00 ± 1,27	48,12 ± 14,75
GII (n=6)	38,33 ± 4,80	50,73 ± 19,94
GIII (n=5)	39,20 ± 3,03	49,18 ± 13,62
GIV (n=12)	40,67 ± 2,87	43,58 ± 15,47
GV (n=11)	41,27 ± 2,41	39,30 ± 12,40
GVI (n=13)	42,46 ± 4,70	47,83 ± 22,92
Significância (ANOVA)	$p = 0,0765$	$p = 0,7505$

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: DP: desvio padrão; ANOVA: análise de variância.

5.4 Peso dos órgãos

A análise do peso dos órgãos (pulmões, fígado, baço, rins e cólon) foi feita a partir do percentual que cada órgão representou do peso corporal total de cada animal no dia da eutanásia. As comparações entre os seis grupos não demonstrou diferença estatisticamente significativa (ANOVA associada a Tukey, tabela 4).

Tabela 4 – Peso dos órgãos em percentual do peso corporal total

Grupos	Peso dos pulmões (%) Média ± DP	Peso do fígado (%) Média ± DP	Peso do baço (%) Média ± DP	Peso dos rins (%) Média ± DP	Peso do cólon (%) Média ± DP
GI (n=6)	0,51 ± 0,05	3,56 ± 0,20	0,18 ± 0,02	1,58 ± 0,07	1,55 ± 0,28
GII (n=6)	0,50 ± 0,07	3,68 ± 0,43	0,20 ± 0,06	1,59 ± 0,24	1,83 ± 0,38
GIII (n=5)	0,55 ± 0,06	4,56 ± 0,78	0,24 ± 0,05	1,89 ± 0,24	1,52 ± 0,45
GIV (n=12)	0,61 ± 0,20	3,85 ± 0,90	0,30 ± 0,16	1,73 ± 0,25	1,62 ± 0,36
GV (n=11)	0,72 ± 0,35	3,60 ± 0,38	0,23 ± 0,07	1,69 ± 0,22	1,58 ± 0,25
GVI (n=13)	0,60 ± 0,16	4,04 ± 0,62	0,27 ± 0,15	1,63 ± 0,23	1,72 ± 0,39
Significância (ANOVA)	$p = 0,3339$	$p = 0,0668$	$p = 0,3401$	$p = 0,1608$	$p = 0,5806$

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: DP: desvio padrão; ANOVA: análise de variância.

5.5 Número de criptas aberrantes

Analisando-se as criptas aberrantes observadas nos grupos GIV, GV e GVI, por segmento do cólon (proximal, médio ou distal), observou-se que não houve diferença significativa entre os diferentes segmentos colônicos dentro de um mesmo grupo ($p=0,6012$). Entretanto, houve redução estatisticamente significativa deste número no grupo GVI (AOM + GA 5%) em relação ao grupo GIV (AOM + água) no segmento distal (ANOVA associado a Tukey, tabela 5).

Tabela 5 - Número de criptas aberrantes observado nos grupos GIV, GV e GVI, conforme o segmento do cólon: proximal, médio e distal.

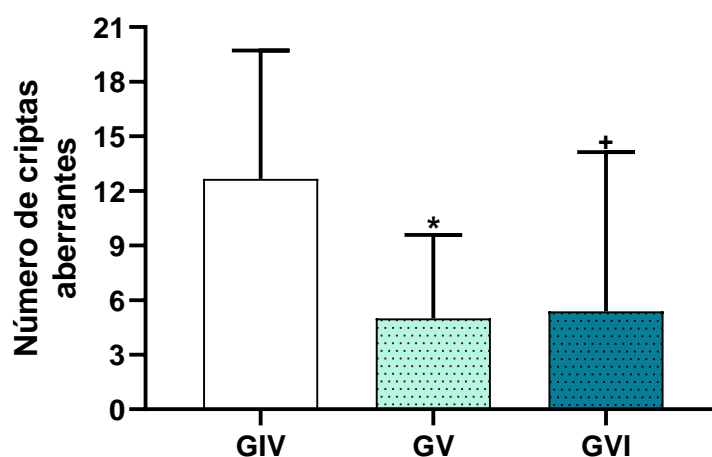
Segmento do cólon	GIV (n=12) Média ± DP	GV (n=11) Média ± DP	GVI (n=13) Média ± DP
Proximal	3,92 ± 6,40	1,64 ± 3,04	3,62 ± 8,43
Médio	3,58 ± 3,15	1,55 ± 2,11	1,38 ± 2,33
Distal	5,17 ± 3,83	1,82 ± 2,68	0,38 ± 0,77 ^a

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: DP: desvio padrão. A letra ^a($p=0,0031$) denota diferença estatisticamente significante em relação ao grupo GIV no segmento distal do cólon (teste de comparações múltiplas de Tukey).

Quanto às criptas aberrantes nos grupos GIV, GV e GVI, considerando toda extensão do cólon, foi notado que o número de criptas observado no grupo GIV ($12,67 \pm 7,05$) foi significativamente maior que o verificado nos grupos GV ($5,00 \pm 4,58$; $*p=0,0379$) e GVI ($5,39 \pm 8,75$; $+p=0,0401$) (dados expressos como média e desvio-padrão das observações realizadas em 12, 11 e 13 animais dos grupos IV, V e VI, respectivamente - ANOVA associada a Tukey, gráfico 2).

Gráfico 2 – Número de criptas aberrantes considerando toda extensão do cólon



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: $*p=0,0379$ em relação a GIV; $+p=0,0401$ em relação a GIV

5.6 Focos de criptas aberrantes (FCA)

Comparando-se os FCA observados nos grupos GIV, GV e GVI, de acordo com o

segmento do cólon (proximal, médio ou distal), observou-se que não houve diferença significativa entre os diferentes segmentos colônicos dentro de um mesmo grupo ($p=0,2889$). Entretanto, nos grupos que receberam goma GV (AOM + GA2,5%) e GVI (AOM + GA5%) comparados ao GIV (AOM + água), houve redução significativa dos FCA, principalmente nos segmentos médio e distal (ANOVA associado a Tukey, tabela 6).

Tabela 6 – Número de FCA nos grupos GIV, GV e GVI, de acordo com o segmento do cólon: proximal, médio ou distal

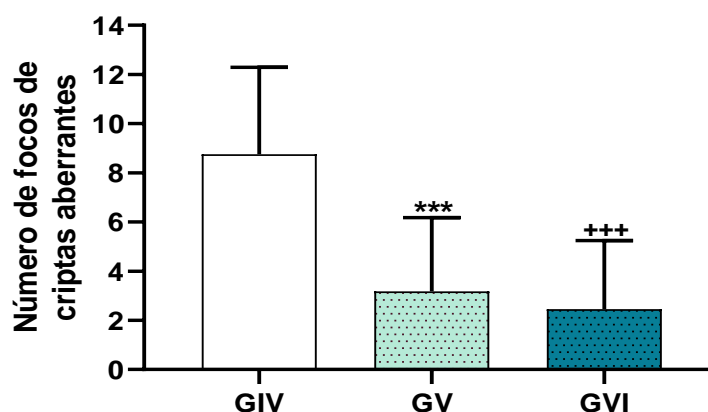
Segmento do cólon	GIV (n=12) Média ± DP	GV (n=11) Média ± DP	GVI (n=13) Média ± DP
Proximal	1,67 ± 2,06	0,73 ± 1,56	1,15 ± 2,38
Médio	3,08 ± 2,27	1,00 ± 1,26 ^a	1,00 ± 1,58 ^b
Distal	3,83 ± 2,44	1,45 ± 2,11	0,31 ± 0,63 ^c

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: DP: desvio padrão. As letras ^a($p=0,0346$), ^b($p=0,0405$) e ^c($p=0,0010$) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo GIV no mesmo segmento do cólon (teste de comparações múltiplas de Tukey).

Analisando-se os FCA nos grupos GIV, GV e GVI, considerando toda extensão do cólon, foi observado que o número de FCA no grupo GIV ($8,75 \pm 3,55$) foi significativamente maior que o verificado nos grupos GV ($3,18 \pm 2,99$; $***p=0,0004$) e GVI ($2,46 \pm 2,79$; $+++p<0,0001$) (dados expressos como média e desvio-padrão das observações realizadas em 12, 11 e 13 animais dos grupos IV, V e VI, respectivamente - ANOVA associado a Tukey, gráfico 3).

Gráfico 3 – Número de FCA considerando toda extensão do cólon



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: $***p=0,0004$ em relação a GIV; $+++p<0,0001$ em relação a GIV

5.7 Multiplicidade de criptas

Na comparação dos focos de até 5 criptas aberrantes, constatou-se que não houve diferença estatisticamente significativa no número de FCA entre diferentes segmentos dentro de um mesmo grupo ($p=0,2136$). Por outro lado, nos grupos que receberam goma GV (AOM + GA2,5%) ou GVI (AOM + GA5%) comparados ao GIV (AOM + água), houve redução dos FCA, principalmente nos segmentos médio e distal (ANOVA associado a Tukey, tabela 7).

Tabela 7 – Número de FCA com até 5 criptas nos grupos GIV, GV e GVI comparando-se os diferentes segmentos colônicos

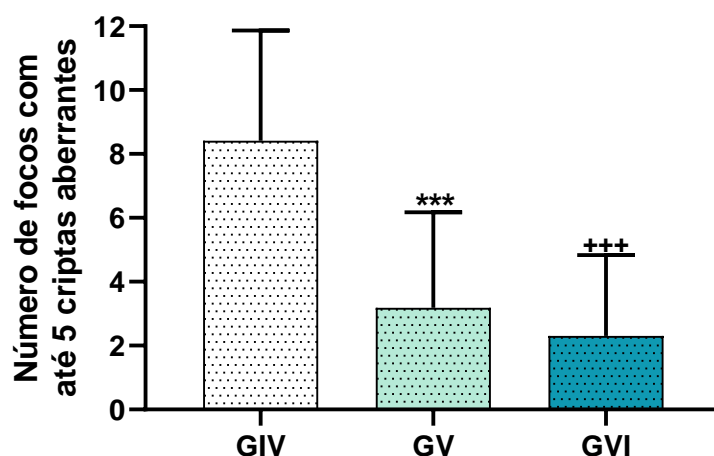
Segmento do cólon	GIV (n=12) Média±DP	GV (n=11) Média±DP	GVI (n=13) Média±DP
Proximal	1,58±2,11	0,73±1,56	1,00±2,04
Médio	3,08±2,27	1,00±1,26 ^a	1,00±1,58 ^b
Distal	3,75±2,45	1,45±2,11	0,31±0,63 ^c

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: DP: desvio padrão. As letras ^a($p=0,0346$), ^b($p=0,0405$) e ^c($p=0,0012$) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo GIV no mesmo segmento do cólon (teste de comparações múltiplas de Tukey).

Considerando toda extensão do cólon, constatou-se que o número de FCA com até 5 criptas observado no grupo GIV ($8,42 \pm 3,45$) foi significativamente maior que o verificado nos grupos GV ($3,18 \pm 2,99$; $***p=0,0006$) e GVI ($2,31 \pm 2,53$; $+++p<0,0001$) (dados expressos como média e desvio-padrão das observações realizadas em 12, 11 e 13 animais dos grupos IV, V e VI, respectivamente - ANOVA associado a Tukey, gráfico 4).

Gráfico 4 – Número de FCA com até 5 criptas aberrantes considerando toda extensão do cólon



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *** $p=0,0006$ em relação a GIV; +++ $p<0,0001$ em relação a GIV

Quanto aos FCA com mais de 5 criptas, foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes segmentos colônicos dentro de um mesmo grupo ($p=0,2098$) ou entre grupos diferentes ($p=0,4019$) (ANOVA associada a Tukey, tabela 8).

Tabela 8 - Número de FCA com mais de 5 criptas nos grupos GIV, GV e GVI comparando-se os diferentes segmentos colônicos

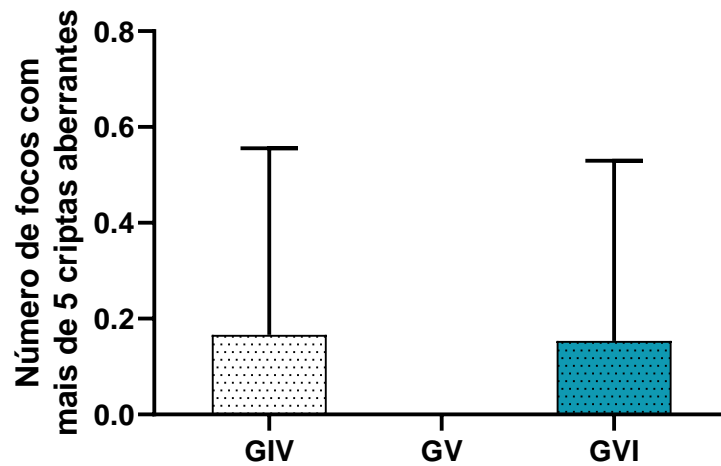
Segmento do cólon	GIV (n=11) Média±DP	GV (n=12) Média±DP	GVI (n=13) Média±DP
Proximal	0,08±0,29	0,00±0,00	0,15±0,38
Médio	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Distal	0,08±0,29	0,00±0,00	0,00±0,00

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: DP: desvio-padrão. Teste de comparações múltiplas de Tukey.

Comparando-se o número de FCA com mais de 5 criptas, considerando toda extensão do cólon, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos GIV ($0,17 \pm 0,39$), GV ($0,00 \pm 0,00$) e GVI ($0,15 \pm 0,38$) ($p=0,3912$) (dados expressos como média e desvio-padrão das observações realizadas em 12, 11 e 13 animais dos grupos IV, V e VI, respectivamente - ANOVA associado a Tukey, gráfico 5).

Gráfico 5 – Número de FCA com mais de 5 criptas aberrantes considerando toda extensão do cólon



Fonte: Dados da pesquisa.

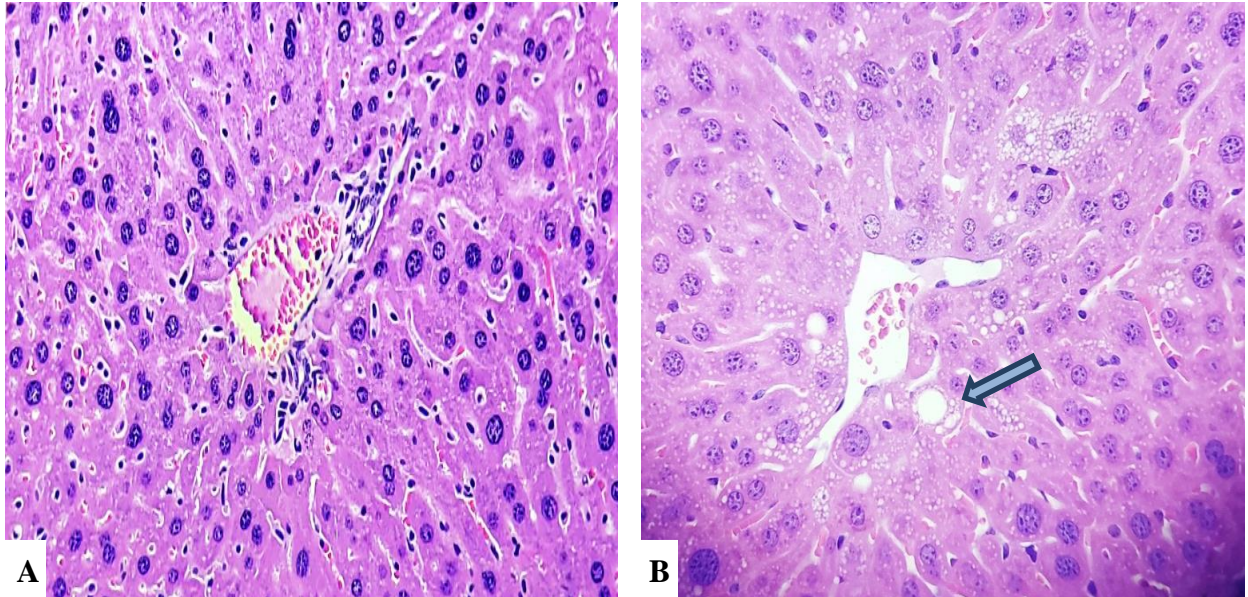
Não foram encontradas criptas aberrantes nos grupos controle GI, GII e GIII.

5.8 Achados morfológicos

Nos animais dos grupos controle (GI, GII e GIII), não foi encontrada alteração macroscópica ou microscópica relevante.

Entre os camundongos do grupo IV, foi observado no fígado de dois animais discreta esteatose macro e microgoticular, em torno da veia centro-lobular, associada a leve dilatação sinusoidal (figura 15). No rim de um dos camundongos, notou-se inflamação perivascular e peritubular. O estudo do cólon, baço e pulmões não revelou alterações.

Figura 15 – Esteatose hepática em camundongo do grupo GIV

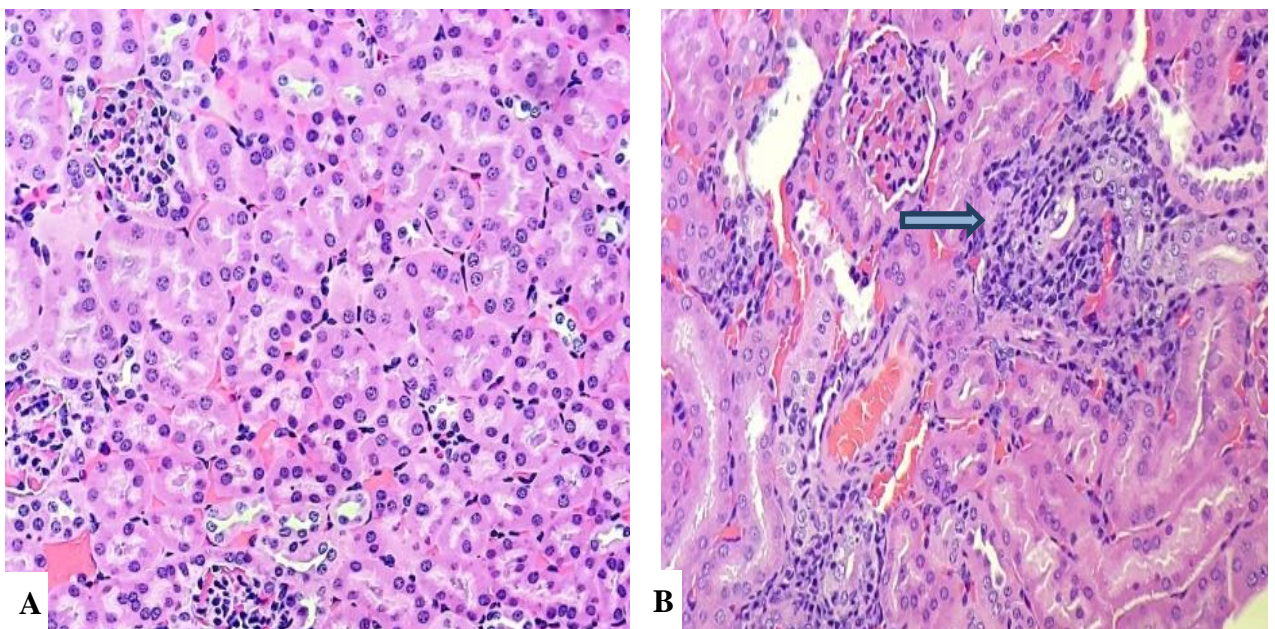


Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Figura 15A: fígado normal do grupo controle (GI) para comparação. Figura 15B: fígado com degeneração gordurosa discreta (esteatose - seta) (grupo GIV) (aumento de 400x, coloração: Hematoxilina e Eosina).

Entre os animais do grupo GV, um deles apresentou esteatose hepática macro e microgoticular perivenular discreta e outro tinha leve dilatação sinusoidal. No rim de dois camundongos foi encontrada inflamação peritubular (figura 16). A análise do cólon, baço e pulmões não revelou alterações.

Figura 16 – Inflamação peritubular em camundongo do grupo GV

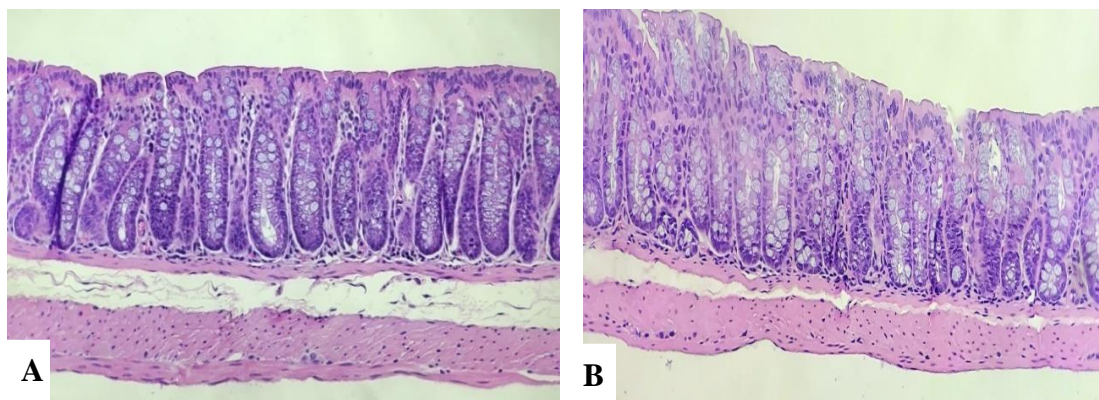


Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Figura 16A: rim normal do grupo controle (GI) para comparação. Figura 16B: parênquima renal com infiltrado linfoplasmocitário peritubular (seta) (grupo GV) (aumento de 400x, coloração: Hematoxilina e Eosina).

Nos animais do grupo GVI não se observaram alterações significativas, assim como não foram encontradas criptas aberrantes pelo estudo na microscopia óptica em nenhum grupo (figura 17).

Figura 17 – Ausência de criptas aberrantes na microscopia óptica



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Figura 17A: cólon normal do grupo controle (GI) para comparação. Figura 17B: cólon normal do grupo experimental (GVI). Não foram observadas criptas aberrantes (aumento de 200x, coloração: Hematoxilina e Eosina).

5.9 Ensaio biológicos

5.9.1 Ensaio do cometa e detecção de EROS

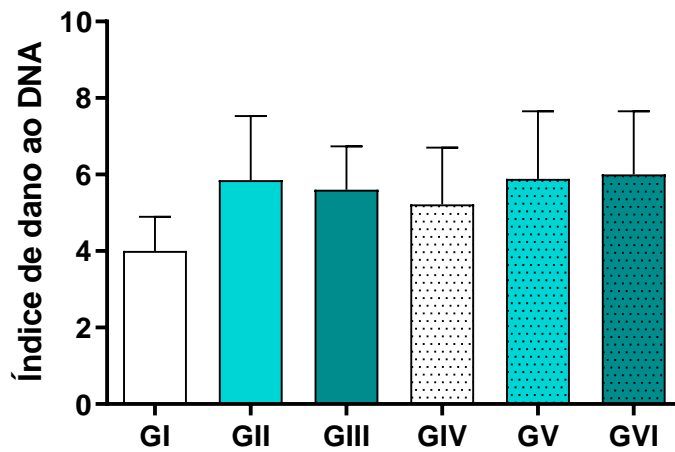
5.9.1.1 Cólon proximal

A avaliação da genotoxicidade por meio do ensaio do cometa neutro não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$ - ANOVA associada a Tukey, gráfico 6). No ensaio do cometa alcalino, notou-se que a genotoxicidade nos grupos GV e GVI foi menor que no grupo GIV ($p < 0,01$ - ANOVA associada a Tukey, gráfico 7). No ensaio do cometa alcalino com enzima hOGG1, observou-se que a genotoxicidade nos grupos GV e GVI foi menor que no grupo GIV ($p < 0,001$), assim como a genotoxicidade no grupo GVI foi menor comparada ao grupo GV ($p < 0,05$ - ANOVA associada a Tukey, gráfico 8).

