

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Efeito da suplementação da dieta com feijão-frade (*Vigna unguiculata*) num modelo animal de cancro colorretal

Dissertação de Mestrado de Bioquímica

Bruno Alexandre Lopes Mendes

Orientadora:

Prof.^a Dra. Paula Alexandra Martins de Oliveira

Coorientadores:

Prof.^a Dra. Adelina Maria Gaspar Gama Quaresma

Prof. Dr. Eduardo Augusto dos Santos Rosa



Vila Real, 2020

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Efeito da suplementação da dieta com feijão-frade (*Vigna unguiculata*) num modelo animal de cancro colorretal

Dissertação de Mestrado de Bioquímica

Bruno Alexandre Lopes Mendes

Orientadora

Professora Doutora Paula Alexandra Martins de Oliveira

Departamento de Ciências Veterinárias, UTAD

Coorientadora

Professora Doutora Adelina Maria Gaspar Gama Quaresma

Departamento de Ciências Veterinárias, UTAD

Coorientador

Professor Doutor Eduardo Augusto dos Santos Rosa

Departamento de Agronomia, UTAD

Composição do Júri:

Vila Real, 2020

Declaro que esta dissertação de mestrado é resultado do meu trabalho pessoal, da minha pesquisa e das instruções dos meus orientadores. O seu conteúdo é original e todas as fontes consultadas estão devidamente mencionadas no texto e na bibliografia. Declaro ainda que este trabalho não foi apresentado em nenhuma outra instituição para obtenção de qualquer grau acadêmico.

Agradecimentos

Com o término deste trabalho, gostaria de dar a conhecer e agradecer a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram, direta ou indiretamente, na realização desta dissertação.

À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro e ao Magnífico Reitor, Professor Doutor António Fontainhas Fernandes pelas condições concedidas na realização deste trabalho, pelo conhecimento, pela experiência adquirida e por todos os valores transmitidos.

À Professora Doutora Paula Oliveira, por ter aceite ser minha orientadora, pelo tempo disponibilizado, pela ajuda, orientação, boa disposição e, principalmente, pela amizade que guardarei para sempre.

À Professora Adelina Gama, minha coorientadora, por todo o trabalho realizado vital para esta dissertação, pela simpatia, confiança, ajuda, paciência e conhecimentos transmitidos da sua área.

À Professora Doutora Isabel O'Neill de Mascarenhas Gaivão, pela confiança depositada no uso dos microscópios e do seu laboratório, acompanhamento e pela orientação na sua área.

Ao Professor Doutor Eduardo Augusto dos Santos Rosa, pela oportunidade de participar neste projeto e nesta equipa.

À Professora Doutora Fernanda Aurora Gomes de Seixas Travassos, pela ajuda na componente prática-laboratorial, pela confiança, oportunidade de aprendizagem com a sua equipa e conhecimentos transmitidos.

Ao CECAV-UTAD, pela disponibilidade de acesso ao equipamento de aquisição de imagem Nikon NIS-Elements D.

À técnica do Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da UTAD, D. Lígia Lourenço pela disponibilidade e apoio prestado na componente prática-laboratorial.

À Professora Doutora Tânia Martins, pela ajuda, boa disposição, amizade e companheirismo durante a minha passagem pelo biotério.

À Professora Doutora Ana Faustino, pela disponibilidade, dedicação e ajuda na realização deste trabalho.

Aos meus Pais, Alexandre Mendes e Sandra Lopes, pela paciência, dedicação, ajuda, preocupação e, sobretudo, pela confiança nesta longa jornada na minha vida.

Ao meu irmão Tiago, simplesmente pela importância que tem na minha vida.

À Clara, pois sem ela não teria conseguido chegar tão longe, pelo menos tão cedo. Agradeço-lhe também pelo apoio que me dá, por todas as alegrias que me fez passar, pela amizade e por me aturar todos os dias.

À Beatriz Fonseca e Verónica Mestre, agradeço pela companhia no laboratório, pela amizade, por toda a ajuda no aprendizado de novas técnicas e partilha de conhecimentos essencial para a realização deste trabalho.

À Elisabete Gonçalves e Rita Reis, agradeço a amizade e partilha de conhecimentos nesta área de investigação que partilhamos no último ano

Ao Senhor Manuel, agradeço por todas as conversas e partilha da sua contagiante boa disposição.

Publicações relacionadas com o trabalho experimental

- **Publicação na forma de poster**

Mendes, Bruno; Reis, Rita; Ferreira, Rita; Gama, Adelina; Faustino-Rocha, Ana; Rosa, Eduardo; Oliveira, Paula (2019). Animal welfare in a mouse model aiming to study the effects of black-eye-bean (*Vigna unguiculata*) on colorectal carcinogenesis. XV Congreso Nacional de la SECAL, de 6 a 8 de novembro, Sevilla, Espanha.

Mendes, Bruno; Reis, Rita; Ferreira, Rita; Gama, Adelina; Faustino-Rocha, Ana; Rosa, Eduardo; Oliveira, Paula (2019). Inflammatory serum markers and histological characterization of colorectal lesions in a mice model. 17th European Congress of Toxicologic Pathology, de 17 a 20 de setembro, Maternushaus, Cologne, Alemanha.

Mendes, Bruno; Rosa, Eduardo; Gama, Adelina; Oliveira, Paula (2019) Histological characterization of colorectal lesions induced by azoxymethane and dextran-sodium sulfate in female FVBn mice, XXIV Encontro da Sociedade Portuguesa de Patologia Animal, de 15 a 16 de junho, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.

Mendes, Bruno; Gama, Adelina; Moutinho, Magda; Oliveira, Paula; Seixas, Fernanda (2019). Immunohistochemistry technique in cancer investigation: the animal model of prostate cancer. XII Jornadas de Bioquímica incluída na semana da Ciência e cidadania, de 25 de fevereiro a 1 de março, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.

Oliveira, Rui; Reis, Rita; Moutinho, Magda; Mendes, Bruno; Ferreira, Rita; Oliveira, Paula; Rosa, Eduardo (2018) A mouse model of colorectal cancer linked to serum biomarkers of inflammation, 3rd International Workshop of HPV-related tumors 3rd International Workshop of Biobank Tumors and DNA, de 22 a 24 de novembro, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil.

- **Publicação na forma de apresentação oral**

Oliveira, Paula; Mendes, Bruno; Reis, Rita; Ferreira, Tiago; Venâncio, Carlos; Félix, L.; Pires, Maria; Gama, Adelina; Gaivão, Isabel; Rosa, Eduardo (2019). Effects of black-eye-bean (*Vigna unguiculata*) diet supplementation in healthy, SPF Meeting 2019, de 6 a 8 de fevereiro, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, Portugal.

- **Prémios**

2018 - Menção honrosa para o prémio de melhor Poster, 3rd International Workshop of HPV-related tumors 3rd International Workshop of Biobank Tumors and DNA, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil.

2019 - Menção honrosa para o prémio de melhor Poster, XII Jornadas de Bioquímica, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

Página propositadamente deixada em branco

Resumo

O cancro colorretal (CCR) é uma doença comum. A maioria dos casos diagnosticados são espontâneos e difíceis de prevenir com base na alteração de fatores ambientais e de hábitos alimentares. Comprovada a associação entre a melhoria no estado de saúde individual e redução significativa nas taxas de mortalidade associadas ao cancro pela adesão a certos tipos de dieta, a população saudável e os doentes oncológicos são encorajados a aderir a um padrão dietético semelhante à dieta mediterrânica.

Nesta dissertação, pretende-se avaliar os efeitos da suplementação de feijão-frade, leguminosa incluída na dieta mediterrânica, na dieta de um modelo experimental de CCR induzido através da administração sequencial de azoximetano (AOM) e dextran-sulfato de sódio (DSS).

Para alcançar estes objetivos utilizaram-se quarenta e oito (n=48) murganhos fêmeas da estirpe FVB/n (*Mus musculus*), com idade compreendida entre os 5-6 meses, divididos aleatoriamente em quatro grupos: grupo controlo (n=9), grupo induzido (n=13), grupo induzido/20% (m/m) farinha de feijão frade (FFF) (n=12) e grupo induzido/50% (m/m) FFF (n=14). O AOM foi administrado uma única vez por via intraperitoneal (7,5 mg/kg). Uma semana depois, os animais foram expostos na água de bebida a 1,5% de DSS durante 7 dias seguidos em três ciclos, com intervalos de 7 dias entre ciclos. Os animais tiveram acesso *ad libitum* às respetivas dietas durante 13 semanas e foram observados diariamente para registar o seu estado geral. Durante o ensaio experimental foram registadas semanalmente a temperatura corporal, a massa corporal, o consumo de alimento e água dos animais. Após 13 semanas todos os animais foram eutanasiados através da administração de uma *overdose* da associação de xilazina com ketamina e realizada a sua necrópsia completa. Os órgãos dos animais foram recolhidos, registadas as suas massas e fixados em formaldeído para posterior análise histopatológica, avaliação imunohistoquímica do marcador de proliferação celular Ki-67; foi também recolhido sangue por punção cardíaca para a realização do ensaio do cometa.

Durante o ensaio experimental nenhum dos animais manifestou sinais clínicos de doença. Um murganho do grupo controlo morreu durante o ensaio devido a fatores externos, sendo excluído da experiência. Observámos um maior consumo de água e comida no grupo induzido e alimentado com 20% de FFF. O grupo induzido e alimentado com 50% FFF apresentou o maior aumento de massa corporal ao longo do ensaio. A média da massa relativa do colon do grupo induzido e alimentado com 20% FFF foi superior aos restantes grupos e estatisticamente

significativa ($p < 0,05$). Os parâmetros recolhidos durante o ensaio relativamente ao bem-estar geral dos animais revelaram não existir diferenças estatisticamente significativas entre grupos. Relativamente à análise histopatológica, 50% ($n=6$) dos animais do grupo induzido + 20% FFF desenvolveram displasia do epitélio intestinal, 16,67% ($n=2$) apresentaram adenocarcinomas no reto, sendo o grupo a apresentar mais lesões quando comparado aos restantes. Nos três grupos induzidos com AOM/DSS foi observada inflamação leve a moderada. Relativamente à expressão do marcador de proliferação celular Ki-67, verificou-se uma maior marcação no grupo induzido + 20%FFF. O ensaio do cometa não revelou diferenças estatisticamente significativas entre grupos.

Em conclusão, tendo em conta os resultados obtidos, o feijão frade não revela efeitos negativos ou positivos aos animais induzidos quimicamente com AOM/DSS. Novos testes devem ser realizados usando diferentes doses do composto carcinogénico, tempo de exposição ao agente inflamatório, momento do sacrifício e/ou concentração do feijão-frade usado.

Palavras-chave: Cancro colorretal, murganho, AOM, DSS, histologia, genotoxicidade.

Abstract

Colorectal cancer (CCR) is a worldwide common disease. Most cases are spontaneous and difficult to prevent based on environmental factors and dietary habits. The demonstration of the association between individual health status improvement and cancer mortality rates reduction with adherence to certain diets, such as the Mediterranean diet, the population is encouraged to follow a dietary pattern similar to Mediterranean diet, but not all foods have equal activities.

With this research, we intended to evaluate the effects of black-eye-beans supplementation in an induced CCR mouse model by azoxymethane (AOM) followed by dextran-sodium sulfate (DSS) on physiological parameters, histological parameters and genotoxicity.

Forty-eight (n=48) female FVB/n mice (*Mus musculus*) with 5-6 months-old were randomly divided into four groups: control group (n=9), induced group (n=13), induced group + diet containing 20% (m/m) of black-eye-bean flour (BEBF) (n=12) and induced group + diet containing 50% (m/m) of BEBF (n=14). A single intraperitoneal AOM injection was administered (7.5 mg/kg). One week later, animals were exposed to 1.5% of DSS in drinking water for 7 days in three cycles with 7-days interval. All animals had *ad libitum* access to their diets for 13 weeks. Animals were daily observed to check their general health status. Animals' body temperature, weight, food and water consumption were also recorded. At the end of the 13 weeks period all animals were humanely sacrificed with an overdose (xylazine + ketamine association) and a complete necropsy was performed. The organs were collected and fixed in formaldehyde to perform histopathological analysis. The genotoxicity of black-eye-beans was determined by the comet assay.

None of these animals showed any clinical signs of disease during the experimental period; however, one mouse from control group died during the experiment due to external factors and was excluded from the experience. Water and food consumption registered a slightly higher consumption by the induced group + 20% BEBF when compared to the other groups. The induced group + 50% BEBF showed a higher body mass at the end. The relative colon mass was higher in induced group + 20% BEBF compared to the other groups ($p < 0,05$). The parameters collected during the test for the general welfare of the animals revealed no statistically significant differences between groups. Regarding histopathological analysis, 50% (n=6) of the animals of the induced group + 20% BEBF developed dysplasia and 16.67% (n=2)

had rectal adenocarcinoma, being the group presenting more lesions when compared to the other groups. Mild to moderate inflammation was observed in the three groups induced with AOM/DSS. Regarding the expression of the Ki-67 marker, a higher proliferation rate was observed in the induced group + 20% BEBF. The comet assay did not reveal statistically significant differences between groups.

In conclusion, considering the results obtained, the black-eye-beans supplementation did not reveal a negative or positive effect to the animals with induced colorectal cancer. Further tests should be performed using different doses of the carcinogenic compound, exposure time to the inflammatory agent, time of sacrifice and/or black-eye-bean concentration.

Keywords: Colorectal cancer, mouse, AOM, DSS, histology, genotoxicity.

Índice	
Agradecimentos	VII
Publicações relacionadas com o trabalho experimental	IX
Resumo	XI
Abstract	XIII
Índice	XV
Índice de Figuras	XIX
Índice de Tabelas	XXI
Abreviaturas e Siglas	XXIII
1. Introdução	1
1.1. Cancro colorretal	1
1.1.1. Epidemiologia	1
1.1.2. Etiologia	3
1.1.3. Carcinogénese	3
1.1.4. Tratamento	4
1.2. Modelos animais para o estudo de doenças humanas.....	5
1.2.1. Modelos para o estudo do cancro colorretal no Homem.....	6
1.2.2. Anatomia do intestino grosso: Homem e murganho	7
1.2.3. Modelos CCR em roedores	7
1.2.4. Indução química	8
1.2.5. Azoximetano (AOM)	9
1.3. Genotoxicidade.....	9
1.4. Eletroforese em gel de célula única.....	10
1.4.1. Aplicabilidade	11
1.4.2. Danos no ADN	12
1.5. Imunohistoquímica	13
1.5.1. Ki-67.....	15

1.6.	Feijão-frade.....	17
2.	Objetivos.....	19
3.	Materiais e métodos.....	21
3.1.	Características dos animais.....	21
3.2.	Condições experimentais.....	21
3.3.	Marcação dos animais.....	22
3.4.	Protocolo experimental.....	22
3.5.	Introdução do feijão-frade na dieta dos murganhos.....	23
3.6.	Avaliação dos <i>endpoints</i>	24
3.7.	Sacrifício dos animais e recolha de amostras.....	26
3.8.	Avaliação histopatológica.....	26
3.9.	Avaliação imunohistoquímica.....	27
3.10.	Ensaio cometa.....	29
3.10.1.	Análise microscópica.....	31
3.11.	Análise estatística.....	32
4.	Resultados.....	33
4.1.	Parâmetros fisiológicos.....	33
4.1.1.	Consumo médio de comida e água.....	33
4.1.2.	Média da massa corporal.....	35
4.1.3.	Média da massa relativa dos órgãos.....	36
4.2.	Avaliação dos <i>endpoints</i>	38
4.3.	Análise histopatológica.....	43
4.4.	Imunohistoquímica.....	48
4.4.1.	Ki-67.....	48
4.5.	Parâmetros de genotoxicidade.....	50
4.5.1.	Ensaio cometa em sangue.....	50
5.	Discussão.....	53

6. Conclusões	59
7. Referências bibliográficas.....	61

Página propositadamente deixada em branco

Índice de Figuras

Figura 1 - Estimativas da incidência e mortalidade em Portugal (GLOBOCAN, 2018).....	2
Figura 2 - Trato intestinal do murganho (Treuting e Dintzis 2012).....	7
Figura 3 - Representação esquemática do método imunohistoquímico direto e indireto (adaptado de Ramos-Vara e Miller, 2014).	14
Figura 4 - Concentração gradual de Ki-67 ao longo do ciclo celular (Sales Gil e Vagnarelli 2018).....	15
Figura 5 - Utilização do marcador de proliferação Ki-67 como ferramenta de diagnóstico e prognóstico (adaptado de Li <i>et al.</i> , 2015).....	16
Figura 6 - Esquemática do protocolo realizado.	23
Figura 7 - Processo de preparação da dieta (Ração Standard + feijão frade) A- Vorwerk Thermomix; B-ROTEXMASTER YHKJ250	24
Figura 8 - Ilustração do programa QuPath utilizado para a análise da imunomarcação do Ki-67 (Vermelho- núcleo com marcação positiva, Verde- núcleo com marcação negativa).....	28
Figura 9 - Escala para a quantificação de cometas (Collins <i>et al.</i> , 2004).	31
Figura 10 - Consumo médio de comida por grupo ao longo do protocolo experimental.	33
Figura 11 - Consumo médio de água por grupo ao longo do protocolo experimental.....	34
Figura 12 - Evolução da média da massa corporal dos animais ao longo do ensaio experimental.	35
Figura 13 - Representação da média da massa relativa dos pulmões e baço.	36
Figura 14 - Representação da média da massa relativa do fígado e timo.	36
Figura 15 - Representação da média da massa relativa do rim esquerdo e direito.	37
Figura 16 - Representação da média da massa relativa das adrenais esquerda e direita.....	37
Figura 17 - Representação da média da massa relativa do cólon.....	37
Figura 18 - Temperatura corporal média apresentada por grupo ao longo do protocolo experimental.	38
Figura 19 - Aspeto macroscópico do cólon de murganho do grupo controlo (A) e induzido (B), sem presença de alterações visíveis.	43
Figura 20 - Cólon de murganho sem alterações, grupo controlo (HE, 200x).	44
Figura 21 - Cólon de murganho com presença de infiltrado inflamatório leve na mucosa, grupo induzido. (HE, 200x).	44

Figura 22 - Cólon de murganho com presença de infiltrado inflamatório moderado, associado a displasia, grupo induzido (HE, 200x).....	45
Figura 23 - Colon de murganho: adenocarcinoma. Proliferação carcinomatosa de células epiteliais associadas a atipia citonuclear e presença de mitoses; grupo induzido + 50% FFF (HE, 200x).....	45
Figura 24 - Reto de murganho: adenocarcinoma. Proliferação carcinomatosa de células epiteliais associadas a atipia citonuclear, presença de mitoses e microinvasão do estroma adjacente, que apresenta inflamação e desmoplasia; grupo induzido (HE, 200x).	46
Figura 25 - Cólon de murganho: imunomarcção negativa para o Ki-67, grupo controlo (Hematoxilina de Gill,400x).	49
Figura 26 - Cólon de murganho: imunomarcção positiva para o Ki-67, grupo Induzido + 20%FFF (Hematoxilina de Gill, 400x).	49
Figura 27 - Representação da média de dano basal e dano oxidativo por grupo em unidades arbitrárias (UA).	50

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Estimativa da incidência e mortalidade para os cancros mais comuns a nível mundial (GLOBOCAN, 2018).	1
Tabela 2 - Agentes carcinogénicos usados na indução de CCR em roedores (adaptado de Rosenberg <i>et al.</i> , 2009).	8
Tabela 3 - Composição e valor energético de feijão-frade (adaptado de Frota <i>et al.</i> , 2008). .	17
Tabela 4 - Marcação e número correspondente de cada animal.....	22
Tabela 5 - Endpoints usados na avaliação do bem-estar dos murganhos (adaptada de Oliveira <i>et al.</i> , 2017).....	24
Tabela 6 - Preparação da solução tampão citrato.	27
Tabela 7 - Preparação da solução de lise celular.....	30
Tabela 8 - Preparação da solução Buffer F.	30
Tabela 9 - Número e percentagem de animais com alterações no parâmetro "Olhos, Orelhas e Vibrissas".	40
Tabela 10 - Número e percentagem de animais com alterações no parâmetro "Postura".	41
Tabela 11 - Número e percentagem de animais com alterações no parâmetro "Estado mental".	42
Tabela 12 - Lesões histopatológicas identificadas no intestino dos animais nos diferentes grupos experimentais.....	43
Tabela 13 - Avaliação do grau de inflamação do intestino nos diferentes grupos (média dos scores observados em cada grupo).	47
Tabela 14 - Média percentual de células marcadas com Ki-67 por murganho nos 4 grupos experimentais.	48

Página propositadamente deixada em branco

Abreviaturas e Siglas

ADN - Ácido desoxirribonucleico

AOM - Azoximetano

APC – do latim *Adenomatous Polyposis Coli*

CCR - Cancro colorretal

DAPI - 4',6'-Diamino-2-fenil-indol

DMH - 1,2-dimetil-hidrazina

DSS - Dextrano sulfato de sódio

FFF - Farinha de feijão frade

FPG – Formamidopirimidina ADN glicosilase

GCO - do inglês *Global Cancer Observatory*

IHQ - Imunohistoquímica

IP - Intraperitoneal

LSAB – do inglês *Labeled streptavidin-biotin*

PAF - Polipose Adenomatosa Familiar

PFB - Ponto de fusão baixo

PFN - Ponto de fusão normal

ROS - Espécies reativas de oxigénio (do inglês *reactive oxygen species*)

UA – Unidades Arbitrárias

UTAD - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

WHO - do inglês *World Health Organization*

Página propositadamente deixada em branco

1. Introdução

1.1. Cancro colorretal

1.1.1. Epidemiologia

Nas últimas décadas, a incidência do cancro tem aumentado por todo o mundo (Boyle *et al.*, 2008). O cancro colorretal (CCR) é a neoplasia maligna mais comum do trato gastrointestinal e, devido ao aumento da sua incidência e mortalidade associada, os custos envolvidos no seu diagnóstico e tratamento tornaram esta doença um problema de saúde pública grave (Teliarova-Foucher *et al.*, 2012). Mundialmente, o CCR é o terceiro cancro mais comum em homens e o segundo em mulheres, sendo a segunda maior causa de morte por cancro (GLOBOCAN, 2018). Os dados referentes à incidência e à mortalidade associados aos vários tipos de cancro, publicados pela GLOBOCAN, podem ser consultados na Tabela 1 (GLOBOCAN, 2018).

Tabela 1 - Estimativa da incidência e mortalidade para os cancros mais comuns a nível mundial (GLOBOCAN, 2018).

Cancro	Incidência		Mortalidade	
	Número	(%)	Número	(%)
Pulmão	2 093 876	11,6	1 761 007	18,4
Mama	2 088 849	11,6	626 073	6,6
Colorretal	1 849 518	10,2	880 792	9,2
Próstata	1 276 106	7,1	358 989	3,8
Estomago	1 033 701	5,6	782 685	8,2
Fígado	841 080	4,7	781 631	8,2

Na Europa, anualmente, o CCR é diagnosticado em 17 de cada 100 000 habitantes (Maughan *et al.*, 2003). Segundo os últimos dados (Figura 1), recolhidos em 2018 pela WHO (*World Health Organization*) e pela GCO (*Global Cancer Observatory*), o CCR foi o cancro com maior taxa de incidência e segunda maior taxa de mortalidade na população portuguesa.