Com relação ao estresse oxidativo, a porcentagem de EROS foi menor nos grupos que tomam goma, GV e GVI comparados a GIV ($p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente - ANOVA associado a Tukey, gráfico 9).

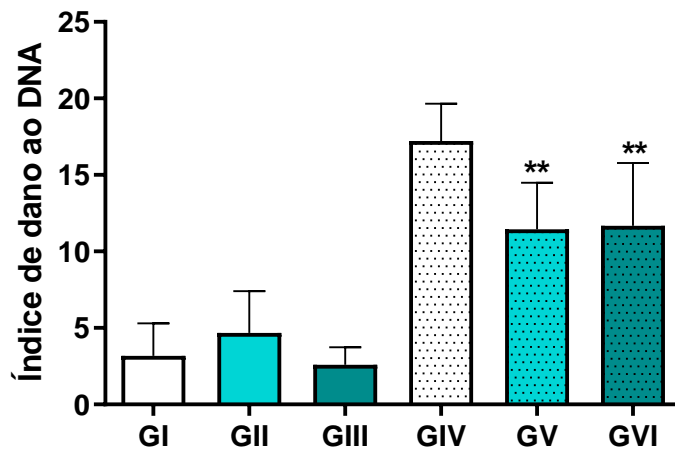
Dados expressos como média e desvio-padrão das observações realizadas nos grupos I (n=6), II (n=6), III (n=5), IV (n=12), V (n=11) e VI (n=13).

Gráfico 6 – Ensaio do cometa neutro em cólon proximal



Fonte: Dados da pesquisa.

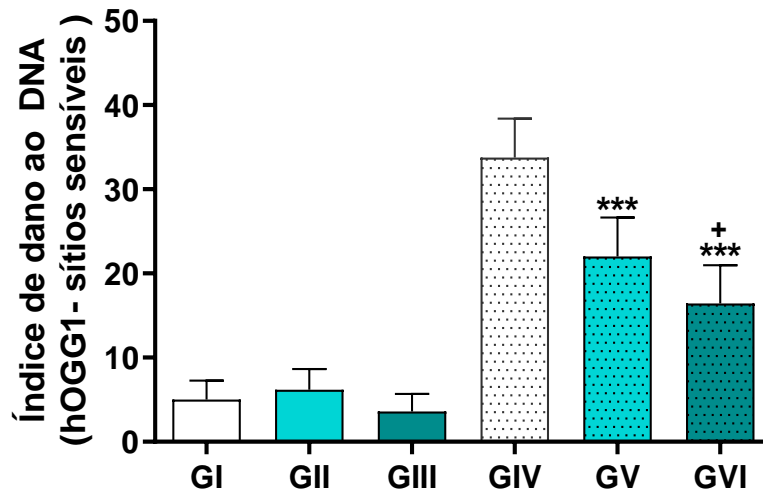
Gráfico 7 – Ensaio do cometa alcalino em cólon proximal



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: ** $p < 0,01$ em relação a GIV

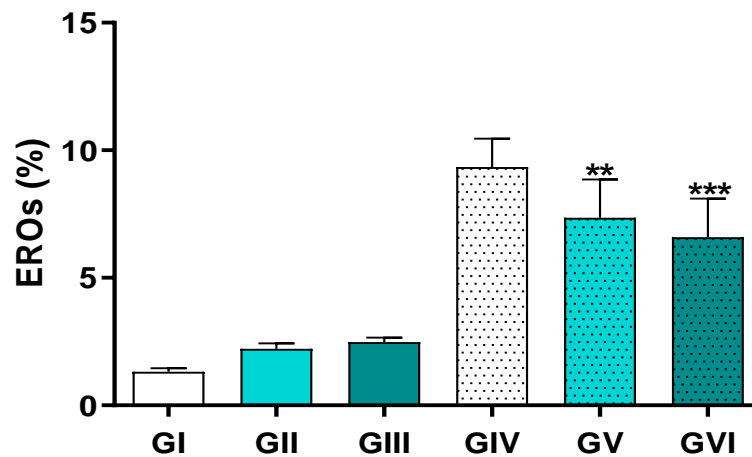
Gráfico 8 – Ensaio do cometa alcalino com hOGG1



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *** $p < 0,001$ em relação a GIV; + $p < 0,05$ em relação a GV

Gráfico 9 – EROS em cólon proximal



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *** $p < 0,001$ em relação a GIV; ** $p < 0,01$ em relação a GIV

5.9.1.2 Cólon distal

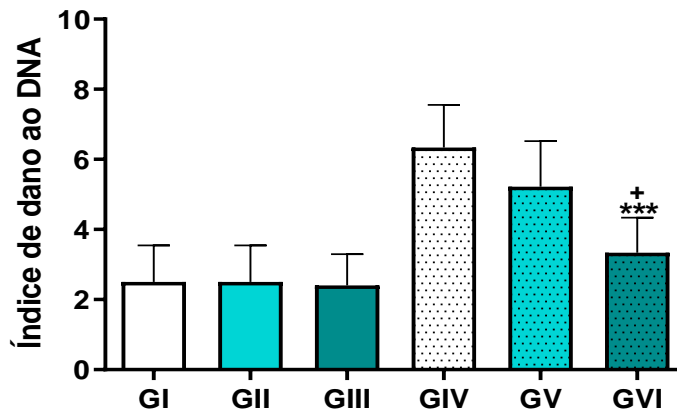
A avaliação da genotoxicidade através do ensaio do cometa neutro revelou redução significativa da genotoxicidade do grupo GVI comparado ao grupo GIV ($p < 0,001$) e do grupo GVI comparado ao grupo GV ($p < 0,05$) (ANOVA associado a Tukey, gráfico 10). No ensaio do cometa alcalino e cometa alcalino com enzima hOGG1, notou-se que a genotoxicidade nos grupos GV e GVI foi menor que no grupo GIV ($p < 0,001$) (ANOVA

associado a Tukey, gráfico 11 e gráfico 12).

Com relação ao estresse oxidativo, a porcentagem de EROS foi menor nos grupos que receberam goma, GV e GVI ($p < 0,001$) (ANOVA associado a Tukey, gráfico 13).

Dados expressos como média e desvio-padrão das observações realizadas nos grupos I (n=6), II (n=6), III (n=5), IV (n=12), V (n=11) e VI (n=13).

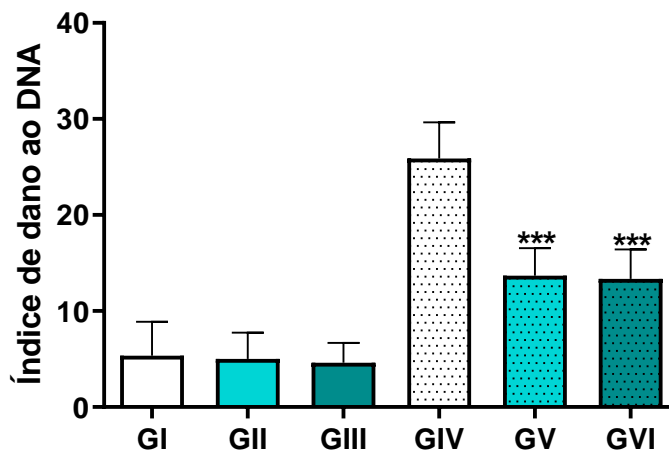
Gráfico 10 - Ensaio do cometa neutro em cólon distal



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *** $p < 0,001$ em relação a GIV; + $p < 0,05$ em relação a GV

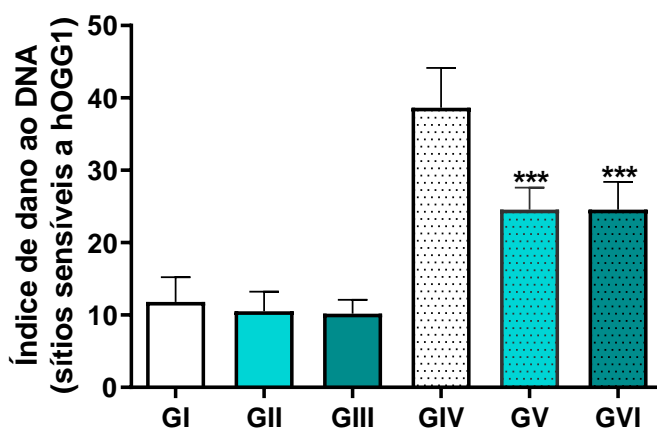
Gráfico 11 - Ensaio do cometa alcalino em cólon distal



Fonte: Dados da pesquisa.

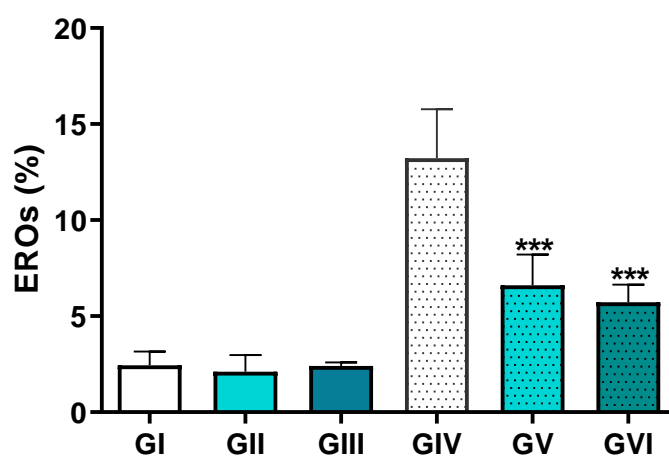
Legenda: *** $p < 0,001$ em relação a GIV

Gráfico 12 – Ensaio do cometa alcalino com hOGG1 em cólon distal



Fonte: Dados da pesquisa.
 Legenda: *** $p < 0,001$ em relação a GIV

Gráfico 13 – EROS em cólon distal



Fonte: Dados da pesquisa.
 Legenda: *** $p < 0,001$ em relação a GIV

5.9.1.3 Fígado

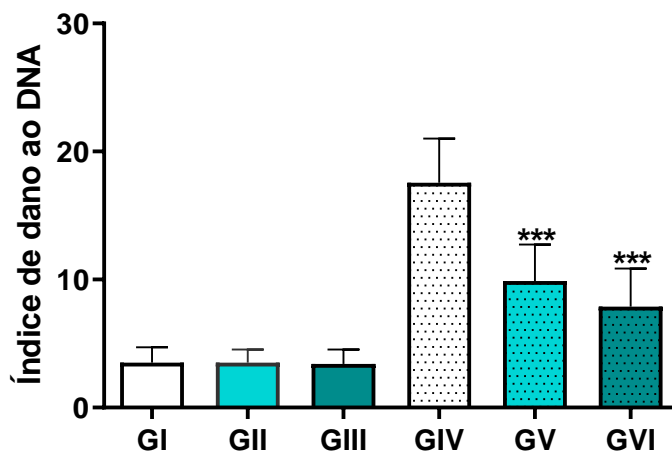
O estudo da genotoxicidade revelou redução da mesma do grupo GVI e GV comparado ao grupo GIV no ensaio do cometo neutro (gráfico 14), alcalino (gráfico 15) e alcalino com enzima hOGG1 (gráfico 16) com $p < 0,001$ em todos ensaios (ANOVA associado

a Tukey).

No que diz respeito ao estresse oxidativo, as EROS foram menos numerosas nos grupos que receberam goma, GV e GVI comparados ao GIV ($p < 0,001$ - ANOVA associado a Tukey, gráfico 17).

Dados expressos como média e desvio-padrão das observações realizadas nos grupos I (n=6), II (n=6), III (n=5), IV (n=12), V (n=11) e VI (n=13).

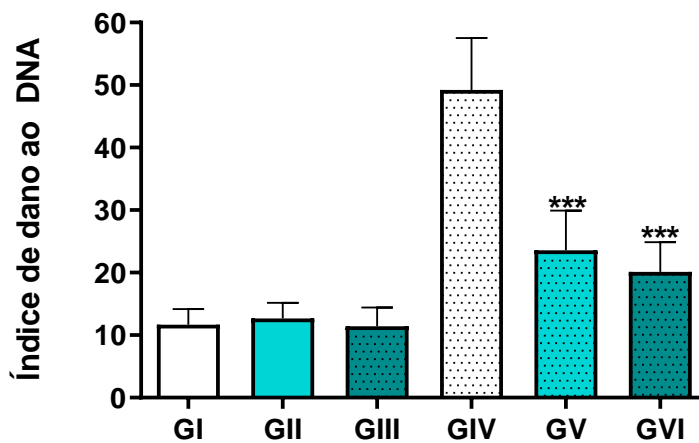
Gráfico 14 – Ensaio do cometa neutro no fígado



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *** $p < 0,001$ em relação a GIV

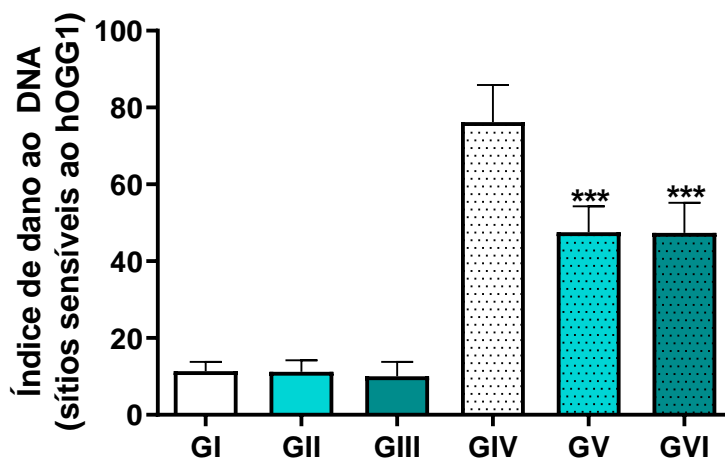
Gráfico 15 – Ensaio do cometa alcalino no fígado



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *** $p < 0,001$ em relação a GIV

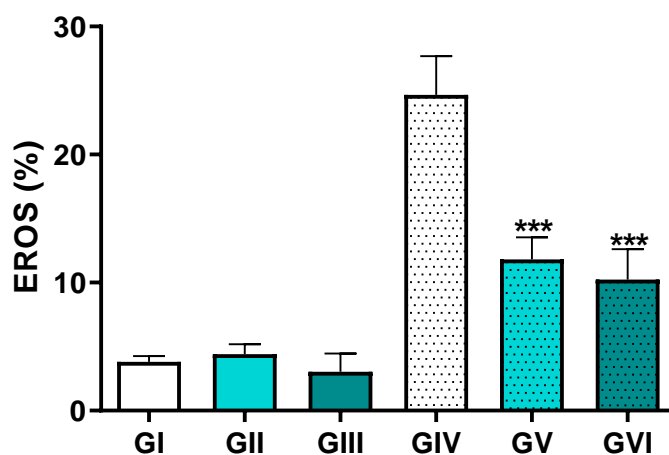
Gráfico 16 – Ensaio do cometo alcalino com hOGG1 em fígado



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *** $p < 0,001$ em relação a GIV

Gráfico 17 – EROS em fígado



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *** $p < 0,001$ em relação a GIV

5.9.2 Sangue (ensaio do cometa, teste do micronúcleo e EROS)

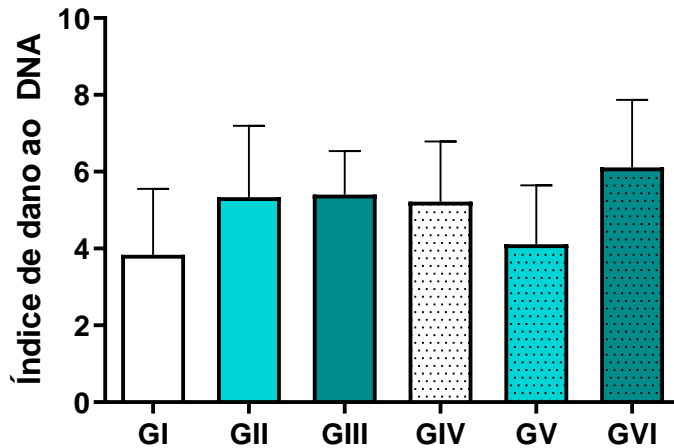
No sangue não foi observada genotoxicidade pelo ensaio do cometa alcalino ($p > 0,05$) (gráfico 18) e teste do micronúcleo ($p > 0,05$) (ANOVA associado a Tukey, gráfico 19).

Com relação ao estresse oxidativo, as EROS obtiveram uma porcentagem

estatisticamente menor no grupo GVI comparado ao GIV ($p < 0,001$ - ANOVA associado a Tukey, gráfico 20).

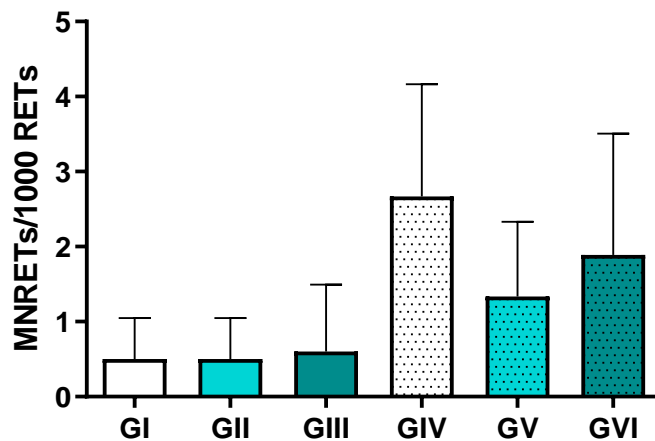
Dados expressos como média e desvio-padrão das observações realizadas nos grupos I (n=6), II (n=6), III (n=5), IV (n=12), V (n=11) e VI (n=13).

Gráfico 18 – Ensaio do cometa alcalino em sangue



Fonte: Dados da pesquisa.

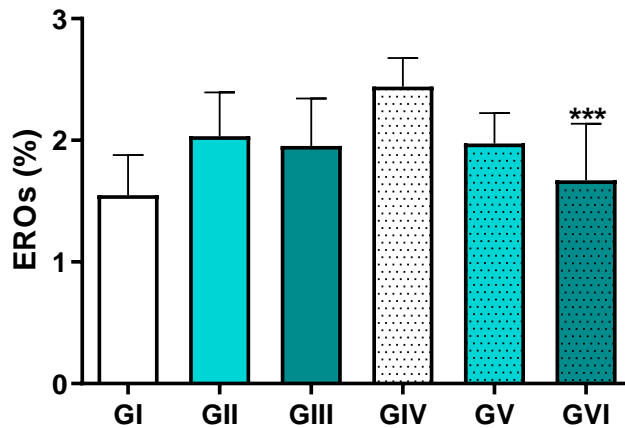
Gráfico 19 – Teste do micronúcleo no sangue



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: MNRETs: reticulócitos micronucleados; RETs: reticulócitos.

Gráfico 20 – EROS no sangue



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *** $p < 0,001$ em relação a GIV

5.9.3 Medula óssea (ensaio do cometa e teste do micronúcleo)

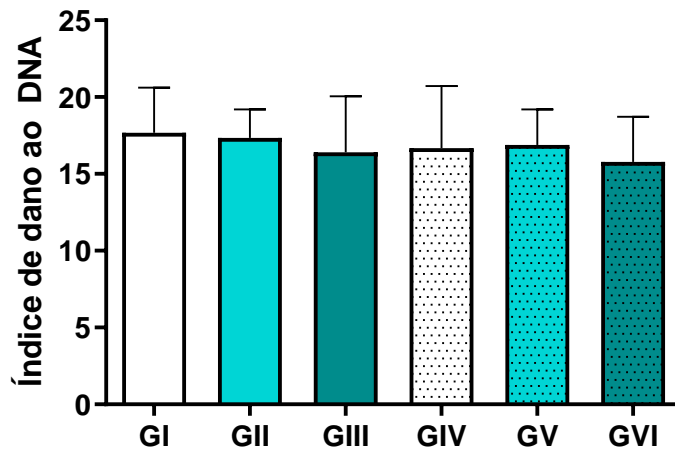
O estudo da medula óssea não revelou genotoxicidade nos grupos através do ensaio do cometa alcalino ($p > 0,05$ - ANOVA associado a Tukey, gráfico 21).

No teste do micronúcleo, houve redução da formação de micronúcleos nos grupos GV ($p < 0,001$) e GVI ($p < 0,01$) comparados ao grupo GIV (ANOVA associado a Tukey, gráfico 22).

Quanto à citotoxicidade medular, não foi observada diferença significativa estatisticamente na relação EPC/ENC entre os grupos ($p > 0,05$ - ANOVA associado a Tukey, gráfico 23).

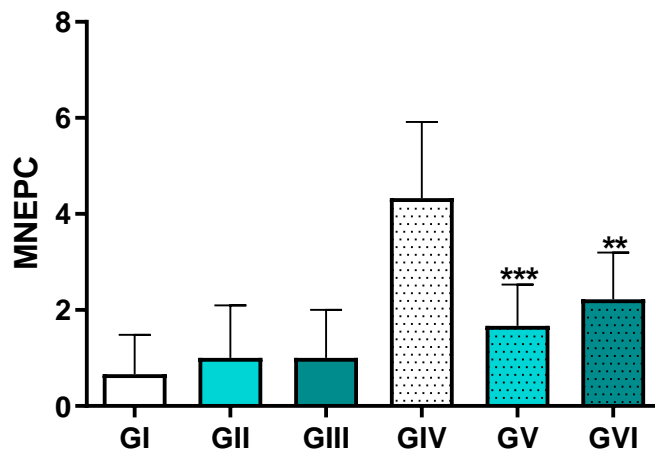
Dados expressos como média e desvio-padrão das observações realizadas nos grupos I (n=6), II (n=6), III (n=5), IV (n=12), V (n=11) e VI (n=13).

Gráfico 21 – Ensaio do cometa alcalino na medula óssea



Fonte: Dados da pesquisa.

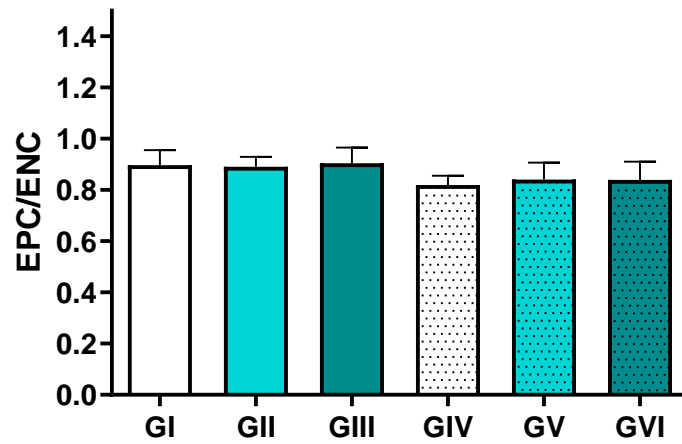
Gráfico 22 – Teste do micronúcleo na medula óssea



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: MNEPC: Micronúcleos em eritrócitos policromáticos; ** $p < 0,01$ em relação a GIV; *** $p < 0,001$ em relação a GIV

Gráfico 23 – Relação entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos da medula óssea



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: EPC: Eritrócitos policromáticos; ENC: Eritrócitos normocromáticos; $p > 0,05$ entre todos grupos

6 DISCUSSÃO

O câncer representa um importante problema de saúde pública mundial correspondendo a uma das principais causas de morte da população e com estimativa de 5,2% no crescimento de óbitos em 2020 comparado a 2018 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). No Brasil, o câncer corresponde à segunda causa de morte ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares sendo que o CCR é a terceira neoplasia maligna mais incidente (BRASIL, 2020).

Dada a importância do tema, muito tem se estudado sobre câncer e grandes avanços têm se obtido nas formas de tratamento, entretanto pouco se sabe sobre maneiras de evitar a progressão da doença.