Em Portugal, no que diz respeito à prevalência do CCR até 5 anos, este apresenta uma taxa de 18,1% sendo o cancro com maior número de casos (GLOBOCAN, 2018).

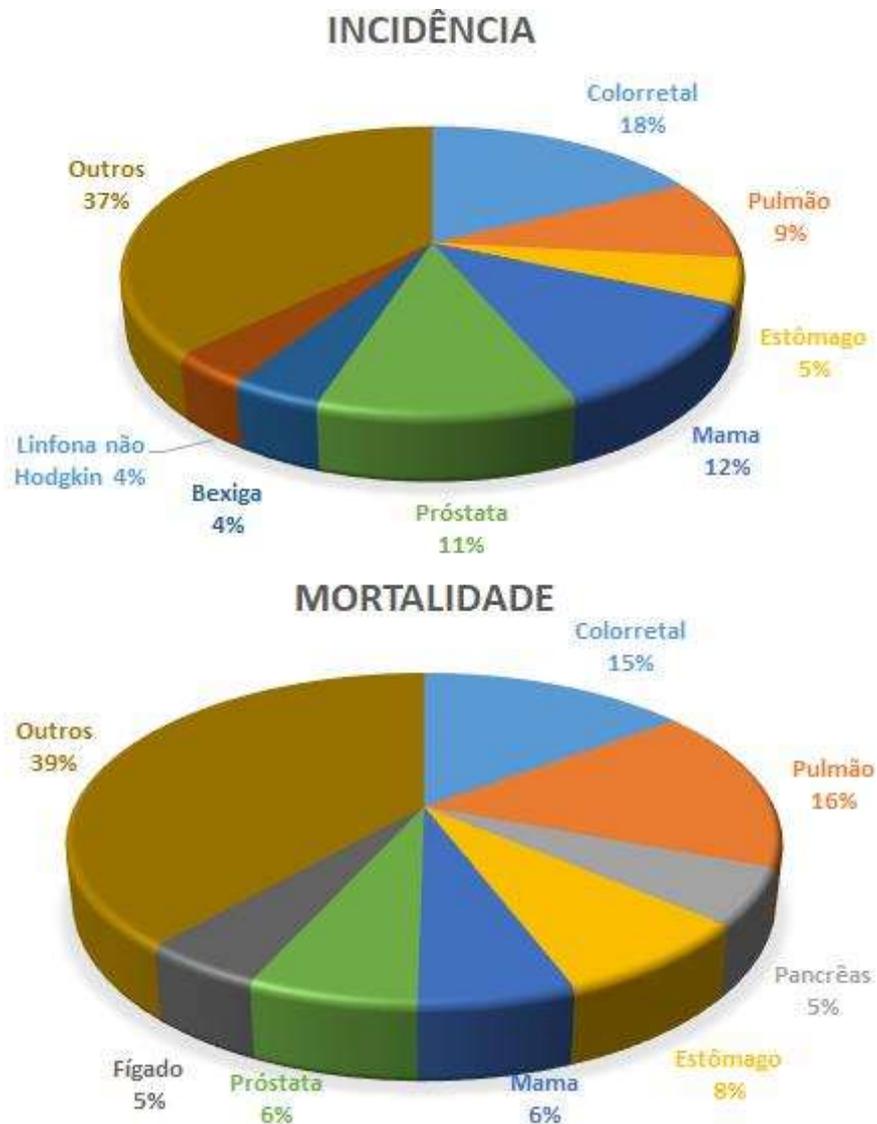


Figura 1 - Estimativas da incidência e mortalidade em Portugal (GLOBOCAN, 2018).

Apesar do aumento da incidência deste tipo de cancro até ao início da década de 90 do século passado, a incidência desta doença tem-se mantido estável nos últimos anos. Este facto resulta das medidas de prevenção e diagnóstico adotadas pelos serviços de saúde, tendo também um importante contributo os estudos epidemiológicos desenvolvidos a propósito desta doença. Os exames para diagnóstico precoce, através da realização de colonoscopias em grupos de risco, permitiram diminuir a mortalidade associada ao CCR (Mayer *et al.*, 2008).

1.1.2. Etiologia

O CCR é uma doença associada ao envelhecimento; a idade média do seu diagnóstico é aos 70 anos, sendo 80% dos casos diagnosticados em idosos e com exposição prévia a agentes considerados carcinogênicos. Os restantes casos têm origem hereditária (20%), nomeadamente a polipose adenomatosa familiar (APC) ou o CCR hereditário não polipóide (Half *et al.*, 2009). Cerca de 95% dos casos hereditários de CCR estão associados à polipose adenomatosa familiar, com incidência crescente em indivíduos mais velhos. No entanto, apenas 10% dos adenomas evoluem para CCR (Pestana e Martins, 2016). Em indivíduos com menos de 50 anos, o CCR espontâneo é pouco comum (Kosmider *et al.*, 2007).

1.1.3. Carcinogénese

A carcinogénese é definida como uma sucessão de etapas onde ocorrem alterações celulares e genéticas nas células normais que conduzem à expressão de um fenótipo alterado (Cole e Kramer, 2016). As células multiplicam-se através da mitose, mas para manter o número de células constante em cada órgão a apoptose é fundamental. Quando ocorre um aumento descontrolado da proliferação e uma diminuição da apoptose, o equilíbrio é alterado e favorece-se o aparecimento de células com alterações fenotípicas, que numa fase inicial constituem do ponto de vista histológico uma lesão pré-neoplásica. A continuidade da multiplicação acelerada das células que constituem esta última lesão, muitas vezes por exposição acrescida a compostos químicos promotores, favorece a ocorrência de lesões neoplásicas (Botelho *et al.*, 2014). As neoplasias podem ser benignas ou malignas. As neoplasias benignas são de crescimento lento, localizadas, sendo mais fácil a sua remoção cirúrgica e com menor probabilidade de recidivar. As neoplasias malignas apresentam um crescimento rápido, com alta probabilidade de metastizar, sendo muitas vezes de difícil remoção cirúrgica (Botelho *et al.*, 2014).

O desenvolvimento do CCR caracteriza-se pela ocorrência de alterações genotípicas e fenotípicas nas células epiteliais do cólon e do reto caracterizando-se inicialmente pela formação de lesões pré-neoplásicas, que evoluem para neoplasias benignas (adenomas) com a sua subsequente evolução para lesões neoplásicas malignas (adenocarcinomas), com possível invasão da parede intestinal (Kobaek-Larsen *et al.*, 2000). Assim, as etapas histológicas

descritas na progressão do CCR são: hiperplasia, displasia, adenoma e adenocarcinoma (Tanaka, 2009); com o aumento da gravidade, o epitélio intestinal pode sofrer uma transformação que leva ao desenvolvimento de um carcinoma invasor, com potencial metastático (Kobaek-Larsen *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2016).

Durante este processo ocorrem mudanças progressivas na atividade das proteínas que regulam a proliferação, a diferenciação e sobrevivência celular (Tanaka, 2009). No CCR ocorre uma sequência de alterações nos genes associados à formação de tumores, como no *K-ras* e no gene *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*) (Fearon e Vogelstein, 1984; Kinzler e Vogelstein, 1996). A maioria dos casos de CCR são esporádicos e podem aparecer em doentes sem antecedentes; geralmente devem-se a mutações somáticas espontâneas ou induzidas (Kinzler e Vogelstein, 1996; Lynch *et al.*, 1996; Polakis, 1997).

O desenvolvimento e evolução do CCR favorece a ocorrência de alterações detetadas através do uso de marcadores tumorais, que têm como finalidade estabelecer um diagnóstico precoce e definir o melhor tratamento. Entre os marcadores usados no estudo e identificação do CCR destacam-se: CA 242, CA 19-9, CA72-4, CEA, citoqueratinas, o gene p53, o anticorpo Ki-67, entre outros (Fernandes e Matos, 2002; Rosati *et al.*, 2004). O uso de determinados marcadores permite indicar a presença, extensão da lesão, ou prever a resposta ao tratamento e recorrência da neoplasia (Hünerbein, 1998; Fernandes e Matos, 2002).

1.1.4. Tratamento

O tratamento de um doente com CCR é decidido por uma equipa multidisciplinar constituída por várias especialidades médicas. Até ao momento, a cirurgia continua a ser o único tratamento com potencial curativo; os tratamentos adjuvantes aumentam a sobrevivência e qualidade de vida destes doentes (Leslie *et al.*, 2002). A quimioterapia e a radioterapia fazem parte das abordagens adjuvantes do tratamento de doentes com CCR (Schwartz *et al.*, 2004; Matos, 2012).

Um estudo desenvolvido pela ForPoint, Europacoln Portugal e o *Research Group on Digestive Cancer* indica que 71% dos doentes portugueses com CCR foram submetidos a quimioterapia. A opção pela quimioterapia deve-se ao facto deste tratamento ser considerado mais eficaz. Em doentes com CCR de estágio I, a quimioterapia não é usada, mas no estágio II, o 5-Fluorouracilo (5-FU) combinado com oxaliplatina (FOLFOX) são geralmente seleccionados

como primeira opção de tratamento. Nos estádios III e IV, a combinação do 5-FU com o ácido fólico é a terapia mais usada, sendo o FOLFOX a segunda opção de tratamento. No entanto, nos doentes em estágio IV são usadas outras combinações nomeadamente a associação do 5-FU com o irinotecan ou a associação do FOLFOX com a capecitabina. O uso de bevacizumab e do cetuximab, combinado com o irinotecan, são outras opções terapêuticas (Pinto *et al.*, 2010).

1.2. Modelos animais para o estudo de doenças humanas

O uso de modelos animais tem sido um dos métodos selecionados para estudar várias doenças humanas, nomeadamente o cancro, a paralisia cerebral, a diabetes, a doença de Alzheimer, a obesidade e as doenças cardiovasculares. Os modelos animais contribuem com informações inestimáveis para melhor compreender os diversos aspetos envolvidos no aparecimento e desenvolvimento da doença, bem como na descoberta e avaliação de novos tratamentos farmacológicos e não farmacológicos, como são disso exemplos o efeito da prática regular de exercício físico, o consumo de uma alimentação equilibrada, e estratégias preventivas (Vandamme, 2014; Nascimento-Gonçalves *et al.*, 2018).

Estão disponíveis vários modelos animais para o estudo das doenças humanas: modelos espontâneos, induzidos quimicamente, implantados com células cancerígenas de origem animal (modelo singeneico) ou com células de origem humana (xenógrafo), e modelos animais geneticamente modificados (Fagundes *et al.*, 2004; Steele *et al.*, 2010; Nascimento-Gonçalves *et al.*, 2018).

O modelo espontâneo caracteriza-se pelo uso de um animal que desenvolve espontaneamente uma doença, ou seja, faz parte das características do animal o aparecimento da doença sem recurso ao uso de compostos químicos ou técnicas cirúrgicas. O modelo espontâneo mimetiza o observado e descrito no Homem. Contudo, as principais desvantagens deste modelo são a baixa incidência de tumores, e o tempo necessário para observar resultados com significância estatística, encarecendo os custos do protocolo experimental (Johnson *et al.*, 2013).

Nos modelos xenógrafos são colocadas células cancerígenas humanas num animal de laboratório imunodeprimido; no caso dos modelos singeneicos é feito um transplante de linhas celulares cancerígenas entre animais da mesma espécie, sendo o animal recetor imunocompetente. O transplante pode ser feito de duas formas: ectópico ou ortotópico, isto é,

as células são colocadas sob a pele ou no órgão de origem das células, respetivamente (Cekanova *et al.*, 2014; Chandra *et al.*, 2020).

Nos modelos com indução química os animais são expostos a compostos carcinogénicos químicos através de várias vias de administração. Trata-se de um processo demorado e que requer cuidados especiais na manipulação das substâncias químicas e dos animais. Num modelo animal de indução química identificam-se as três etapas descritas durante a carcinogénese: iniciação, promoção e progressão. Cada uma destas etapas caracteriza-se por transformações morfológicas e bioquímicas, e resulta de alterações genéticas incluindo mutações nos genes que controlam a proliferação celular, a morte celular e a reparação do ácido desoxirribonucleico (ADN) (Oliveira *et al.*, 2007).

As lesões carcinomatosas identificadas em animais geneticamente modificados assemelham-se às lesões descritas no Homem. Estes animais dividem-se em dois grupos: animais *knockout* e transgénicos. Os animais (murganhos ou ratos) transgénicos obtêm-se através da injeção de ADN de outra espécie num óvulo fertilizado, enquanto o modelo *knockout* caracteriza-se pela omissão dos alelos de um gene específico. Ambos os modelos têm a vantagem de não provocar a exposição dos investigadores a compostos cancerígenos e a desvantagem de ser mais dispendiosa a sua aquisição (Navale, 2013).

1.2.1. Modelos para o estudo do cancro colorretal no Homem

A capacidade de induzir de forma fiável os tumores do cólon e do reto em animais de laboratório proporcionou aos investigadores a oportunidade de estudarem as várias etapas da carcinogénese desta doença. Estes modelos fornecem informações sobre a iniciação, a promoção e a progressão dos tumores, incluindo informações detalhadas sobre a transformação celular e os eventos subsequentes que levam à progressão de lesões pré-neoplásicas a lesões neoplásicas. Os modelos animais de CCR também são usados para avaliar a imunoterapia, quimioterapia e novos tratamentos cirúrgicos (Tanaka, 2009).

Os animais usados como modelo para o estudo de CCR podem ser não roedores ou roedores. Como exemplo de não roedores temos o cão e o gato, que desenvolvem adenomas pedunculados no cólon e no reto distal de modo espontâneo. Em ambas as espécies se observam semelhanças histológicas e evolutivas com o CCR diagnosticado no Homem (Church *et al.*, 1987; Johnson *et al.*, 2013; Cekanova *et al.*, 2014). A principal desvantagem destes modelos

espontâneos é a baixa prevalência do CCR (menos de 1%) (Schaffer *et al.*, 1968; Church *et al.*, 1987; Cribb *et al.*, 1988). Nos gatos, mais de 70% dos tumores do intestino ocorre no intestino delgado (Cribb *et al.*, 1988).

A ovelha é também usada como modelo para o estudo desta doença dada a incidência significativa de CCR espontâneo. Na Nova Zelândia, foram encontradas neoplasias intestinais em 1,6% dos ovinos adultos (Simpson *et al.*, 1972; Munday *et al.*, 2006). No entanto, praticamente todos os tumores intestinais nas ovelhas são identificados no intestino delgado (Johnson *et al.*, 2013).

1.2.2. Anatomia do intestino grosso: Homem e murganho

O intestino do murganho (Figura 2) é similar ao intestino humano no que diz respeito ao desenvolvimento, à estrutura e às suas funções (Kwong e Dove, 2009). O intestino grosso começa no ceco, passa pelo cólon e reto até ao ânus, e é o responsável pela absorção de água das fezes (Treuting *et al.*, 2018). O ceco é um saco curvo que tem como principal função a fermentação bacteriana; esvazia todo o seu conteúdo para o cólon proximal (Rubesin, 2011). O colon tem a mesma estrutura histológica do restante trato gastrointestinal: mucosa, submucosa, túnica muscular circular interna, túnica muscular externa longitudinal e serosa. O reto é relativamente curto e muito semelhante ao cólon distal (Treuting *et al.*, 2018).

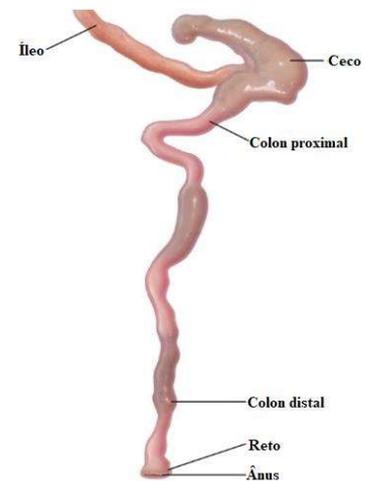


Figura 2 - Trato intestinal do murganho (Treuting e Dintzis 2012)

1.2.3. Modelos CCR em roedores

O uso dos roedores como modelos para o estudo do CCR está amplamente aceite devido às semelhanças identificadas com o CCR no Homem. Uma rápida indução de tumores e uma elevada taxa de reprodutibilidade são duas das vantagens destes modelos (Machado *et al.*, 2016). Com recurso aos roedores é possível induzir CCR usando compostos químicos (Reddy

et al., 1998; Reddy *et al.*, 2000; Rosenberg *et al.*, 2009), recorrer ao implante de células cancerígenas ou ainda usar modelos geneticamente modificados (Boivin *et al.*, 2003; Taketo *et al.*, 2009).

1.2.4. Indução química

Existem dois tipos de agentes químicos cancerígenos: agentes diretos e indiretos. Os primeiros não necessitam de ser metabolizados pelo organismo para induzirem o desenvolvimento do cancro, enquanto os segundos são administrados na sua forma inativa e apenas adquirem atividade carcinogénica quando biotransformados e convertidos pelo fígado na sua forma ativa (Tanaka, 2009; Machado *et al.*, 2016).

Os modelos quimicamente induzidos de CCR são modelos animais usados há muito tempo e caracterizam-se pela exposição a agentes carcinogénicos químicos, como a 1,2-dimetilhidrazina (DMH) ou o azoximetano (AOM), entre outros (Tabela 2). Estes compostos químicos são considerados ideais para o estudo do CCR em animais de laboratório (Rajamanickam *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2013). Na indução química podem ser usadas várias estirpes de animais, cuja seleção varia com o objetivo de cada trabalho (Bobe *et al.*, 2008; Švec *et al.*, 2010) (Tabela 2).

Tabela 2 - Agentes carcinogénicos usados na indução de CCR em roedores (adaptado de Rosenberg *et al.*, 2009).

Agente carcinogénico	Via de administração	Espécie (estirpe)
Metilnitrosoguanidina	Aplicação retal	Rato Donryu Fêmea
Acetato de Metilazoximetanol	Aplicação retal	Rato Donryu Macho
Acetato de Metilazoximetanol	Intraperitoneal	Rato (Sprague-Dawley) Macho
N-Butyl-N-nitrosourea (BNU)	Intraperitoneal	Murganho C57BL/6 Macho
N-metil-N-nitrosourea (MNU)	Aplicação retal	Rato F344/Machos
Acetato de O-dimetilnitrosamina	Intraperitoneal	Rato (Sprague-Dawley) Macho
2-Amino-1-metil-6-fenilimidazo (4,5-b) piridina	Dieta	Rato F344

1.2.5. Azoximetano (AOM)

O AOM é um metabolito proveniente da DMH, mais frequentemente utilizado que a DMH na indução de tumores no cólon, dado que algumas das suas vantagens sobre o composto original são o aumento da potência e maior estabilidade química (Papanikolaou *et al.*, 1998). O AOM é considerado um agente carcinogénico indireto, porque é ativado no fígado, por N-oxidação através do citocromo P450 2E1, e após a sua metabolização, os produtos seguem por via sanguínea até ao local de ação, isto é, o intestino grosso (Tanaka, 2009; Machado *et al.*, 2016). Os metabolitos produzidos como o metilazoximetanol e metil-diazóxido, indutores da inflamação (Sohn *et al.*, 1987), tornam-se em compostos ativos essenciais para a indução de CCR. Estes vão atuar de diferentes formas, levando a mutações pontuais, separação de cromátides irmãos, bem como à indução da apoptose no cólon, que, como consequência, vai estimular a proliferação celular e o aparecimento de lesões proliferativas (Newell e Heddle, 2004). O mecanismo de indução das lesões pré-neoplásicas pelo AOM deve-se ao aumento da expressão do gene *c-fos*, à diminuição da expressão do gene *c-myc* e à mutação do gene *K-ras*, alterações estas comuns às alterações diagnosticadas na carcinogénese espontânea do CCR no Homem (Stopera *et al.*, 1992; Caderni *et al.*, 2006).

Ao modelo animal de indução com o AOM associa-se a administração por via oral do dextran sulfato de sódio (DSS). Este composto é um agente químico com propriedades inflamatórias utilizado na indução de colites (Tanaka, 2009; Fazio *et al.*, 2011). O mecanismo pelo qual o DSS induz a inflamação intestinal não é claro, mas suspeita-se que seja devido a danos nas células epiteliais que revestem o intestino grosso, permitindo a disseminação de conteúdo intestinal pró-inflamatório, como bactérias e outros microrganismos, aos tecidos subjacentes (Chassaing *et al.*, 2014).

O desenvolvimento deste modelo de CCR após inflamação induzida por DSS confirma a hipótese de que a inflamação crónica desempenha um papel crítico no desenvolvimento da neoplasia maligna epitelial no intestino grosso (Seril *et al.*, 2003; Tanaka, 2009).

1.3. Genotoxicidade

A genotoxicidade estuda as alterações físicas e químicas ocorridas no material genético após a exposição a agentes genotóxicos, podendo estes ser químicos, físicos e/ou biológicos

(Doak *et al.*, 2017). Uma das técnicas mais utilizadas para detetar a genotoxicidade é o ensaio cometa, porque permite a deteção de lesões pré-mutagénicas (Kammann *et al.*, 2001).

1.4. Eletroforese em gel de célula única

Na década de 1970, introduziu-se o princípio do que hoje é denominado por eletroforese em gel de célula única. Peter Cook e a sua equipa desenvolveram a técnica para investigar a estrutura nuclear com base na lise das células com detergente não iónico e cloreto de sódio. Este procedimento remove conteúdos celulares como as membranas celulares, citoplasma e nucleoplasma, e solubiliza os núcleos, dado o elevado teor de sal, restando o nucleóide, com o ADN, que se encontra enrolado ao redor das histonas do nucleossoma. Para desenrolar o ADN é adicionado brometo de etídio (Cook *et al.*, 1976).

A primeira demonstração daquilo a que chamamos “cometas”, foi feita por Östling e Johanson, descrevendo como caudas o ADN danificado desenrolado, referindo-se assim ao modelo de Peter Cook e restante equipa. A cauda do cometa é descrita como um halo de *loops* de ADN desenrolado, arrastado pelo campo eletroforético, sendo utilizado um pH inferior a 10 na realização da eletroforese (Östling *et al.*, 1984).

A eletroforese em gel de célula única, também conhecida como ensaio de cometa, é uma metodologia utilizada para determinar a genotoxicidade de um composto devido à sua sensibilidade, simplicidade e baixo custo. Permite analisar e quantificar possíveis danos na cadeia do ADN, bem como investigar os seus processos de reparação (Speit e Hartmann, 1999; Olive e Banáth, 2006). Este método pode ser realizado em pH neutro e pH alcalino. O pH alcalino tem a vantagem de revelar locais lábeis alcalinos, isto é, locais isentos de purinas e pirimidinas como resultado de danos no ADN (Collins, 2009).

A técnica consiste em impregnar as células num gel de agarose de baixo ponto de fusão sob a superfície de uma lâmina de microscópio revestida com gel de agarose. De seguida é feita a lise para descondensar o ADN. Após a eletroforese ser realizada, como o ADN tem carga negativa, se estiver danificado, vai migrar para fora do nucleóide, apresentando a aparência de um cometa. De seguida, o gel na lâmina é corado com um fluorocromo específico de ADN. A análise dos resultados é realizada através de *softwares* específicos, como o QuPath ou o ImageJ, sendo feita uma avaliação visual do cometa e atribuída uma categoria que varia entre 0 e 4. A

diferença entre as categorias está relacionada com a diferença entre o tamanho da cabeça e o tamanho da cauda do cometa (Silva *et al.*, 2003; Collins, 2004).