Uma forma de estudar o CCR com mais detalhes, suas repercussões no organismo e formas de quimioprevenção, é utilizando modelos de experimentação animal. Modelos com roedores são amplamente usados para mimetizar doenças humanas, permitindo melhor entendimento de suas causas, progressão e possibilitando o desenvolvimento de intervenções terapêuticas. O estudo clássico da carcinogênese colorretal está pautado principalmente na utilização do AOM em modelo experimental com ratos, sendo menor a quantidade de relatos deste carcinógeno em camundongos (BISSAHOYO *et al.*, 2005; CENESIZ *et al.*, 2008; HATA *et al.*, 2004; MADRIGAL-BUJAJIDAR *et al.*, 2013). Nesta pesquisa, foram utilizados estes últimos animais, já que os camundongos apresentam carcinogênese colorretal muito semelhante a humana do ponto de vista histológico e genético (CORPET; PIERRE, 2005). Além disso, esse modelo permite a indução tumoral de maneira rápida, reprodutível, recapitulando a mesma sequência da carcinogênese humana (das lesões pré-neoplásicas ao carcinoma) e reduzindo os custos comparado aos ratos (que são animais de maior porte) (ROSENBERG; GIARDINA; TANAKA, 2009).

Para indução da carcinogênese colorretal, foi utilizado o AOM, metabólito hepático da 1,2-dimetil-hidrazina, indutor direto de neoplasia. É considerado um potente carcinógeno colônico, sendo amplamente utilizado em modelos experimentais (PÉREZ-HOLANDA *et al.*, 2008). Seu mecanismo de ação está relacionado a mutações das vias K-ras, β -catenina e TGF- β (CHEN; HUANG, 2009) e ao estresse oxidativo pela indução da formação de peróxidos lipídicos e EROS (AL-NUMAIR *et al.*, 2011; ANILAKUMAR *et al.*, 2010; WALY *et al.*, 2014).

Este estudo objetivou avaliar os efeitos da GA na formação de criptas aberrantes, genotoxicidade e EROS em camundongos *Swiss* submetidos a carcinogênese colorretal

induzida pelo AOM. Para isso, foram utilizados 55 animais distribuídos em 6 grupos, os quais receberam diferentes substâncias via gavagem (água destilada, GA 2,5% ou GA 5%).

O protocolo experimental do presente estudo foi desenvolvido em 12 semanas e, do ponto de vista clínico, foram observadas poucas alterações. Notou-se rarefação de vibrissas e pelos próximo ao focinho dos animais em todos os grupos com exceção de um camundongo em cada grupo. Esse fenômeno está relacionado ao comportamento do animal dominante em que ele retira o pelo dos outros indivíduos do grupo (KALUEFF *et al.*, 2006). Não houve outras mudanças no comportamento, motricidade, padrão respiratório ou características das fezes.

Percebeu-se que os animais de todos os grupos apresentaram ganho de peso ao longo da pesquisa, sendo maior o do grupo GII (Água + GA 2,5%) - 50,73% e menor o do grupo GV (AOM + GA 2,5%) - 39,30%. Entretanto, não houve diferença estatística significativa no ganho de peso entre os diferentes grupos ($p=0,7505$) ou no peso final ($p=0,0765$) dos animais, o que significa que as substâncias administradas não alteraram a ingesta alimentar nem induziram anorexia, muito embora a dose de carcinógeno utilizada tenha sido apenas para indução de lesões pré-neoplásicas. Esses resultados correspondem aos encontrados na literatura, mostrando que não há diferença de peso entre camundongos (C57BL/6, CF1 e ddY) com a utilização do AOM em concentração e tempo semelhantes aos utilizados neste trabalho (JEONG; CHANG; PARK, 2012; MADRIGAL-BUJAJIDAR *et al.*, 2013; SHIMIZU *et al.*, 2006).

No presente estudo, também não foi observada diferença estatística significativa no peso dos órgãos (baço, fígado, pulmões e rins) entre os grupos. O que vai de encontro à literatura, a qual demonstra que a aplicação do AOM em camundongos C57BL/6 provoca um aumento do peso dos órgãos pela indução da resposta inflamatória com o recrutamento de células de defesa e retenção de líquido (JEONG; CHANG; PARK, 2012; LIU *et al.*, 2018). Essa diferença pode ser atribuída à pouca inflamação encontrada no estudo histopatológico dos órgãos neste trabalho.

Em se tratando mais especificadamente do CCR e tendo em vista a repercussão que a neoplasia tem para a população, é fundamental o estudo da sua fisiopatogênese e a pesquisa de novas maneiras de prevenir seu aparecimento ou impedir sua progressão a partir das fases iniciais. Entre essas formas de prevenção, tem importância ainda maior os compostos naturais, que podem ser obtidos com maior facilidade e menor custo, principalmente em países de grande biodiversidade como o Brasil, facilitando seu acesso à população.

Um desses compostos que parece ter influência na carcinogênese colorretal é a GA, fibra dietética (TISS; CARRIÈRE; VEGER, 2001), obtida a partir dos exsudatos de caules e ramos de vegetais do gênero *Acacia* (ISLAM *et al.*, 1997) que possui efeito anti-inflamatório (KAMAL *et al.*, 2018) e antioxidante (GADO; ALDAHMAH, 2013).

Sabe-se que a carcinogênese colorretal consiste em uma sequência de alterações genéticas e histopatológicas caracterizadas inicialmente por discretas alterações arquiteturais do epitélio colônico, as criptas aberrantes (KHARE *et al.*, 2009). Por serem as primeiras modificações histológicas detectáveis, são consideradas um marcador biológico do desenvolvimento da doença, sendo utilizadas nas pesquisas relacionadas à quimioprevenção do CCR (SIU *et al.*, 1997; TAKAYAMA *et al.*, 1998).

Neste trabalho, estudou-se a relação entre as criptas aberrantes e utilização da GA. Foi observado que o número de criptas aberrantes e de FCA nos cólons dos camundongos que receberam AOM foi de $7,69 \pm 7,67$ criptas aberrantes e de $4,72 \pm 4,03$ FCA por animal em média. Estes números são reduzidos em relação ao que se observa na literatura no modelo de ratos (NORAZALINA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 1994; VELMURUGAN *et al.*, 2010). Mas quando comparado a modelos de camundongos, os resultados são semelhantes com doses similares do carcinógeno (BIRD, 1987; MADRIGAL-BUJAJIDAR *et al.*, 2013).

Analisando-se de acordo com o segmento colônico, não se nota diferença estatística significativa entre os segmentos intestinais de um mesmo grupo quanto ao número de criptas ($p=0,6012$) ou FCA ($p=0,2889$). Ao mesmo tempo, percebe-se que o grupo GIV (AOM + água), que não recebeu goma, foi o que obteve o maior número de criptas aberrantes e FCA em cada segmento individualmente (proximal, médio e distal), com predomínio no segmento distal do cólon. Esse aspecto é concordante com a literatura, já que os trabalhos mostram maior concentração de criptas aberrantes no cólon médio e distal de ratos (Wistar e F344) (GHIRARDI *et al.*, 1999; RODRIGUES *et al.*, 2002), no segmento distal de camundongos (C57BL/6J, CF1, SWR/J, A/J e AKR/J) (MCLELLAN; BIRD, 1988; PAPANIKOLAOU *et al.*, 1998) e humanos (SHPITZ, 1998).

Quando se compara os diferentes segmentos colônicos entre os diferentes grupos, nota-se redução da quantidade de criptas aberrantes nos grupos que receberam GA, principalmente no segmento distal do intestino.

O número de criptas aberrantes do cólon distal do grupo GVI (AOM + GA 5%) foi estatisticamente menor que no grupo GIV (AOM + água) ($p=0,0031$), não se observando diferença significativa estatística quando comparado ao grupo GV (AOM + GA 2,5%) em que foi utilizada uma concentração menor da GA. De forma semelhante, o número de FCA

também foi menor no grupo GVI (AOM + GA 5%) comparado ao grupo GIV (AOM + água) no cólon distal ($p=0,0012$) e médio ($p=0,0405$). Embora não tenha havido diferença estatística significativa entre os grupos GV (AOM + GA 2,5%) e GVI (AOM + GA 5%), a utilização da GA 2,5% no grupo GV proporcionou resultados menos consistentes, notando-se redução de FCA no cólon médio ($p=0,0346$), mas sem redução no cólon distal. No cólon proximal não foram observadas diferenças estatisticamente significantes.

Observou-se que a redução na formação de criptas aberrantes foi mais evidente nos segmentos distais do cólon. O que pode ser explicado pela via de formação tumoral diferente neste segmento (relacionada principalmente à deficiência de mecanismos de reparo do DNA e diferenças na composição e metabolismo de glicoproteínas) (FREEMAN; KIM; KIM, 1978; PERSE; CERAR, 2011). Trabalho já apresentado por nosso grupo de pesquisa em 2019 também mostrou redução da formação de FCA em ratos Wistar com o uso da GA 1% principalmente nos segmentos distais (BRAGA *et al.*, 2019).

A literatura relata o aparecimento de lesões pré-neoplásicas em ratos com o avançar da idade, mesmo que não tenham recebido carcinógeno (HOLT; YEH, 1988). Nesta pesquisa não foram observadas criptas aberrantes nos animais dos grupos controle GI (água), GII (água + GA 2,5%) e GIII (água + GA 5%), o que pode ter relação com o tempo de experimento (12 semanas) que é pequeno para o desenvolvimento de criptas aberrantes pela senescência dos animais.

Considerando toda extensão do cólon, foi notado que o número de criptas aberrantes observado no grupo GIV (AOM + água: $12,67 \pm 7,05$) foi maior que o verificado nos grupos GV (AOM + GA 2,5%: $5,00 \pm 4,58$; $p=0,0379$) e GVI (AOM + GA 5%: $5,39 \pm 8,75$; $p=0,0401$). De forma semelhante, o número de FCA no grupo GIV (AOM + água: $8,75 \pm 3,55$) foi maior que o verificado nos grupos GV (AOM + GA 2,5%: $3,18 \pm 2,99$; $p=0,0004$) e GVI (AOM + GA 5%: $2,46 \pm 2,79$; $p<0,0001$). Isso mostra que a utilização de GA 2,5% e GA 5% nos grupos GV e GVI respectivamente provocou redução da formação de criptas aberrantes e FCA.

São muito poucos os trabalhos relatados que investigaram a utilização da GA na inibição da carcinogênese colorretal (BRAGA *et al.*, 2019; NASIR *et al.*, 2010). Entretanto, os resultados apresentados estão em concordância com os encontrados nesta pesquisa. Nasir *et al.* (2010) mostraram que a GA a 10% tem efeito importante em reduzir o crescimento de tumores do cólon de camundongos BALB/c. De forma semelhante, Braga *et al.* (2019) demonstraram redução da formação de FCA em ratos Wistar que receberam GA 1%. Segundo Nasir *et al.* (2010), esse efeito da GA está relacionado principalmente a redução dos níveis

transcricionais no epitélio colônico de angiogeninas (proteínas relacionadas ao crescimento de novos vasos sanguíneos) e genes importantes para a proliferação celular e/ou crescimento tumoral, como o antígeno CD38, ubiquitina D, oncogene vav 3, ligante de quimiocina 5 e β -catenina. Somado a isso, tem-se o efeito anti-inflamatório da GA (GILBERT *et al.*, 1989; KAMAL *et al.*, 2018), a propriedade de induzir a formação de ácidos graxos com propriedades anti-tumorais a partir da fermentação bacteriana no cólon (BASSON; EMENAKER; HONG, 1998) e seu poder antioxidante, responsável por reduzir o estresse oxidativo induzido por EROS (AHMED *et al.*, 2015; NEMMAR *et al.*, 2019). Este efeito de redução do estresse oxidativo pela GA também ocorreu em nossa avaliação no cólon proximal e distal como veremos mais adiante.

No que diz respeito ao número de criptas por foco (multiplicidade), sabe-se que os focos com maior quantidade de criptas têm um comportamento mais agressivo, apresentam resposta diferente a fatores de crescimento e são mais resistentes a mecanismos anti-tumorais. Dessa forma, quanto maior a multiplicidade de criptas, maior a chance de se desenvolver o câncer, principalmente os FCA que apresentam mais de 5 criptas por foco (BIRD, 1995; BOATENG *et al.*, 2007; LASKO; BIRD, 1995; SHIRTLIFF; BIRD, 1996).

Quando se comparou os FCA com até 5 criptas, observou-se que houve redução significativa no grupo GVI (AOM + GA 5%) comparado ao grupo GIV (AOM + água) em segmento médio ($p=0,0405$) e distal ($p=0,0010$). Já no grupo GV (AOM + GA 2,5%) comparado ao grupo GIV (AOM + água) houve diminuição significativa dos FCA apenas em segmento médio ($p=0,0346$). Analisando-se o cólon como um todo, percebeu-se que o número de FCA nos grupos GV (AOM + GA 2,5%) e GVI (AOM + GA 5%) foi significativamente menor que no grupo GIV (AOM + água) ($p=0,0006$ e $p<0,0001$ respectivamente). Resultado semelhante foi mostrado por nosso grupo de pesquisa em trabalho apresentado em 2019 que evidenciou redução da quantidade de FCA com ≤ 4 criptas em ratos Wistar que receberam GA 1% (BRAGA *et al.*, 2019). Isso se deve provavelmente aos efeitos protetores da GA já mencionados.

Quanto aos FCA com mais de 5 criptas, não se observou diferença estatística significativa entre os grupos quando comparados por segmento colônico ou quando comparados em toda extensão do cólon. O que pode ser explicado pela pouca quantidade de focos com essa quantidade de criptas, já que o tempo de experimentação foi pequeno.

Um aspecto importante relacionado a carcinogênese é o estresse oxidativo, evento que ocorre nas etapas iniciais da carcinogênese e em que há predomínio na formação de compostos oxidantes em detrimento da ação dos sistemas antioxidantes (BARBOSA *et al.*,

2010). Nessa situação, as EROS causam dano tecidual com fragmentação do DNA e desregulação do seu sistema de reparo, contribuindo para o desenvolvimento do câncer (SOSA *et al.*, 2013).

Nesta pesquisa, a utilização da GA reduziu a formação de EROS no grupo GV (AOM + GA 2,5%) e grupo GVI (AOM + GA 5%) comparado ao grupo GIV (AOM + água) em cólon proximal ($p < 0,01$) e distal ($p < 0,001$).

Conforme discutido previamente, o uso da GA 2,5% proporcionou redução da formação de FCA em cólon médio, enquanto a GA 5% reduziu a formação de FCA em cólon médio e distal, assim como o número de criptas no segmento distal. Não ocorreu redução de criptas aberrantes no cólon proximal em nenhuma das concentrações. O que é um aspecto interessante, pois a concentração parece não ter influenciado na formação dos FCA no cólon proximal mesmo com assinalada e significativa redução do estresse oxidativo. Mas, é preciso lembrar que as alterações morfológicas das criptas são posteriores aos danos ocorridos a nível de homeostase celular (WALY *et al.*, 2014) e conseqüentemente a proteção antioxidante gerada pela GA foi identificada em ambos segmentos colônicos, embora não se visualize seu benefício morfológicamente no cólon proximal.

Essa redução da concentração de EROS pela GA é correspondente ao efeito antioxidante desse composto já apresentado pela literatura em modelos animais e está relacionada à propriedade de seus componentes flavonoides e outros polifenóis em causar redução da peroxidação lipídica e aumento da atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) (AHMED *et al.*, 2016; NAJLA *et al.*, 2017). Além disso, a goma possui em sua formação aminoácidos com propriedades antioxidantes como a lisina, tirosina e histidina (MARCUSE, 1960; PARK; MURAKAMI; MATSUMURA, 2005). Pesquisa recente desenvolvida por Ali *et al.* (2020), por exemplo, demonstra a redução da oxidação e inflamação na mucosa gastrointestinal de camundongos CD1 com doença renal crônica que receberam GA 15%.

Outro conceito importante em se tratando de carcinogênese é a genotoxicidade, evento que ocorre após o estresse oxidativo e corresponde a capacidade que determinado agente químico tem de causar dano ao DNA ou cromossomo das células. Essas alterações do material genético podem levar ao desenvolvimento de mutações e ao câncer (PHILLIPS; ARLT, 2009). Com isso, a análise da genotoxicidade tem importância em prever o potencial que determinado agente tem em induzir ou evitar o desenvolvimento do câncer.

Os métodos mais utilizados na avaliação da genotoxicidade são o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo. O ensaio do cometa possibilita o estudo de dano ao material

genético de células individuais a partir da análise da migração do DNA em gel de agarose (OSTLING; JOHANSON, 1984). Este método se aplica a qualquer tipo de célula eucariótica, tem baixo custo e permite a aferição direta da capacidade de quebra do DNA por um agente químico (SILVA *et al.*, 2000). O teste do micronúcleo avalia a capacidade que determinado agente tem em induzir quebras cromossômicas (efeito clastogênico) ou divisão cromossômica anormal (efeito aneugênico), o que leva a distribuição desigual dos cromossomos durante a divisão celular e formação dos micronúcleos que são fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros não incorporados ao núcleo da célula filha (MACGREGOR *et al.*, 1987).

Nesta pesquisa, o estudo do cólon proximal revelou redução da genotoxicidade por meio do ensaio cometa alcalino nos grupos que receberam GA GV (AOM + GA 2,5%) e GVI (AOM + GA 5%) ($p < 0,01$). Pelo ensaio do cometa alcalino com enzima hOGG1, também observou-se diminuição da genotoxicidade dos grupos GV (AOM + GA 2,5%) e GVI (AOM + GA 5%) comparados ao grupo GIV (AOM + água) ($p < 0,001$). Além disso, nesse mesmo ensaio foi observada redução da genotoxicidade do grupo GVI (AOM + GA 5%) comparado ao grupo GV (AOM + GA 2,5%) ($p < 0,05$) que recebeu uma menor concentração de GA. Pelo ensaio do cometa neutro, nenhuma diferença estatística significativa foi notada, provavelmente porque não houve quebra da dupla fita do DNA (SINGH *et al.*, 1988).

No cólon distal, obteve-se redução da genotoxicidade por meio do ensaio do cometa alcalino e cometa alcalino com enzima hOGG1 nos grupos GV (AOM + GA 2,5%) e GVI (AOM + GA 5%) ($p < 0,001$). Pelo ensaio do cometa neutro, notou-se menor genotoxicidade no grupo GVI (AOM + GA 5%) comparado ao grupo GIV (AOM + água) ($p < 0,001$) e comparado ao grupo GV (AOM + GA 2,5%) ($p < 0,05$). Entretanto, não se observou diferença estatística significante entre o grupo GV (AOM + GA 2,5%) e o grupo GIV (AOM + água) por este último método ($p > 0,05$).

Essa redução da genotoxicidade do cólon nos grupos que receberam GA (2,5% e 5%) mais uma vez corrobora nossos resultados com relação a redução de criptas aberrantes. Ou seja, o uso da GA diminuiu não só o estresse oxidativo, como a genotoxicidade em cólon proximal e distal.

A redução do estresse oxidativo e genotoxicidade em cólon distal está relacionada a diminuição do número de criptas aberrantes neste segmento, diferente do cólon proximal, em que mesmo com a diminuição do estresse oxidativo e genotoxicidade, não se observou redução do número de criptas. Isso pode ser explicado porque o fenômeno morfológico de aparecimento dos FCA é posterior aos danos ocorridos a nível de homeostase celular (WALY

et al., 2014). Ou seja, mesmo com a proteção na genotoxicidade pela GA, pode não haver redução da formação de criptas (como no caso de cólon proximal deste estudo), já que essa alteração morfológica acontece em uma etapa seguinte da carcinogênese.

Apesar de não ter sido avaliada a genotoxicidade ou estresse oxidativo do cólon médio, pode-se supor que estavam reduzidos nos grupos que receberam goma, já que esses parâmetros diminuíram em cólon proximal e distal, bem como a identificada redução das criptas aberrantes observadas no segmento intermediário do cólon.

A partir da microscopia óptica (realizada em cortes de 5 micrômetros dos segmentos do cólon disposto em formato de “rocambolé”), não se evidenciaram criptas aberrantes, diferente da microscopia estereoscópica. Isso se deve ao fato de que este último é um método mais sensível no qual se avalia de forma tridimensional toda a superfície intestinal, enquanto a microscopia óptica se trata de uma amostragem em duas dimensões de parte do órgão.

Quanto à medula óssea, não foi observada genotoxicidade por meio do ensaio do cometa alcalino nos grupos analisados GI-GVI. Entretanto, no teste do micronúcleo, houve menor genotoxicidade nos grupos GV (AOM + GA 2,5%) ($p < 0,001$) e GVI (AOM + GA 5%) ($p < 0,01$) comparados ao grupo GIV (AOM + água) que não recebeu GA. Essa diferença se deve aos distintos mecanismos de alteração do DNA relacionados a positividade de cada um dos testes. O micronúcleo é mais sensível na detecção de lesões iniciadas após um maior tempo de exposição, lesões irreparáveis e mutações cromossômicas, enquanto o ensaio do cometa está mais relacionado a detecção de lesões mais precoces e reversíveis (MALUF, 2004). Soma-se a isso o fato de alguns carcinógenos apresentarem baixo nível de ativação metabólica a nível medular o que diminui a sensibilidade da detecção de seus efeitos nesta localização (AGOSTINI, 1993).

Essa redução da genotoxicidade se deve provavelmente às propriedades anti-tumorais da GA que tem efeito inibitório sobre genes relacionados a proliferação celular conforme discutido previamente (NASIR *et al.*, 2010), assim como à inibição do estresse oxidativo pela GA (AHMED *et al.*, 2016; MOHAMED *et al.*, 2018; NEMMAR *et al.*, 2019).

Para estudo da citotoxicidade medular, foi realizada a relação entre eritrócitos policromáticos (EPC) e eritrócitos normocromáticos (ENC). Sabe-se que os EPC são formas jovens de glóbulos vermelhos, derivadas dos eritroblastos, sem núcleo, mas dotados de uma trama reticular rica em RNA e caracterizados por adquirirem coloração azul clara em contato com o Giemsa. À medida que amadurecem, perdem o RNA e tornam-se normocromáticos, passando a ser chamados de ENC (KRISHNA; HAYASHI, 2000). Como fazem parte dos

estágios iniciais da hematopoiese, a quantidade de eritrócitos medulares, principalmente os policromáticos, refletem a integridade funcional da medula óssea e sua capacidade de produzir novas células. Dessa forma, a relação EPC/ENC é utilizada para avaliar a citotoxicidade de determinado agente, uma vez que quanto mais tóxico ele for, menor será a produção de EPC e conseqüentemente menor será a relação EPC/ENC (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

Neste trabalho, não se notou diferença na relação EPC/ENC entre os diferentes grupos, ou seja, não houve diferença na citotoxicidade medular. Isso pode se dever ao fato de que determinados carcinógenos atingem baixo nível de concentração na medula óssea o que dificulta a detecção do efeito dessas substâncias nesta localização conforme discutido anteriormente (AGOSTINI, 1993).

No sangue, por sua vez, não foi observada genotoxicidade nos grupos estudados GI-GVI através do ensaio do cometo alcalino e teste do micronúcleo. Esse fato se deve provavelmente à fagocitose esplênica de células com dano genético circulantes na corrente sanguínea (ISHII *et al.*, 2011).

Com relação ao estudo do estresse oxidativo a nível sorológico no momento da eutanásia dos animais, não se notou redução no grupo GV (AOM + GA 2,5%). Entretanto, percebeu-se que a quantidade de EROS foi menor no grupo GVI (AOM + GA 5%) em relação ao grupo GIV (AOM + água) ($p < 0,001$), o que pode ser explicado pela maior concentração de GA utilizada. É importante lembrar que as análises sorológicas para avaliação do estresse oxidativo correspondem às repercussões teciduais nos diversos tecidos (cólon e fígado, por exemplo), podendo não ser a expressão no sangue isoladamente. Entretanto, isso foi superado pela avaliação do estresse oxidativo no cólon e fígado individualmente.

Quanto aos achados morfológicos dos órgãos (cólon, fígado, baço, pulmões e rins), foram evidenciadas poucas alterações. Entre os animais dos grupos controle GI (água), GII (GA 2,5%) e GIII (GA 5%) não foi encontrada alteração macroscópica ou microscópica, como lesões inflamatórias, lesões neoplásicas ou formação tumoral. O que está em concordância com o apresentado por Melnik *et al.* (1983), que não observou alterações histopatológicas relacionadas ao uso da GA em ratos F344 e camundongos B6C3F1.

No fígado, sabe-se que o AOM pode induzir uma série de alterações histológicas entre as quais esteatose, peliose, espongiose, fibrose e lesões neoplásicas como colangioma, adenoma e carcinoma hepático (ABDELLA; MAHMOUD; EL-DERBY, 2016; BURLAMAQUI *et al.*, 2013; LAHOUAR *et al.*, 2014). Essas modificações estão relacionadas ao efeito oxidativo e peroxidação lipídica causados pelo carcinógeno (DIEHL,

2005).

Na microscopia óptica do fígado dos camundongos, foram identificadas discretas alterações inflamatórias como esteatose em torno da veia centro-lobular e dilatação sinusoidal em poucos animais do grupo GIV (AOM + água) e grupo GV (AOM + GA 2,5%). Essas poucas alterações são previsíveis diante da redução do estresse oxidativo hepático ($p < 0,001$) nos animais que receberam GA 2,5% ou 5%.

Foi investigada também a genotoxicidade hepática, tendo sido observada redução no grupo GV (AOM + GA 2,5%) e GVI (AOM + 5%) comparado ao grupo GIV (AOM + água) em todos ensaios (ensaio do cometo neutro, cometa alcalino e cometa alcalino com enzima hOGG1, $p < 0,001$). Resultado que era esperado pela diminuição do estresse oxidativo por efeito da GA como comentado anteriormente.

Entre as alterações renais, em um dos camundongos do grupo GIV (AOM + água) e em dois do grupo GV (AOM + GA 2,5%), notou-se inflamação peritubular, que também é relacionada à exposição ao AOM (MAHMOUD *et al.*, 2014).

Não foram identificadas alterações no baço ou pulmões, assim como não se observou alteração nos órgãos dos camundongos do grupo GVI (AOM + GA 5%).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A carcinogênese colorretal é um processo sequencial que tem início com o estresse oxidativo no cólon seguido pelo dano ao DNA (genotoxicidade), formação dos FCA (lesões pré-neoplásicas) e desenvolvimento do câncer propriamente dito, de forma que essas etapas estão interligadas entre si (AL-NUMAIR *et al.*, 2011; ANILAKUMAR *et al.*, 2010; GOLDMAN; SHIELDS, 2003; WALY *et al.*, 2014).

Estudou-se as repercussões da goma arábica a 2,5% e 5% em camundongos submetidos a carcinogênese colorretal induzida pelo AOM passando pela avaliação de lesões pré-neoplásicas colônicas (criptas aberrantes observadas ao microscópio estereoscópico) assim como a genotoxicidade (ensaio do cometa e teste do micronúcleo) e EROS em cólon, fígado, medula óssea e sangue.

Como resultado, a GA tanto na concentração de 2,5% quanto 5% foi eficaz na redução da carcinogênese (diminuição do número de criptas aberrantes) em camundongos através da diminuição do estresse oxidativo e genotoxicidade do cólon, explicando assim a fisiopatologia da carcinogênese e o mecanismo de ação da goma arábica. Somado a isso, a GA reduziu o estresse oxidativo e a genotoxicidade em diferentes tecidos (fígado, sangue e medula óssea).

Neste estudo utilizou-se o modelo de carcinogênese de cólon em camundongos, diferente da maioria das pesquisas que utilizam ratos com esse objetivo. Na verdade, a utilização de camundongos se torna interessante pela facilidade nos manuseios e pela redução dos custos com insumos de laboratório.

A GA é largamente consumida pelas populações em alimentos e preparações farmacológicas possuindo propriedades anti-tumorais pouco investigadas na literatura. Por seu efeito anti-cancerígeno e baixo custo, a GA poderá ser tomada como base no direcionamento de estudos futuros com o objetivo de desenvolver maneiras de prevenir o câncer e outras doenças cujo substrato seja o estresse oxidativo.

7 CONCLUSÃO

O uso da GA nas concentrações de 2,5% e 5% reduziu a formação de criptas aberrantes, FCA e FCA com menos de 5 criptas no cólon, principalmente em seu segmento distal por meio da redução da genotoxicidade e estresse oxidativo locais. Efeito semelhante foi observado em outros tecidos estudados, como a redução da genotoxicidade em fígado e medula óssea e do estresse oxidativo hepático e sanguíneo.

REFERÊNCIAS

- ABD-ALLAH, A. R. *et al.* Protective Effect of Arabic Gum Against Cardiotoxicity Induced by Doxorubicin in Mice: A Possible Mechanism of Protection. **J Biochem Mol Toxicol.**, New York, v. 16, n. 5, p. 254-259. 2002.
- ABDELLA, E. M.; MAHMOUD, A. M.; EL-DERBY, A. M. Brown seaweeds protect against azoxymethane induced hepatic repercussions through upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and attenuation of oxidative stress. **Pharm Biol.**, Lisse, v. 54, n. 11, p. 2496-2504, nov. 2016.
- AGOSTINI, J. M. S. O teste do micronúcleo: seu uso no homem. **Biotemas.**, Florianópolis, v. 6, n. 2, p. 1-19. 1993.
- AGUILAR, J. F. N. *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibition in colon experimental carcinogenesis. **Rev Esp Enferm Dig.**, Madrid, v. 97, n. 9, p. 637-647, set. 2005.
- AHMED, A. A. *et al.* Gum Arabic extracts protect against hepatic oxidative stress in alloxan induced diabetes in rats. **Pathophysiology.**, Amsterdam, v. 22, n. 4, p. 189-194, dez. 2015.
- AHMED, A. A. *et al.* Gum Arabic supplementation improved antioxidant status and alters expression of oxidative stress gene in ovary of mice fed high fat diet. **Middle East Fertil Soc J.**, Cairo, v. 21, n. 2, p. 101-108, jun. 2016.
- ALARIFI, S.; BELL, A.; WALTON, G. In vitro fermentation of gum acacia – impact on the faecal microbiota. **Int J Food Sci Nutr.**, v. 69, n. 6, p. 696-704, set. 2018.
- AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAM, P. A. Studies on acacia exudate gums. Part I: the molecular weight of *Acacia senegal* gum exudate. **Food Hydrocolloids.**, Wrexham, v. 19, n. 4, p. 647-660, jul. 2005.
- ALI, A. A. *et al.* The effects of gum arabic oral treatment on the metabolic profile of chronic renal failure patients under regular haemodialysis in Central Sudan. **Nat Prod Res.**, Milton Park, v. 22, n. 1, p. 12-21, jan. 2008.
- ALI, B. H.; ZIADA, A.; BLUNDEN, G. Biological effects of gum arabic: a review of some recent research. **Food Chem Toxicol.**, New York, v. 47, n. 1, p. 1-8, jan. 2009.
- ALI, B. H. *et al.* Gum arabic reduces inflammation, oxidative, and nitrosative stress in the gastrointestinal tract of mice with chronic kidney disease. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.**, mar. 2020.
- AL-MAJED, A. A. *et al.* Effect of Oral Administration of Arabic Gum on Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats. **J Biochem Mol Toxicol.**, New York, v. 17, n. 3, p. 146-153. 2003.
- AL-MOSAWI, A. J. The challenge of chronic renal failure in the developing world: possible use of acacia gum. **Pediatr Nephrol.**, Berlin, v. 17, n. 5, p. 390-391, mai. 2002.

AL-NUMAIR, K. S. *et al.* Dietary folate protects against azoxymethane-induced aberrant crypt foci development and oxidative stress in rat colon. **Exp Biol Med.**, Basel, v. 236, n. 9, p. 1005-1011, set. 2011.

AMERICAN CANCER SOCIETY - ACS. **Guideline for Colorectal Cancer Screening.** 2019. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/acs-recommendations.html>>. Acesso em: 1 abr. de 2019.

ANDERSON, D. M. W. Evidence for the safety of gum arabic (*Acacia Senegal* (L.) Willd.) as a food additive - a brief review. **Food Additives and Contaminants.**, London, v. 3, n. 3, p. 225-230, jul./set. 1986.

ANDERSON, D. M. W.; STODDART, J. F. Studies on uronic acid materials: the use of molecular-sieve chromatography in studies on *acacia senegal* gum (gum arabic). **Carbohydr Res**, Bristol, v. 2, p. 104-114, jun. 1966.

ANDRADE, M. G. S. *et al.* Micronúcleo: um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal. **Revista Odonto Ciência.**, Porto Alegre, v. 20, n. 48, p. 137-141, abr./jun. 2005.

ANILAKUMAR, K. R. *et al.* Effect of *Aloe vera* gel extract on antioxidant enzymes and azoxymethane-induced oxidative stress in rats. **Indian J Exp Biol.**, New Delhi, v. 48, n. 8 p. 837-842, ago. 2010.

ARNOLD, C. N. *et al.* APC promoter hypermethylation contributes to the loss of APC expression in colorectal cancers with allelic loss on 5q. **Cancer Biol Ther.**, Georgetown, v. 3, n. 10, p. 960-964, out. 2004.

ARNOLD, M. *et al.* Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut.**, Londres, v. 66, n. 4, p. 683-691, abr. 2016.

BACHMAN, K. E. *et al.* The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. **Cancer Biol Ther.**, Georgetown, v. 3, n. 8, p. 772-775, ago.2004.

BARBOSA, K. B. R. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev Nutr.**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, jul./ago. 2010.

BARTOSZ, G. Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. **Clin Chim Acta.**, Amsterdam, v. 368, n. 1-2, p. 53-76, jun. 2006.

BASSON, M. D., EMENAKER, N. J., HONG, F. Differential Modulation of Human (Caco-2) Colon Cancer Cell Line Phenotype by Short Chain Fatty Acids. **Proc Soc Exp Biol Med.**, v. 217, n. 4, p. 476-483, abr. 1998.

BAZO, A. P. *et al.* Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. **Teratog Carcinog Mutagen.**, New York, v. 22, n. 3, p. 183-194. 2002.

BENETOU, V.; LAGIOU, A.; LAGIOU, P. Chemoprevention of cancer: current evidence and future Prospects. **F1000Res.**, v. 4, n. 916, p. 1-10, set. 2015.

BENNER, S. E. *et al.* Micronuclei, a biomarker for chemoprevention trials: results of a randomized study in oral pre-malignancy. **Int J Cancer.**, Genève, v. 59, n. 4, p. 457-459, nov. 1994.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr.**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, mai./ago. 1999.

BIRD, R. J.; GOOD, C. K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Toxicol Lett.**, Amsterdam, v. 112-113, p. 395-402, mar. 2000.

BIRD, R. P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v. 37, n. 2, p. 147-151, out. 1987.

BIRD, R. P. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v. 93, n. 1, p. 55-71, jun. 1995.

BISSAHOYO, A. *et al.* Azoxymethane is a genetic background-dependent colorectal tumor initiator and promoter in mice: effects of dose, route, and diet. **Toxicol Sci.**, Orlando, v. 88, n. 2, p. 340-345, dez. 2005.

BISWAS, S. *et al.* Transforming growth factor beta receptor type II inactivation promotes the establishment and progression of colon cancer. **Cancer Res.**, Chicago v.64, n. 14, p. 4687-4692, jul. 2004.

BLOCHING, M. *et al.* Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. **Oral Oncol.**, New York, v. 36, n. 6, p. 550-555, nov. 2000.

BOATENG, J. A. *et al.* Inhibitory effects of selected dry beans (*Phaseolus spp L*) on azoxymethane-induced formation of aberrant crypt foci in Fisher 344 male rats. **Nutrition Research.**, California, v. 27, n.10, p. 640-646, out. 2007.

BOIVIN, G. P. *et al.* Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. **Gastroenterology.**, Baltimore, v. 124, n. 3, p. 762-777, mar. 2003.

BOUVARD, V. *et al.* Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. **Lancet Oncol.**, London, v. 16, n. 16, p.1599-600, dec. 2015.

BOYLE, P.; LEON, M. E. Epidemiology of colorectal cancer. **British Medical Bulletin.**, Oxônia, v. 64, n. 1, p. 1-25, dez. 2002.

BRAGA, V. N. L. *et al.* Gum arabic and red propolis protecting colorectal preneoplastic lesions in a rat model of azoxymethane. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 1-12, fev. 2019.

BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. Ministério da Saúde. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil.** 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 6 fev. 2020.

BURLAMAQUI, I. M. B. *et al.* Optimization of visibility and quantification of aberrant crypt foci in colonic mucosa in Wistar rats. **Acta Cir Bras.**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 148-152, mar./abr. 2010.

BURLAMAQUI, I. M. B. *et al.* Repercussão hepática da carcinogênese colorretal induzida pelo azoximetano. **Rev Col Bras Cir.**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 2, p. 137-141. 2013.

CALAME, W. *et al.* Gum arabic establishes prebiotic functionality in healthy human volunteers in a dose-dependent manner. **Br J Nutr.**, Cambridge, v. 100, n. 6, p. 1269-1275, dez. 2008.

CARINI, F. *et al.* Colorectal Carcinogenesis: Role of Oxidative Stress and Antioxidants. **Anticancer Res.** v. 37, n. 9, p. 4759-4766, set. 2017.

CENESIZ, S. *et al.* The effect of kefir on glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) levels in mice with colonic abnormal crypt formation (ACF) induced by azoxymethane (AOM). **Dtsch Tierarztl Wochenschr.**, Hannover, v. 115, n. 1, p.15-19, jan. 2008.

CHACKO, B. M. *et al.* Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF-beta signaling. **Mol Cell.**, Cambridge, v. 15, n. 5, p. 813-823, set. 2004.

CHAMBERS, E.S. *et al.* Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. **Gut.** v. 64, n. 11, p. 1744-1754, nov. 2015.

CHEN, J. S.; FALLER, D. V.; SPANJAARD, R. A. Short-Chain Fatty Acid Inhibitors of Histone Deacetylases: Promising Anticancer Therapeutics. **Curr Cancer Drug Targets.**, v. 3, n. 3, p. 219-236, jun. 2003.

CHEN, J.; HUANG, X. The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. **Cancer Biol Ther.**, Georgetown, v. 8, n. 14, p. 1313-1317, jul. 2009.

COLLINS, A. *et al.* Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. **Environ Mol Mutagen.**, New York, v. 30, n. 2, p. 139-146.1997.

COMHAIR, S. A. A.; ERZURUM, S.C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**, Bethesda, v. 283, n. 2, p. 246-255, ago. 2002.

CORPET, D. E.; PIERRE, F. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. **Eur J Cancer.**, New York, v. 41, n. 13, p. 1911-1922, set. 2005.

CROW, J. P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. **Nitric Oxide.**, Orlando, v. 1, n. 2, p. 147-157, abr. 1997.

DIEHL, A. M. Lessons from animal models of NASH. **Hepato Res.** v. 33, p. 138-144, set. 2005.

DiGREGORIO, C. *et al.* Histology of aberrant crypt foci in the human colon. **Histopathology.**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 328-334, abr. 1997.

DING, X. *et al.* Inducible nitric oxide synthase-dependent DNA damage in mouse model of inflammatory bowel disease. **Cancer Sci.**, v. 96, n. 3, p. 157-163, mar. 2005.

DOI, Y. *et al.* A ninety-day oral toxicity study of a new type of processed gum arabic, from Acacia tree (*Acacia senegal*) exudates, in F344 rats. **Food Chem Toxicol.**, New York, v. 44, n. 4, p. 560-566, abr. 2006.

EWEN, M. E. *et al.* TGF β inhibition of cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. **Cell.**, Cambridge, v. 74, n. 6, p. 1009-1020, set. 1993.

FRAGA, C. G. *et al.* Oxidative damage to DNA during aging: 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, Berkeley, v. 87, n. 12, p. 4533-4537, jun. 1990.

FEDERICO, A. *et al.* Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. **Int J Cancer.** v. 121, n.11, p. 2381-2386, dez. 2007.

FEDIRKO, V. *et al.* Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. **Ann Oncol.**, Boston, v. 22, n. 9, p. 1958-1972, set. 2011.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil.**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, jan./mar. 1997.

FLEMING, M. *et al.* Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. **J Gastrointest Oncol.**, Hong Kong, v. 3, n. 3, p. 153-173, set. 2012.

FREEMAN, H. J.; KIM, Y.; KIM, Y. S. Glycoprotein metabolism in normal proximal and distal rat colon and changes associated with 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic neoplasia. **Cancer Res.**, Chicago, v. 38, n. 10, p. 3385-3390, out. 1978.

GADO, A. M.; ALDAHMAH, B. A. Antioxidant effect of Arabic gum against mercuric chloride-induced nephrotoxicity. **Drug Des Devel Ther.**, Auckland, v. 7, p. 1245-1252, out. 2013.

GAMAL EL-DIN, A. M. *et al.* Protective effect of arabic gum against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **Pharmacol Res.**, London v. 48, n. 6, p. 631-635, dez. 2003.

GATELY, S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. **Cancer Metastasis Rev.** v. 19, n. 1-2, p.19-27. 2000.

- GHIRARDI, M. *et al.* Azoxymethane-induced aberrant crypt foci and colorectal tumors in F344 rats: sequential analysis of growth. **Eur Surg Res.**, New York, v. 31, n. 3, p. 272-280. 1999.
- GHOSH, S. *et al.* Topographic, histological and molecular study of aberrant crypt foci identified in human colon in different clinical groups. **Intest Res.**, v. 16, n. 1, p. 116-125. 2018.
- GILBERT, D. N. *et al.* Polyaspartic Acid Prevents Experimental Aminoglycoside Nephrotoxicity. **J Infect Dis.**, Chicago, v. 159, n. 5, p. 945-953, mai. 1989.
- GOLDMAN, R.; SHIELDS, P.G. Food mutagens. **J Nutr.**, Springfield, v. 3, p. 965-973, mar. 2003.
- GOODMAN, D.; IRVIN, T. T. Delay in the diagnosis and prognosis of carcinoma of the right colon. **Br J Surg.**, Baltimore, v. 80, n.10, p. 1327-1329, out. 1993.
- GUDA, K. *et al.* Defective processing of the transforming growth factor-beta1 in azoxymethane-induced mouse colon tumors. **Mol Carcinog.**, New York, v. 37, n. 1, p. 51-59, mai. 2003.
- GUPTA, R. A.; DUBOIS, R. N. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. **Nat Rev Cancer.** v. 1, n. 1, p. 11-21, out. 2001.
- GUSTAFSSON, J. K. *et al.* An ex vivo method for studying mucus formation, properties, and thickness in human colonic biopsies and mouse small and large intestinal explants. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, Bethesda, v. 302, n. 4, p. 430-438, dez. 2011.
- HAMILTON, S. R. *et al.* **WHO Classification of Tumours of the Digestive System.** 4 ed. Lyon: IARC Press, 2010.
- HARRISS, D. J. *et al.* Lifestyle factors and colorectal cancer risk (2): a systematic review and meta-analysis of associations with leisure-time physical activity. **Colorectal Dis.**, Oxford, v. 11, n. 7, p. 689-701, set. 2009.
- HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (Comet assay). **Toxicol Lett.**, Amsterdam, v. 90, n. 2-3, p. 183 - 188, fev. 1997.
- HASKELL, W. L. *et al.* Role of water-soluble dietary fiber in the management of elevated plasma cholesterol in healthy subjects. **Am J Cardiol.**, New York, v. 69, n. 5, p. 433-439, fev. 1992.
- HATA, K. *et al.* Tumor formation is correlated with expression of beta-catenin-accumulated crypts in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. **Cancer Sci.**, Tokyo, v. 95, n. 4, p. 316-320, abr. 2004.
- HAWTHORNE, V. S.; YU, D. PI3K: Missense mutation motivates malignancy. **Cancer Biol Ther.**, Georgetown, v. 3, n. 8, p. 776-777, mai. 2004.

HAYASHI, M. *et al.* The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange coated slides. **Mutat Res.**, Amsterdam, v. 245, n. 4, p. 245-249, dez. 1990.

HAYASHI, M. *et al.* The micronucleus test-most widely used *in vivo* genotoxicity test. **Genes Environ.**, Tokyo, v. 38, n. 18, p. 1-6, out. 2016.

HEDDLE, J. A. A. *et al.* The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat Res.**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 61-118, set. 1983.

HEMPEL, S. L. *et al.* Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. **Free Radic Biol Med.**, New York, v. 27, n. 1-2, p.146-159, jul. 1999.

HISAMUDDIN, I. M.; YANG, V. W. Molecular Genetics of Colorectal Cancer: An Overview. **Curr Colorectal Cancer Rep.**, Philadelphia, v. 2, n. 2, p 53-59, abr. 2006.

HOLT, P. R.; YEH, K. Y. Colonic proliferation is increased in senescent rats. **Gastroenterology.**, Baltimore, v. 95, n. 6, p. 1556-1563, dez. 1988.

HOWARD, M. D. *et al.* Dietary fructooligosaccharide, xylooligosaccharide and gum arabic have variable effects on cecal and colonic microbiota and epithelial cell proliferation in mice and rats. **J Nutr.**, Springfield, v. 125, n. 10. p. 2604-2609, out. 1995.

HOWE, L. R. *et al.* Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. **Endocr Relat Cancer.** v. 8, n. 2, p. 97-114, jun. 2001.

HOWLADER, N. *et al.* **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013.** Bethesda: National Cancer Institute, 2016.

HUGENHOLTZ, F.; DE VOS, W. M. Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. **Cell Mol Life Sci.**, Boston, v. 75, n. 1, p. 149-160, jan. 2018.

HWANG, E. S.; BOWEN, P. E. DNA damage, a biomarker of carcinogenesis: its measurement and modulation by diet and environment. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, Chicago, v. 47, n. 1, p. 27-50. 2007.

ISHII, P. L. *et al.* Evaluation of *Agaricus blazei* *in vivo* for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. **Regul Toxicol Pharmacol.**, New York, v. 59, n. 3, p. 412-22, abr. 2011.

ISLAM, A. M. *et al.* A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic. **Food Hydrocolloids.**, Wrexham, v. 11, n. 4, p. 493-505, out. 1997.

JANSEN, M. Marching out of the crypt. Intestinal epithelial cells actively migrate up

the villus, challenging a long-held view. **Science.**, New York, v. 365, n. 6454, p. 642-643, ago. 2019.

JEONG, J. K.; CHANG, H. K.; PARK, K. Y. Inhibitory effects of meju prepared with mixed starter cultures on azoxymethane and dextran sulfate sodium-induced colon carcinogenesis in mice. **J Carcinog.**, London, v. 11, n. 13, p. 30-38, ago. 2012.

JUCA, M. *et al.* Metalloproteinases 1 and 7 and Colorectal Cancer. **Rev bras Coloproct.**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 3, p. 353-362, jul./set. 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KALUEFF, A. V. *et al.* Hair barbering in mice: Implications for neurobehavioural research. **Behav. process.**, Amsterdam, v. 71, p. 8-15, jan. 2006.

KAMAL, E. *et al.* Gum Arabic Fibers Decreased Inflammatory Markers and Disease Severity Score among Rheumatoid Arthritis Patients, Phase II Trial. **Int J Rheumatol.**, New York, v. 2018, p. 1-6, jul. 2018.