1.4.1. Aplicabilidade

Esta técnica é utilizada como uma ferramenta básica em muitas áreas de investigação, incluindo biomonitorização ambiental, genética toxicológica e radioativa (Gontijo e Tice, 2003). O ensaio cometa não é usado para detetar mutações, mas sim lesões no genoma, que podem resultar em mutação quando não reparadas. Também pode ser utilizado para estudos de reparação do ADN, monitorização do dano e tipo de lesão reparada (Gontijo e Tice, 2003; Silva *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2003).

Para detetar o dano oxidativo é necessário adicionar um passo ao processo, realizando-se um tratamento enzimático. As enzimas mais usadas são a formamidopirimidina ADN glicosilase (FPG) e endonuclease III (endo III). A FPG deteta e remove bases púricas, adenina e guanina, oxidadas, em particular a 8-oxoguanina e purinas alquiladas. As quebras que se detetam na cadeia de ADN sem utilização da FPG fornece uma informação limitada porque, muitas vezes, as quebras são rapidamente reparadas. A utilização desta enzima torna o ensaio mais específico e mais sensível, uma vez que a enzima vai detetar bases oxidadas, onde existiram quebras que se tenham ligado, através de processos de reparação, ou então que estariam prestes a quebrar. Isto é, sem enzimas só se detetam quebras simples e duplas na cadeia de ADN, enquanto com a adição da enzima identificam-se outros tipos de dano mais específico, como bases oxidadas (Collins, 2004).

Foi introduzida uma nova versão do método realizada em condições de pH neutro, permitindo a deteção de quebras duplas de ADN, independentemente da presença de quebras simples (Olive *et al.*, 1991). Os danos oxidativos nas bases pirimídicas e púricas podem ser identificados pela incubação das células lisadas com endonucleases específicas antes da eletroforese (Collins *et al.*, 1993).

A diversidade da aplicação da técnica, com base no objetivo pretendido, é vista como uma das suas principais vantagens. Esta técnica apresenta uma certa superioridade sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, uma vez que pode ser utilizada em qualquer tipo de célula, isto é, em qualquer tecido onde é possível extrair células nucleadas, sendo necessário apenas uma pequena quantidade de amostra, e por não necessitar de células em divisão (Hartmann *et*

al., 2003). Outras vantagens desta técnica são a identificação de baixos níveis de danos no ADN, baixo custo, a não necessidade de cultura celular, rapidez, fornecer informação sobre apoptose e capacidade reparadora do ADN, fácil aplicação e monitorização do dano e efeitos de reparo no ADN em células individuais expostas a agentes genotóxicos (Tice *et al.*, 2000).

O facto de não ser possível realizar este procedimento com células procariontes, a necessidade de pessoal especializado para a realização da técnica e a baixa ou nula informação retirada sobre possíveis mutações são as principais desvantagens do ensaio cometa (Singh *et al.*, 1988).

1.4.2. Danos no ADN

A integridade da informação genética é fulcral para evitarmos doenças associadas, como eventos cancerígenos e mutações, que ocorrem após danos no ADN. Quebras e danos oxidativos no ADN são duas das informações obtidas através da análise dos resultados do ensaio cometa. Células com aumento de danos no ADN exibem maior migração de ADN do núcleo em direção ao ânodo. Esta migração é observada, por microscopia de fluorescência, após a coloração com o corante fluorescente, nomeadamente o 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI), e a intensidade da cauda do cometa reflete o número de quebras de ADN (Soares *et al.*, 2015).

A integridade do ADN é ameaçada diariamente por diversos fatores exógenos, como a presença de contaminantes em alimentos, ingestão de fármacos, exposição a radiação, exposição a químicos e estilo de vida não saudável, que pode incluir: consumo de álcool, tabaco e drogas. Estes fatores levam, na sua grande maioria ao aumento da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) pelo organismo, que embora sejam moléculas produzidas naturalmente, o seu aumento favorece a stresse oxidativo. Como tal, existem consequências graves para as macromoléculas, como o ADN. Caso o dano não seja reparado atempadamente, quando em quebras simples, pode originar quebras duplas muito mais complicadas de reparar (Scherer e Strohschoen, 2013).

Os danos identificados frequentemente no ADN são quebras simples ou duplas e quebras resultantes de um mau processo de reparação (Singh *et al.*, 1988; Tice, 1995; Silva *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2003; Pavão *et al.*, 2007).

O dano sofrido por oxidação no ADN é considerado o mais grave, sendo este oriundo do metabolismo celular. O dano no ADN aumenta naturalmente com o envelhecimento (Singh *et*

al., 1991); no entanto, vícios, como fumar, podem aumentar o dano no ADN tanto em adultos como em jovens, o que faz com que seja necessário tomar precauções para prevenir um aumento extra ao dano já inevitável (Piperakis *et al.*, 2003).

A frequência mutacional aumenta com o envelhecimento, dada a acumulação de danos e a baixa capacidade de reparação do ADN, levando a um aumento exponencial de danos com a idade (Betti *et al.*, 1994; McCord e Edeas, 2005). Uma das medidas preventivas para diminuir os efeitos do ROS é aumentar a defesa antioxidante através da ingestão de alimentos ricos em compostos antioxidantes (McCord e Edeas, 2005).

1.5. Imunohistoquímica

O princípio da imunohistoquímica (IHQ) já é conhecido desde 1930 (Coons *et al.*, 1942). Hoje, a IHQ é um método amplamente utilizado para localizar antígenos em células ou tecidos biológicos, com base na interação entre antígenos e anticorpos. Esta técnica pode ser utilizada para diagnóstico de doenças, assim como para o desenvolvimento de fármacos. Os anticorpos são muito seletivos no reconhecimento do respetivo antígeno, o que os torna uma ferramenta perfeita para o processo (Yu *et al.*, 2015).

A técnica de IHQ é um processo com várias etapas, podendo ser realizada por método direto ou indireto. Esta técnica baseia-se na formação de um complexo imune, antígeno-anticorpo. Este complexo torna-se visível quando é feita uma ligação do complexo a um agente fluorescente ou cromogéneo (Pires *et al.*, 2010).

O método direto (Figura 3) é o mais rápido e simples. O primeiro passo consiste na ligação de um anticorpo ao antígeno correspondente do tecido a identificar. Neste método, esta ligação é crucial, porque se não ocorrer, não será emitido qualquer sinal ao conjugado enzimático, que é o próximo e último passo. O método direto além de não poder amplificar sinais fracos, carece de sensibilidade suficiente para a deteção da maioria dos antígenos (Ramos-Vara e Miller, 2014).

O método indireto (Figura 3) veio substituir o método direto, dada a necessidade de um método com maior sensibilidade. Ao contrário do método direto, o método indireto envolve mais do que um passo. O primeiro passo consiste na ligação do antígeno ao anticorpo primário adicionado, que de seguida vai ligar-se a um segundo anticorpo. Dependendo do tipo de estudo, um anticorpo terciário pode também vir a ser adicionado. De seguida é feita a ligação do

complexo enzimático ao anticorpo secundário ou terciário, para obter o sinal pretendido. Além de mais sensível, este método também é mais económico, porque o anticorpo secundário usado pode ligar-se a outros anticorpos primários em aplicações futuras (Ramos-Vara e Miller, 2014).

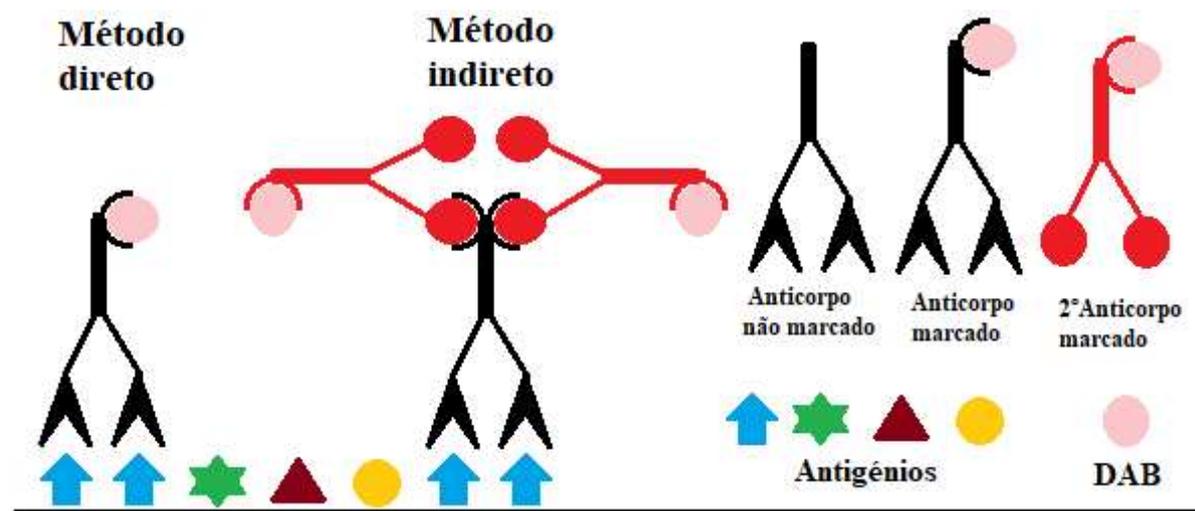


Figura 3 - Representação esquemática do método imunohistoquímico direto e indireto (adaptado de Ramos-Vara e Miller, 2014).

Atualmente, o método indireto enzimático é o mais usado, dada a sua capacidade de amplificação do sinal, sendo o método de estreptavidina-biotina (*Labeled streptavidin-biotin* - LSAB) o mais utilizado. Uma questão crítica no desenvolvimento de outras técnicas de IHQ foi a necessidade de se obter maior sensibilidade e aumento do sinal. Uma maior sensibilidade facilita a marcação de tecidos previamente fixados em formol e incluídos em parafina, pelo que se evoluiu de um método simples, direto, para métodos de deteção de múltiplos passos, como os métodos peroxidase-antiperoxidase (PAP), avidina-biotina (ABC) e LSAB, ou mesmo métodos que têm como base o uso de polímeros para uma amplificação de elevada sensibilidade (Taylor *et al.*, 2006).

Neste estudo foi usado o método enzimático LSAB. Resumidamente, o método LSAB consiste em 3 passos. Em primeiro, dá-se a ligação do antígeno ao anticorpo primário, que se liga de seguida, ao anticorpo secundário. Este por sua vez vai permitir a formação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (Ramos-Vara e Miller, 2014).

Para a realização desta técnica é necessária a produção de anticorpos. Em condições naturais, os antígenos induzem a produção de anticorpos. Este processo é mimetizado na produção de anticorpos para a IHQ. Para esse efeito, antígenos sintetizados com a estrutura da proteína produzida naturalmente são injetados em animais hospedeiros como: ratos, ovinos,

caprinos, entre outros, que por sua vez produzem anticorpos contra o antígeno sintetizado (Kalyuzhny, 2016).

1.5.1. Ki-67

O gene *ki-67* codifica duas isoformas proteicas com pesos moleculares de 345 e 395 kDa, identificadas por Scholzer e Gerdes no início de 1980 (Scholzen e Gerdes 2000). A proteína Ki-67 (pKi-67), denominada comumente por Ki-67, está presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M), estando ausente em células na fase G0, tal como ilustrado na Figura 4, apresentando variações na concentração do Ki-67, com maior [Ki-67] nas fases G2 e M e menor [Ki-67] nas fases G1 e S (Hooghe *et al.*, 2008; Shirendeb *et al.*, 2009). Isto é visível nas fases posteriores da mitose (anáfase e telófase), onde se dá uma diminuição dos níveis do Ki-67 (Modlin *et al.*, 2008).

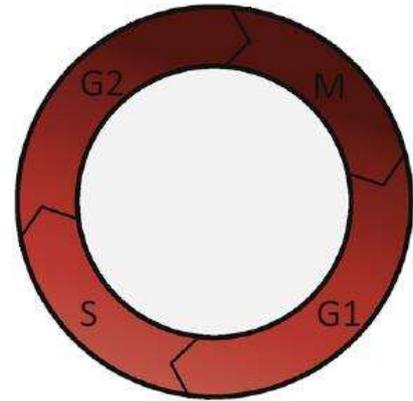


Figura 4 - Concentração gradual de Ki-67 ao longo do ciclo celular (Sales Gil e Vagnarelli 2018).

A determinação imunohistoquímica do Ki-67 é realizada calculando a percentagem de células tumorais de Ki-67 marcadas positivamente; é este o método mais utilizado para avaliar a proliferação tumoral (Dowsett *et al.*, 2011). Ao efetuar a IHQ com o anticorpo Ki-67 é possível usar a sua expressão celular como um marcador de proliferação tumoral e avaliar a sua extensão e intensidade (Brown e Gatter 2002; Kloppel *et al.*, 2004). O Ki-67 é amplamente usado como ferramenta de diagnóstico e como indicador de prognóstico em diversas neoplasias (Figura 5) (Li *et al.*, 2015).

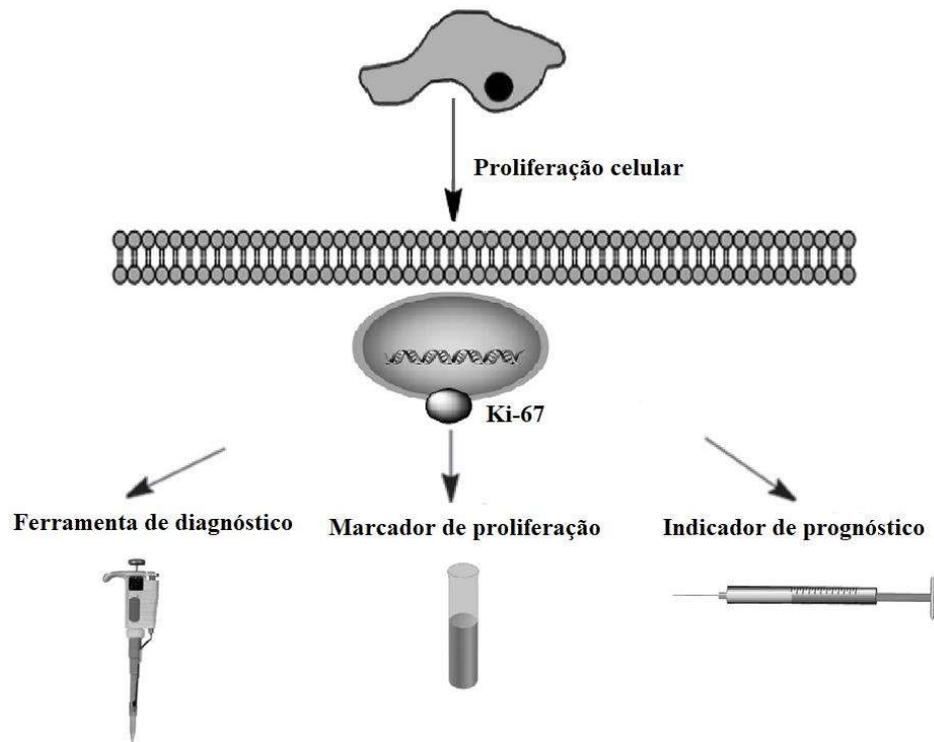


Figura 5 - Utilização do marcador de proliferação Ki-67 como ferramenta de diagnóstico e prognóstico (adaptado de Li *et al.*, 2015).

Para avaliar a marcação do Ki-67, os tumores são classificados com base na proliferação como baixa, intermédia ou elevada, de acordo com valores percentuais pré-definidos (Jonat e Arnold, 2011). Na avaliação do Ki-67, existem alguns aspetos a ter em atenção, nomeadamente a credibilidade da contagem devido à heterogeneidade dos tecidos. Para ultrapassar e prevenir este problema, alguns especialistas optam por fazer uma contagem maior (Camp *et al.*, 2008; Sapino *et al.*, 2006). Embora seja possível, nos dias de hoje, usar programas para realizar a contagem, grande parte dos patologistas optam pela contagem manual, de modo a obter uma pontuação mais confiável, mesmo estando sujeitos a diferenças na interpretação entre examinadores, o que leva a variabilidade (Konsti *et al.*, 2011).

A importância do Ki-67 tem sido analisada em vários estudos dado o seu potencial como marcador de proliferação confiável, o qual foi demonstrado em diversos tipos de cancro (Ciancio *et al.*, 2012; Ishihara *et al.*, 2013; Josefsson *et al.*, 2012; Sorbye *et al.*, 2012a, b).

1.6. Feijão-frade

Tal como referido anteriormente, o uso de modelos animais é uma mais-valia para determinar a eficácia quimiopreventiva de diversos compostos químicos, alimentos, ou estilos de vida (Nascimento-Gonçalves *et al.*, 2018).

A dieta mediterrânica, composta essencialmente por peixe, cereais, azeite, legumes, leguminosas, fruta e vinho, foi classificada como Património Mundial e Imaterial da Humanidade pela Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura (UNESCO) em 2013. A adesão à dieta mediterrânica está associada a uma melhoria significativa no estado de saúde de um indivíduo, com uma redução significativa nas taxas de mortalidade relacionadas com as doenças cardiovasculares, na redução da incidência e morte por cancro e redução da incidência da doença de Parkinson e Alzheimer. Estes resultados encorajam a população na adesão a um padrão dietético semelhante à dieta mediterrânica para prevenção primária das principais doenças crónicas (Sofi *et al.*, 2008)

O feijão-frade (*Vigna unguiculata*, L. Walp) é uma leguminosa presente na dieta mediterrânica, com baixo teor de gordura, rico em ferro e baixo teor calórico, constituindo uma boa fonte alternativa de proteína. A composição e valor energético por 100 grama de feijão está presente na Tabela 3. Esta leguminosa é uma fonte rica em compostos bioativos, peptídeos, amido, fibra, fitoquímicos e antioxidantes, assim como em certas vitaminas e minerais, possuindo características específicas que beneficiam a saúde humana de várias formas.

Tabela 3 - Composição e valor energético de feijão-frade (adaptado de Frota *et al.*, 2008).

Componentes	Porção por 100 grama de feijão-frade
Valor energético	323,4 ± 0,84 kcal
Proteínas	24,5 ± 0,47 g
Lípidos	2,2 ± 0,02 g
Fibras	19,4 ± 1,07 g
Hidratos de carbono	51,4 ± 0,63 g

Os compostos fenólicos presentes neste tipo de feijão caracterizam-se por diferentes propriedades funcionais nomeadamente antidiabéticas, anti-inflamatórias, ou mesmo anticancerígenas, uma vez que protege o ADN do dano oxidativo e inibe a proliferação celular (Jayathilake *et al.*, 2018).

Além do efeito benéfico dos compostos fenólicos presentes na leguminosa, estudos realizados provaram que as proteínas, peptídeos e inibidores de proteases do feijão-frade apresentam efeitos positivos na manutenção do nível de glicose no sangue, pressão arterial e também na prevenção do cancro (Jayathilake *et al.*, 2018). Os peptídeos presentes no feijão-frade apresentaram actividade citotóxica seletiva em diversas linhas celulares cancerígenas, comprovando assim o seu efeito anticancerígeno (Jayathilake *et al.*, 2018). O feijão-frade apresenta na sua constituição altos níveis de saponinas, ácido fítico e inibidores de tripsina, compostos que podem reduzir o risco de desenvolvimento de cancro, nomeadamente cancro colorrectal, gástrico, da mama, renal e da próstata (Zia-Ul-Haq *et al.*, 2013; Jayathilake *et al.*, 2018).

2. Objetivos

Esta dissertação teve como objetivo geral avaliar os efeitos da introdução do feijão-frade na dieta de murganhos fêmeas FVB/n às quais foi induzido CCR. Para tal foram considerados os objetivos específicos:

- Avaliar os parâmetros fisiológicos (consumos de água e ração; variação da massa corporal e o estado geral) dos animais nos diferentes grupos experimentais.
- Identificar e caracterizar as lesões macroscópicas e microscópicas no cólon dos murganhos nos diferentes grupos experimentais.
- Determinar o índice de proliferação celular, através da técnica de imunohistoquímica, no cólon dos murganhos nos diferentes grupos experimentais.
- Analisar os efeitos genotóxicos provocados pela indução do CCR nos diferentes grupos experimentais.

Página propositadamente deixada em branco

3. Materiais e métodos

3.1. Características dos animais

Para a realização deste estudo foram usados quarenta e oito murganhos fêmea da estirpe FVB/n, com idades compreendidas entre as 5 e 6 meses de idade. Estes animais foram provenientes do cruzamento de uma colónia alojada no Biotério da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD).

O protocolo animal foi aprovado pelo Comité de Ética para Experimentação Animal e pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (número de aprovação 010535). Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com a Recomendação da Comissão Europeia 2010/63/EU e pela Lei Nacional (DL n.º 113/2013) de Proteção de Animais usados para fins científicos. O protocolo experimental decorreu em condições ambientais controladas: temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, níveis de humidade relativa mantidos entre os 55-65% e fotoperíodo de 12 horas de dia e 12 horas de noite, com a luz entre as 8.00 e as 20.00 horas.

3.2. Condições experimentais

Os animais foram mantidos em gaiolas de policarbonato duro com superfícies lisas e cantos redondos (Eurostandard Tipo IV S 1500U, Tecniplast, Itália), com cama de carolo de milho adquirido à empresa Ultragene (Santa Comba Dão, Portugal). Com o intuito de reduzir o stresse animal e a monotonia foram colocados no interior das gaiolas rolos de cartão e tubos de policarbonato duro para proporcionar enriquecimento ambiental.

Cada gaiola foi devidamente etiquetada com indicação do grupo. Para manutenção das condições de limpeza e higiene da gaiola foi realizada a muda das camas e lavagem das respetivas gaiolas uma vez por semana.

Foi fornecido acesso *ad libitum* à água e à ração (4RF21[®] da Mucedola, Itália) e registados os seus consumos, através de pesagens semanais com recurso a uma balança de precisão (KERN[®] PLT 6200-2A, Dias de Sousa S.A., Alcochete, Portugal).

3.3. Marcação dos animais

Durante o protocolo experimental, foi feita a marcação na cauda dos animais, com um marcador preto, sendo este procedimento repetido duas vezes por semana ao longo do protocolo, para facilitar a sua identificação, de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4 - Marcação e número correspondente de cada animal.

Marcação	Nº do murganho
•	1
••	2
•••	3
• —	4
—	5
— •	6
— ••	7
— •••	8
• — —	9
— —	10
— — •	11
— — ••	12
— — •••	13

3.4. Protocolo experimental

O protocolo experimental utilizado neste ensaio teve a duração de 13 semanas (Figura 6). Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: controlo não induzido (n=9), controlo induzido (n=13), induzido + 20% farinha de feijão frade (FFF) (n=12) e induzido + 50%FFF (n=14). As massas corporais dos animais foram registadas semanalmente ao longo do ensaio experimental.