KARAMAN, A. *et al.* Micronucleus analysis in patients with colorectal adenocarcinoma and colorectal polyps. **World J Gastroenterol.**, Beijing, v. 14, n. 44, p. 6835-6839, nov. 2008.

KASSEM, .A; ABDULLAH, A. Dietary Gum Arabic Supplementation Alter Plasma and Tissue Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities in Sprague Dawley Male Rats. **Journal of Biology and Life Science.**, Las Vegas, v. 6, n. 1, p. 129-138. 2015.

KHARE, S. *et al.* Aberrant crypt foci in colon cancer epidemiology. **Methods Mol Biol.**, Clifton, v. 472, p. 373-86. 2009.

KISHIMOTO, A. *et al.* Identification of Intestinal Bacteria Responsible for Fermentation of Gum Arabic in Pig Model. **Curr Microbiol.** v. 53, n. 3, p. 173-177, set. 2006.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L.M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** v. 44, p. 239-267. 2004.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M.; HOCEVAR, B. A. **Toxicol Pathol.**, Indianapolis, v. 38, n. 1, p. 96-109, jan. 2010.

KONDO, S. *et al.* Overexpression of the *hOGGI* Gene and High 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) Lyase Activity in Human Colorectal Carcinoma: Regulation Mechanism of the 8-OHdG Level in DNA. **Clin Cancer Res.**, v. 6, n.4, p. 1394-1400, abr. 2000.

KORINEK, V. *et al.* Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. **Science.**, New York, v. 275, n. 5307, p. 1784-1787, mar. 1997.

KORKMAZ, K. S.; BUTUNER, B. D.; ROGGENBUCK, D. Detection of 8-OHdG as a diagnostic biomarker. **J Lab Precis Med.**, v. 3, n. 95, p. 1-8, nov. 2018.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev Nutr.**, Campinas, v. 16, n. 4, p. 433-441, out./dez. 2003.

KRISHNA, G; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutat Res.**, Amsterdam, v. 455, n. 1-2, p. 155-66, nov. 2000.

KRNDIJA, D. *et al.* Active cell migration is critical for steady-state epithelial turnover in the gut. **Science.**, New York, v. 365, n. 6454, p.705-710, ago. 2019.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins, Basic Pathology**. 10. ed. Philadelphia: Elsevier, 2018.

LAHOUAR, L. *et al.* Attenuation of histopathological alterations of colon, liver and lung by dietary fibre of barley Rihane in azoxymethane-treated rats. **Food Chem.**, Amsterdam, v. 149, p. 271-276, abr. 2014.

LASKO, C. M.; BIRD, P. R. Modulation of aberrant crypt foci by dietary fat and caloric restriction: the effects of delayed intervention. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, Philadelphia, v. 4, n. 1, p. 49-55, jan./fev. 1995.

LEBEL, C. P.; ISCHIOPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2, 7-dichlorofluorescein as indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem Res Toxicol.**, Washington, v. 5, n. 2, p. 227-231, mar./abr. 1992.

LEVIN, B. *et al.* Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008: A Joint Guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. **CA Cancer J Clin.**, New York, v. 58, n. 3, p.130-160, mai./jun. 2008.

LIMA, R. O. *et al.* Modifying effect of propolis on dimethylhydrazine-induced DNA damage but not colonic aberrant crypt foci in rats. **Environ Mol Mutagen.**, New York, v. 45, n. 1, p. 8-16. 2005.

LIU, L. Q. *et al.* Tea Polysaccharide Prevents Colitis-Associated Carcinogenesis in Mice by Inhibiting the Proliferation and Invasion of Tumor Cells. **Int J Mol Sci.**, Basel, v. 19, n. 2, p. 1-15, fev. 2018.

LU, A. L. *et al.* Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions. **Cell Biochem Biophys.**, Baltimore, v. 35, n. 2, p.141-170. 2001.

LÜHRS, H. *et al.* Cytokine-activated degradation of inhibitory kappaB protein alpha is inhibited by the short-chain fatty acid butyrate. **Int J Colorectal Dis.**, New York, v. 16, n. 4, p. 195-201, ago. 2001.

LUZHNA, L.; KATHIRIA, P.; KOVALCHUK, O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. **Front Genet.**, Lausanne, v. 4, n. 131, p. 1-17, jul. 2013.

MACFARLANE, G. T.; GIBSON, G.R.; CUMMINGS, J.H. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. **J Appl Bacteriol.**, v. 72, n.1, p. 57-64, jan.1992.

MACGREGOR, J. T. *et al.* Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutat Res.**, Amsterdam, v. 189, n. 2, p. 103-112, out. 1987.

MACRAE, F. A.; BENDELL, J. **Clinical presentation, diagnosis, and staging of colorectal cancer.** UpToDate. 2018. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-presentation-diagnosis-and-staging-of-colorectal-cancer?search=clinical-presentation-diagnosis-and-staging-of-colorectal-&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1>. Acesso em: 1 abr. 2019.

MADARA, J. L. *et al.* Evidence for an adenoma-carcinoma sequence in dimethylhydrazine-induced neoplasms of rat intestinal epithelium. **Am J Pathol.**, Philadelphia, v. 110, n. 2, p. 230-235, fev. 1983.

MADRIGAL-BUJAJIDAR, E. *et al.* Grapefruit juice suppresses azoxymethane-induced colon aberrant crypt formation and induces antioxidant capacity in mice. **Asian Pac J Cancer Prev.**, Bangkok, v. 14, n. 11, p. 6851-6856. 2013.

MAHMOUD, A. M. *et al.* Brown seaweeds ameliorate renal alterations in mice treated with the carcinogen azoxymethane. **Int J Pharm Pharm Sci.**, Rewa, v. 6, n. 11. P. 365-369, dez. 2014.

MAHMOUD, M. F.; DIAAI, A. A.; AHMED, F. Evaluation of the efficacy of ginger, Arabic gum, and Boswellia in acute and chronic renal failure. **Ren Fail.**, New York, v. 34, n. 1, p. 73-82. 2012.

MAJER, B. J. *et al.* Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. **Mutat Res.**, Amsterdam, v. 489, n. 2-3, p. 147-172, dez. 2001.

MAKKI, K. *et al.* The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. **Cell Host Microbe.**, v. 23, n. 6, p. 705-715, jun. 2018.

MALUF, S. W. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. **Clin Chim Acta.**, Amsterdam, v. 347, n. 1-2, p. 15-24, set. 2004.

MARCUSE, R. Antioxidative effect of amino-acids. **Nature.**, London, v. 186, p. 886-887, jun. 1960.

MARNETT, L. J.; RIGGINS, J. N.; WEST, J. D. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. **J Clin Invest.**, v.111, n. 5, p. 583-593, mar. 2003.

MARTINS, K. F.; BOSCHINI FILHO, J. Determinação da frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares em células da mucosa bucal de indivíduos não-fumantes e fumantes. **Rev. Fac. Cienc. Med. Sorocaba**, Sorocaba v. 5, n. 1, p. 43-53, 2003.

MCLELLAN, E. A.; BIRD, R. P. Aberrant Crypts: Potential Preneoplastic Lesions in the Murine Colon. **Cancer Res.**, Chicago, v. 48. n. 21, p. 6187-6192, nov. 1988.

MCLELLAN, E. A.; MEDLINE, A.; BIRD, R. P. Sequential Analyses of the Growth and Morphological Characteristics of Aberrant Crypt Foci: Putative Preneoplastic Lesions. **Cancer Res.**, Chicago, v. 51, n. 19, p. 5270-5274, out. 1991.

MELNIK, R. L. *et al.* Chronic effects of agar, guar gum, gum arabic, locust-bean gum, or tara gum in F344 rats and B6C3F1 mice. **Food Chem Toxicol.**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 305-311, jun. 1983.

MENEZES, H. L. *et al.* Analysis of the immunohistochemical expressions of p53, bcl-2 and ki-67 in colorectal adenocarcinoma and their correlations with the prognostic actors. **Arq Gastroenterol.**, São Paulo, v. 47, n. 2, p.141-147, abr./jun. 2010.

MIYAKE, H. *et al.* Oxidative DNA damage in patients with prostate cancer and its response to treatment. **J Urol.**, v. 171, n. 4, p. 1533-1536, abr. 2004.

MIK, M. *et al.* Right- and left-sided colon cancer – clinical and pathological differences of the disease entity in one organ. **Arch Med Sci.**, Poznań, v. 13, n. 1, p. 157-162, fev. 2017.

MOHAMED, E. S. M. *et al.* Determination of antioxidant activity of gum arabic: An exudation from two different locations. **Science Asia.**,Thailand, v. 44 p. 179–186, jun. 2018.

MOLLER, P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.**, Copenhagen, v. 98, n. 4, p. 336-345, abr. 2006.

MONTENEGRO, D. E. *et al.* TGF β inhibits GM-CSF-induced phosphorylation of ERK and MEK in human myeloid leukaemia cell lines via inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-k). **Cell Prolif.**, Oxford v. 42, n. 1, p. 1-9, fev. 2009.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F. **Anatomia orientada para a clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

MOURA, N. A. *et al.* Enhancement of colon carcinogenesis by the combination of indole-3 carbinol and synbiotics in hemin-fed rats. **Food Chem Toxicol.**, New York v. 112, p. 11-18, fev. 2018.

MURPHY, G. *et al.* Sex Disparities in Colorectal Cancer Incidence by Anatomic Subsite, Race and Age. **Int J Cancer.**, Genève, v. 128, n. 7, p. 1668–1675, abr. 2011.

NAJLA, O. A. *et al.* Protective role and antioxidant activity of arabic gum against trichloroacetate-induced toxicity in liver of male rats. **Indian J Anim Res.**, Karnal, v. 51, n. 2, p 303-309, abr. 2017.

NAKAMURA, A.; OSONOI, T.; TERAUCHI, Y. Relationship between urinary sodium excretion and pioglitazone-induced edema. **J Diabetes Investig.**, v.1, n. 5, p. 208-211, out. 2010.

NASIR, O. *et al.* Downregulation of Angiogenin Transcript Levels and Inhibition of Colonic Carcinoma by Gum Arabic (*Acacia senegal*). **Nutr Cancer.**, Philadelphia. v. 62, n. 6, p. 802-810, jul. 2010.

NASIR, O. *et al.* Effects of gum arabic (*Acacia senegal*) on water and electrolyte balance in healthy mice. **J Ren Nutr.**, Philadelphia, v. 18, n. 2, p. 230-238, mar. 2008.

NATIONAL CANCER INSTITUTE - NIH. **Colon Cancer Treatment.** 2019. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq>>. Acesso em: 1 abr. 2019.

NEMMAR, A. *et al.* Gum Arabic Ameliorates Impaired Coagulation and Cardiotoxicity Induced by Water-Pipe Smoke Exposure in Mice. **Front. Physiol.**, Lausanne, v. 10, n.53, p. 1-10, fev. 2019.

NETTER, F. H. **Atlas de anatomia humana.** 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

NORAZALINA, S. *et al.* Anticarcinogenic efficacy of phytic acid extracted from rice bran on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. **Exp Toxicol Pathol.**, New York, v. 62, n. 3, p. 259-268, mai. 2010.

OHYAMA, W. *et al.* Collaborative validation study of the in vivo micronucleus test using mouse colonic epithelial cells. **Mutat Res.**, Amsterdam, v. 518, n. 1, p. 39-45, jun. 2002.

OLIVEIRA, M. M. *et al.* Disparidades na mortalidade de câncer colorretal nos estados brasileiros. **Rev. bras. epidemiol.**, São Paulo, v. 21, p. 1-14, ago. 2018.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, New York, v. 123, n. 1, p. 291-298, ago. 1984.

O'TOOLE, S. M.; PEGG, A. E.; SWENBERG, J. A. Repair of O6-Methylguanine and O4-Methylthymidine in F344 Rat Liver following Treatment with 1,2-Dimethylhydrazine and O6-Benzylguanine. **Cancer Res.**, Chicago v. 53, n. 17, p. 3895-3898, set. 1993.

OZES, O. N. *et al.* NF-kappa B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. **Nature.**, London, v. 401, n. 6748, p. 82-85, set. 1999.

PAN, Q. *et al.* Genomic variants in mouse model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate improperly mimic human colorectal cancer. **Sci Rep.**, London v. 7, n. 1, p. 25, fev. 2017.

PAPANIKOLAOU, A. *et al.* Azoxymethane-induced colon tumors and aberrant crypt foci in mice of different genetic susceptibility. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v. 130, p. 29-34, ago. 1998.

PARK, E.Y.; MURAKAMI, H.; MATSUMURA, Y. Effects of the Addition of Amino Acids and Peptides on Lipid Oxidation in a Powdery Model System. **J Agric Food Chem.**, Washington, v. 53, p. 8334-8341, set.2005.

PEREIRA, M. A. *et al.* Use of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon to identify potential cancer chemopreventive agents. **Carcinogenesis.**, New York, v. 15, n. 5. p. 1049-1054, mai. 1994.

PÉREZ-HOLANDA, S. *et al.* Colonic perianastomotic carcinogenesis in an experimental model. **BMC Cancer.**, London, v. 8, p. 217, jul. 2008.

PERSE, M; CERAR, A. Dimethylhydrazine model is not appropriate for evaluating effect of ethanol on colorectal cancer. **Rev Esp Enferm Dig.**, Madrid, v. 99, n. 8, p. 463-466, ago. 2007.

PERSE, M; CERAR, A. Morphological and Molecular Alterations in 1,2 Dimethylhydrazine and Azoxymethane Induced Colon Carcinogenesis in Rats. **J Biomed Biotechnol.**, Ohio, v. 2011 p.1-15, 2011.

PHILLIPS, D. H.; ARLT, V. M. Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. **EXS.**, Boston, v. 99, p.87-110. 2009.

PHILLIPS, G. O. Acacia gum (Gum Arabic): A nutritional fibre; metabolism and calorific value. **Food Addit Contam.**, v. 15, n. 3, p. 251-264, abr. 1998.

POLAKIS, P. The oncogenic activation of beta-catenin. **Curr Opin Genet Dev.**, London, v. 9, n. 1, p. 15-21, fev. 1999.

QASEEM, A. *et al.* Screening for Colorectal Cancer: A Guidance Statement From the American College of Physicians. **Ann Intern Med.**, Philadelphia, v. 156, n. 5, p. 378-86, mar. 2012.

READ, R. J. *et al.* Persistence of DNA adducts, hypermutation and acquisition of cellular resistance to alkylating agents in glioblastoma. **Cancer Biology & Therapy.**, Georgetown, v. 18, n. 12, p. 917-926, dec. 2017.

REDON, C. E. *et al.* Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 107, n. 42, p. 17992-17997, out. 2010.

REHMAN, K. *et al.* Proabsorptive action of gum arabic: regulation of nitric oxide metabolism in the basolateral potassium channel of the small intestine. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, New York, v. 32, n. 5, p. 529-533, mai. 2001.

RENEHAN, A. G. *et al.* Impact on survival of intensive follow up after curative resection for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis of randomised trials. **BMJ.** London, v. 324, n. 7341, p. 1-8, abr. 2002.

RIGOTTIER-GOIS, L. *et al.* Enumeration of *Bacteroides* Species in Human Faeces by Fluorescent *in situ* Hybridisation Combined with Flow Cytometry Using 16S rRNA Probes. **Syst Appl Microbiol.**, v. 26, n. 1, p. 110-118, mar. 2003.

RIVERA, E. *et al.* Molecular profiling of a rat model of colitis: Validation of known inflammatory genes and identification of novel disease-associated targets. **Inflammatory Bowel Diseases.**, New York, v.12, n.10, p. 950-966, out. 2006.

ROBLES-ESPINOZA, C. D.; ADAMS, D. J. Cross-Species Analysis of Mouse and Human Cancer Genomes. **Cold Spring Harb Protoc.**, New York, v. 4, p. 350-358, abr. 2014.

RODRIGUES, M. A. *et al.* Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **Braz J Med Biol Res.**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 351-355, mar. 2002.

RONCUCCI, L. *et al.* Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. **Hum Pathol.**, Philadelphia, v. 22, n. 3, p. 287-294, mar. 1991.

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

SANDLER, R. S. Epidemiology and risk factors for colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am.*, **Philadelphia**, v. 25, n. 4, p. 717-735, dez. 1996.

SCHMID, W. In: Hollaender, A. *Chemical Mutagens: principles and methods for their detection.* **Plenum.** New York. v. 4, p. 31-43. 1976.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 9-15, fev.1975.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte**, Campinas, v. 10, n. 4, p. 308-313, jul./ago. 2004.

SCHOLTENS, A. M. J. *et al.* The Early Settlers: Intestinal Microbiology in Early Life. **Annu Rev Food Sci Technol.**, Palo Alto, v. 3, p. 425-427, abr. 2012.

SHARMA, R. D. Hypocholesterolemic effect of gum acacia in men. **J Nutr.**, Springfield. v. 5, n. 12, p. 1321-1326, dez. 1985.

SHIMIZU, K. *et al.* Dietary artemisin C suppresses the formation of aberrant crypt foci induced by azoxymethane in mouse colon. **Cancer Lett.**, Virginia, v. 240, n. 1, p. 135-142, ago. 2006.

SHIRTLIFF, N.; BIRD, R. P. Growth features of aberrant crypt foci that resist modulation by cholic acid. **Carcinogenesis.**, New York, v. 17, n. 9, p. 2093-2096, set. 1996.

SHPITZ, B. *et al.* Aberrant crypt foci in human colons: distribution and histomorphologic characteristics. **Hum Pathol.**, Philadelphia, v. 29, n. 5, p. 469-475, mai. 1998.

SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer statistics, 2017. **CA Cancer J Clin.**, New York, v. 67, n. 3, p. 177-193, mai. 2017.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. **CA Cancer J Clin.**, v. 70, n. 1, p. 7-30, jan/fev. 2020.

SILVA, J. *et al.* An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. **Genet Mol Biol.**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 1, p. 241-245, mar. 2000.

SINGH, N. P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res.**, New York, v. 175, n. 1, p. 184-191, mar. 1988.

SIU, I. *et al.* Identification of Dysplasia in Human Colonic Aberrant Crypt Foci. **Am J Pathol.**, Philadelphia, v. 150, n. 5, p. 1805-1813, mai. 1997.

SIU, I. *et al.* The Identification of Monoclonality in Human Aberrant Crypt Foci. **Cancer Res.**, Chicago, v. 59, n. 1, p. 63-66, jan. 1999.

SLIWINSKA, A. *et al.* The levels of 7,8-dihydrodeoxyguanosine (8-oxoG) and 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) – A potential diagnostic biomarkers of Alzheimer's disease. **J Neurol Sci.**, v. 15, p. 155-159, set. 2016.

SMITH, A. J. *et al.* Somatic APC and K-ras Codon 12 Mutations in Aberrant Crypt Foci from Human Colons. **Cancer Res.**, Chicago, v. 54, n. 21, p. 5527-5530, nov. 1994.

SMITH, C.C.; O'DONOVAN, M.R.; MARTIN, E.A. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG orENDOIII. **Mutagenesis.**, Oxford, v. 21, n.3, p. 185-190, mai. 2006.

SOHN, O. S. *et al.* Differential effects of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoxymethanol. **Cancer Res.**, Chicago, v. 61, n. 23, p. 8435-8440, dez. 2001.

SOSA, V. *et al.* Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing res. rev.**, Oxford, v. 12, p. 376-390, jan. 2013.

STICH, H. F.; CURTIS, J. R.; PARIDA, B. B. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. **Int J Cancer.**, Genève, v. 30, n. 5, p. 553-559, nov. 1982.

STICH, H. F.; ROSIN, M. P. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. **Int J Cancer.**, Genève, v. 31, n. 3, p. 305-308, mar. 1983.

STONE, W. L. *et al.* The role of antioxidants and pro-oxidants in colon cancer . **World J Gastrointest Oncol.**, v. 6, n. 3, p. 55-66, mar. 2014.

TAKAHASHI, M.; WAKABAYASHI, K. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. **Cancer Sci.**, Tokyo, v. 95, n. 6, p. 475-800, jun. 2004.

TAKAYAMA, T. *et al.* Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. **N Engl J Med.**, Boston, v. 339, n. 18, p. 1277-1284, out. 1998.

TANAKA, H. *et al.* Hepatic oxidative DNA damage is associated with increased risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. **Br J Cancer.**, v. 98, n. 3, p. 580-586, fev. 2008.

TISS, A.; CARRIÈRE, F.; VERGER, R. Effects of Gum Arabic on Lipase Interfacial Binding and Activity. **Anal Biochem.**, Orlando, v. 294, n. 1, p. 36-43, jul. 2001.

TREUTING, P.; VALASEK, M.; DINTZIS, S. **Comparative anatomy and histology, a mouse and human atlas.** Londres: Academic Press, 2012.

TROTMAN, L. C.; PANDOLFI, P. P. PTEN and p53: who will get the upper hand? **Cancer Cell.**, Cambridge, v. 3, n. 2, p. 97-99, fev. 2003.

VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact.**, v. 160, n. 1, p. 1-40, mar. 2006.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. j. biochem. cell biol.**, London, v. 39, p. 44-84. 2007.

VANHAUWAERT, A.; VANPARYS, P.; KIRSCH-VOLDERS, M. The *in vivo* gut micronucleus test detects clastogens and aneugens given by gavage. **Mutagenesis.**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 39-50, jan. 2001.

VELMURUGAN, B. *et al.* Dietary-Feeding of Grape Seed Extract Prevents Azoxymethane-Induced Colonic Aberrant Crypt Foci Formation in Fischer 344 Rats. **Mol. Carcinog.**, New York, v. 49, n. 7, p. 641-652, jul. 2010.

VERBEKEN, D.; DIERCKX, S.; DEWETTINCK, K. Exudate gums: occurrence, production, and applications. **Appl Microbiol Biotechnol.**, New York, v. 63, n. 1, p. 10-21, nov. 2003.

VINCENT, H. K.; INNES, K. E.; VINCENT, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes obes. metab.**, Oxford, v. 9, p. 813-839, nov. 2007.

WALTER, V. *et al.* Smoking and survival of colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. **Ann Oncol.**, Boston, v. 25, n. 8, p. 1517-1525, ago. 2014.

WALY, M. I. *et al.* Amelioration of azoxymethane induced-carcinogenesis by reducing oxidative stress in rat colon by natural extracts. **BMC Complement Altern Med.**, London, v. 14, n. 60, p. 1-10, fev. 2014.

WANG, Q. *et al.* Differential Expression of p16INK4a in Azoxymethane-Induced Mouse Colon Tumorigenesis. **Mol Carcinog.**, New York, v. 28, p.139-147, jul. 2000.

WANG, T. *et al.* Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. **ISME J.**, v. 6, n. 2, p. 320-329, fev. 2012.

WAPNIR, R. A. *et al.* Oral rehydration solutions: enhanced sodium absorption with gum arabic. **J Am Coll Nutr.**, New York, v. 15, n. 4, p. 377-382, ago. 1996.

WHISTLER, R. L.; BEMILLER, I. N. **Industrial Gum**. 3. ed. San Diego, CA: Academic Press, 1993.

WOJEWODZKA, M.; BURACZEWSKA, I.; KRUSZEWSKI, M. A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. **Mutat Res.**, Amsterdam, v. 518, n. 1, p. 9 - 20, jun. 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Global Cancer Observatory – GLOBOCAN**. 2018. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>. Acesso em: 1 abr. 2019.

XU, Y.; PASCHE, B. TGF- β signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. **Hum Mol Genet.**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 1-11, abr. 2007.

YASUHARA, S. *et al.* Comparison of Comet Assay, Electron Microscopy, and Flow Cytometry for Detection of Apoptosis. **J Histochem Cytochem.**, Baltimore, v. 51, n. 7, p. 873-885, jul. 2003.