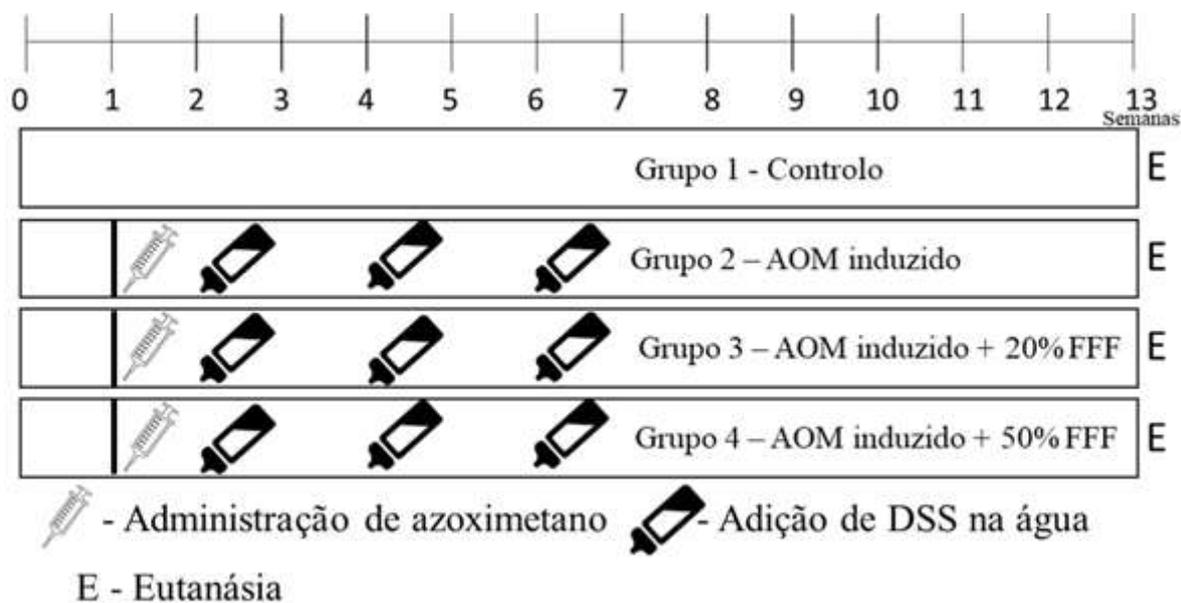


Figura 6 - Esquemática do protocolo realizado.

Para a indução do CCR foi utilizado AOM (SIGMA), juntamente com o DSS (SIGMA). Foi feita uma única administração por via intraperitoneal de AOM (7,5 mg/kg de massa corporal) a cada animal nos grupos 2, 3 e 4. O grupo controlo não induzido foi sujeito ao mesmo stresse, tendo sido sujeito ao mesmo procedimento com soro fisiológico. Uma semana depois da indução, os animais foram expostos a 1,5% de DSS na água, previamente fervida, por 7 dias, em três ciclos com intervalos de 7 dias. Os valores definidos foram obtidos a partir do intervalo de valores do modelo AOM/DSS descritos por Thaker e colaboradores (Thaker *et al.*, 2012).

3.5. Introdução do feijão-frade na dieta dos murganhos

O feijão-frade foi adquirido a um produtor local de Coimbra e moído utilizando uma Vorwerk Thermomix (Figura 7-A). Depois de moído, o feijão frade foi adicionado a ração *standard* de animais de laboratório. Para tal a mesma foi moída seguindo o mesmo procedimento da farinha de feijão frade (FFF). Depois a FFF foi misturada com a dieta *standard* nas percentagens de 20% e 50% (m/m) usando uma misturadora de cozinha (Kenwood Chef Excel A902) com a adição de 5% (m/m) água por quilograma de mistura. O último passo consistiu na formação de pellets com auxílio da ROTEXMASTER YHKJ250 (Figura 7-B). De

seguida, deixaram-se os pellets a arrefecer à temperatura ambiente e armazenaram-se no frigorífico a 5°C até serem introduzidos na dieta dos murganhos.

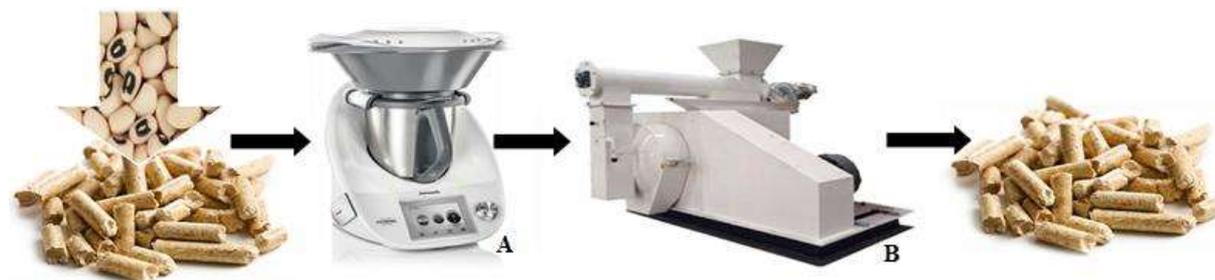


Figura 7 - Processo de preparação da dieta (Ração Standard + feijão frade) A- Vorwerk Thermomix; B- ROTEXMASTER YHKJ250

3.6. Avaliação dos *endpoints*

Durante o protocolo experimental foi realizada a avaliação semanal do bem-estar e aparência dos animais usando uma tabela de *endpoints* (Tabela 5) (adaptada de Oliveira *et al.* 2017). Através da sua aplicação foram avaliados os seguintes parâmetros: condição corporal, massa corporal, postura, aparência do pelo, produção de muco, aspeto dos olhos, ouvidos e bigodes, estado mental, estado de hidratação, frequência respiratória e cardíaca, temperatura corporal, medida com o auxílio de um termómetro digital de infravermelhos, a aparência das fezes e presença ou ausência de convulsões. Para cada um dos parâmetros avaliados foi atribuída uma pontuação. Caso a sua soma atingisse o valor de quatro, o sacrifício dos animais seria antecipado.

Tabela 5 - *Endpoints* usados na avaliação do bem-estar dos murganhos (adaptada de Oliveira *et al.*, 2017)

Pontuação*	Parâmetros
Condição corporal	
0	Boa condição corporal
1	Condição corporal alterada
2	Emaciado
Massa corporal	
0	Normal
1	Perda de massa corporal <10%
2	Perda de massa corporal 10-20%
3	Perda de massa corporal >20% (eutanasia)
Postura	
0	Postura normal
1	Alterações da postura (Postura ortopneica)

Aspetto do pelo e <i>grooming</i>	
0	Normal
1	Falta de <i>grooming</i>
2	Pelo com mau aspeto, cromodacriorreia
3	Pelo com muito mau aspeto, cromodacriorreia severa
Muco	
0	Normal
1	Ligeiramente anémico
2	Moderadamente anémico
3	Anemia severa (eutanásia)
Olho, orelhas e vibrissas	
0	Normal
1	Olhos parcialmente fechados, orelha em baixo e falta das vibrissas
2	Olhos completamente fechados, orelhas curvas e em baixo e falta das vibrissas (comportamento barbeiro)
Estado mental	
0	Normal (alerta, curioso e olhos brilhantes)
1	Letárgico/ Comportamento estereotipado
2	Estupor
3	Moribundo / Coma (eutanásia)
Resposta a estímulos externos	
0	Normal
1	Resposta moderada
2	Resposta moderada com vocalização
3	Resposta violenta
Estado de hidratação	
0	Normal
1	Prega anormal da pele (baixa elasticidade celular)
Frequência respiratória	
0	Normal
1	Aumentado
2	Diminuído
3	Respiração abdominal
Frequência cardíaca	
0	Normal
1	Aumentado
2	Diminuído
Temperatura corporal	
0	Normal (35,6-38,9°C)
1	Hipertermia (>38,9°C)
2	Hipotermia (<35,6°C)
Aparência das fezes	
0	Normal
1	Diarreia
2	Negras (melena - sangue digerido)
3	Com sangue
Convulsões	
0	Ausente
3	Presente (Eutanásia)

* Pontuação de limites críticos: Qualquer animal que atinja uma pontuação de 4 ou superior será eutanasiado.

3.7. Sacrifício dos animais e recolha de amostras

Oitenta dias após a administração do composto indutor procedeu-se ao sacrifício dos animais. O sacrifício foi feito utilizando uma sobredosagem de xilazina (20mg/mL) (*Rompun*® 2%, Bayer Healthcare S.A., Kiel, Alemanha) e ketamina (100mg/mL) (*Clorketam 1000*, solução injetável, Vétoquinol, Barcarena, Portugal) administrada por via intraperitoneal.

Após o sacrifício, procedeu-se à recolha de sangue, por punção intracardíaca, método recomendado pela FELASA - *Federation for Laboratory Animal Science Associations*, para tubos com e sem heparina (*Tube Lithium Heparin 0,5 mL*, FL MEDICAL, Itália), de modo a obter plasma e soro, respetivamente. Depois de exsanguinados foi realizada a necrópsia a todos os animais, sendo recolhidos os seguintes órgãos: coração, pulmões, fígado, timo, baço, rins, intestino, glândulas adrenais e os músculos gastrocnémio e solear.

O cólon foi recolhido desde a junção ileocecal até ao ânus, sendo registado o seu peso (balança de precisão KERN® PLJ 750-3N, KERN & Sohn GmbH, 72336 Balingen, Alemanha). O cólon foi aberto ao longo do eixo longitudinal, procedeu-se à sua lavagem com PBS e à avaliação macroscópica para identificar o desenvolvimento macroscópico de lesões. Foi em seguida enrolado, de acordo com a técnica de *swiss roll* (Bialkowska *et al.*, 2016) e fixado em formol tamponado a 10% (ITW Reagents, Alemanha) para posterior processamento para análise histopatológica e imunohistoquímica.

Concluimos a necrópsia com o registo da massa dos restantes órgãos, que de seguida foram também fixados em formol, para posterior análise histopatológica.

3.8. Avaliação histopatológica

As amostras foram processadas de acordo com o procedimento de rotina para microscopia de luz no Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica (LHAP) da UTAD. Após inclusão em parafina, foram realizados cortes de 2µm em micrótomo, os quais foram corados com hematoxilina e eosina (HE). A análise histopatológica foi realizada pela Professora Doutora Adelina Maria Gaspar Gama Quaresma.

As lesões proliferativas foram classificadas de acordo com os critérios propostos por Washington e colaboradores (Washington *et al.*, 2013).

O grau de inflamação foi avaliado de acordo com estudos anteriores (Tian *et al.*, 2013, Tian *et al.*, 2018). Assim, avaliou-se a severidade da inflamação numa escala de 0 a 3 (0 = sem inflamação, 1 = inflamação ligeira, 2 = inflamação moderada e 3 = inflamação marcada) e a profundidade da inflamação em 0 a 3 (0 = sem inflamação, 1 = inflamação da mucosa, 2 = inflamação da submucosa e mucosa e 3 = inflamação transmural). Adicionalmente, foi avaliado o grau de lesão epitelial em 0 a 3 (0 = epitélio intacto, 1 = interrupção da estrutura arquitetural, 2 = presença de erosão e 3 = presença de ulceração) e a extensão das lesões (0 = sem lesões, 1 = lesão focal, 2 = lesão multifocal e 3 = lesão difusa).

3.9. Avaliação imunohistoquímica

Neste trabalho foi realizada a técnica de IHQ enzimática indireta. Foram utilizados cortes de tecidos de 2µm em lâminas de vidro revestidas com Silane. O primeiro passo foi a desparafinação dos tecidos. As lâminas foram colocadas numa tina de vidro com xilol durante 15 minutos. De seguida, realizou-se a hidratação com álcoois decrescentes (100% > 95% > 80% > 70%) durante 10 minutos em cada um dos primeiros dois álcoois e 5 minutos em cada um dos restantes. Seguiu-se a recuperação antigénica, realizada em micro-ondas, em tampão citrato (Tabela 6) (pH=6 ± 0,2), em 3 ciclos de 5 minutos a 750W. Entre ciclos, verificou-se o nível do tampão para evitar a desidratação dos tecidos.

Tabela 6 - Preparação da solução tampão citrato.

Solução Tampão citrato:	Quantidade para 250 mL de solução
H ₂ O destilada	225 mL
Acido Cítrico	4,5 mL
Citrato de Sódio	20,5 mL

Em seguida, as lâminas arrefeceram à temperatura ambiente, sendo posteriormente colocadas em peróxido de hidrogénio (H₂O₂) a 3% durante 30 minutos, para bloquear as peroxidases endógenas. Após este passo, as lâminas foram lavadas com PBS e realizou-se a incubação com soro universal (*Large Volume Ultra V Block, Thermo Scientific*), 100 µL por lâmina, durante 30 minutos em câmara húmida. Seguiu-se a incubação com o anticorpo primário (Ki-67, clone SP6, Abcam), 120 µL por lâmina, durante 2 horas à temperatura ambiente. O anticorpo primário foi diluído previamente em PBS na diluição 1:500.

Após a incubação com o Ki-67, procedeu-se à lavagem em PBS, seguida da incubação com 100 µL de soro biotilado universal (*Biotinylated Goat Polyvalent Secondary, Thermo Scientific*), durante 10 minutos. Após nova lavagem com PBS, foi efetuada a incubação com 100 µL do complexo enzimático estreptavidina peroxidase (*Streptavidin Horseradish Peroxidase, Thermo Scientific*) durante 10 minutos.

Após lavagem com PBS, a reação foi revelada com a adição de 3,3-diaminobenzidina (DAB) durante 5 minutos, seguida de lavagem em água corrente. Seguidamente, as lâminas foram coradas com hematoxilina durante 40 segundos, procedendo-se novamente à lavagem em água morna corrente durante 10 minutos. De seguida, foi realizada a desidratação com álcoois crescentes (95%(I) < 95%(II) < 100%(I) < 100%(II)) durante 10 minutos em cada um dos primeiros dois álcoois e 5 minutos em cada um dos restantes. Após desidratação, as lâminas foram colocadas numa tina com xilol (diafanização) durante 15 minutos. O último passo consistiu no processo de montagem, no qual uma lamela é colocada em cima do tecido, com a adição prévia de uma gota de Entellan. Após secagem, as lâminas foram observadas ao microscópio de luz, sendo selecionados cinco campos de grande ampliação com marcação positiva para a proteína Ki-67 (marcação nuclear castanha), as quais foram fotografadas. Para calcular o valor percentual da imunomarcação do Ki-67 foi efetuada uma contagem das células marcadas e não marcadas usando o programa QuPath (*Quantitative Pathology & Bioimage Analysis*, v0.1.2 para o Windows) (Figura 8).

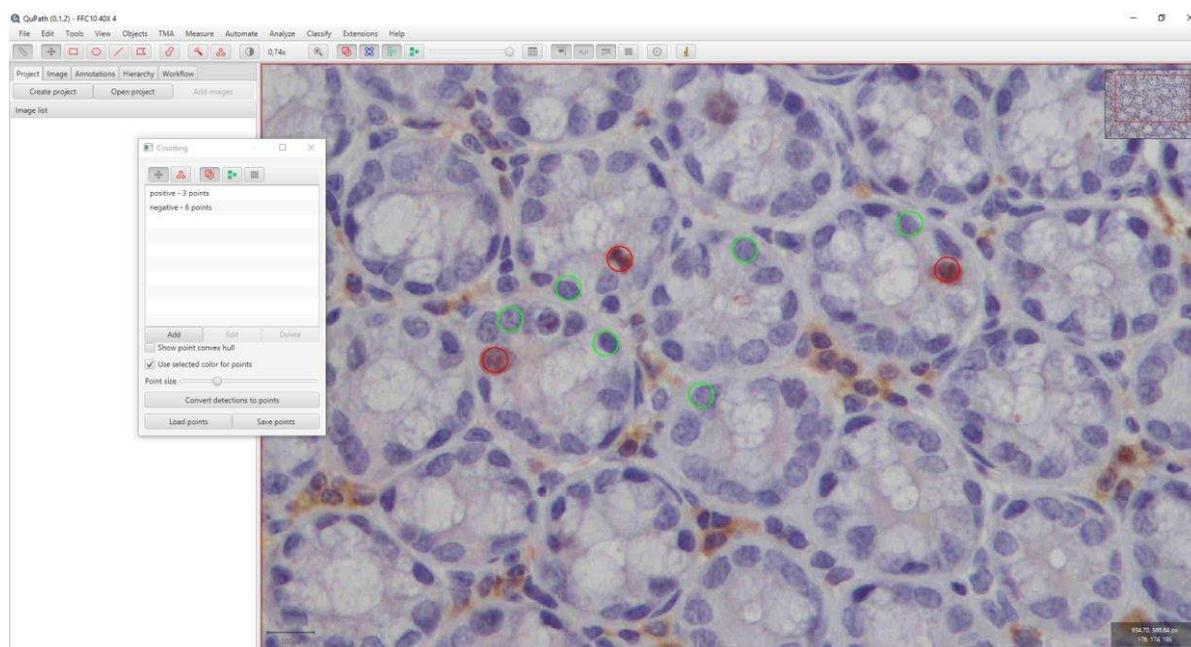


Figura 8 - Ilustração do programa QuPath utilizado para a análise da imunomarcação do Ki-67 (Vermelho- núcleo com marcação positiva, Verde- núcleo com marcação negativa).

3.10. Ensaio cometa

A preparação das lâminas, desde a recolha da amostra durante a realização da necropsia até à visualização microscópica, foi realizada com o apoio do aluno de doutoramento João Ferreira, orientado pela Professora Isabel Gaivão, na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, sendo que a visualização microscópica ficou exclusivamente à nossa responsabilidade.

O primeiro passo para a preparação das lâminas é denominado *precoating*. Neste passo é usada uma solução de agarose a 1% com ponto de fusão normal (PFN) (Sigma) de 89°C para revestir a superfície da lâmina onde serão colocadas as amostras. Para finalizar a preparação da lâmina, esta é deixada a secar à temperatura ambiente.

A solução de agarose a 1% é preparada adicionando 1 g de agarose PFN em pó a 100 mL de água destilada. A agarose é aquecida em banho-maria, a cerca de 90°C ou então é utilizado o micro-ondas, sendo depois colocada em banho-maria a 55°C para evitar a solidificação.

A preparação da amostra é o próximo passo: do sangue total recolhido aos murganhos durante o sacrifício, são pipetados 30 µl para um microtubo juntamente com 1 mL de solução de agarose a 1% com ponto de fusão baixo (PFB) (UltraPure™ *Low Melting Point Agarose*, Invitrogen). A solução de agarose PFB a 1% é obtida através da adição de 0,3g de agarose PFB em pó a 30 mL de tampão fosfato salino (PBS).

De seguida, são pipetados 6 µl da suspensão celular para a superfície *precoated* da lâmina, para formar 1 gel. Este processo é repetido 2 vezes em cada lâmina, ou seja, 2 géis por lâmina. Para cada amostra foram realizadas 4 repetições, 2 para análise sem enzima e 2 para análise com enzima. Por fim, é colocada uma lamela por cima da lâmina com as amostras e colocadas no frigorífico durante 5 minutos para permitir a solidificação do gel.

Após a solidificação, é realizado o processo de lise a baixa temperatura, no frigorífico, durante 1 hora. A solução de lise foi preparada de acordo com a Tabela 7.

Após a lise é realizado o tratamento enzimático em duas das 4 lâminas com a mesma amostra, sendo que as restantes não realizam este passo.

Neste processo é necessária a preparação do *Buffer F*, solução padrão usada para diluição da enzima FPG, preparada de acordo com a Tabela 8.

Tabela 7 - Preparação da solução de lise celular.

Solução de lise	Quantidade para 1 L de H ₂ O destilada
2,5 M NaCl	146,1 g
0,1 M EDTA	37,22 g
0,01 M Tris	1,21 g
10 M NaOH	±20 mL para colocar o pH a 10
1 mL Triton X-100 por 100 mL solução	10 mL Triton X-100

Após a lise, retiram-se as lâminas do frigorífico e são feitas 3 lavagens com o buffer F durante 5 minutos cada, no frigorífico. Enquanto as lâminas estão no frigorífico é preparada a enzima. A 10 µl de FPG são adicionados 300 µl de Buffer F, colocando-se de seguida em gelo. Às lâminas sujeitas tratamento enzimático são adicionados 30 µl de FPG por gel às lâminas, sendo que as restantes lâminas sem enzima levam apenas buffer F. Por fim, é colocada uma lamela grande em cada uma das lâminas e vão todas à estufa a 37°C durante 30 minutos para ativar a enzima. No final deste tempo, as lâminas são preparadas para a eletroforese, sendo colocadas na tina de eletroforese no frigorífico com as lâminas cobertas pela solução alcalina de eletroforese. Para a preparação de 1 litro de solução de eletroforese são usados 30 mL de NaOH a 10 M, 1 mL de EDTA a 1M e, por fim, perfaz-se o restante com 969 mL de água destilada. Por fim, a tina é deixada no frigorífico durante 30 minutos para permitir a desnaturação do ADN.

Tabela 8 - Preparação da solução *Buffer F*.

<i>Buffer F</i>	Quantidade para 1 L de H ₂ O destilada
0,04 M HEPES	9,53 g
0,1 M KCl	7,46 g
0,0005 M EDTA	0,19 g
0,2 mg/mL BSA	0,20 g
6 M KOH	± 45 mL para colocar o pH a 8

A tina de eletroforese é retirada do frigorífico para a realização da eletroforese. Os eléctrodos são ligados e é dado o início da corrida durante 30 minutos a 25 V e 300 mA. Após a realização da eletroforese, as lâminas são retiradas da tina e é feita uma primeira lavagem em

PBS durante 10 min a 4°C (frigorífico) e uma segunda lavagem com água destilada durante 10 min a 4°C (frigorífico).

O passo final é a fixação em etanol a 70% durante 15 min e em etanol a 96% durante 15 min, pela respetiva ordem. No final deste passo, as lâminas são colocadas a secar à temperatura ambiente até à sua visualização.

3.10.1. Análise microscópica

O passo final do ensaio cometa realiza-se através da quantificação visual. Com o auxílio de uma micropipeta, adicionam-se 20 µl de DAPI a cada gel e cobre-se com lamela para poder ser observado ao microscópio de fluorescência. Até ser feita a observação microscópica, as lâminas coradas devem ser mantidas no escuro para evitar perder a coloração.

Para a análise do gel, são avaliados 100 cometas em cada gel, utilizando o microscópio de fluorescência, com ampliação de 40x; em seguida, avalia-se cada cometa na sua respetiva categoria, definida através da escala presente na Figura 9.

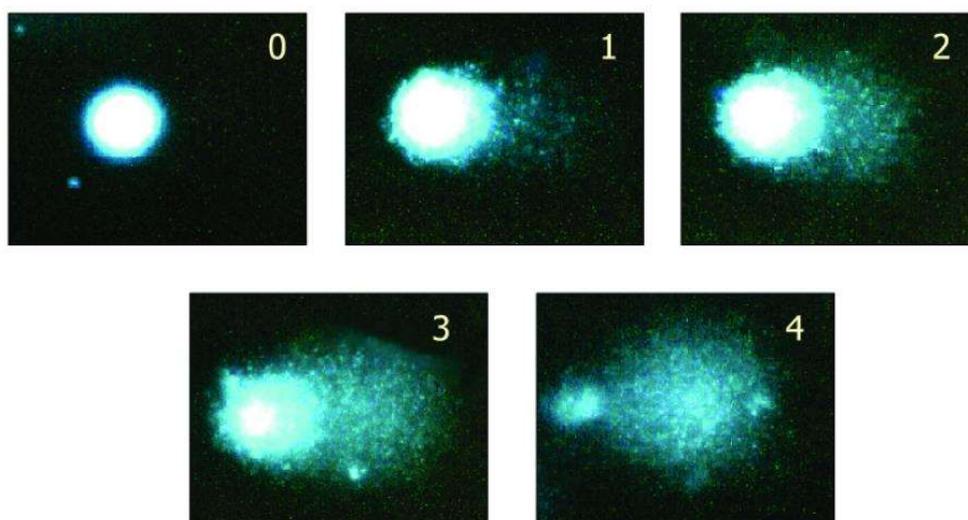


Figura 9 - Escala para a quantificação de cometas (Collins *et al.*, 2004).

A contagem dos cometas não deve ser feita nas bordas do gel, onde se acumulam com níveis anormais de danos elevados. O resultado é obtido através da soma do valor das diferentes classes multiplicado pelas células de cada classe, obtendo-se um valor entre 0 e 400 unidades arbitrárias (UA) para cada gel.

Os géis sem tratamento enzimático dão uma estimativa das quebras basais na cadeia de ADN, enquanto os géis tratados com enzima mostram não só as quebras basais na cadeia de ADN como também as quebras provocadas pela clivagem da cadeia, por parte da FPG, das bases oxidadas, as quais não surgem no ensaio sem enzima.

3.11. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa IBM SPSS® (*Statistical Package for the Social Sciences*, versão 25 para Windows, SPSS). Foram calculadas as médias e erros padrão da massa corporal, das massas relativas dos órgãos por grupo. Para determinar as diferenças significativas entre os grupos, relativamente aos parâmetros referidos anteriormente, temperatura, ensaio cometa e imunomarcção do Ki-67, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. O nível de significância usado foi $p < 0,05$.

As fórmulas seguintes foram usadas para calcular três parâmetros:

- Consumo médio de água por animal e por dia;
- Consumo médio de comida por animal e por dia;
- Massa relativa dos órgãos.

Consumo Médio de água por animal e por dia

$$= \frac{\text{Massa inicial de água} - \text{Massa final de água}}{\text{n}^\circ \text{ de dias entre a pesagem final e inicial} \times \text{n}^\circ \text{ de animais por gaiola}}$$

Consumo Médio de comida por animal e por dia

$$= \frac{\text{Massa inicial de comida} - \text{Massa final de comida}}{\text{n}^\circ \text{ de dias entre a pesagem final e inicial} \times \text{n}^\circ \text{ de animais por gaiola}}$$

Massa Relativa dos órgãos

$$= \frac{\text{Massa do órgão}}{\text{Massa corporal final do animal}}$$

4. Resultados

Durante o ensaio experimental, a taxa de mortalidade foi nula; no entanto, um animal do grupo 1 (Controlo) morreu, devido a fatores externos, sendo conseqüentemente retirado do número total de animais presentes nesta dissertação.

4.1. Parâmetros fisiológicos

4.1.1. Consumo médio de comida e água

As médias dos consumos de comida e água, desde o início até ao final do ensaio estão descritas nas Figuras 10 e 11, respetivamente.

Quanto ao consumo de comida, ao longo do protocolo, os animais do grupo controlo e induzido + 20%FFF apresentaram o maior consumo médio: 4,22 g e 4,32 g, enquanto o grupo induzido e induzido + 50% apresentaram o menor consumo médio: 3,97 e 3,83, respetivamente.

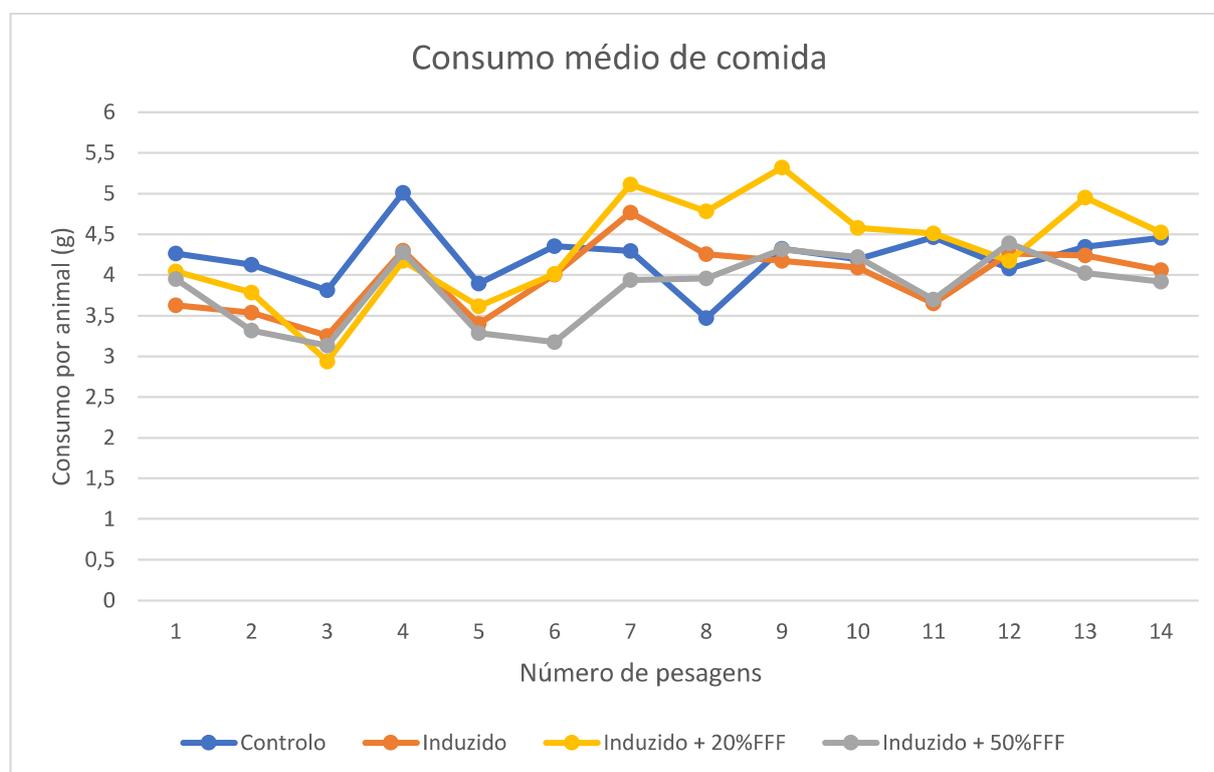


Figura 10- Consumo médio de comida por grupo ao longo do protocolo experimental.

Relativamente ao consumo de água ao longo do ensaio experimental, este foi maior no grupo induzido + 20%FFF, com um consumo médio de 6,07 mL por animal ao longo do ensaio. O grupo que apresentou menor consumo médio de água foi o grupo induzido + 50%FFF, com um consumo de 5,12 mL por animal. Os animais dos restantes grupos, controlo e induzido, tiveram como média de consumo 5,53 mL e 5,59 mL por animal, respetivamente.

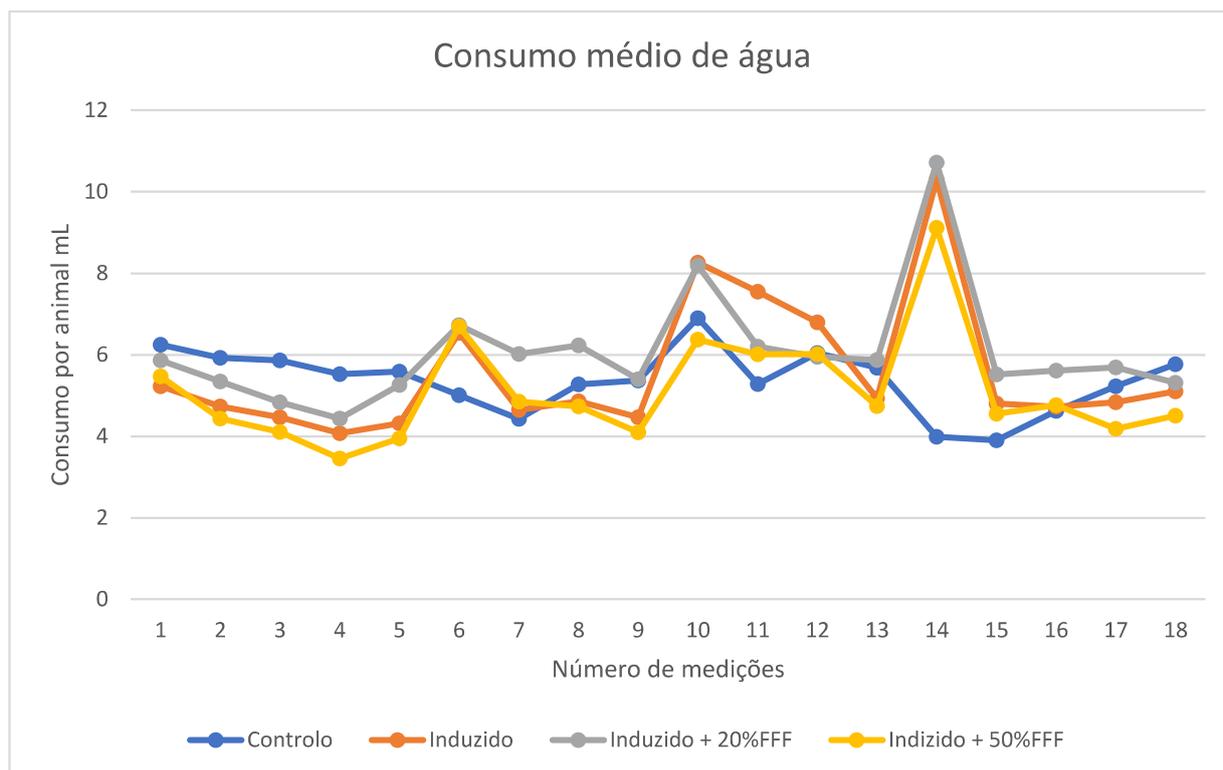
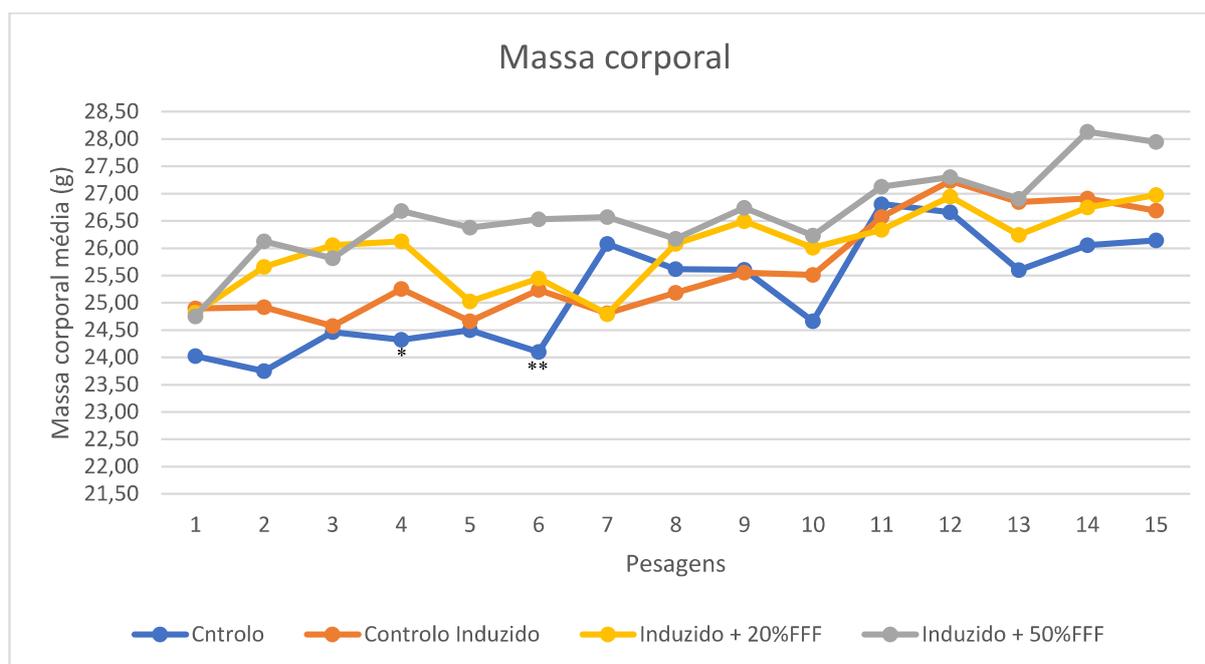


Figura 11 - Consumo médio de água por grupo ao longo do protocolo experimental.

4.1.2. Média da massa corporal

Na figura 12, pode observar-se a variação da média da massa corporal dos murganhos desde o início até ao final do ensaio experimental. Foi realizada a análise estatística para cada pesagem durante o tempo experimental, sendo as mais relevantes: P5, após a administração de AOM, e P8, P10 e P12, referentes à ingestão do DSS na água. Pode observar-se um aumento da média da massa corporal em todos os grupos ao longo do ensaio experimental, sendo superior no grupo induzido + 50%FFF.

Apesar das variações da média da massa corporal ao longo do ensaio, apenas foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo e o grupo induzido + 50%FFF nas pesagens 4 e 6.



* $p < 0,05$ diferença estatisticamente significativa entre o grupo 1 e 3

** $p < 0,05$ diferença estatisticamente significativa entre o grupo 1 e 3

Figura 12 - Evolução da média da massa corporal dos animais ao longo do ensaio experimental.

4.1.3. Média da massa relativa dos órgãos

Analisando as Figuras 13, 14, 15 e 16, correspondentes à representação média da massa relativa dos pulmões, baço, fígado, timo, rins e adrenais, é possível verificar que não existem diferenças significativamente estatísticas, ao contrário da figura 17, que corresponde à representação média da massa relativa do cólon, onde é possível verificar uma diferença significativamente estatística ($p < 0,05$) entre o grupo induzido + 20%FFF em comparação com os outros grupos.

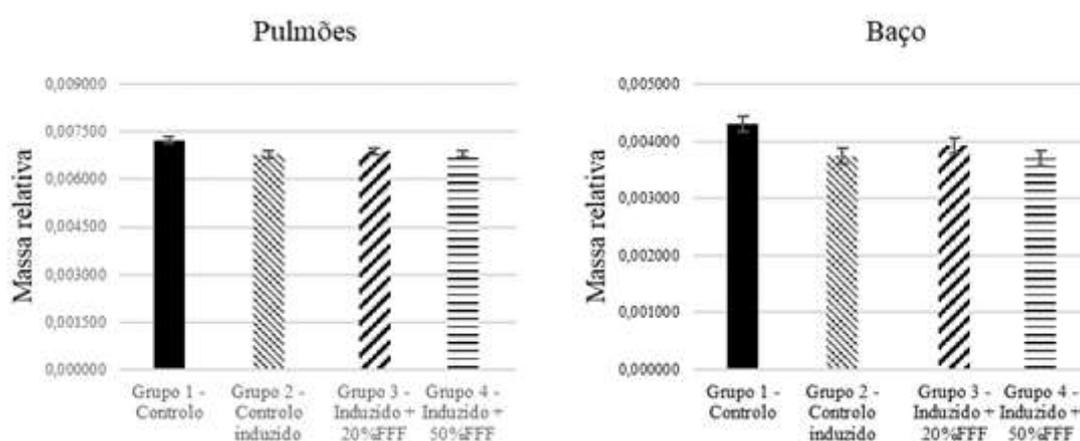


Figura 13 - Representação da média da massa relativa dos pulmões e baço.

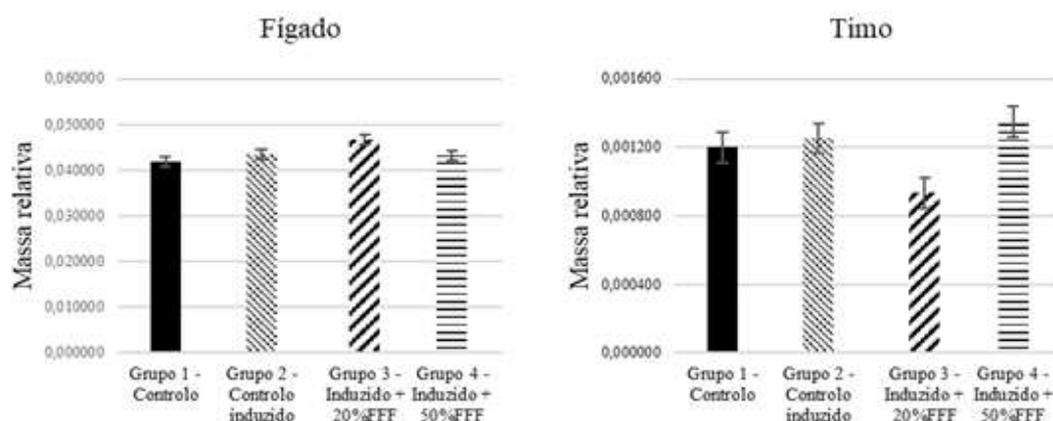


Figura 14 - Representação da média da massa relativa do fígado e timo.

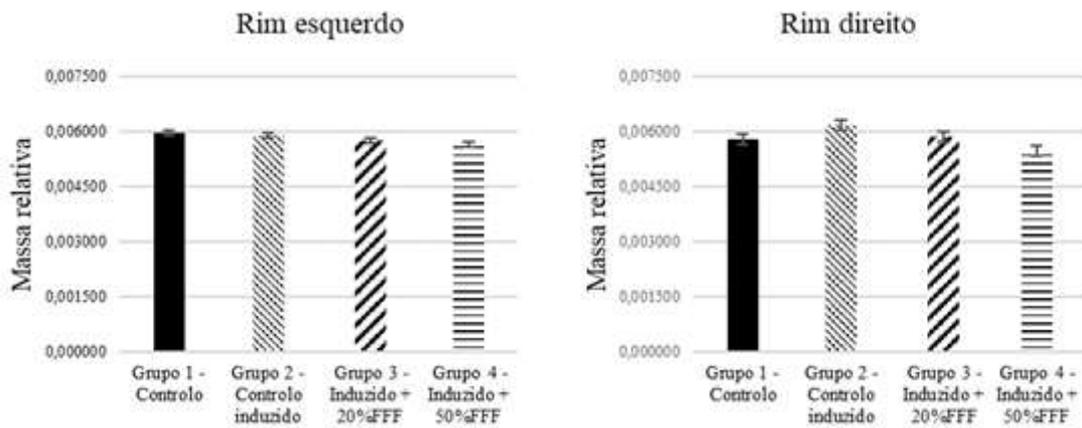


Figura 15 - Representação da média da massa relativa do rim esquerdo e direito.

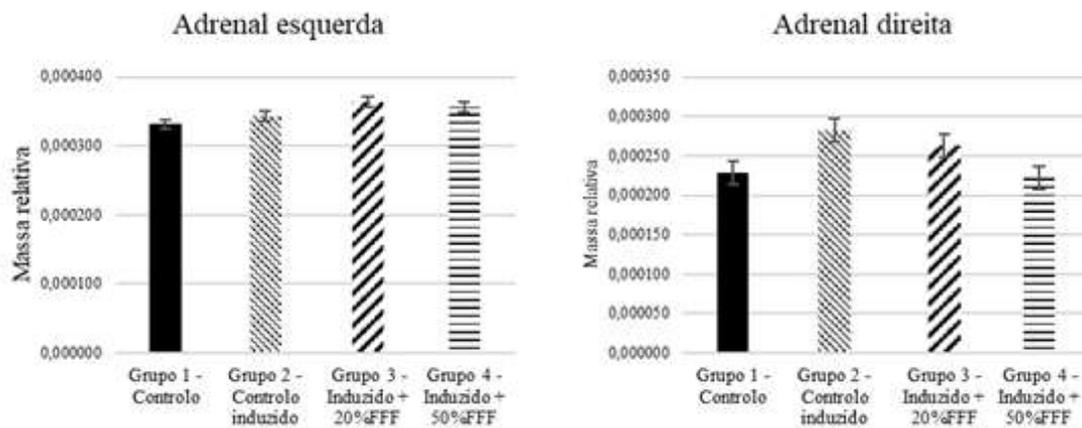
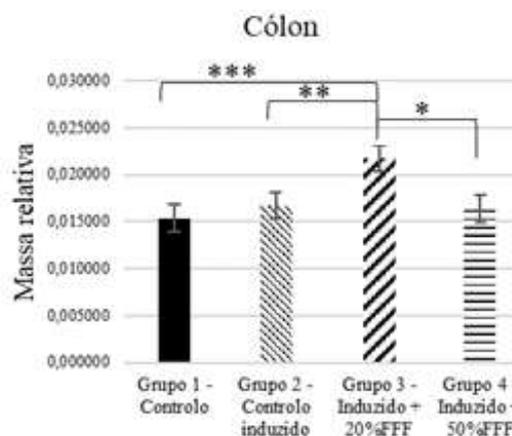


Figura 16 - Representação da média da massa relativa das adrenais esquerda e direita.



*p=0,00538 diferença estatisticamente significativa entre o grupo 3 e 4
 ** p=0,00505 diferença estatisticamente significativa entre o grupo 3 e 2
 *** p=0,00636 diferença estatisticamente significativa entre o grupo 3 e 1

Figura 17 - Representação da média da massa relativa do cólon.

4.2. Avaliação dos *endpoints*

Uma vez que não se verificaram alterações estatisticamente significativas nos restantes parâmetros, apenas foi realizada a análise estatística dos seguintes parâmetros: temperatura corporal (Figura 18), olhos, orelhas e vibrissas (Tabela 9), postura (Tabela 10) e estado mental (Tabela 11).

O resultado da medição semanal da temperatura dos murganhos pode ser observado na Figura 18, verificando-se heterogeneidade na média obtida por grupos ao longo do ensaio experimental.

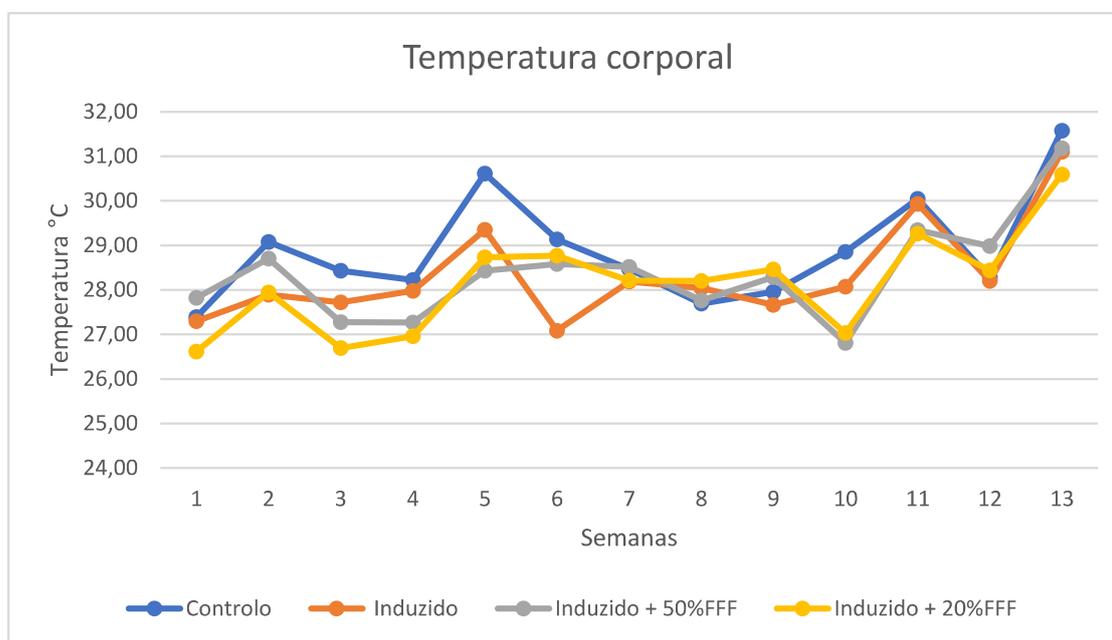


Figura 18 - Temperatura corporal média apresentada por grupo ao longo do protocolo experimental.