YOUNES, H. *et al.* Fermentable fibers or oligosaccharides reduce urinary nitrogen excretion by increasing urea disposal in the rat cecum. **J Nutr.**, Springfield, v. 125, n. 4, p. 1010-1016, abr. 1995.

YU, C. *et al.* American ginseng attenuates azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. **J Ginseng Res.**, Korean Society of Ginseng, v. 39, n. 1, p. 14-21, jan. 2015.

ZHAO, L.; VOGT, P. K. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. **Oncogene.**, Basingstoke, v. 27, n. 41, p. 5486-5496, set. 2008.

APÊNDICE A – TABELA DOS PESOS DOS ANIMAIS/GRUPO

Distribuição de peso em gramas com valores das médias dos grupos estudados: Grupo I- Água; Grupo II- Goma arábica 2,5%; Grupo III- Goma arábica 5%; Grupo IV- Azoximetano + Água; Grupo V- Azoximetano + Goma arábica 2,5%; Grupo VI- Azoximetano+ Goma arábica 5%.

Semana	Grupo					
	I	II	III	IV	V	VI
1	25,85	25,48	26,36	28,48	29,45	29,12
2	29,47	29,10	30,81	31,89	32,42	32,62
3	31,59	31,86	33,55	34,23	34,71	34,30
4	32,67	33,00	34,33	35,67	35,33	35,69
5	34,00	34,67	35,67	37,33	37,00	37,69
6	35,00	35,33	37,00	38,67	38,83	39,08
7	35,33	36,67	37,33	38,83	39,33	39,54
8	36,67	36,67	37,67	39,17	40,00	39,54
9	36,67	37,00	39,00	40,17	40,33	38,31
10	36,33	36,67	38,33	39,83	38,67	38,92
11	36,00	37,00	39,00	39,83	38,83	39,23
12	36,00	37,67	37,33	39,83	39,33	40,92
13	36,33	38,67	38,00	39,33	40,50	41,38
14	37,00	39,00	39,33	39,83	40,67	41,69
15	37,67	39,33	39,00	40,00	40,67	42,15
16	38,00	38,33	39,20	40,67	41,27	42,17

Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE B – TABELA DE PESOS DOS ÓRGÃOS DOS ANIMAIS (gramas)

Grupos controle: GI – Água; GII – GA 2,5%; GIII – GA 5%

Grupo	Animal	Pulmões	Fígado	Baço	Rins	Intestino
GI	C1	0,19	1,30	0,07	0,57	0,44
	C2	0,23	1,26	0,07	0,61	0,65
	C3	0,20	1,41	0,08	0,62	0,68
	C4	0,18	1,44	0,06	0,6	0,70
	C5	0,18	1,32	0,08	0,65	0,47
	C6	0,19	1,37	0,06	0,55	0,59
II	C1	0,22	1,57	0,06	0,61	1,03
	C2	0,18	1,33	0,07	0,63	0,65
	C3	0,18	1,42	0,08	0,62	0,57
	C4	0,17	1,31	0,07	0,54	0,53
	C5	0,21	1,51	0,11	0,66	0,82
	C6	0,19	1,25	0,06	0,55	0,61
GIII	C1	0,20	1,61	0,08	0,66	0,42
	C2	0,24	2,29	0,13	0,84	0,54
	C3	0,23	1,86	0,09	0,75	0,52
	C4	0,21	1,62	0,08	0,70	0,80
	C5	0,19	1,54	0,08	0,74	0,65
	C6	-	-	-	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

Grupos experimentais: GIV - AOM + Água; GV - AOM + GA2,5%; GVI - AOM + GA 5%

Grupo	Animal	Pulmões	Fígado	Baço	Rins	Intestino
GIV	C1	0,22	1,87	0,33	0,78	0,47
	C2	0,24	1,34	0,11	0,58	0,51
	C3	0,17	1,37	0,09	0,78	0,77
	C4	0,26	1,38	0,11	0,73	0,61
	C5	0,27	1,22	0,11	0,85	0,60
	C6	0,26	1,14	0,11	0,56	0,60
	C7	0,23	1,29	0,08	0,69	0,68
	C8	0,19	1,65	0,07	0,64	0,58
	C9	0,16	1,57	0,07	0,69	0,78
	C10	0,22	1,67	0,11	0,65	0,80
	C11	0,48	2,49	0,14	0,70	0,61
	C12	0,25	1,76	0,13	0,76	0,80
GV	C1	0,71	1,38	0,07	0,54	0,86
	C2	0,28	1,19	0,14	0,87	0,53
	C3	0,28	1,55	0,07	0,68	0,56
	C4	0,23	1,50	0,09	0,73	0,70
	C5	0,25	1,60	0,09	0,73	0,59
	C6	0,25	1,56	0,14	0,68	0,65
	C7	0,23	1,70	0,12	0,72	0,63
	C8	0,24	1,51	0,08	0,64	0,61
	C9	0,27	1,38	0,07	0,71	0,79
	C10	0,27	1,43	0,09	0,67	0,69
	C11	0,22	1,49	0,09	0,66	0,56
	C12	-	-	-	-	-
GVI	C1	0,36	1,90	0,28	0,66	0,35
	C2	0,21	1,42	0,06	0,75	0,56
	C3	0,20	1,79	0,10	0,79	0,70
	C4	0,30	1,95	0,12	0,78	0,85
	C5	0,25	1,81	0,07	0,66	0,67
	C6	0,30	2,07	0,11	0,67	0,89
	C7	0,24	1,74	0,11	0,71	0,76
	C8	0,24	1,66	0,09	0,55	0,76
	C9	0,19	1,42	0,08	0,73	0,85
	C10	0,22	1,64	0,09	0,58	0,60
	C11	0,20	1,41	0,14	0,62	0,82
	C12	0,31	1,54	0,11	0,76	0,82
	C13	0,22	1,74	0,09	0,64	0,82

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os animais C6 do grupo III e o C12 do grupo V morreram durante o experimento.

**APÊNDICE C – TABELA DO NÚMERO DE CRIPTAS ABERRANTES POR
SEGMENTO DO CÓLON POR ANIMAL**

Azoximetano + água

GRUPO IV	cólon proximal	cólon médio	cólon distal	TOTAL
C1	0	0	0	0
C2	0	11	0	11
C3	6	1	7	14
C4	1	7	4	12
C5	0	5	5	10
C6	2	3	6	11
C7	2	5	5	12
C8	0	2	12	14
C9	1	2	5	8
C10	12	3	12	27
C11	2	4	3	9
C12	21	0	3	24
TOTAL	47	43	62	152

Fonte: Elaborado pelo autor.

Azoximetano + GA 2,5%

GRUPO V	cólon proximal	cólon médio	cólon distal	TOTAL
C1	0	0	0	0
C2	0	5	7	12
C3	0	0	2	2
C4	0	6	7	13
C5	5	2	0	7
C6	9	0	0	9
C7	0	0	2	2
C8	0	2	0	2
C9	4	0	1	5
C10	0	1	1	2
C11	0	1	0	1
C12	-	-	-	-
TOTAL	18	17	20	55

Fonte: Elaborado pelo autor.

Azoximetano + GA 5%

GRUPO VI	cólon proximal	cólon médio	cólon distal	TOTAL
C1	0	0	0	0
C2	0	0	1	1
C3	0	2	0	2
C4	29	0	0	29
C5	0	3	0	3
C6	0	0	0	0
C7	3	0	0	3
C8	0	0	0	0
C9	0	2	0	2
C10	0	0	0	0
C11	13	3	2	18
C12	0	0	2	2
C13	2	8	0	10
TOTAL	47	18	5	70

Fonte: Elaborado pelo autor.

O animal C12 do grupo V morreu durante o experimento.

**APÊNDICE D – TABELA DO NÚMERO DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES
(FCA) POR SEGMENTO DO CÓLON POR ANIMAL**

Azoximetano + água

Grupo IV	Cólon Proximal						Cólon Médio						Cólon Distal						Total	
	1	2	3	4	5	+5	1	2	3	4	5	+5	1	2	3	4	5	+5		
C1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C2	0	0	0	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
C3	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	9	
C4	1	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	11	
C5	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	9	
C6	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	11	
C7	2	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	12	
C8	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	1	6	
C9	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	8	
C10	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	6	3	0	0	0	0	13	
C11	2	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	8	
C12	2	0	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	10	
																			103	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Azoximetano + GA 2,5%

Grupo V	Cólon Proximal						Cólon Médio						Cólon Distal						Total	
	1	2	3	4	5	+5	1	2	3	4	5	+5	1	2	3	4	5	+5		
C1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	5	1	0	0	0	0	0	7
C3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	
C4	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	0	4	0	1	0	0	0	9	
C5	5	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	
C6	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
C7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
C8	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
C9	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	
C10	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	
C11	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
C12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
																			35	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Azoximetano + GA 5%

Grupo VI	Cólon Proximal						Cólon Médio						Cólon Distal						Total	
	Animais	1	2	3	4	5	+5	1	2	3	4	5	+5	1	2	3	4	5		+5
C1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
C3	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
C4	5	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
C5	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
C6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
C8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C9	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
C10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C11	3	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	6
C12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2
C13	2	0	0	0	0	0	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
																				32

Fonte: Elaborado pelo autor.

O animal C12 do grupo V morreu durante o experimento.

APÊNDICE E – TABELA DAS DOSES DAS SUBSTÂNCIAS ADMINISTRADAS

Dose administrada (em ml) por gavagem nos grupos estudados: Grupo I- Água; Grupo II- Goma arábica 2,5%; Grupo III- Goma arábica 5%; Grupo IV - Água; Grupo V- Goma arábica 2,5%; Grupo VI- Goma arábica 5%.

Semana	Grupo					
	I	II	III	IV	V	VI
1	0,16	0,16	0,17	0,18	0,17	0,18
2	0,17	0,17	0,17	0,18	0,17	0,18
3	0,17	0,17	0,18	0,19	0,19	0,19
4	0,17	0,18	0,18	0,19	0,19	0,19
5	0,18	0,17	0,18	0,19	0,20	0,19
6	0,18	0,17	0,19	0,20	0,20	0,19
7	0,18	0,17	0,19	0,19	0,19	0,19
8	0,18	0,17	0,19	0,19	0,19	0,19
9	0,18	0,18	0,18	0,19	0,19	0,20
10	0,18	0,18	0,19	0,19	0,20	0,20
11	0,18	0,18	0,19	0,19	0,20	0,20
12	0,18	0,18	0,19	0,20	0,20	0,20

Fonte: Elaborado pelo autor.

ANEXO A – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



**UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ**

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "GOMA ARÁBICA NA CARCINOGENESE COLORRETAL (LESOES PRE NEOPLASICAS) INDUZIDAS POR AZOXIMETANO EM CAMUNDONGOS ", protocolada sob o CEUA nº 3925060318 (ID 000250), sob a responsabilidade de **Conceição Aparecida Dornelas** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 30/05/2018.

We certify that the proposal "ARABIC GUM IN CARCINOGENESE COLORRETAL (PRE NEOPLASTIC INJURIES) INDUCED BY AZOXIMETHANE IN MICE", utilizing 54 Heterogenics mice (54 males), protocol number CEUA 3925060318 (ID 000250), under the responsibility of **Conceição Aparecida Dornelas** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 05/30/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 08/2018 a 08/2019

Área: Departamento de Patologia E Medicina Legal

Origem: Biotério Central da UFC

Espécie: Camundongos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 6 a 10 semanas

N: 54

Linhagem: Swiss

Peso: 25 a 30 g

Local do experimento: Laboratório de Manipulação Animal DPML

Fortaleza, 14 de novembro de 2018

Alexandre Havt Bindá

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Virgínia Cláudia Carneiro Girão

Profa. Dra. Virgínia Cláudia Carneiro Girão
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

ANEXO B – COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DA DIETA PADRÃO
RACÃO NUVILAB CR-1 IRRADIADA

COMPOSIÇÃO BÁSICA DO PRODUTO: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, óleo vegetal, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, niacina, pantotenato d cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, monóxido de manganês, óxido de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina, BHT.

NÍVEIS DE GARANTIA POR QUILOGRAMA DO PRODUTO: umidade (máx): 125g/kg; proteína bruta (min): 220g/kg; extrato etéreo (min): 50g/kg; material mineral (máx): 90g/kg; fibra bruta (máx): 70g/kg; cálcio (mín-máx): 10-14 g/kg; e fósforo; 6.000 mg/kg.

VITAMINAS: vitamina A (min) 13.000 UI/kg; vitamina D3 (min) 2.000 UI/kg, vitamina E (min) 34 UI/kg; vitamina K3 (min) 3mg/kg; vitamina B1 (min) 5 mg/kg; vitamina B2 (min) 6mg/kg; vitamina B6 (min) 7 mg/kg; vitamina B12 (min) 22 mcg/kg; niacina (min) 60 mg/kg; pantoteno de cálcio (min) 21 mg/kg; ácido fólico (min) 1mg/kg; biotina (min) 0,05mg/kg; colina 1.900 mg/kg;

MINERAIS: sódio (min) 2700 mg/kg; ferro (min) 50mg/kg; manganês (min) 60mg/kg; zinco (min) 60mg/kg; cobre (min) 10mg/kg; iodo (min) 2mg/kg; selênio (min) 0,05mg/kg; cobalto (min) 1,5 mg/kg, flúor (máx) 60mg/kg. aminoácidos: lisina (min) 12g/kg, metionina (min) 4.000mg/kg, aditivos BHT 100mg/kg.

INDICAÇÃO : Ração irradiada para camundongos e ratos de laboratório.

USO: Administração à vontade em comedouros suspensos.

CONSERVAÇÃO: Conservar o produto em ambiente seco e arejado, sobre estrados, evitando luz e calor excessivos.

ANEXO C – DECLARAÇÕES DE PERIGO E PRECAUÇÃO DO AZOXIMETANO

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

FICHA DE INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DE PRODUTOS QUÍMICOS

Versão 5.6

Data de revisão 22.05.2017

Data de impressão 04.08.2018

1. IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO E DA EMPRESA

1.1 Identificadores do produto

Nome do produto : Azoxymethane

Referência do Produto : A5486

Marca : Sigma

1.2 Outros meios de identificação

Dados não disponíveis

1.3 Utilizações identificadas relevantes da substância ou mistura e utilizações desaconselhadas

Só para utilização R&D. Não para utilização farmacêutica, doméstica ou outras utilizações.

1.4 Identificação do fornecedor da ficha de dados de segurança

Companhia : Sigma-Aldrich Brasil Ltda.
Rua Torre Eiffel, 100, galpão 2 Parque Rincão
06705-481 COTIA - SP
BRAZIL

Telefone : +55 11 2170 8484

Número de Fax : +55 11 4191 2586

Email endereço : sigmabr@sial.com

1.5 Número de telefone de emergência

0800-707-7022 / 0800 17 2020

2. IDENTIFICAÇÃO DE PERIGOS

2.1 Classificação GHS

Líquidos inflamáveis (Categoria 3)
Corrosivo para os metais (Categoria 1)
Toxicidade aguda, Oral (Categoria 2)
Irritação cutânea (Categoria 2)
Irritação ocular (Categoria 2A)
Carcinogenicidade (Categoria 1B)

2.2 Elementos da Etiqueta GHS, incluindo declarações de prevenção

Pictograma



Palavra de advertência : Perigo

Frases de Perigo

H226	Líquido e vapor inflamáveis.
H290	Pode ser corrosivo para os metais.
H300	Mortal por ingestão.
H315	Provoca irritação cutânea.
H319	Provoca irritação ocular grave.
H350	Pode provocar cancro.

Frases de Precaução

Prevenção

P201
P210

Pedir instruções específicas antes da utilização.
Manter afastado do calor/faisca/chama aberta/ superfícies quentes. Não fumar.

P234
P264
P280

Conservar unicamente no recipiente de origem.
Lavar a pele cuidadosamente após manuseamento.
Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/ protecção ocular/ protecção facial.

Resposta

P301 + P310 + P330

EM CASO DE INGESTÃO: Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/ médico. Enxaguar a boca.

P303 + P361 + P353

SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche.

P308 + P313

EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.

P337 + P313

Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.

P370 + P378

Em caso de incêndio: para extinguir utilizar areia seca, um produto químico seco ou espuma resistente ao álcool.

Reservado aos utilizadores profissionais.

2.3 Outros Perigos - nenhum(a)

3. COMPOSIÇÃO E INFORMAÇÕES SOBRE OS INGREDIENTES

3.1 Substâncias

Peso molecular : 74.08 g/mol

Componente		Concentração
No. CAS	25843-45-2	>= 90 - <= 100 %
Carboxylic acid		
No. CAS	64-19-7	>= 10 - < 20 %
No. CE	200-580-7	
No. de Index	607-002-00-6	
Alcohol		
No. CAS	64-17-5	>= 10 - < 20 %
No. CE	200-578-6	
No. de Index	603-002-00-5	
No. CAS	75-09-2	>= 0.1 - < 1 %
No. CE	200-838-9	
No. de Index	602-004-00-3	

4. MEDIDAS DE PRIMEIROS-SOCORROS

4.1 Descrição das medidas de primeiros socorros

Recomendação geral

Consultar um médico. Mostrar esta ficha de segurança ao médico de serviço.

Em caso de inalação

Se for respirado, levar a pessoa para o ar fresco. Se não respirar, dar respiração artificial. Consultar um médico.

Em caso de contacto com a pele

Lavar com sabão e muita água. Transportar imediatamente paciente para um Hospital. Consultar um médico.

Se entrar em contacto com os olhos

Lavar cuidadosamente com muita água, durante pelo menos quinze minutos, e consultar o médico.

Em caso de ingestão

NÃO provoca vômito. Nunca dar nada pela boca a uma pessoa inconsciente. Enxaguar a boca com água. Consultar um médico.

4.2 Sintomas e efeitos mais importantes, tanto agudos como retardados

O diclorometano é metabolizado no organismo produzindo monóxido de carbono, que eleva e mantém os níveis da carboxiemoglobina no sangue, o que reduz a capacidade de condução do oxigênio do sangue., Actua como simples asfixiante deslocando o ar., efeitos anestésicos, Dificuldades respiratórias, Dor de cabeça, Vertigem, O contacto prolongado ou repetido com a pele pode provocar:, redução de gordura, Dermatites, O contacto com os olhos pode provocar:, Vermelhidão, Visão desfocada, Provoca lágrimas., Os efeitos devidos a ingestão podem incluir:, Desconforto gastrointestinal, Depressão do sistema nervoso central, Parestesia., Sonolência, Convulsões, Conjuntivite., Edema pulmonar. Os efeitos podem ser tardios., Respiração irregular., Doenças do estômago / intestinais, Náusea, Vômitos, Aumento dos níveis das enzimas hepáticas., Debilidade, A exposição prolongada ou em altos níveis pode resultar na absorção de quantidades nocivas de material., Dor abdominal

4.3 Indicações sobre cuidados médicos urgentes e tratamentos especiais necessários

Dados não disponíveis

5. MEDIDAS DE COMBATE A INCÊNDIO**5.1 Meios de extinção****Meios adequados de extinção**

Pó seco Areia seca

Meios inadequados de extinção

NÃO UTILIZAR jactos de água.

5.2 Perigos especiais decorrentes da substância ou mistura

Dados não disponíveis

5.3 Recomendações para o pessoal de combate a incêndios

Usar equipamento de respiração autónomo para combate a incêndios, se necessário.

5.4 Informações adicionais

Os jatos de água podem ser utilizados para arrefecer os contentores fechados.

6. MEDIDAS DE CONTROLE PARA DERRAMAMENTO OU VAZAMENTO**6.1 Precauções individuais, equipamento de proteção e procedimentos de emergência**

Pôr uma protecção respiratória. Evitar a respiração do vapor/névoa/gas. Assegurar ventilação adequada. Cortar todas as fontes de ignição. Evacuar o pessoal para áreas de segurança. Atenção com a acumulação de vapores que pode formar concentrações explosivas. Os vapores podem-se acumular nas áreas baixas.

6.2 Precauções a nível ambiental

Prevenir dispersão ou derramamento, se seguro. Não permitir a entrada do produto no sistema de esgotos.

6.3 Métodos e materiais de confinamento e limpeza

Controlar e recuperar o líquido derramado com um produto absorvente não combustível, (por exemplo areia, terra, terra diatomácea, vermiculite) e pôr o líquido dentro de contentores para eliminação de acordo com os regulamentos locais / nacionais (ver secção 13).

6.4 Remissão para outras secções

Para eliminação de resíduos ver secção 13.

7. MANUSEIO E ARMAZENAMENTO

7.1 Precauções para um manuseamento seguro

Evitar a exposição - obter instruções específicas antes da utilização. Evitar o contacto com a pele e os olhos. Evitar a inalação do vapor ou da névoa. Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição - Não fumar. Tome medidas para impedir a formação de electricidade estática.

7.2 Condições de armazenagem segura, incluindo eventuais incompatibilidades

Guardar o recipiente herméticamente fechado em lugar seco e bem ventilado. Os contentores abertos devem ser cuidadosamente fechados de novo e têm que ficar direitos para evitar a dispersão.

Temperatura recomendada de armazenagem -20 °C

7.3 Utilização(ões) final(is) específica(s)

Dados não disponíveis

8. CONTROLE DE EXPOSIÇÃO E PROTEÇÃO INDIVIDUAL

8.1 Parâmetros de controlo

Limites de exposição ocupacional

Componente	No. CAS	Valor	Parâmetros de controlo	Bases
Acetic acid	64-19-7	LT	8 ppm 20 mg/m ³	AGENTES QUÍMICOS CUJA INSALUBRIDADE É CARACTERIZADA POR LIMITE DE TOLERÂNCIA E INSPEÇÃO NO LOCAL DE TRABALHO
	Observações	Grau de insalubridade: médio		
Ethanol	64-17-5	LT	780 ppm 1,480 mg/m ³	AGENTES QUÍMICOS CUJA INSALUBRIDADE É CARACTERIZADA POR LIMITE DE TOLERÂNCIA E INSPEÇÃO NO LOCAL DE TRABALHO
		Grau de insalubridade: mínimo		
Methylene chloride	75-09-2	LT	156 ppm 560 mg/m ³	AGENTES QUÍMICOS CUJA INSALUBRIDADE É CARACTERIZADA POR LIMITE DE TOLERÂNCIA E INSPEÇÃO NO LOCAL DE TRABALHO
		Grau de insalubridade: máximo		

Limites profissionais biológicas de exposição

Componente	No. CAS	Parametros	Valor	Amostras biológicas	Bases
Methylene chloride	75-09-2	Carboxihe moglobina	3.5% NF	Sangue	NR 7 - Programa de controle medico de saúde ocupacional
	Observações	O indicador biológico possui significado clínico ou toxicológico próprio, mas, na prática, devido à sua curta meia-vida biológica, deve ser considerado como EE.			

8.2 Controlo da exposição

Controlos técnicos adequados

Evitar o contacto com a pele, olhos e vestuário. Lavar as mãos antes de interrupções do trabalho, e imediatamente a seguir ao manuseamento do produto.

Protecção individual

Protecção ocular/ facial

Mascaras de protecção e óculos de segurança. Use equipamento de protecção ocular testado e aprovado de acordo com as normas governamentais adequadas, tais como NIOSH (US) ou EN 166 (EU).

Protecção da pele

Manusear com luvas. As luvas devem ser inspeccionadas antes da utilização. Use uma técnica adequada para a remoção das luvas (sem tocar a superfície exterior da luva) para evitar o contacto da pele com o produto. Descarte as luvas contaminadas após o uso, em conformidade com as leis e boas práticas de laboratório. Lavar e secar as mãos.

As luvas de protecção seleccionadas devem satisfazer as especificações da Directiva da UE 89/689/CEE e a norma EN 374 derivada dela.

Protecção do corpo

Fato completo de protecção para produtos químicos, Tecido protector anti-estático retardador de chama. O tipo de equipamento de protecção deve ser escolhido de acordo com a concentração e a quantidade da substância perigosa no local de trabalho.