Apenas no grupo Induzido + 50%FFF, mais especificamente numa das duas gaiolas pertencente ao grupo, foram verificadas alterações ao nível dos parâmetros olhos, orelhas e vibrissas (Tabela 9). No grupo referido, os animais apresentaram “comportamento barbeiro” caracterizado pelo corte das vibrissas dos animais. Relativamente às alterações ao nível da postura dos animais, foram verificadas várias alterações nos três grupos induzidos ao longo do protocolo experimental, maioritariamente no grupo Induzido + 50%FFF (Tabela 10). Os animais apresentaram uma postura curvada devido a, possivelmente, dor abdominal causada pela exposição ao agente inflamatório. Relativamente ao estado mental (Tabela 11), do início ao final do ensaio verificámos que os murganhos adotavam comportamentos repetitivos,

denominados de “Comportamento estereotipado”. Este comportamento revela alterações no estado da saúde mental do animal induzidos por diferentes fatores.

Os restantes parâmetros não revelaram variações permanecendo com uma pontuação de zero em todos os grupos ao longo do período experimental.

Tabela 9 - Número e percentagem de animais com alterações no parâmetro "Olhos, Orelhas e Vibrissas".

Grupo	Olhos, Orelhas e Vibrissas												
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11	Semana 12	Semana 13
Controlo	0 (100%)	9 (100%)											
	1												
	2												
Induzido	0 (100%)	13 (100%)											
	1												
	2												
Induzido + 20%FFF	0 (100%)	12 (100%)											
	1												
	2												
Induzido + 50%FFF	0 (100%)	14 (100%)	14 (100%)	7 (50%)									
	1			7 (50%)									
	2												

Tabela 10 - Número e percentagem de animais com alterações no parâmetro "Postura".

Grupo	Postura												
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11	Semana 12	Semana 13
Controlo	0	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	8 (88,9%)	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)
	1									1 (11,1%)			
Induzido	0	13 (100%)	13 (100%)	13 (100%)	13 (100%)	13 (100%)	12 (92,3%)	11 (84,6%)	11 (84,6%)	13 (100%)	13 (100%)	13 (100%)	13 (100%)
	1						1 (7,7%)	2 (15,4%)	2 (15,4%)				
Induzido + 20%FFF	0	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)	11 (91,7%)	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)	11 (91,7%)	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)
	1				1 (8,3%)					1 (8,3%)			
Induzido + 50%FFF	0	14 (100%)	14 (100%)	14 (100%)	14 (100%)	12 (92,3%)	14 (100%)	14 (100%)	14 (100%)	9 (64,3%)	9 (64,3%)	13 (92,9%)	14 (100%)
	1					2 (14,3%)				5 (35,7%)	5 (35,7%)	1 (7,1%)	

Tabela 11 - Número e percentagem de animais com alterações no parâmetro "Estado mental".

Grupo	Estado mental												
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11	Semana 12	Semana 13
Controlo	0	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	7 (77,8%)	9 (100%)	7 (77,8%)	9 (100%)	7 (77,8%)	7 (77,8%)
	1	3 (33,3%)	3 (33,3%)	2 (22,2%)	3 (33,3%)	3 (33,3%)	3 (33,3%)	2 (22,2%)	3 (33,3%)	2 (22,2%)	3 (33,3%)	2 (22,2%)	2 (22,2%)
	2												
	3												
Induzido	0	13 (100%)	13 (100%)	10 (76,9%)	10 (76,9%)	10 (76,9%)	10 (76,9%)	11 (84,6%)	11 (84,6%)	11 (84,6%)	11 (84,6%)	11 (84,6%)	12 (92,3%)
	1			1 (7,7%)	3 (23,1%)	3 (23,1%)	3 (23,1%)	2 (15,4%)	2 (15,4%)	2 (15,4%)	2 (15,4%)	2 (15,4%)	1 (7,7%)
	2												
	3												
Induzido + 20%FFF	0	12 (100%)	11 (91,7%)	12 (100%)	9 (75%)	9 (75%)	8 (66,7%)	10 (83,3%)	10 (83,3%)	9 (75%)	9 (75%)	9 (75%)	7 (58,3%)
	1		1 (8,3%)		3 (25%)	3 (25%)	4 (33,3%)	2 (16,7%)	2 (16,7%)	3 (25%)	3 (25%)	3 (25%)	5 (41,7%)
	2												
	3												
Induzido + 50%FFF	0	14 (100%)	14 (100%)	13 (92,9%)	14 (100%)	12 (85,7%)	12 (85,7%)	13 (92,9%)	13 (92,9%)	13 (92,9%)	13 (92,9%)	13 (92,9%)	13 (92,9%)
	1			1 (7,1%)	1 (7,1%)	2 (14,3%)	2 (14,3%)	1 (7,1%)	1 (7,1%)	1 (7,1%)	1 (7,1%)	1 (7,1%)	1 (7,1%)
	2												
	3												

4.3. Análise histopatológica

Durante a necropsia, não foram observadas lesões macroscópicas no intestino (Figura 19). Na Tabela 12 estão identificadas as lesões proliferativas observadas no cólon e reto durante a avaliação histopatológica. O grupo controlo não apresentou qualquer tipo de lesão proliferativa (Fig. 20), enquanto os grupos induzidos apresentaram lesões displásicas (Fig. 21) e adenocarcinomas (Fig. 23 e 24), em percentagens semelhantes. O grupo induzido apresentou 5 (38,46%) animais com displasia e um animal (7,69%) com adenocarcinoma no reto. O grupo induzido + 20% FFF apresentou a maior percentagem de lesões face aos restantes grupos induzidos com 6/12 (50%) animais a exibirem lesões displásicas e 2/12 (16,67%) animais a apresentarem adenocarcinomas, também no reto. O grupo induzido + 50% FFF apresentou 5/14 (35,72%) animais com displasia epitelial e apenas um (7,14%) com adenocarcinoma no cólon.



Figura 19 - Aspeto macroscópico do cólon de murgancho do grupo controlo (A) e induzido (B), sem presença de alterações visíveis.

Tabela 12 - Lesões histopatológicas identificadas no intestino dos animais nos diferentes grupos experimentais.

Grupo	Normal	Displasia	Adenocarcinoma
Controlo	9 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Induzido	7 (53,85%)	5 (38,46%)	1 (7,69%)
Induzido + 20%FFF	4 (33,33%)	6 (50%)	2 (16,67%)
Induzido + 50%FFF	8 (57,14%)	5 (35,72%)	1 (7,14%)

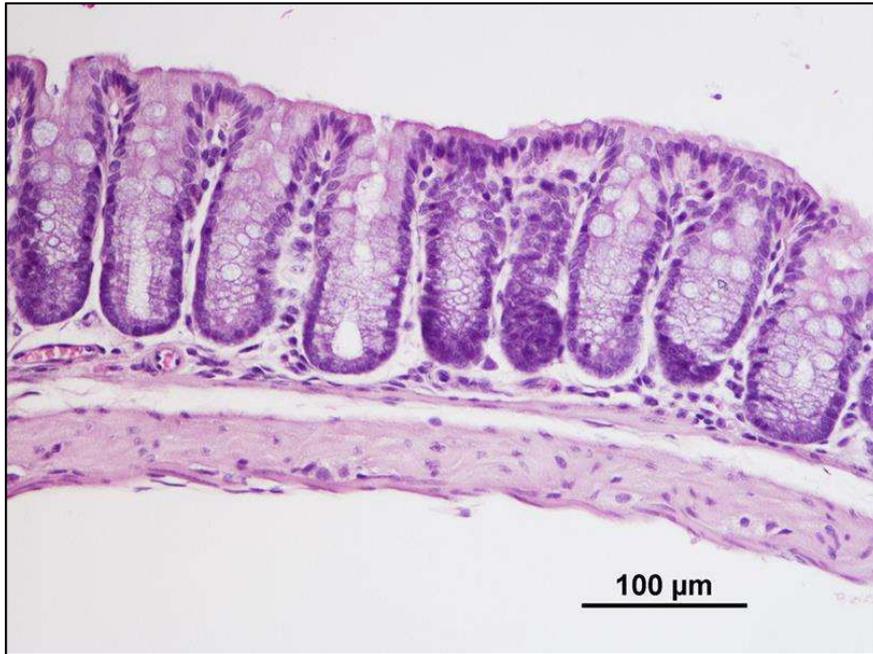


Figura 20 - Cólon de murganho sem alterações, grupo controlo (HE, 200x).



Figura 21 - Cólon de murganho com presença de infiltrado inflamatório ligeiro na mucosa, grupo induzido. (HE, 200x).

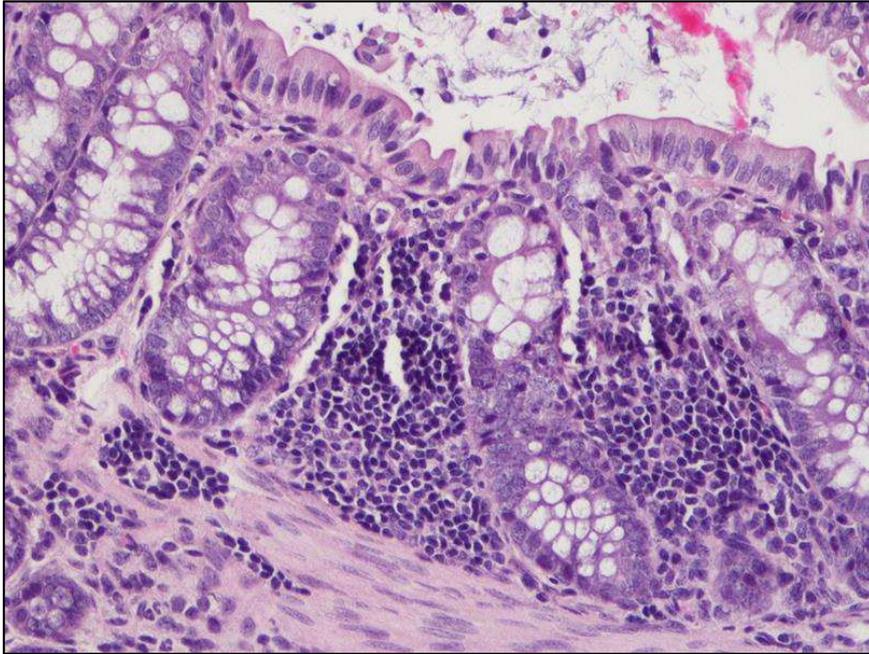


Figura 22 - Cólon de murganho com presença de infiltrado inflamatório moderado, associado a displasia, grupo induzido (HE, 200x).

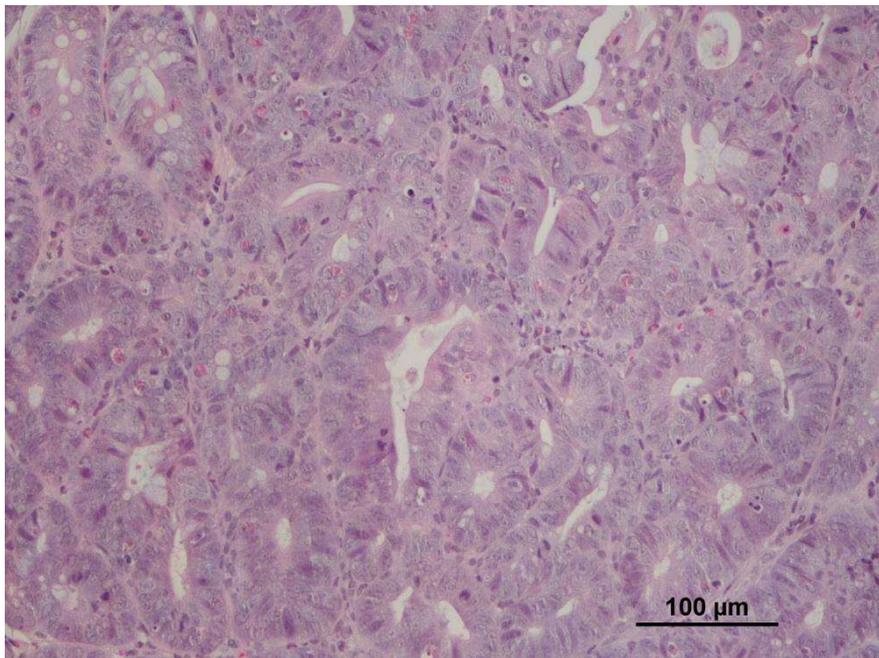


Figura 23 - Cólon de murganho: adenocarcinoma. Proliferação carcinomatosa de células epiteliais associadas a atipia citonuclear e presença de mitoses; grupo induzido + 50% FFF (HE, 200x).

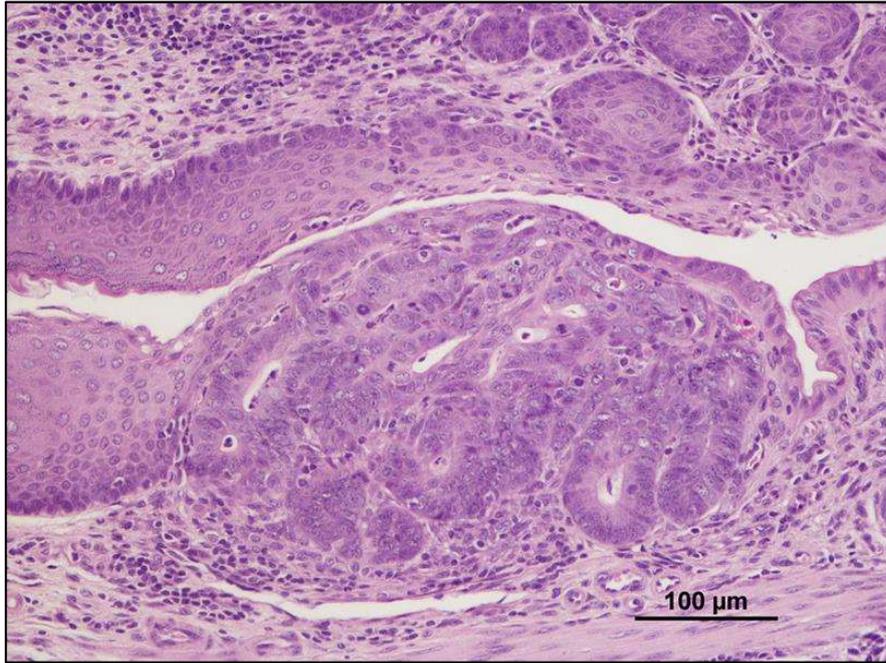


Figura 24 - Reto de murganho: adenocarcinoma. Proliferação carcinomatosa de células epiteliais associadas a atipia citonuclear, presença de mitoses e microinvasão do estroma adjacente, que apresenta inflamação e desmoplasia; grupo induzido (HE, 200x).

No que diz respeito à avaliação da inflamação no intestino, observou-se que a maioria dos animais apresentou algum grau de inflamação, sendo esta mais evidente e marcada nos grupos induzidos, sobretudo os suplementados com FFF 20% (Tabela 13). Enquanto o grupo controlo se caracterizou maioritariamente por inflamação ligeira da mucosa (Fig. 21), sem lesão epitelial, os restantes apresentaram na maioria dos casos inflamação moderada (Fig. 22), multifocal, ocasionalmente com extensão à submucosa. Não foi observada ulceração em nenhum grupo, sendo a lesão epitelial apenas observada nos grupos suplementados com FFF que, no entanto, apresentaram um grau leve de dano epitelial. Nenhum dos animais apresentou um processo inflamatório transmural ou difuso.

Tabela 13 - Avaliação do grau de inflamação do intestino nos diferentes grupos (média dos scores observados em cada grupo).

Grupo	Severidade	Profundidade	Dano epitelial	Extensão
Controlo	0,88±0,600	0,33±0,500	0±0,00	0±0,00
Induzido	1,42±0,515	1±0,00	0±0,00	1,67±0,492
Induzido + 20%FFF	1,67±0,492	1,67±0,492	0,67±0,985	1,83±0,389
Induzido + 50%FFF	1,57±0,646	1,36±0,497	0,36±0,633	1,86±0,363

Ocasionalmente, os restantes órgãos (pulmão, fígado, rim) apresentaram escassos focos de infiltrado inflamatório mononuclear (inferior a 5 focos), tanto nos grupos controlo como induzidos, com ou sem suplementação.

4.4. Imunohistoquímica

4.4.1. Ki-67

Na Tabela 14 está representada a média percentual de células epiteliais marcadas positivamente com Ki-67 no cólon. Sete casos foram excluídos, porque não apresentavam qualquer marcação (Figura 25). Verificou-se que este anticorpo também marcava algumas células inflamatórias (linfócitos e plasmócitos) e que a maioria das células positivas apresentavam figuras de mitose.

Os grupos induzidos com suplementação apresentaram a maior taxa de proliferação, em especial o grupo induzido + 20% FFF (Figura 26), com a média de 2,24% (erro padrão de 0,5997.) Contudo, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Tabela 14 - Média percentual de células marcadas com Ki-67 por murganho nos 4 grupos experimentais.

Grupo	Ki-67 Positivo (% ± erro padrão)
Controlo	1,3689±0,1938
Induzido	0,9846±0,1155
Induzido + 20%FFF	2,2429±0,5997
Induzido + 50%FFF	1,5564±0,4027

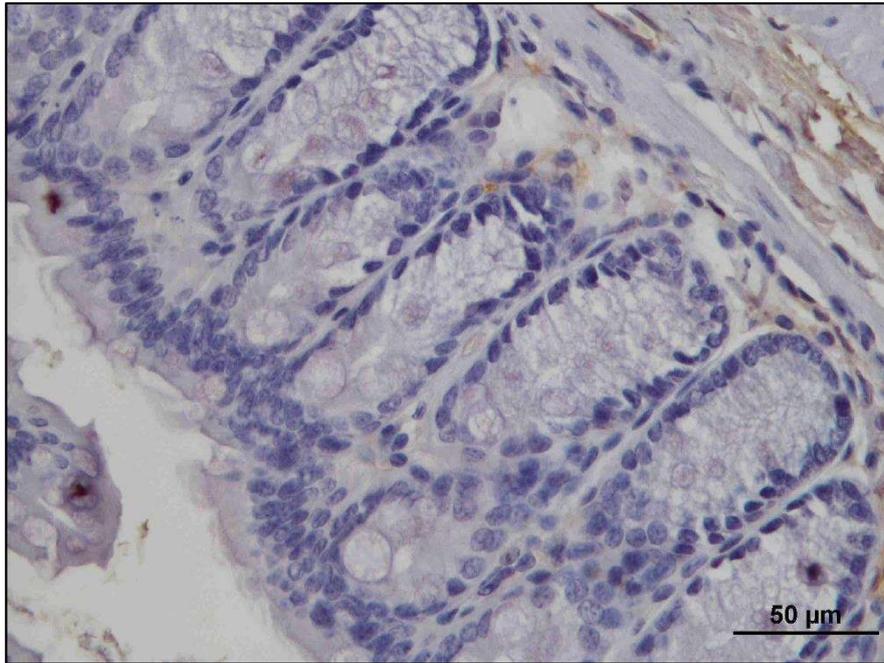


Figura 25 - Cólon de murganho: imunomarcção negativa para o Ki-67, grupo controlo (Hematoxilina de Gill,400x).

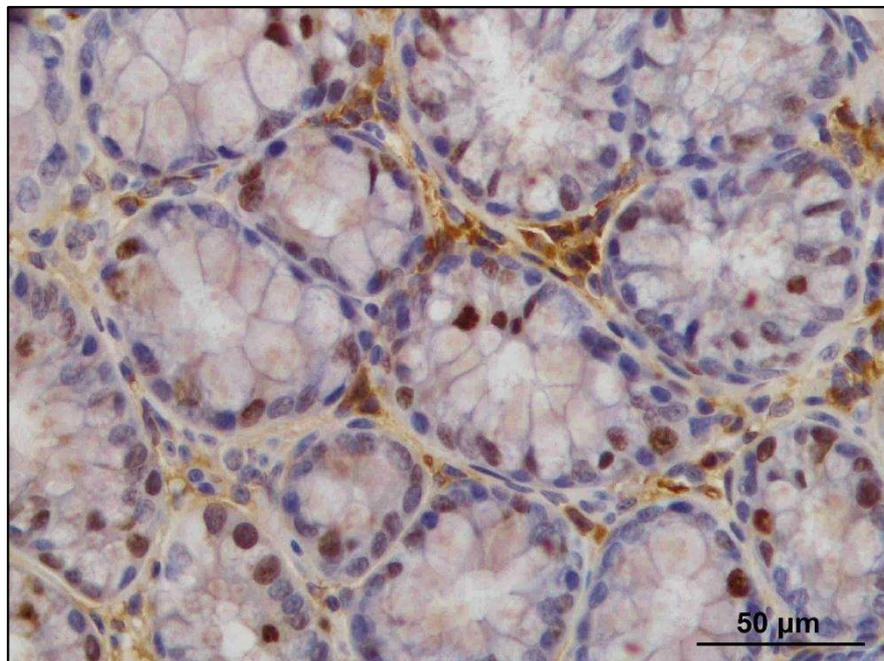


Figura 26 - Cólon de murganho: imunomarcção positiva para o Ki-67, grupo Induzido + 20%FFF (Hematoxilina de Gill, 400x).

4.5. Parâmetros de genotoxicidade

4.5.1. Ensaio cometa em sangue

A Figura 27 corresponde aos resultados obtidos pelo ensaio cometa com e sem o uso da enzima FPG. O ensaio cometa sem enzima permitiu detetar o dano basal (azul), enquanto o ensaio cometa com FPG permitiu detetar o dano oxidativo juntamente com o dano basal. O uso da enzima permite determinar o dano oxidativo (laranja) através da diferença do resultado do ensaio cometa com enzima e sem enzima.

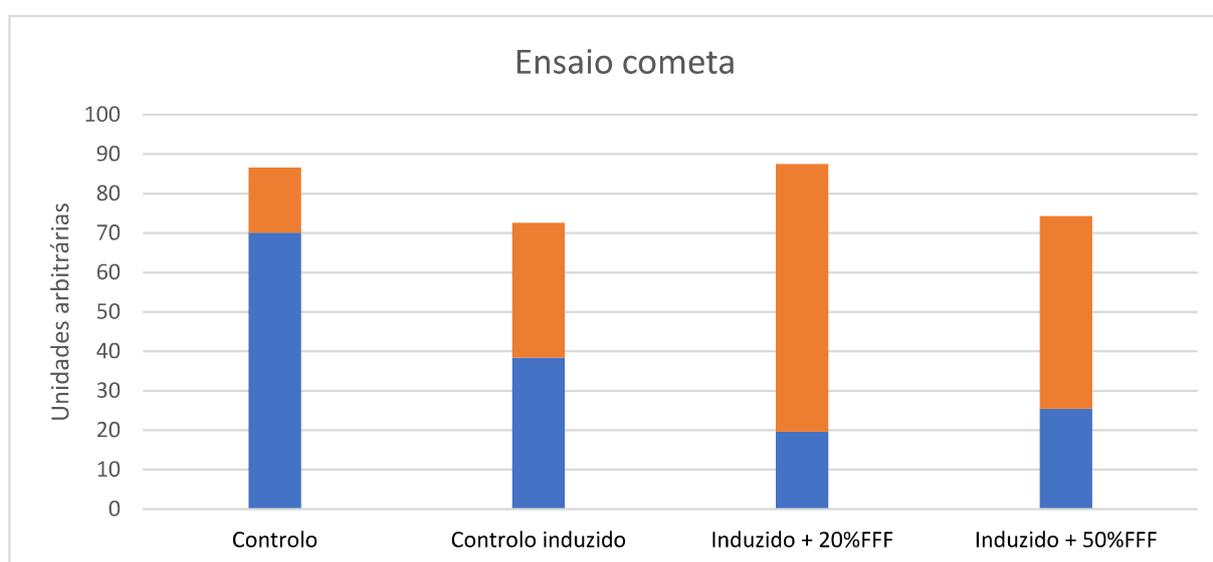


Figura 27 - Representação da média de dano basal e dano oxidativo por grupo em unidades arbitrárias (UA).

Relativamente aos resultados obtidos das amostras sem tratamento enzimático, ou seja, referentes ao dano basal, o valor médio para o grupo controlo foi de 70 UA, de 38,4 UA para o grupo controlo induzido, de 19,6 UA para o grupo induzido + 20% FFF e de 25,4 UA para o grupo induzido + 50% FFF, com erro padrão de 5,35, 3,57, 2,10 e 1,55, respetivamente.

Relativamente ao dano oxidativo calculado, obtido a partir das amostras com FPG, o valor médio para o grupo controlo foi 17 UA, de 34,2 UA para o grupo controlo induzido, de 67,9 UA para o grupo induzido + 20% FFF e de 48,9 UA para o grupo induzido + 50% FFF, com erro padrão de 12,92, 10,66, 7,80 e 12,38, respetivamente.

Não se verificam quaisquer diferenças significativas entre grupos relativamente aos danos oxidativos. No entanto, nos resultados obtidos sem FPG (dano basal) verificam-se diferenças

significativas entre o grupo controlo em relação ao grupo induzido + 50% FFF ($p < 0,05$) e em relação ao grupo induzido + 20% FFF ($p < 0,05$).

Página propositadamente deixada em branco

5. Discussão

O CCR é um dos maiores problemas de saúde nos países industrializados, sendo importante definir não só estratégias terapêuticas, mas também preventivas, tal como a prática de uma dieta saudável.

A dieta tem um papel muito importante no desenvolvimento do CCR. Nos últimos tempos, foram feitas descobertas resultantes de uma investigação experimental e epidemiológica, que ligaram o consumo de vários alimentos e nutrientes ao risco de CCR (Song *et al.*, 2015). Integrantes de uma dieta saudável fazem parte o cálcio, a fibra, o leite e o grão integral, relacionados com um menor risco de desenvolver CCR, enquanto o consumo de carne vermelha e/ou processada se encontra associado a um risco acrescido de desenvolver esta neoplasia (Aune *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2015). Após avaliar 11 meta-análises relativamente à relação entre o consumo de carne vermelha e o risco de CCR, Aykan (2015) concluiu que o consumo de carne vermelha e processada aumenta entre 20% a 30% a probabilidade de desenvolver esta neoplasia. A dieta influencia a carcinogénese colorretal através da interação com vários mecanismos. Estes incluem os efeitos diretos na capacidade de resposta imune e inflamação, e os efeitos indiretos da sobrenutrição e obesidade, considerados fatores de risco para o CCR. Estão publicados vários estudos que confirmam os potenciais efeitos preventivos de determinados constituintes da dieta, tais como frutas e legumes (Sofi *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2015).

Zhu e colaboradores realizaram uma meta-análise com o intuito de esclarecer a relação controversa entre o consumo de legumes e a diminuição do risco de CCR. Estes autores concluíram existir uma relação direta entre o consumo de legumes, particularmente legumes ricos em fibras como as leguminosas (soja, feijão, feijão frade, entre outros) e a diminuição do risco de CCR. No entanto, destacam a necessidade de realizar mais estudos para consolidar e validar esta associação, de forma a assegurar uma melhor definição dos ingredientes a incluir na dieta (Zhu *et al.*, 2015).

O mecanismo subjacente ao possível efeito protetor da ingestão de legumes relativamente ao risco de CCR é complexo devido à grande variedade de interações das propriedades anticancerígenas presentes nos legumes. Os flavonoides são os compostos com propriedades anticancerígenas mais importante dos legumes, especialmente as isoflavonas. Os flavonoides presentes nos vegetais inibem o crescimento de células tumorais interferindo na actividade da

proteína cinase envolvida na regulação da proliferação celular e apoptose (Akiyama *et al.*, 1987; Constantinou *et al.*, 1990). Os vegetais são boas fontes de proteína, vitamina E, vitamina B, selênio e lignano com potenciais efeitos cancerígenos preventivos. Os vegetais possuem um elevado teor em vitamina B6 e foi reportado que a sua ingestão consegue reduzir o risco de CCR (Jang *et al.*, 2001; Larsson *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2015).

O feijão-frade e as propriedades dos seus componentes foram objetivo de estudo em vários trabalhos dada a natureza dos seus efeitos, tal como a ação hipocolesterolémica, antidiabética, anti-inflamatória, anti-hipertensa e, sobretudo, a atividade anticancerígena. A actividade anticancerígena foi confirmada por Joanitti e seus colaboradores, ao usarem um inibidor de protease Bowman–Birk purificado a partir do feijão-frade numa linha celular de cancro da mama (MCF-7), onde demonstrou efeito citostático e citotóxico provavelmente associado à indução de apoptose (Joanitti *et al.*, 2010). Por outro lado, as propriedades antioxidantes do feijão-frade foram exploradas por Nassourou e sua equipa através do estudo do genoma da semente e do seu conteúdo em flavonoides, mostrando até ser possível escolher as sementes com maior potencial antioxidante para o interesse do produto (Nassourou *et al.*, 2016). Os antioxidantes protegem as células do stresse oxidativo que pode iniciar e promover a carcinogénese induzindo mutações genéticas, danos no ADN, instabilidade do genoma, proliferação celular e inflamação (Song *et al.*, 2015). A elevada capacidade antioxidante e restantes vantagens associadas ao consumo de feijão-frade fazem desta leguminosa o candidato ideal para a prevenção do dano no ADN.

Considerando os pressupostos anteriores, este trabalho foi delineado com o objetivo de avaliar os efeitos da introdução do feijão-frade na dieta de murganhos fêmeas FVB/n num modelo animal de indução química do CCR. O modelo de indução AOM/DSS tem demonstrado ser um método eficaz para investigar a patogenia e a quimioprevenção da carcinogénese do cólon. Pode ainda ser usado em diversas situações, permitindo uma fácil deteção de agentes carcinogénicos ambientais (Mirvish *et al.*, 2002), modificadores de risco tumoral (Hata *et al.*, 2006), bem como o estudo do efeito de novos agentes quimiopreventivos (Kohno *et al.*, 2006) contra o CCR (Rosenberg *et al.*, 2009).

A estirpe de rato FVB/n foi selecionada devido à sua boa suscetibilidade para o desenvolvimento de tumores. Estudos realizados verificaram que após a indução química com AOM/DSS, todos os murganhos desenvolveram adenocarcinomas no cólon distal, semelhantes aos observados em pacientes com CCR, tornando esta estirpe ideal para a experimentação em CCR (Barderas *et al.*, 2013). Tendo em conta o nosso conhecimento e através de várias

pesquisas bibliográficas exaustivas assumimos que este é o primeiro trabalho experimental em que se avalia o efeito do feijão-frade *in vivo* em murganhos FVB/n fêmeas induzidos quimicamente com CCR.

Verificámos que a média da massa corporal dos animais em todos os grupos aumentou durante a experiência; a alteração à dieta e carcinogénese a que foram sujeitos não interferiu na fisiologia normal dos animais. Este é um parâmetro importante a avaliar para compreender o impacto dos procedimentos realizados nos animais (Faustino-Rocha *et al.*, 2019). O grupo induzido + 50%FFF apresentou o maior aumento de massa corporal ao longo do ensaio. Já o grupo induzido + 20%FFF apresentou o maior consumo médio de comida e água ao longo do ensaio, não se verificando diferenças estatisticamente significativas entre grupos. No entanto, quando foi adicionado DSS à água, verificou-se um aumento estatisticamente significativo no consumo de água, principalmente na terceira exposição ao DSS. A diferença estatisticamente significativa obtida em comparação com o grupo controlo, vem contrariar o que Benoit Chassaing e os seus colaboradores concluem no seu estudo sobre o uso de DSS na indução de colites em murganhos, obtendo valores semelhantes no consumo de água com DSS entre o grupo controlo e os expostos ao DSS (Chassaing *et al.*, 2014). Se seguirmos os valores de consumo médio de água e comida, tal como a massa corporal média da estirpe FVB/n definida por Bachmanov e os seus colaboradores, podemos assumir que os nossos resultados estão dentro dos parâmetros normais da estirpe (Bachmanov *et al.*, 2002). Verificámos uma média da massa relativa do colon superior, estatisticamente significativa, entre o grupo induzido + 20%FFF e os restantes grupos. Uma vez que o grupo induzido + 20%FFF apresentou níveis de inflamação mais elevados e maior número de lesões observadas por grupo (apesar de não macroscópicas), o aumento da média da massa relativa do colon é coerente com as lesões histopatológicas identificadas.

A análise dos *endpoints* foi introduzida para controlar o bem-estar dos animais durante o protocolo experimental. Não foram observadas alterações suficientes (*score*>4) nos parâmetros alterados dos animais que justificasse a eutanásia dos mesmos antes da data prevista para termino da experiência. As alterações observadas na postura dos animais são, na nossa opinião, a reação à exposição ao DSS, que provoca dor abdominal e desconforto, induzindo a postura curvada dos animais. As alterações no estado mental são comuns e devem-se essencialmente à idade dos animais e indução/aumento de stresse, que é influenciado pelo número de murganhos por gaiola, manuseamento ou falta de enriquecimento ambiental. Vöikar e a sua equipa fizeram um estudo sobre o comportamento de várias estirpes e resposta comportamental em situações

de ansiedade, concluindo que a estirpe FVB/n apresentava hiperatividade espontânea quando exposta aos diferentes testes realizados no estudo comportamental (Võikar *et al.*, 2001). Relativamente ao parâmetro olhos, orelhas e vibrissas, foram apenas observadas alterações num grupo (induzido + 50% FFF), mais precisamente numa só gaiola, onde o comportamento barbeiro típico dos murganhos levou a que todos os murganhos da gaiola perdessem as vibrissas. Relativamente à temperatura corporal, medida com o auxílio de um termómetro digital de infravermelhos, concluímos que a determinação deste parâmetro através desta metodologia impede a obtenção de resultados fiáveis, porque os animais são muito agitados e a distância de colocação do mesmo junto ao animal inviabiliza uma determinação precisa. Devido à inexistência de estudos sobre *endpoints* usando a mesma estirpe e procedimento experimental semelhante, não foi possível estabelecer uma comparação dos resultados obtidos neste estudo, com outros realizados previamente.

A análise histológica ao intestino permitiu identificar lesões microscópicas proliferativas no cólon e reto de murganhos dos grupos induzidos. Porém, não foi identificada qualquer lesão macroscópica quer no grupo controlo quer nos grupos induzidos. Os grupos induzidos com AOM/DSS, com ou sem a adição de feijão-frade à dieta, apresentaram lesões displásicas e adenocarcinomas, em percentagens semelhantes, tendo o grupo induzido + 20%FFF maior percentagem de lesões face aos restantes grupos induzidos. A presença de lesões demonstra que o AOM é eficaz na carcinogénese do CCR em conjunto com o agente inflamatório DSS. Relativamente ao número de administrações e à dose de AOM, assim como à concentração de DSS (1,5%) e o ciclo de administrações, consideramos que o objetivo da indução foi atingido; no entanto, apenas foi possível identificar lesões microscópicas e nem todos os animais induzidos apresentaram lesões. O protocolo de indução usado tinha como objetivos diminuir o stresse, desconforto e taxa de mortalidade. Para observarmos lesões macroscópicas poderíamos optar por seguir a metodologia de investigadores como Choi e colaboradores, que optaram por administrar uma injeção via intraperitoneal (i.p.) de AOM numa dose 10 mg/kg, seguida da exposição do DSS diluído em água a 2,5% durante sete dias, obtendo-se assim lesões macroscópicas e microscópicas (Choi *et al.*, 2017). Em alternativa, poderíamos manter todo o modelo de indução usado e adiar o sacrifício dos animais para mais tarde. Os resultados relativos à inflamação do intestino mostram que a maior parte dos animais apresentou algum grau de inflamação, sendo esta mais evidente e marcada nos grupos induzidos, sobretudo os suplementados com FFF 20%. Teoricamente, os grupos onde foi usada a dieta com feijão-frade, legume que deveria agir como protetor intestinal, apresenta valores superiores ao grupo

induzido sem suplementação de FFF, o que contraria a literatura e resultados de outros investigadores. Novos estudos são necessários para garantir a eficácia da metodologia utilizada.

O Ki-67 foi utilizado para avaliar o índice de proliferação na mucosa colónica e avaliar se a ingestão de dieta suplementada com FFF influencia a sua proliferação (Bird *et al.*, 1987; Siu *et al.*, 1997; Papanikolaou *et al.*, 2000; Nambiar *et al.*, 2003). Os nossos resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, porém o grupo induzido + 20% FFF, apresentou a maior média percentual de células epiteliais marcadas positivamente com Ki-67. Verificámos que o clone do anticorpo usado também marcava algumas células inflamatórias (linfócitos e plasmócitos), estroma e que a maioria das células positivas se encontravam em mitose, pelo que o anticorpo poderá não estar a detetar todas as células em proliferação. Consideramos que devem ser realizados novos testes com um novo anticorpo para se obterem resultados mais coerentes.

Relativamente ao ensaio cometa, os resultados obtidos não foram muito precisos, pelo que deveriam ter sido analisadas mais lâminas. No caso dos valores obtidos no ensaio cometa sem enzima, eram esperados valores superiores nos grupos induzidos, verificando-se o oposto, uma vez que se observaram valores muito superiores no grupo controlo. Quanto ao ensaio cometa com enzima FPG, os valores obtidos são mais coerentes; uma vez que a indução carcinogénica leva ao aumento do dano oxidativo, verificou-se um aumento considerável nos danos do ADN face ao dano basal nos grupos induzidos, quando em comparação com o grupo controlo. Relativamente às diferenças significativas observadas no ensaio cometa sem FPG, entre o grupo controlo e os grupos induzido + 50% FFF ($p < 0,0001$) e induzido + 20% FFF ($p < 0,0001$), não é possível retirar conclusões concretas, uma vez que os grupos apresentam mais do que uma variável, nomeadamente a indução do CCR e a alteração da dieta, quando comparados ao grupo controlo. Estudos prévios realizados pelo nosso grupo demonstraram que a suplementação de 70% de feijão-frade na dieta do murgancho macho ICR não causa danos estatisticamente significativos no ADN, o que nos leva a concluir que o dano observado pode ser maioritariamente causado pela indução carcinogénica e não pela introdução do feijão-frade na dieta do murgancho. No entanto, num ensaio realizado por Azevedo e colaboradores verificou-se que a administração de 1%, 10% e 20% de feijão preto em murganchos macho induzia danos no ADN (Azevedo *et al.*, 2003), valores percentuais muito inferiores aos testados pelo nosso grupo.

Relativamente às propriedades anticancerígenas do feijão-frade, no presente estudo não são manifestados quaisquer efeitos anticancerígenos, uma vez que não existem diferenças

estatisticamente significativas entre o grupo induzido e os grupos induzidos + 20% e 50% de feijão-frade. No entanto, serão necessários novos estudos para esclarecer os potenciais efeitos anticancerígenos *in vivo*.

6. Conclusões

Neste trabalho pretendeu avaliar-se os efeitos da introdução do feijão-frade na dieta de um modelo animal com CCR induzido quimicamente pela conjugação AOM/DSS. Para tal foi utilizado o modelo animal FVB/n (fêmea). Podemos concluir:

- Nos parâmetros fisiológicos verificámos um maior consumo médio de água e comida no grupo induzido + 20%FFF. O grupo induzido + 50%FFF apresentou o maior aumento da média da massa corporal ao longo do ensaio experimental. Os *end points* escolhidos foram adequados ao ensaio, não sendo verificadas diferenças estatisticamente significativas entre grupos;

- A nível histológico, foi possível induzir lesões displásicas e carcinomas no cólon dos murganhos FVB/n (fêmea) expostos ao AOM/DSS, confirmando o processo de indução de CCR. No entanto, não foram observadas lesões macroscópicas. O grau de inflamação observado no cólon foi maior no grupo induzido + 20%FFF.

- A nível imunohistoquímico, a utilização do marcador Ki-67 permitiu determinar o índice de proliferação celular associado à adição de feijão-frade à dieta;

- A nível genotóxico, o ensaio do cometa revelou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre grupos, com ou sem a adição de feijão-frade à dieta.

- De um modo geral, realização deste trabalho permitiu concluir que a suplementação de feijão-frade à dieta dos murganhos não teve efeitos significativos, quer positivos, quer negativos, na progressão do CCR.

- Consideramos serem necessárias novas investigações neste modelo de CCR, eventualmente alterando doses do composto carcinogénico, tempo de exposição ao agente inflamatório, momento do sacrifício ou a concentração de feijão-frade usado.

Página propositadamente deixada em branco

7. Referências bibliográficas

- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. e Fukami, Y. (1987).** Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *The Journal of biological chemistry*, v. 262, p. 5592–5595.
- Aune, D., Chan, D.S., Vieira, A.R., Rosenblatt, D.A.N., Vieira, R., Greenwood, D. C., Kampman, E., e Norat, T. (2013).** Red and processed meat intake and risk of colorectal adenomas: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Cancer causes and control*, v. 24, p. 611–627.
- Aykan N. F. (2015).** Red Meat and Colorectal Cancer. *Oncology reviews*, v. 9, p. 288.
- Azevedo, L., Gomes, J.C., Stringheta, P.C., Gontijo, Á.M.M.C., Padovani, C.R., Ribeiro, L.R. e Salvadori, D.M.F (2003).** Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against ADN damage in mice. *Food and Chemical Toxicology*, v. 41, p. 1671-1676.
- Bachmanov, A. A., Reed, D. R., Beauchamp, G. K., e Tordoff, M. G. (2002).** Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains. *Behavior genetics*, v. 32, p. 435–443.
- Barderas, R., Villar-Vázquez, R., Fernández-Aceñero, M.J., Babel, I., Peláez-García, A., Torres, S. e Casal, J.I. (2013).** Sporadic colon cancer murine models demonstrate the value of autoantibody detection for preclinical cancer diagnosis. *Scientific Reports*, v. 3, p. 2938.
- Betti, C., Davini, T., Giannesi, L., Loprieno, N. e Barale, R. (1994).** Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutation Research*, v. 307, p. 323-33.
- Bialkowska, A.B., Ghaleb, A.M., Nandan, M.O. e Yang, V.W. (2016).** Improved Swiss-rolling Technique for Intestinal Tissue Preparation for Immunohistochemical and Immunofluorescent Analyses. *Journal of visualized experiments*, p.54161.
- Bird, R.P. (1987).** Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen. *Cancer Letters*, v. 37, p.147-151.
- Bobé, G., Barrett, K.G., Mentor-Marcel, R.A., Saffiotti, U., Young, M.R., Colburn, N.H. e Lanza, E. (2008).** Dietary Cooked Navy Beans and Their Fractions Attenuate Colon Carcinogenesis in Azoxymethane-Induced Ob/ob Mice. *Nutrition and Cancer*, v. 60, p. 373–381.

- Boivin, G.P., Washington, K., Yang, K., Ward, J.M., Pretlow, T.P. e Russell, R. (2003).** Pathology of mouse models of intestinal cancer: Consensus report and recommendations. *Gastroenterology*, v. 124 p. 762-777.
- Botelho, M.C., Teixeira, J.P. e Oliveira, P.A. (2014).** Carcinogenesis. In: P. Wexler (ed.), *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*. Academic Press, Oxford.
- Boyle, P. e Levin, B. (2008).** World cancer report 2008. Lyon, France: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer.
- Brown, D.C. e Gatter, K.C. (2002).** Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology*, v. 40, p. 2-11.
- Caderni, G., Femia, A.P., Giannini, A., Favuzza, A., Luceri, C., Salvadori, M. (2003).** Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: correlation with carcinogenesis. *Cancer Research*, v. 63, p. 2388-2392.
- Camp, R.L., Neumeister, V. e Rimm, D.L. (2008).** A decade of tissue microarrays: progress in the discovery and validation of cancer biomarkers. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, v. 26, p. 5630-5637.
- Cekanova, M. e Rathore, K. (2014).** Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 8, p. 1911.
- Chandra, P.K., Datta, A. e Mondal, D. (2020).** Chapter 5 - Development of Mouse Models for Cancer Research. *in Animal Biotechnology (Second Edition)*, p. 77–102.
- Chassaing, B., Aitken, J.D., Malleshappa, M., e Vijay-Kumar, M. (2014).** Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Current protocols in immunology*, v. 104, p. 15.25.1–15.25.14.
- Choi, Y.J., Choi, Y.J., Kim, N., Nam, R.H., Lee, S., Lee, H.S., Lee, H.N., Surh, Y.J. e Lee, D.H. (2017).** Açai Berries Inhibit Colon Tumorigenesis in Azoxymethane/Dextran Sulfate Sodium-Treated Mice. *Gut and liver*, v. 11, p. 243–252.
- Church, E.M., Mehlhaff, C.J. e Patnaik, A.K. (1987).** Colorectal adenocarcinoma in dogs: 78 cases (1973–1984). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 191, p. 727–730.
- Ciancio, N., Galasso, M.G., Campisi, R., Bivona, L., Migliore, M. e Di Maria, G.U. (2012).** Prognostic value of p53 and Ki67 expression in fiberoptic bronchial biopsies of patients with non-small cell lung cancer. *Multidisciplinary Respiratory Medicine*, v. 7, p. 29.