Protecção respiratória

Nos casos em que a avaliação de risco mostrar que os respiradores purificadores de ar são apropriados, use um respirador de cobertura facial total com cartuchos de combinação multi-objectivos (E.U.A.) ou do tipo ABEK (EN 14387) como apoio a controlos de engenharia. Se o respirador for o único meio de protecção, use um respirador de ar de cobertura facial total. Use respiradores e componentes testados e aprovados por normas governamentais apropriadas, tais como as NIOSH (E.U.A.) ou CEN (UE).

9. PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS

9.1 Informações sobre propriedades físicas e químicas de base

a) Aspeto	Forma: líquido
b) Odor	Dados não disponíveis
c) Limite de Odor	Dados não disponíveis
d) pH	Dados não disponíveis
e) Ponto de fusão/ponto de congelamento	Dados não disponíveis
f) Ponto de ebulição inicial e intervalo de ebulição	97 - 99 °C - lit.
g) Ponto de fulgor	24 °C
h) Taxa de evaporação	Dados não disponíveis
i) Inflamabilidade (sólido, gás)	Dados não disponíveis
j) Limites de inflamabilidade superior / inferior ou explosividade	Dados não disponíveis
k) Pressão de vapor	Dados não disponíveis
l) Densidade de vapor	Dados não disponíveis
m) Densidade relativa	0.991 g/cm ³ a 25 °C
n) Hidrossolubilidade	Dados não disponíveis
o) Coeficiente de partição n-octanol/água	Dados não disponíveis

- p) Temperatura de auto-ignição Dados não disponíveis
- q) Temperatura de decomposição Dados não disponíveis
- r) Viscosidade Dados não disponíveis

10. ESTABILIDADE E REATIVIDADE

- 10.1 Reatividade**
Dados não disponíveis
- 10.2 Estabilidade química**
Dados não disponíveis
- 10.3 Possibilidade de reações perigosas**
Dados não disponíveis
- 10.4 Condições a evitar**
Calor, chamas e faíscas.
- 10.5 Materiais incompatíveis**
Agentes oxidantes fortes
- 10.6 Produtos de decomposição perigosos**
Outros produtos de decomposição perigosos - Dados não disponíveis
Produtos perigosos de decomposição formados durante os incêndios. - Óxidos de carbono, Óxidos de azoto (NOx)

11. INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS

11.1 Informações sobre os efeitos toxicológicos

Toxicidade aguda

Corrosão/irritação cutânea

Dados não disponíveis

Lesões oculares graves/irritação ocular

Dados não disponíveis

Sensibilização respiratória ou cutânea

Dados não disponíveis

Mutagenicidade em células germinativas

Dados não disponíveis

Carcinogenicidade

IARC: Nenhum componente deste produto presente a níveis maiores ou iguais a 0.1% é identificado como carcinógeno provável, possível ou confirmado pelo IARC.

Toxicidade à reprodução e lactação

Dados não disponíveis

Toxicidade sistêmica para órgãos-alvo específicos - exposição única

Dados não disponíveis

Toxicidade sistêmica para órgãos-alvo específicos - exposição repetida

Dados não disponíveis

Perigo de aspiração

Dados não disponíveis

Possíveis danos para a saúde

Inalação

Pode ser perigoso se for inalação. Causa uma irritação no aparelho respiratório.

Ingestão

Pode ser mortal se for engolido.

**Pele
Olhos**

Pode ser perigoso se for absorvido pela pele. Causa uma irritação da pele.
Provoca irritação ocular grave.

Sinais e sintomas de exposição

O diclorometano é metabolizado no organismo produzindo monóxido de carbono, que eleva e mantém os níveis da carboxiemoglobina no sangue, o que reduz a capacidade de condução do oxigênio do sangue., Actua como simples asfixiante deslocando o ar., efeitos anestésicos, Dificuldades respiratórias, Dor de cabeça, Vertigem, O contacto prolongado ou repetido com a pele pode provocar., redução de gordura, Dermatites, O contacto com os olhos pode provocar., Vermelhidão, Visão desfocada, Provoca lágrimas., Os efeitos devidos a ingestão podem incluir:., Desconforto gastrointestinal, Depressão do sistema nervoso central, Parestesia., Sonolência, Convulsões, Conjuntivite., Edema pulmonar. Os efeitos podem ser tardios., Respiração irregular., Doenças do estômago / intestinais, Náusea, Vômitos, Aumento dos níveis das enzimas hepáticas., Debilidade, A exposição prolongada ou em altos níveis pode resultar na absorção de quantidades nocivas de material., Dor abdominal

Informação adicional

RTECS: PA2975000

12. INFORMAÇÕES ECOLÓGICAS**12.1 Ecotoxicidade**

Dados não disponíveis

12.2 Persistência e degradabilidade

Dados não disponíveis

12.3 Potencial biocumulativo

Dados não disponíveis

12.4 Mobilidade no solo

Dados não disponíveis

12.5 Resultados da avaliação PBT e mPmB

Dados não disponíveis

12.6 Outros efeitos adversos

Dados não disponíveis

13. CONSIDERAÇÕES SOBRE TRATAMENTO E DISPOSIÇÃO**13.1 Métodos de tratamento de resíduos****Produto**

Queimar em um incinerador químico equipado com pós-combustor e purificador de gases, mas tomar precauções adicionais ao colocar esse material em ignição, visto que é altamente inflamável. Deve ser eliminado como resíduo perigoso de acordo com a legislação local. O tratamento e a disposição devem ser avaliados especificamente para cada produto. Devem ser consultadas legislações federais, estaduais e municipais. Manter restos de produto em suas embalagens originais e devidamente fechadas. O descarte deve ser realizado conforme o estabelecido para o produto.

Embalagens contaminadas

Não reutilize embalagens vazias. Estas podem conter restos do produto e devem ser mantidas fechadas e encaminhadas para descarte apropriado conforme estabelecido para o produto.

14. INFORMAÇÕES SOBRE TRANSPORTE**14.1 Número ONU**

ADR/RID: 1992 DOT (US): 1992 IMDG: 1992 IATA: 1992 ANTT: 1992

14.2 Designação oficial de transporte da ONU

ADR/RID: LÍQUIDO INFLAMÁVEL, TÓXICO, N.S.A. (Ethanol, Azoxymethane, Methylene chloride)

DOT (US): Flammable liquids, toxic, n.o.s. (Ethanol, Azoxymethane, Methylene chloride)

IMDG: FLAMMABLE LIQUID, TOXIC, N.O.S. (Ethanol, Azoxymethane, Methylene chloride)

IATA: Flammable liquid, toxic, n.o.s. (Ethanol, Azoxymethane, Methylene chloride)

ANTT: LÍQUIDO INFLAMÁVEL, TÓXICO, N.E. (Ethanol, Azoxymethane, Methylene chloride)

Sigma - A5486 Azoxymethane

Página 7 de 8
Data de revisão 22.05.2017

- 14.3 Classes de perigo para efeitos de transporte**
ADR/RID: 3 (6.1) DOT (US): 3 (6.1) IMDG: 3 (6.1) IATA: 3 (6.1) ANTT: 3 (6.1)
- 14.4 Grupo de embalagem**
ADR/RID: III DOT (US): III IMDG: III IATA: III ANTT: III
- 14.5 Perigos para o ambiente**
ADR/RID: não DOT (US): não IMDG Poluente marinho: não IATA: não
- 14.6 Precauções especiais para o utilizador**
Dados não disponíveis
- 14.7 Numero De Risco 36**

15. REGULAMENTAÇÕES**15.1 Regulamentação/legislação específica para a substância ou mistura em matéria de saúde, segurança e ambiente**

Esta Ficha de Informações de Produtos Químicos foi preparada de acordo com a NBR 14725-4/2014 da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas)

16. OUTRAS INFORMAÇÕES**Informações adicionais**

Direitos exclusivos, 2016, da Sigma-Aldrich Co. LLC. Permissão concedida para fazer número ilimitado de cópias em papel, somente para uso interno.

Acredita-se que as informações acima estejam correctas, embora não pretendam ser totalmente abrangentes, devendo ser usadas apenas como um guia. A informação contida neste documento esta baseada no presente estado do nosso conhecimento e é aplicável às precauções de segurança apropriadas para o produto. Não representa nenhuma garantia das propriedades do produto. A Corporação Sigma-Aldrich e as suas companhias afiliadas, não responderão por nenhum dano resultante do manuseio ou do contato com o produto acima. Consultar www.sigma-aldrich.com e/ou o verso da factura ou nota que acompanha o produto para tomar conhecimento dos termos adicionais e condições de venda.

ANEXO D – ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA ANTICANCER RESEARCH

Title: Antioxidant and antigenotoxic action of gum arabic on the intestinal mucosa, liver and bone marrow in colorectal carcinogenesis

Authors: ANDRÉ LUÍS NUNES AVELINO¹, NINA VICTÓRIA RIBEIRO E SILVA², GILSON BRITO DE OLIVEIRA³, ANTÔNIO ADAILSON DE SOUSA SILVA⁴, BRUNO COELHO CAVALCANTI⁵, FRANCISCO VAGNALDO FECHINE JAMACARU⁶, CONCEIÇÃO APARECIDA DORNELAS⁷.

1- Fellow Master degree, Postgraduate Program in Medical-Surgical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-CE, Brazil.

2- Graduate student, School of Medicine, UFC, Fortaleza-CE, Brazil.

3- Graduate student, School of Medicine, UFC, Fortaleza-CE, Brazil.

4- PhD, Nucleus for Research and Development of Medicines (NPDM), National Laboratory of Experimental Oncology, UFC.

5- PhD, Nucleus for Research and Development of Medicines (NPDM), National Laboratory of Experimental Oncology, UFC.

6- PhD in Surgery, Researcher, Nucleus of Research and Development of Medicines, Laboratory of Pharmacology and Preclinical Research, School of Medicine, UFC.

7- PhD, Associate Professor, Postgraduate Program in Pathology and Medical-Surgical Sciences, School of Medicine, UFC, Fortaleza-CE, Brazil.

Author to whom proofs are to be sent: André Luís Nunes Avelino.

Key words: Gum Arabic. Colorectal Neoplasms. Oxidative Stress. Mice.

Abbreviated running title: Gum arabic for inhibition of colorectal carcinogenesis.

Experimental study.

Date of submission: 19 May, 2020

Abstract

Background/Aim: Colorectal carcinogenesis is characterized by oxidative stress and the formation of aberrant crypts in its initial stages. Gum arabic (GA) is a natural product with antioxidant properties. We aim to evaluate the effects of GA on the formation of aberrant crypts, as well as the local, hepatic and systemic genotoxicity and oxidative stress. **Materials and Methods:** We induced mice colorectal carcinogenesis, afterwards treated them with water, 2.5% GA or 5% GA via gavage for twelve weeks and then performed surgery in order to obtain samples to analysis (proximal and distal colon, liver, blood and bone marrow). **Results:** The number of aberrant crypts in the GA-treated animals was lower than in the control groups. Likewise, there was a decline of local, hepatic and systemic genotoxicity and oxidative stress. **Conclusion:** These results reflect the antioxidant role of GA and may lead to the development of treatments that inhibit colorectal carcinogenesis.

Introduction

Cancer is a global health problem, as one of the main causes of mortality. Among the malignant neoplasms, colorectal carcinoma (CRC) is the third most incident form worldwide (1), being expected a 5.5% increase of this rate in 2020 and 38.2% until 2030 (2).

Oxidative stress is an initial event in colorectal carcinogenesis, where production of excess free radicals such as reactive oxygen species (ROS) can cause damage to the genetic material (genotoxicity), development of mutations and formation of cancer (3).

The establishment of genotoxicity and progression of carcinogenesis are accompanied by tissue morphological alterations. In the case of the colon, aberrant crypts are the first detectable abnormalities from the histopathological standpoint (4). They stand out for their greater size and darker color than normal, with slightly raised and thickened epithelium, slit-like lumens and increased pericryptal space (5).

The quantity of crypts per focus (multiplicity) is related to the prognosis, i.e., the higher the number of crypts per focus, the more aggressive the cancerous behavior tends to be, mainly in the case of aberrant crypts focus (ACF) with more than five crypts (6,7).

Gum arabic (GA) is an exudate obtained from the trees of the *Acacia* genus (8) with recognized antioxidant (9) and anti-inflammatory effects (10). However, despite knowledge that oxidative stress plays an important role in colorectal carcinogenesis (11), few

studies have investigated the action of GA to inhibit the development of cancer.

Therefore, we evaluated the effects of GA on the colonic mucosa of mice submitted to induced colorectal carcinogenesis (preneoplastic lesions - aberrant crypts) in different colon segments (proximal, middle and distal) as well as the local (proximal and distal colon), hepatic, bone marrow and blood genotoxicity and oxidative stress.

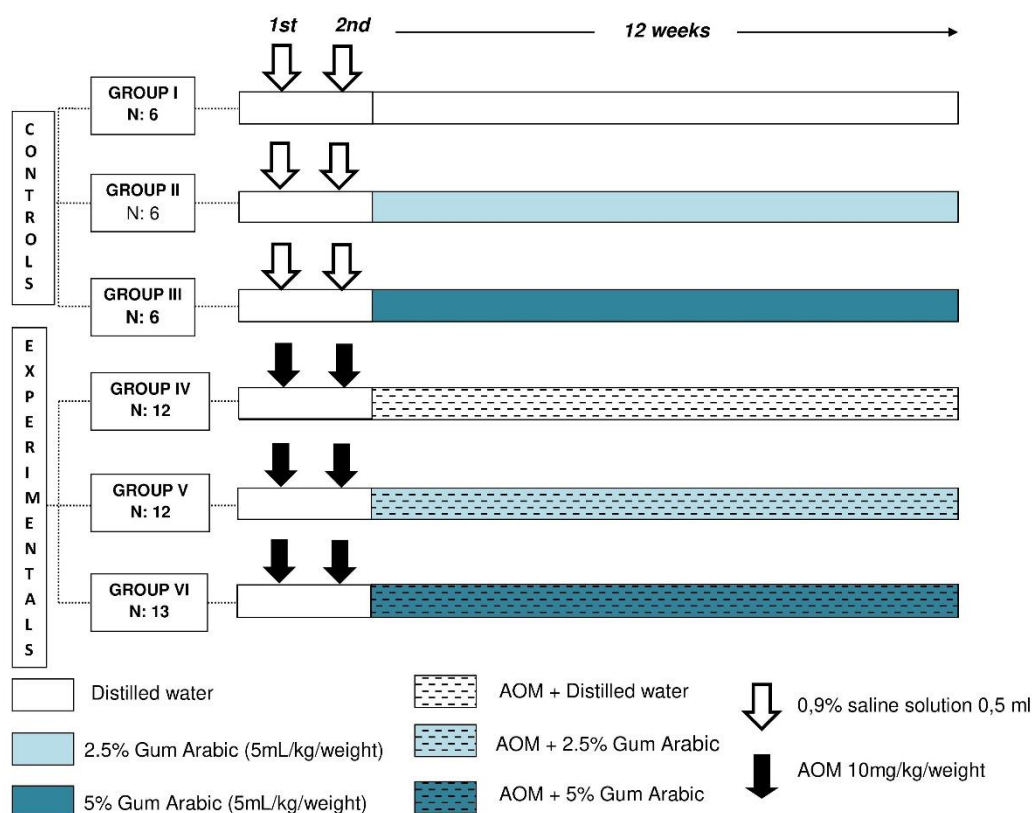
Materials and Methods

The research protocol followed the guidelines of the National Council for Animal Experiment Control (CONCEA) and was approved by the Committee on Ethical Use of Animals (CEUA) of Federal University of Ceará (UFC) (Protocol nº 3925060318).

Three control groups were formed (Groups I-III, n = 6) and three treatment groups (Groups IV and V, n = 12, and VI with n = 13), for a total of 55 animals (male Swiss mice). The animals were housed under controlled environmental conditions (24°C, 50% humidity, and a 12 hours light/dark cycle) and had free access to standard food (NUVILAB CR-1) and tap water.

Once a week for two weeks, the animals in the control groups were given an intraperitoneal (i.p.) injection of saline solution, while those in the experimental groups received azoxymethane (AOM) at 10 mg/kg i.p. In the following 12 weeks, all the animals received daily administration by gavage of 5 ml/kg of water (Groups I and IV), 2.5% GA (Groups II and V) or 5% GA (Groups III and VI) (Figure 1).

Figure 1



Experimental design. AOM: azoxymethane; 1st: first week; 2nd: second week.

The AOM (purchased from Sigma-Aldrich Corporation®) and the GA (obtained from Dinâmica Química Contemporânea Ltda® in powder form) were diluted in a sterile saline solution to obtain the necessary concentrations. The dilutions were prepared once a week, taking into account changes in body weight.

Surgical procedure

Twelve weeks after the application of the carcinogen or saline solution, the animals were submitted to the surgical procedure. After fasting for 24 hours with access to water *ad libitum*, the mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg) and submitted to laparotomy by median xyphopubic incision. After opening the cavity, blood was collected from the abdominal aorta and complete resection of the colon was

performed, with removal of the lungs, kidneys, spleen, liver and right femur.

The colon was opened along the antimesenteric border and washed with saline solution, followed by removal of small fragments from the proximal and distal regions for biological examination. The large intestine was rolled up in filter paper and fixed with the 10% buffered formaldehyde, and a small liver fragment was also removed for biological analysis. All the organs were evaluated for the presence of tumor formation or other alterations and then placed in a 10% buffered formaldehyde solution for 24 hours. After fixing, all the organs were cleaved and embedded in paraffin. Next, they were sectioned and stained with hematoxylin and eosin (HE) for histopathological study.

Evaluation of the ACF

After fixing for 24 hours, each colon was immersed in a 0.1% methylene blue solution buffered with phosphate for 1 minute. Then the mucosa of each colon was examined under a stereomicroscope (Vasconcellos M90, DF Vasconcellos S.A.®) with 40x magnification (Figure 2) to determine the number of ACF and number of crypts per focus (multiplicity) in each colon segment (proximal, middle and distal). Afterwards, each specimen was submitted to the same histological processing as the other organs.

Figure 2



Focus containing various aberrant crypts (white arrow) observed under a stereomicroscope. 40x magnification (methylene blue).

Biological Assays

The biological tests were performed on the blood collected from the aorta, liver fragment, colon fragments (proximal and distal) and bone marrow aspirate. The liver and colon fragments were individually macerated in a phosphate buffered saline (PBS) solution at 4 °C and filtered. The cells were obtained from the suspension after filtration.

The bone marrow was obtained from the right femur of the animals. For this purpose, the femur of each animal was removed and the epiphysis were sectioned. Then the needle of a syringe with volume of 1 ml filled with 0.5 ml of fetal bovine serum (FBS) was inserted in one of the openings of the femur and the serum was injected to displace the marrow into a centrifuge tube previously filled with the same material (3 ml of FBS).

Alkaline comet assay (colon, liver, bone marrow and blood)

The possible DNA damage was studied by the alkaline comet assay, as described by Hartmann and Speit (12).

Modified alkaline comet assay (colon and liver)

To enhance the sensitivity and specificity, the alkaline comet assay was carried out with the addition of the enzyme human 8-oxoguanine DNA-N-glycosylase 1 (hOGG1), which identifies oxidized nitrogen bases such as 8-oxoguanine (8-oxoGua) (13,14). The test was performed as described by Smith, O'Donovan and Martin (14).

Micronucleus test of blood

The micronucleus test of blood was performed to analyze the frequency of micronuclei in reticulocytes in the blood, using acridine orange staining, as described by Hayashi *et al.* (15).

Micronucleus test of bone marrow

The bone marrow obtained as described previously was centrifuged at 1,000 rpm for 5 minutes, after which the supernatant was discarded and the precipitate was

homogenized. Then smears were prepared by placing a droplet of the suspension on a clean dry slide. Two slides were prepared for each animal. The slides were stained by the Leishman method (16) and analyzed with a binocular optical microscope with 20 and 40 x magnification to identify the micronuclei by the criteria of Schmid (17) and Heddle *et al.* (18).

Reactive oxygen species (colon, liver and blood)

The cell preparations were placed in contact with 20 μ M of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA) in the absence of light at 37 °C for 30 minutes. The H₂DCFDA is oxidized when contacting the intracellular ROS, becoming strongly fluorescent. The preparations were then washed, resuspended in a phosphate buffered saline (PBS) solution and analyzed by flow cytometry (Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, USA®). Among the ROS involved in this process are the radicals hydroxyl (HO[•]), peroxy (ROO[•]) and peroxynitrite (ONOO[•]), along with hydrogen peroxide (H₂O₂) and singlet oxygen (¹O₂) (19).

Statistical analysis

After confirmation of normal distribution by the Shapiro-Wilk test, the data on the number of aberrant crypts, number of ACF and multiplicity of crypts, along with the data from the biological tests (comet assay, micronucleus test, ROS measurement) were tabulated to calculate the mean and standard deviation. Then each parameter was submitted to comparisons between the groups by analysis of variance (ANOVA) together with the Tukey multiple comparison test to check for differences between the groups. GraphPad Prism 8.0® (GraphPad Software, La Jolla, California, USA) was used for all the statistical procedures and preparation of graphs, with a significance level of 5% in all the tests ($p < 0.05$).

Results

Number of aberrant crypts (total and per colon segment)

There was a significant reduction in the number in GVI in the distal segment (Table 1).

Table 1 - Number of aberrant crypts observed in groups GIV, GV and GVI by colon segment: proximal, middle and distal

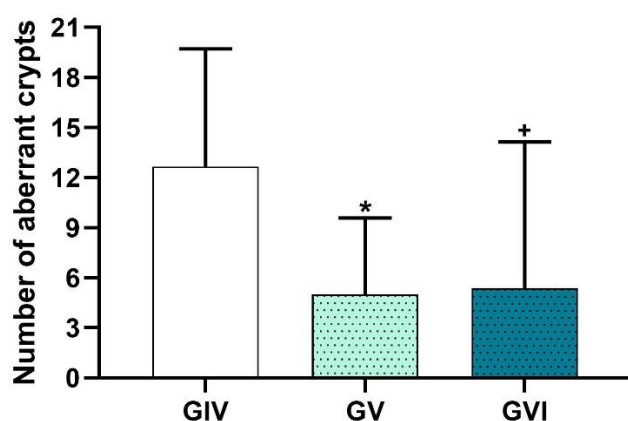
Colon segment	GIV (n=12) Mean \pm SD	GV (n=11) Mean \pm SD	GVI (n=13) Mean \pm SD
Proximal	3.92 \pm 6.40	1.64 \pm 3.04	3.62 \pm 8.43
Middle	3.58 \pm 3.15	1.55 \pm 2.11	1.38 \pm 2.33
Distal	5.17 \pm 3.83	1.82 \pm 2.68	0.38 \pm 0.77 ^a

SD: standard deviation. The letter ^a($p=0.0031$) denotes statistically significant difference in relation to group GIV in the colon distal segment.

There were no significant differences in the number of crypts between different colon segments in the same group ($p=0.6012$).

With respect to the entire colon, there was a decrease in the number of crypts observed in groups GV and GVI (figure 3).

Figure 3



Number of aberrant crypts (mean and standard deviation) in groups GIV, GV and GVI considering the entire colon extension. * $p=0.0379$ in relation to GIV; + $p=0.0401$ in relation to GIV.

Aberrant crypt foci (ACF)

Comparison of the number of ACF showed significant reductions in the middle

and distal segments (table 2).