- Cole, L. e Kramer, P.R. (2016).** Chapter 6.3 - Human Cancers and Carcinogenesis. In: L. Cole and P. R. Kramer (eds.), *Human Physiology, Biochemistry and Basic Medicine*. Academic Press, Boston.
- Collins, A.R. (2009).** Investigating oxidative ADN damage and its repair using the comet assay. *Mutation Research*, v. 681, p. 24-32.
- Collins, A.R., (2004).** The comet assay for ADN damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*, v. 26, p. 249–61.
- Collins, A.R., Duthie, S.J. e Dobson, V.L. (1993).** Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, v. 14, p. 1733–1735.
- Constantinou, A., Kiguchi, K. e Huberman, E. (1990).** Induction of differentiation and DNA strand breakage in human HL-60 and K-562 leukemia cells by genistein. *Cancer research*, v. 50, p. 2618–2624.
- Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N. e Berliner, E. (1942).** The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *Journal of Immunology*, v. 45, p. 159-70.
- Cook, P.R., Brazell, I.A., e Jost, E. (1976).** Characterization of nuclear structures containing superhelical ADN. *Journal of Cell Science*, v. 22, p.303–324.
- Cribb, A.E. (1988).** Feline gastrointestinal adenocarcinoma: a review and retrospective study. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 29, p. 709–712.
- Doak, S.H., Liu, Y. e Chen, C. (2017).** Chapter 18 - Genotoxicity and Cancer, *In: Adverse Effects of Engineered Nanomaterials (Second Edition)*, p. 423–445.
- Dowsett, M., Nielsen, T.O., A’Hern, R., Bartlett, J., Coombes, R.C., Cuzick, J., Ellis, M., Henry, N.L., Hugh, J.C., Lively, T., McShane, L., Paik, S., Penault-Llorca, F., Prudkin, L., Regan, M., Salter, J., Sotiriou, C., Smith, I. E., Viale, G., Zujewski, J. A. e Hayes, D.F. (2011).** Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 103, p. 1656-1664.
- Fagundes, D.J., e Taha, M.O. (2004).** Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cirurgica Brasileira*, v.19, p. 59-65.
- Faustino-Rocha, A.I., Ginja, M., Ferreira, R. e Oliveira, P.A. (2019).** Studying humane endpoints in a rat model of mammary carcinogenesis, *Iranian journal of basic medical sciences*, v. 22, p. 643-649.

- Fazio, V. De Robertis, M., Massi, E., Poeta, M.L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L. e Signori, E. (2011).** The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *Journal of Carcinogenesis*, v. 10, p. 9.
- Fearon, E.R. e Vogelstein, B. (1984).** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, v. 61, p. 759-767.
- Fernandes, L.C. e Matos, D. (2002).** Marcadores tumorais no câncer colorretal. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 29, p. 106-111.
- Frota, K.M.G., Soares, R.A.M. e Arêas, J.A.G. (2008).** Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. *Food Science and Technology*, v. 28, p. 470-476.
- GLOBOCAN. (2018).** Global Cancer Observatory: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence in Portugal. (<http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-populations?population=620&sex=0#collapse1>) Consultado a 29 de setembro de 2019.
- Gontijo, A.M.M.C. e Tice, R. (2003).** Teste do cometa para a detecção de dano no ADN e reparo em células individualizadas. *Canoas. Ulbra*, p. 173-200.
- Half, E., Bercovich, D. e Rozen, P (2009).** Familial adenomatous polyposis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v. 4, p. 22.
- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G. e Thybaud V. (2003).** Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, v.18, p. 45-51.
- Hata, K., Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Qiang, S.H., Yamada, Y., Oyama, T., Kuno, T., Hirose, Y., Hara A., e Mori, H. (2006).** beta-Catenin-accumulated crypts in the colonic mucosa of juvenile *ApcMin/+* mice. *Cancer Letters*, v. 239, p. 123-128.
- Hooghe, B., Hulpiau, P., Van Roy, F. e De Bleser, P. (2008).** ConTra: a promoter alignment analysis tool for identification of transcription factor binding sites across species. *Nucleic acids research*, v. 36, p. 128-132.
- Hünerbein, M. (1998).** The value of tumor markers in colorectal cancer. *Cancer Research*, v. 146, p. 48-55.
- Ishihara, M., Mukai, H., Nagai, S., Onozawa, M., Nihei, K., Shimada, T. e Wada, N. (2013).** Retrospective analysis of risk factors for central nervous system metastases in operable breast cancer: effects of biologic subtype and Ki67 overexpression on survival. *Oncology*, v. 84, p. 135-140.

- Jang, Y., Lee, J. H., Kim, O.Y., Park, H.Y. e Lee, S.Y. (2001).** Consumption of whole grain and legume powder reduces insulin demand, lipid peroxidation, and plasma homocysteine concentrations in patients with coronary artery disease: randomized controlled clinical trial. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 21, p. 2065–2071.
- Jayathilake, C., Visvanathan, R., Deen, A., Bangamuwage, R., Jayawardana, B.C., Nammi, S. e Liyanage, R. (2018).** Cowpea: an overview on its nutritional facts and health benefits. *Journal of the science of food and agriculture*, v. 98, p. 4793-4806.
- Joanitti, G.A., Azevedo, R.B. e Freitas, S.M. (2010).** Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman–Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. *Cancer Letters*, v. 293, p. 73–81.
- Johnson, R.L. e Fleet, J.C. (2013).** Animal Models of Colorectal Cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, v. 32, p. 39–61
- Jonat, W. e Arnold, N. (2011).** Is the Ki-67 labelling index ready for clinical use? *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, v. 22, p. 500-502.
- Josefsson, A., Wikstrom, P., Egevad, L., Granfors, T., Karlberg, L., Stattin, P. e Bergh, A. (2012).** Low endoglin vascular density and Ki67 index in Gleason score 6 tumours may identify prostate cancer patients suitable for surveillance. *Scandinavian journal of urology and nephrology*, v. 46, p. 247-257.
- Kalyuzhny, A.E. (2016).** Immunohistochemistry: Essential. Elements and Beyond. 1st ed. Switzerland: Springer, p. 49-61
- Kammann, U., Bunke, M. e Steinhart, H. (2001).** A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 498, p. 61-77.
- Kinzler, K.W. e Vogelstein B. (1996).** Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, v. 87, p. 159-170.
- Kloppel, G., Perren, A. e Heitz, P.U. (2004).** The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1014, p. 13-27.
- Kobaek-Larsen, M., Thorup, I., Diederichsen, A., Fenger, C. e Hoitinga, M.R. (2000).** Review of colorectal cancer and its metastases in rodent models: comparative aspects with those in humans. *Comparative medicine*, v. 50, p.16-26.

- Kohno, H., Suzuki, R., Curini, M., Epifano, F., Maltese, F., Gonzales, S.P. e Tanaka, T. (2006).** Dietary administration with prenyloxycoumarins, auraptene and collinin, inhibits colitis-related colon carcinogenesis in mice. *International journal of cancer*, v. 118, p. 2936-2942.
- Konsti, J., Lundin, M., Joensuu, H., Lehtimäki, T., Sihto, H., Holli, K., Turpeenniemi-Hujanen, T., Kataja, V., Sailas, L., Isola, J. e Lundin, J. (2011).** Development and evaluation of a virtual microscopy application for automated assessment of Ki-67 expression in breast cancer. *BMC Clinical Pathology*, v. 11, p. 3.
- Kosmider, S. e Lipton, L. (2007).** Adjuvant therapies for colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, v. 13, p. 3799-3805.
- Kwong, L. N. e Dove, W. F. (2009).** APC and its modifiers in colon cancer. *Advances in experimental medicine and biology*, v. 656, p. 85-106.
- Larsson, S.C., Orsini, N. e Wolk, A. (2010).** Vitamin B6 and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Journal of the American Medical Association*, v. 303, p. 1077-1083.
- Leslie, A. e Steele, R.J. (2002).** Management of colorectal cancer. *Postgraduate Medical Journal*, v. 78, p. 473-478.
- Li, L.T., Jiang, G., Chen, Q. e Zheng, J.N. (2015).** Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Molecular medicine reports*, v. 11, p. 1566-1572.
- Li, X., Xu, X., Ji, T., Liu, Z., Gu, M., Hoang, B. H., e Zi, X. (2014).** Dietary feeding of Flavokawain A, a Kava chalcone, exhibits a satisfactory safety profile and its association with enhancement of phase II enzymes in mice. *Toxicology reports*, v. 1, p. 2-11.
- Lynch, H.T., Smyrk, T. e Lynch, J.F. (1996).** Overview of natural history, pathology, molecular genetics and management of HNPCC (Lynch syndrome). *International Journal of Cancer*, v. 69, p. 38-43.
- Machado, V.F., Feitosa, M.R., da Rocha, J.J.R. e Féres, O. (2016).** A review of experimental models in colorectal carcinogenesis. *Journal of Coloproctology*, v. 36, p. 53-57.
- Matos, A. (2012).** *Carcinoma Retal: Diagnóstico e Tratamento*. FMUP, Porto Portugal
- Maughan, N.J. e Quirke, P. (2003).** Modern management of colorectal cancer-a pathologist's view. *Scandinavian Journal of Surgery*, v. 92, p. 11-9.
- Mayer, R.J. (2008).** *Gastrointestinal Tract Cancer*. In: *Harrison's principles of internal medicine*. (17th edition. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division), p. 570-580.

- McCord, J.M. e Edeas, M.A. (2005).** SOD, Oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 59, p. 139-42.
- Mirvish, S.S., Haorah, J., Zhou, L., Clapper, M.L., Harrison, K.L. e Povey, A.C. (2002).** Total N-nitroso compounds and their precursors in hot dogs and in the gastrointestinal tract and feces of rats and mice: possible etiologic agents for colon cancer. *The Journal of Nutrition*, v. 132, p. 3526-3529.
- Modlin, I.M., Moss, S.F., Chung, D.C., Jensen, R.T. e Snyderwine, E. (2008).** Priorities for improving the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 100, p. 1282-1289.
- Munday, J.S., Brennan, M.M., Jaber, A.M. e Kiupel, M. (2006).** Ovine Intestinal Adenocarcinomas: Histologic and Phenotypic Comparison with Human Colon Cancer. *Comparative medicine*, v. 56, p. 136– 141.
- Nambiar, P.R., Girnun, G., Lillo, N.A., Guda, K., Whiteley, H.E. e Rosenberg, D.W. (2003).** Preliminary analysis of azoxymethane induced colon tumors in inbred mice commonly used as transgenic/knockout progenitors. *International Journal of Oncology*, v. 22, p. 145-150.
- Nascimento-Gonçalves, E., Faustino-Rocha, A.I., Seixas, F., Ginja, M., Colaço, B., Ferreira, R., Fardilha, M. e Oliveira, P.A. (2018).** Modelling human prostate cancer: Rat models, *Life Sciences*, v. 203, p. 210-224.
- Nassourou, M.A., Njintang, Y.N., Noubissié, T.J.B., Nguimbou, R.M. e Bell, J.M. (2016).** Genetics of seed flavonoid content and antioxidant activity in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *The Crop Journal*, v.4, p.391–397.
- Navale, A.M. (2013).** Animal Models of Cancer: Review. *Internacional Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 4, p. 19–28.
- Newell, L.E. e Heddle, J.A. (2004).** The potent colon1 carcinogen, 1,2- dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. *Mutation Research*, v. 564, p. 1-7.
- Olive, P.L. e Banath, J.P. (2006).** The comet assay: a method to measure ADN damage in individual cells. *Nature Protocols*, v. 1, p. 23-29.
- Olive, P.L., Wlodek, D. e Banáth, J.P. (1991).** DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Research*, v. 51, p. 4671-4676
- Oliveira, M., Nascimento-Gonçalves, E., Silva, J., Oliveira, P.A., Ferreira, R., Antunes, L., Arantes-Rodrigues, R. e Faustino-Rocha, A.I. (2017).** Implementation of humane

- endpoints in a urinary bladder carcinogenesis study in rats, *In Vivo* (Athens, Greece), v. 31, p. 1073–1080.
- Oliveira, P.A., Colaço, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz, P.Lf. e Lopes, C. (2007).** Chemical carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 79, p. 593-616.
- Östling, O. e Johanson, K. J. (1984).** Microelectrophoretic study of radiation-induced ADN damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 123, p. 291–298.
- Papanikolaou, A., Wang, Q-S., Delker, Don A. e Rosenberg, D.W. (1998).** Azoxymethane-induced colon tumors and aberrant crypt foci in mice of different genetic susceptibility. *Cancer Letters*, v. 130, p. 29-34.
- Papanikolaou, A., Wang, Q-S., Papanikolaou, D., Whiteley, H.E. e Rosenberg, D.W. (2000).** Sequential and morphological analyses of aberrant crypt foci formation in mice of differing susceptibility to azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 21, p. 1567-1572.
- Pavão, P., Gontijo, Á., Ribeiro, D. e Salvadori, D. (2007).** Ausência de efeito genotóxico induzido por esteroides anabolizantes em indivíduos fisiculturistas. *Revista Brasileira de Educação Física e Esporte*, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 5-10.
- Pestana, J.S.G. e Martins, S.F.F. (2016).** Colorectal cancer: comparative analysis of clinical and pathological characteristics in patients aged above and below 45 years of age and impact on prognosis. *Journal of Coloproctology*, Rio de Janeiro, v. 36, p. 196-202.
- Pinto, C.G., Paquete, A.T. e Pissarra, I. (2010).** Colorectal cancer in Portugal. *The European Journal of Health Economics*, v. 10, p. 65.
- Piperakis, S.M. Petrakou, E., Tsilimigaki, S., Sagnou, M., Monogiudis, E., Haniotakis, G., Karkaseli, H. e Sarikaki, E. (2003).** Biomonitoring with the comet assay of Greek greenhouse workers exposed to pesticides. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 41, p.104-110.
- Pires, M.A., Coelho, A.C., Palmeira, C., Cardoso, M.N., Seixas, F. e Rodrigues, J. (2010).** Protocolos de imunologia, Série didática. Ciências Aplicadas, UTAD, Vila Real, nº357, p. 49-55.
- Polakis P. (1997).** The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1332, p. 127-147.

- Rajamanickam, S. e Agarwal, R. (2008).** Natural products and colon cancer: current status and future prospects. *Drug Development Research*, v. 69, p. 460-471.
- Ramos-Vara, J. A. e Miller, M. A. (2014).** When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique. *Veterinary Pathology*, v. 51, p. 42-87.
- Reddy, B.S. (1998).** Colon carcinogenesis models for chemoprevention studies. *Hematology/oncology Clinics of North America*, v. 12, p. 963-973.
- Reddy, B.S. e Rao, C.V. (2000).** Colon cancer: A role for cyclo-oxygenase-2-specific nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs and Aging*, v. 16, p. 329-334.
- Rosati, G., Chiacchio, R., Reggiardo, G., De Sanctis, D., e Manzione, L. (2004).** Thymidylate Synthase Expression, p53, bcl-2, Ki-67 and p27 in Colorectal Cancer: Relationships with Tumor Recurrence and Survival. *Tumor Biology*, v. 25, p. 258-263.
- Rosenberg, D.W., Giardina, C. e Tanaka, T. (2009).** Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 30, p. 183-196.
- Rubesin, S. E. (2011).** Chapter 16 - Colon: Contrast Enema and CT. In: E. S. Pretorius and J. A. Solomon (eds.), *Radiology Secrets Plus (Third Edition)*. Mosby, Philadelphia.
- Sales Gil, R. e Vagnarelli, P. (2018).** Ki-67: More Hidden behind a 'Classic Proliferation Marker'. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 43, p.747-748.
- Sapino, A., Marchio, C., Senetta, R., Castellano, I., Macri, L., Cassoni, P., Ghisolfi, G., Cerrato, M., D'Ambrosio, E. e Bussolati, G. (2006).** Routine assessment of prognostic factors in breast cancer using a multicore tissue microarray procedure. *Virchows Archiv: an International Journal of Pathology*, v. 449, p. 288-296.
- Schaffer, E. e Schiefer, B. (1968).** Incidence and Types of Canine Rectal Carcinomas. *Journal of Small Animal Practice*, v. 9, p. 491-496.
- Scherer, K. e Strohschoen, A.A.G. (2013).** Padronização do teste cometa para análise de genotoxicidade como actividade de ensino para graduação na área da saúde. *Revista Destaques Acadêmicos*, v. 5, p. 49-60
- Scholzen, T. e Gerdes, J. (2000).** The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, v. 182, p. 311-322.
- Schwartz, R.N., Blanke, C.D. e Pesko, L.J. (2004).** Targeted therapies in the treatment of colorectal cancer: what managed care needs to know. *Journal of Managed Care Pharmacy*, v. 10, supplement B, p. 2-17.

- Seril, D.N., Liao, J., Yang, G.Y. e Yang, C.S. (2003).** Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: Studies in human and animal models. *Carcinogenesis*, v.24, p.53–62.
- Shirendeb, U., Hishikawa, Y., Moriyama, S., Win, N., Thu, M.M., Mar, K.S., Khatanbaatar, G., Masuzaki, H. e Koji, T. (2009).** Human papillomavirus infection and its possible correlation with p63 expression in cervical cancer in Japan, Mongolia, and Myanmar. *Acta Histochemica et Cytochemica*, v. 42, p. 181-190.
- Simpson, B.H. (1972).** The geographic distribution of carcinomas of the small intestine in New Zealand sheep. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 20, p. 24–28.
- Singh, N. P., McCoy, M.T., Tice, R.R. e Schneider, E.L. (1988).** A simple technique for quantification of low levels of ADN damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, v. 175, p. 184-191.
- Silva, J., Erdtamnn, B. e Henriques, J.A.P. (2003).** *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, p. 183-205.
- Silva, J., Freitas, T.R.O. e Marinho, J.R. (2000).** Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay) to environmental in vivo biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, p. 241-245.
- Siu, I.M., Pretlow, T.G., Amini, S.B. e Pretlow, T.P. (1997).** Identification of dysplasia in human colonic aberrant crypt foci. *The American journal of pathology*, v. 150, p. 1805-1813.
- Soares, J.P., Silva, A.M., Fonseca, S., Oliveira, M.M., Peixoto, F., Gaivão, I. e Mota, M.P. (2015).** How can age and lifestyle variables affect ADN damage, repair capacity and endogenous biomarkers of oxidative stress?, *Experimental Gerontology*, v. 62, p. 45-52.
- Sofi, F., Cesari, F., Abbate, R., Gensini, G. e Casini, A. (2008).** Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)*, p. 337.
- Sohn, O. S., Fiala, E.S., Puz, C., Hamilton, S.R. e Williams, G.M. (1987).** Enhancement of rat liver microsomal metabolism of azoxymethane to methylazoxymethanol by chronic ethanol administration: similarity to the microsomal metabolism of N-nitrosodimethylamine. *Cancer Research*, v. 47, p. 3123-3129.
- Song, M., Garrett, W.S. e Chan, A.T. (2015).** Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology*, v. 148, p. 1244-1260.

- Sorbye, S.W., Kilvaer, T.K., Valkov, A., Donnem, T., Smeland, E., Al-Shibli, K., Bremnes, R.M. e Busund, L-T. (2012a).** Prognostic impact of CD57, CD68, M-CSF, CSF-1R, Ki67 and TGF-beta in soft tissue sarcomas. *BMC Clinical Pathology*, v. 12, p. 7-7.
- Sorbye, S.W., Kilvaer, T.K., Valkov, A., Donnem, T., Smeland, E., Al-Shibli, K., Bremnes, R.M. e Busund, L-T. (2012b).** Prognostic impact of Jab1, p16, p21, p62, Ki67 and Skp2 in soft tissue sarcomas. *PLoS One Journal*, v. 7, p. 47068.
- Speit, G. e Hartmann, A. (1999).** The Comet Assay (Single-Cell Gel Test) – A sensitive genotoxicity test for the detection of ADN damage and repair. *Methods in Molecular Biology*, v. 113, p. 203-212.
- Steele, V.E., e Lubet, R.A. (2010).** The use of animal models for cancer chemoprevention drug development. *Seminars in Oncology*, v. 37, p. 327–338.
- Stopera, S.A., Davie, J.R. e Bird, R.P. (1992).** Colonic aberrant crypt foci are associated with increased expression of c-fos: the possible role of modified c-fos expression in preneoplastic lesions in colon cancer. *Carcinogenesis*, v. 13, p.573-578.
- Švec, J., Ergang, P., Mandys, V., Kment, M. e Pácha, J. (2010).** Expression profiles of proliferative and antiapoptotic genes in sporadic and colitis-related mouse colon cancer models. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 91, p. 44–53.
- Taketo, M.M. e Edelman, W. (2009).** Mouse models of colon cancer. *Gastroenterology*, v. 136, p. 780-798
- Tanaka, T. (2009).** Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *Journal of Carcinogenesis*, v. 8, p. 5.
- Taylor, C.R., Shi, S-R., Barr, N.J. e Wu, N. (2006).** Techniques of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls and Standardization. *Diagnostic Immunohistochemistry (Second Edition)*, p. 1-42.
- Thaker, A.I., Shaker, A., Rao, M.S. e Ciorba, M.A. (2012).** Modeling colitis-associated cancer with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS). *Journal of visualized experiments*, p. 4100.
- Teliarova-Foucher, E., O’Callaghan, M., Ferlay, J., Masuyer, E., Forman, D. e Comber, H. (2012).** European cancer observatory: cancer incidence, mortality, prevalence and survival in Europe. *European Network of Cancer Registries, International Agency for Research on Cancer. European Journal Cancer*, v. 51, p. 1131-1143.
- Tice, R.R. (1995).** The single cell gel/ comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of ADN damage and repair in individual cells. *In: Phillips, DH. e Venitt, S.*

- (Eds.), *Environmental Mutagenesis*. Bios Scientific Publishers, Oxford, United Kingdom, p. 315-339.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anerson, B., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. e Sasaki, Y.F. (2000).** Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 35, p. 206-221
- Tian, Y., Wang, K., Wang, Z., Li, N., e Ji, G. (2013).** Chemopreventive effect of dietary glutamine on colitis-associated colon tumorigenesis in mice. *Carcinogenesis*, v. 34, p. 1593–1600.
- Tian, Y., Xu, Q., Sun, L., Ye, Y. e Ji, G. (2018).** Short-chain fatty acids administration is protective in colitis-associated colorectal cancer development. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 57, p. 103-109.
- Treuting, P.M., Arends, M.J. e Dintzis, S.M. (2018).** 12 - Lower Gastrointestinal Tract. In: P. M. Treuting, S. M. Dintzis and K. S. Montine (eds.), *Comparative Anatomy and Histology (Second Edition)*. Academic Press, San Diego.
- Treuting, PM. e Dintzis, SM. (2012).** 12 - Lower Gastrointestinal Tract. In: P. M. Treuting and S. M. Dintzis (eds.), *Comparative Anatomy and Histology*. Academic Press, San Diego.
- Vandamme T. F. (2014).** Use of rodents as models of human diseases. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, v. 6, p. 2–9.
- Võikar, V., Kõks, S., Vasar, E. e Rauvala, H. (2001).** Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiology & Behavior*, v.72, p.271-281.
- Washington, M.K., Powell, A.E., Sullivan, R., Sundberg, J.P., Wright, N., Coffey, R.J., e Dove, W.F. (2013).** Pathology of rodent models of intestinal cancer: progress report and recommendations. *Gastroenterology*, v. 144, p. 705–717.
- Yu, H.-W., Halonen, M.J. e Pepper, I.L. (2015).** Chapter 12 - Immunological Methods. In: *Environmental Microbiology (Third Edition)*, Academic Press, San Diego, p. 245-269.
- Zhu, B., Sun, Y., Qi, L., Zhong, R., e Miao, X. (2015).** Dietary legume consumption reduces risk of colorectal cancer: evidence from a meta-analysis of cohort studies. *Scientific reports*, v. 5, p. 8797.

Zia-Ul-Haq, M., Ahmad, S., Amarowicz, R. e De Feo, V. (2013). Antioxidant Activity of the Extracts of Some Cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) Cultivars Commonly Consumed in Pakistan. *Molecules*, v. 18, p. 2005-2017.