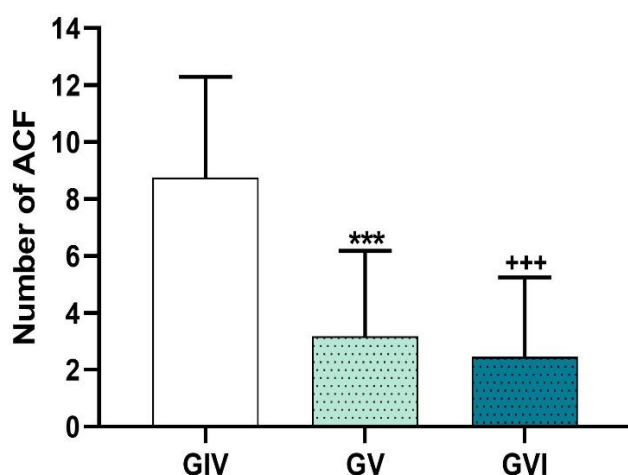
Table 2 - Number of ACF observed in groups GIV, GV and GVI by colon segment: proximal, middle and distal

Colon segment	GIV (n=12) Mean \pm SD	GV (n=11) Mean \pm SD	GVI (n=13) Mean \pm SD
Proximal	1.67 \pm 2.06	0.73 \pm 1.56	1.15 \pm 2.38
Middle	3.08 \pm 2.27	1.00 \pm 1.26 ^a	1.00 \pm 1.58 ^b
Distal	3.83 \pm 2.44	1.45 \pm 2.11	0.31 \pm 0.63 ^c

SD: standard deviation. The letters ^a($p=0.0346$), ^b($p=0.0405$) and ^c($p=0.0010$) denote statistically significant differences in relation to group GIV in the same colon segment.

There were no significant differences in the number of ACF between different colon segments in the same group ($p=0.2889$). Analyzing the entire colon extension, there was a decrease in this number observed in groups GV and GVI (figure 4).

Figure 4



Number of ACF (mean and standard deviation) in groups GIV, GV and GVI, considering the entire colon extension. *** $p=0.0004$ in relation to GIV; +++ $p<0.0001$ in relation to GIV.

Multiplicity of crypts

In the comparison of the foci with up to 5 aberrant crypts, there was no significant difference in the number of ACF between different colon segments in the same group ($p=0.2136$). On the other hand, there was a reduction of the number of ACF in group GV

compared to GIV in the middle colon ($p=0.0346$) and in GVI compared to GIV in the middle ($p=0.0405$) and distal colon ($p=0.0012$). Regarding the entire length of the colon, the numbers of ACF observed in groups GV and GVI were significantly lower than in GIV ($p=0.0006$ and $p<0.0001$, respectively).

With respect to the ACF with more than 5 crypts, there were no significant differences between the groups when comparing the different colon segments ($p=0.2098$) or the entire colon ($p=0.3912$).

No aberrant crypts were detected in the control groups.

Morphological observations

Among the hepatic alterations observed, two mice in group IV and two in group V presented slight macro and microvesicular and perivenular steatosis, associated with mild sinusoidal dilation. Regarding renal alterations, peritubular inflammation was observed in one of the mice in group IV and two in group V. No significant alterations were observed in the colon, spleen and lungs in any animal.

Genotoxicity

The evaluation of genotoxicity by means of the alkaline comet assay demonstrated that it was lower in the GA-treated groups GV and GVI than in the untreated group GIV in the proximal ($p<0.01$) and distal colon ($p<0.001$) and liver ($p<0.001$). Likewise, the alkaline comet assay with the enzyme hOGG1 revealed reductions of genotoxicity in the GA-treated groups in the proximal and distal colon and liver ($p<0.001$ in all the assays).

In the bone marrow, although no differences were observed in genotoxicity between the groups by the alkaline comet assay ($p>0.05$), there was a decline in formation of micronuclei in GV and GVI compared to GIV ($p<0.001$ and $p<0.01$, respectively).

Regarding the blood, no reductions in genotoxicity of GV and GVI were observed in comparison with GIV in the alkaline comet assay ($p>0.05$) or in the micronucleus test ($p>0.05$).

Oxidative stress

The GA-treated groups presented lower ROS formation than GIV in the proximal colon ($p<0.01$), distal colon ($p<0.001$) and liver ($p<0.001$). In the blood, a similar result was

observed when using 5% GA ($p < 0.001$).

DISCUSSION

Colorectal carcinogenesis is a sequential process that begins with oxidative stress in the colon, followed by DNA damage (genotoxicity) caused by ROS, formation of ACF and development of cancer per se (3,4).

The ACF are considered precursor lesions of carcinoma and serve as a biological marker of the disease's development (4). They were first described by Bird (5), who observed the formation of ACF with the aid of methylene blue staining in the colon mucosa of mice treated with AOM. Since ACF are the earliest lesions observed in the development of carcinoma, their analysis can be used as the base to study substances with possible utility to prevent CRC. Some food fibers, for example, appear to confer protection against cancer, one of them being GA (20).

We examined aberrant crypts and ACF in the colon and noted reduction of their formation with administration of 2.5% and 5% GA. Among the three colon segments, the number of aberrant crypts of the distal colon of group VI (treated with 5% GA) was significantly lower. Likewise, the number of ACF and ACF with up to 5 aberrant crypts also was lower in GVI in the distal and middle colon than control group. The results for group GV, treated with a lower GA concentration, were less consistent: there was a reduction in the middle colon, but no reduction in the distal segment. In the proximal colon, no significant differences were observed.

The more pronounced reduction of the formation of aberrant crypts in the distal colon segments in our mice can be explained by the different tumor formation pathway in this part of the organ (mainly related to the deficiency of DNA repair mechanisms and differences in the composition and metabolism of glycoproteins) (21, 22). Similar results were observed in rats treated with 1% GA, which also revealed reduction in the number of ACF with ≤ 4 crypts (23).

When considering the entire colon length, the number of crypts and the number of ACF and ACF with up to 5 aberrant crypts in GA-treated groups was lower than found in control. This finding of anti-tumor effect of GA is in agreement with other reports in the literature in rats and mice (20,23) and can be attributed mainly to the reduced transcriptional levels in the colon epithelium of angiogenins and important genes for cell proliferation and/or tumor growth, such as the antigen CD38, ubiquitin D, oncogene vav 3, chemokine ligand 5

and β -catenin (20). Additionally, GA has antioxidant properties (24,25), as well as anti-inflammatory effect (10). We noted the effect of GA in reducing oxidative stress in the proximal and distal colon segments, as will be discussed shortly.

Regarding the ACF with more than 5 crypts, no significant differences were observed between the groups when comparing the colon segments or when comparing the entire colon length. This can be explained by the small number of foci with these numbers of crypts, since the experimental period was brief.

In the evaluation of oxidative stress, the GA treatment reduced the formation of ROS in the proximal and distal colon. This reduction caused by GA corresponds to the antioxidant effect of this compound reported previously in the literature and is related to the ability of its components flavonoids and other polyphenols to reduce lipid peroxidation and increase the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase) (24,25). For example, in a recent study, Ali *et al.* observed a reduction of oxidation and inflammation in the gastrointestinal mucosa of mice with chronic renal disease treated with 15% GA (26). Likewise, Veskoukis *et al.* demonstrated the antioxidant role of vegetal extracts that are rich in polyphenols (27).

In relation to genotoxicity, we observed a reduction through the regular alkaline comet assay and the assay with the enzyme hOGG1 in the groups treated with GA in the proximal and distal colon. Once again, this corroborates our results regarding the reduction in the number of aberrant crypts in the colon. Therefore, the treatment with GA diminished not only the oxidative stress but also the genotoxicity in the proximal and distal colon segments, which was expected since one process is a consequence of the other.

The reduction of oxidative stress and genotoxicity in the distal colon is related to the smaller number of aberrant crypts in this segment, unlike the proximal colon, in which despite the decrease of oxidative stress and genotoxicity, no reduction in the number of crypts was observed. This can be explained because the morphological phenomenon of the appearance of ACF occurs after the damages that occur at the cell homeostasis level. In other words, even with the protection against genotoxicity by the GA, this may not be manifested in reduced aberrant crypt formation (as in the case of the proximal colon in this study), since this morphological alteration happens in a subsequent step of carcinogenesis.

Although we did not evaluate genotoxicity or oxidative stress in the middle colon, we can assume these parameters were lower in the groups treated with the gum, since they declined in the proximal and distal colon, and a lower number of ACF crypts were observed in the intermediary segment.

Regular optical microscopy did not reveal the presence of aberrant crypts, unlike stereoscopic microscopy. This can be attributed to the fact that the latter method is more sensitive by revealing the three-dimensional aspect of the intestinal surface, while optical microscopy only allows viewing a sample of part of the organ in two dimensions.

In analyzing the genotoxicity of the bone marrow, the alkaline comet assay did not reveal differences among the groups. However, the micronucleus test indicated reductions in animals treated with GA. This difference is due to the distinct DNA alteration mechanisms related to the positivity of each test (28). In addition, some carcinogens have a low level of metabolic activation at the medullary level, which reduces the sensitivity to detect their effects in the marrow (29).

This reduction of genotoxicity is related to the anti-tumor properties of GA, which inhibits the action of genes related to cell proliferation (20), as well as reducing oxidative stress, as observed in previous studies (24,25).

In the blood, in turn, no differences were observed of genotoxicity of the GA-treated groups, what is related to the splenic phagocytosis of cells with genetic damage circulating in the bloodstream (30).

With regard to the study of oxidative stress at the serological level after euthanizing the animals, no reduction was noted in mice that received 2.5% GA. However, the quantity of ROS was lower in the ones treated with 5% GA, what can be explained by the higher GA concentration used.

In the other organs (lungs, kidneys, spleen and liver), few morphological alterations were observed. No macroscopic or microscopic changes were observed among the animals in the control groups. This finding corroborates that of Melnik *et al.* who did not observe histopathological alterations related to the administration of GA in rats and mice (31).

Previous studies have shown that AOM in the liver can induce a series of histological changes, among them steatosis, peliosis, spongiosis, fibrosis, and neoplastic lesions such as cholangioma, adenoma and hepatic carcinoma (32,33,34). These induced alterations are related to the oxidative and lipid peroxidation effects caused by the carcinogen (35). Optical microscopic examination of our animals' livers revealed slight inflammatory alterations, such as perivenular steatosis and sinusoidal dilation in a small number of mice in groups GIV and GV. These few changes are predictable in view of the reduction in hepatic oxidative stress in animals treated with GA 2.5% or 5%. Besides, it was observed a decrease in liver genotoxicity, which is also expected in view of the reduction of oxidative stress by GA.

Among the renal alterations noted was peritubular inflammation in mice of groups GIV and GV, also related to the exposure to AOM (36). As was the case of the liver tissue, these alterations were not noted in group GVI, treated with the highest GA concentration, what is explained by the gum's protective effect. No alterations were noted in the spleen or lungs of the animals in any of the groups, while no alterations were observed in any of the organs of the mice in group GVI.

CONCLUSION

The treatment with GA at concentrations of 2.5% and 5% reduced the formation of aberrant crypts, ACF and ACF with fewer than 5 crypts in the colon of the mice, mainly in the distal segment, due to reduction of the local genotoxicity and oxidative stress. A similar effect was observed in other tissues, such as reduced genotoxicity in the liver and bone marrow and lower hepatic and blood oxidative stress.

Conflicts of Interest

The Authors report no conflicts of interest in regard to this study.

Authors' Contributions

ALNA: Intellectual and scientific development of the study, technical procedures and manuscript preparation.

NVRS: Technical procedures.

GBO: Technical procedures.

AASS: Biological assays.

BCC: Biological assays.

FVFJ: Analysis and interpretation of data, statistics analysis.

CAD: Conception and design of the study and critical review.

Acknowledgements

Research performed at Laboratory of Experimental Surgery and Nucleus of Research and Development of Medicines, and Laboratory of Pharmacology and Preclinical Research, Medical School, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-CE, Brazil.

This study is part of Master degree thesis, Postgraduate Program in Medical Surgical Sciences, UFC. Tutor: Profa. Conceição Aparecida Dornelas. And was supported by CAPES, Ministry of Education (MEC) of Brazil.

REFERENCES

1- World Health Organization – WHO. Global Cancer Observatory – GLOBOCAN. 2018. Available at: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>. Last accessed on 26th April, 2020.

- 2- World Health Organization – WHO. Global Cancer Observatory – GLOBOCAN. 2018. Available at: https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=0&type_sex=0&mode=population&sex=0&populations=900&cancers=8&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0&single_unit=100000&print=0. Last accessed on 26th April, 2020.
- 3- Stone WL, Krishnan K, Campbell SE and Palau VE: The role of antioxidants and pro-oxidants in colon cancer. *World J Gastrointest Oncol* 6(3): 55-66, 2014. PMID: 24653795. DOI: 10.4251/wjgo.v6.i3.55.
- 4- Khare S, Chaudhary K, Bissonnette M and Carroll R: Aberrant crypt foci in colon cancer epidemiology. *Methods Mol Biol* 472: 373-86, 2009. DOI: 10.1007/978-1-60327-492-0_17.
- 5- Bird RP: Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* 37(2): 147-151, 1987. PMID: 3677050. DOI: 10.1016/0304-3835(87)90157-1.
- 6- Boateng JA, Verghese M, Walker LT, Shackelford LA and Chawa CB: Inhibitory effects of selected dry beans (*Phaseolus* spp L) on azoxymethane-induced formation of aberrant crypt foci in Fisher 344 male rats. *Nutr Res* 27(10): 640-646, 2007. DOI: 10.1016/j.nutres.2007.07.004.
- 7- Bird RP: Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett* 93(1): 55-71, 1995. PMID: 7600544. DOI: 10.1016/0304-3835(95)03788-X.
- 8- Islam AM, Phillips GO, Sljivo A, Snowden MJ and Williams PA: A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum Arabic. *Food Hydrocolloids* 11(4): 493-505, 1997. DOI: 10.1016/S0268-005X(97)80048-3.
- 9- Gado AM and Aldahmash BA: Antioxidant effect of Arabic gum against mercuric chloride-induced nephrotoxicity. *Drug Des Devel Ther* 7: 1245-1252, 2013. PMID: 24174869. DOI: 10.2147/DDDT.S50928.
- 10- Kamal E, Kaddam LA, Dahawi M, Osman M, Salih MA, Alagib A and Saeed A: Gum Arabic Fibers Decreased Inflammatory Markers and Disease Severity Score among Rheumatoid Arthritis Patients, Phase II Trial. *Int J Rheumatol*. 2018: 4197537, 2018. PMID: 30112005. DOI: 10.1155/2018/4197537.
- 11- Carini F, Mazzola M, Rappa F, Jurjus A, Geagea AG, Al Kattar S, Bou-Assi T, Jurjus R, Damiani P, Leone A and Tomasello G: Colorectal Carcinogenesis: Role of Oxidative Stress and Antioxidants. *Anticancer Res* 37(9): 4759-4766, 2017. PMID: 28870894. DOI: 10.21873/anticancer.11882.
- 12- Hartmann A and Speit G: The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (Comet assay). *Toxicol Lett* 90(2-3): 183-188, 1997. PMID: 9067486. DOI: 10.1016/s0378-4274(96)03847-7.
- 13- Korkmaz KS, Butuner BD and Roggenbuck D: Detection of 8-OHdG as a diagnostic biomarker. *J Lab Precis Med* 3(95): 1-8, 2018. DOI: 10.21037/jlpm.2018.11.01.

- 14- Smith CC, O'Donovan MR and Martin EA: hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis* 21(3): 185-190, 2006. PMID: 16597659. DOI:10.1093/mutage/gel019.
- 15- Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T and Ishidate M Jr: The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange coated slides. *Mutat Res* 245(4): 245-249, 1990. PMID: 1702516. DOI: 10.1016/0165-7992(90)90153-b.
- 16- Schmid W: The micronucleus test. *Mutat Res* 31(1): 9-15, 1975. PMID: 48190. DOI:10.1016/0165-1161(75)90058-8.
- 17- Schmid, W: Chemical Mutagens: principles and methods for their detection. In: *The Micronucleus Test for Cytogenetic Analysis*. Hollaender A (ed.). New York, Plenum Publ Corp., pp 31-43, 1976.
- 18- Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW and Salamone MF: The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 123(1): 61-118, 1983. PMID: 6888413. DOI: 10.1016/0165-1110(83)90047-7.
- 19- Bartosz G: Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. *Clin Chim Acta* 368(1-2): 53-76, 2006. PMID: 16483560. DOI: 10.1016/j.cca.2005.12.039.
- 20- Nasir O, Wang K, Föllner M, Bhandaru M, Sandulache D, Artunc F, Ackermann TF, Ebrahim A, Palmada M, Klingel K, Saeed AM and Lang F: Downregulation of Angiogenin Transcript Levels and Inhibition of Colonic Carcinoma by Gum Arabic (*Acacia senegal*). *Nutr Cancer* 62(6): 802-810, 2010. PMID: 20661830. DOI: 10.1080/01635581003605920.
- 21- Freeman HJ, Kim Y and Kim YS: Glycoprotein metabolism in normal proximal and distal rat colon and changes associated with 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic neoplasia. *Cancer Res* 38(10): 3385-3390, 1978. PMID: 688227.
- 22- Perše M and Cerar A: Morphological and Molecular Alterations in 1,2 Dimethyl hydrazine and Azoxymethane Induced Colon Carcinogenesis in Rats. *J Biomed Biotechnol* 2011: 473964, 2011. PMID: 21253581. DOI: 10.1155/2011/473964.
- 23- Braga VNL, Juanes CC, Júnior HSP, Sousa JR, Cavalcanti BC, Jamararu FVF, Lemos TLG and Dornelas CA: Gum arabic and red propolis protectetng colorectal preneoplastic lesions in a rat model of azoxymethane. *Acta Cir Bras* 34(2): e201900207, 2019. DOI: 10.1590/s0102-8650201900207.
- 24- Ahmed AA, Fedail JS, Musa HH, Musa TH and Sifaldin AZ: Gum Arabic supplementation improved antioxidant status and alters expression of oxidative stress gene in ovary of mice fed high fat diet. *Middle East Fertil Soc J* 21(2): 101-108, 2016. DOI: 10.1002/jbt.10072.
- 25- Najla OA, Ramadan KS, Farid HEA and Alnahdi HS: Protective role and antioxidant activity of arabic gum against trichloroacetate-induced toxicity in liver of male rats. *Indian J Anim Res* 51(2): 303-309, 2017. DOI: 10.18805/ijar.10976.

- 26- Ali BH, Al Za'abi M, Al Suleimani Y, Manoj P, Ali H, Ribeiro DA and Nemmar A: Gum arabic reduces inflammation, oxidative, and nitrosative stress in the gastrointestinal tract of mice with chronic kidney disease. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2020. PMID: 32157347. DOI: 10.1007/s00210-020-01844-y.
- 27- Veskokoukis AS, Vassi E, Poulas K, Kokkinakis M, Asproдини E, Haroutounian S and Kouretas D: Grape Stem Extracts From Three Native Greek Vine Varieties Exhibit Strong Antioxidant and Antimutagenic Properties. *Anticancer Res* 40(4): 2025-2032, 2020. PMID: 32234893. DOI:10.21873/anticancer.14159.
- 28- Maluf SW: Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Clin Chim Acta* 347(1-2): 15-24, 2004. PMID: 15313138. DOI: 10.1016/j.cccn.2004.04.010.
- 29- Agostini JMS: O teste do micronúcleo: seu uso no homem. *Biotemas* 6(2): 1-19, 1993.
- 30- Ishii PL, Prado CK, Mauro MO, Carreira CM, Mantovani MS, Ribeiro LR, Dichi JB and Oliveira RJ: Evaluation of *Agaricus blazei* in vivo for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 59(3): 412-422, 2011. DOI:10.1016/j.yrtph.2011.01.004.
- 31- Melnick RL, Huff J, Haseman JK, Dieter MP, Grieshaber CK, Wyand DS, Russfield AB, Murthy AS, Fleischman RW and Lilja HS: Chronic effects of agar, guar gum, gum arabic, locust-bean gum, or tara gum in F344 rats and B6C3F1 mice. *Food Chem Toxicol* 21(3): 305-311, 1983. PMID: 6683227. DOI: 10.1016/0278-6915(83)90065-0.
- 32- Abdella EM, Mahmoud AM and El-derby AM: Brown seaweeds protect against azoxymethane induced hepatic repercussions through upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and attenuation of oxidative stress. *Pharm Biol* 54(11): 2496-2504, 2016. DOI: 10.3109/13880209.2016.1160938.
- 33- Burlamaqui IMB, Dornelas CA, Almeida PRC, Jamararu FVF, Mota DMC, FJC Mesquita, Brito LA, Veras LB and Rodrigues LV: Repercussão hepática da carcinogênese colorretal induzida pelo azoximetano. *Rev Col Bras Cir* 40(2): 137-141, 2013. DOI: 10.1590/S0100-69912013000200010.
- 34- Lahouar L, Ghrairi F, Arem AE, Sghaeir W, Felah ME, Salem HB, Sriha B and Achour L: Attenuation of histopathological alterations of colon, liver and lung by dietary fibre of barley Rihane in azoxymethane-treated rats. *Food Chem* 149: 271-276, 2014. PMID: 24295706. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.10.101.
- 35- Diehl AM: Lessons from animal models of NASH. *Hepatol Res* 33(2): 138-144, 2005. PMID: 16198624. DOI: 10.1016/j.hepres.2005.09.022.
- 36- Mahmoud AM, EL-Derby AM, Elsayed KNM and Abdella EM: Brown seaweeds ameliorate renal alterations in mice treated with the carcinogen azoxymethane. *Int J Pharm Pharm Sci* 6(11): 365-369, 2014. DOI: 10.3109/13880209.2016.1160938.

ANEXO E – DECLARAÇÃO DE RECEBIMENTO DO ARTIGO PELA REVISTA PARA PUBLICAÇÃO

Dear Dr. **André Luís Nunes Avelino**:

Thank you very much for the submission of your manuscript entitled:

"Antioxidant and antigenotoxic action of gum arabic on the intestinal mucosa, liver and bone marrow in colorectal carcinogenesis"

Please note the following details concerning the processing of this submission:

1. Your manuscript has been given a number - no. **11945-A** - which should be mentioned in all subsequent correspondence to our office.
2. Please note that all Authors should sign a submission letter confirming that they approve the contents of their article. A doc file containing all Authors' signatures will suffice since there is no specific form. The file should be sent through e-mail to editor@iiar-anticancer.org either after the initial submission of the manuscript or upon acceptance of the paper.
3. Your manuscript will be processed in absolute confidence and as rapidly as possible.
4. Manuscripts are forwarded to editorial reviewers, on the understanding that they should examine them in strict confidence within 10-20 days of receipt.
5. The journal's scientific secretariat and technical personnel work exclusively and confidentially for ANTICANCER RESEARCH, IN VIVO and CANCER GENOMICS & PROTEOMICS at the International Institute of Anticancer Research. No manuscript is sent to any other country or company during any stage of processing, following editorial reviewing.
6. To attain the highest possible quality of presentation, each manuscript is peer-reviewed by two referees (usually from USA, Europe, Japan), and provided that it is accepted, it is read and, if necessary, corrected in detail by our Philological Department in terms of style, language, references, etc
7. The Managing Editor is available to reply immediately to any inquiries concerning a manuscript (e-mail: editor@iiar-anticancer.org; or tel-fax: 0030 2295 053389).
8. The Managing Editor or the reviewers may reject or give low priority for acceptance to manuscripts that do not fulfill the instructions to authors and the basic scientific prerequisites or standards of the journal.
9. The Managing Editor may return a manuscript to the Author(s) for revision in line with the reviewer's comments.
10. The proofs of a manuscript are prepared electronically and sent to the corresponding Author by e-mail. Accepted manuscripts are scheduled to be published in the next available issue, provided that the Authors return their carefully corrected proofs to our office in time.

I am grateful for your support to this journal and am always open to your comments and

advice, which are invaluable in our continuing efforts to improve the service to our authors.

With best regards,

Managing Editor, Anticancer Research.