UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

VANESSA FORESTO MACHADO

**Avaliação da carcinogênese retal induzida por N-Metil-N-
Nitrosoguanidina e efeito da oxigenoterapia hiperbárica
adjuvante à quimioterapia**

RIBEIRÃO PRETO- SP

2019

VANESSA FORESTO MACHADO

Avaliação da carcinogênese retal induzida por N-Metil-N-Nitrosoguanidina e efeito da oxigenoterapia hiperbárica adjuvante à quimioterapia

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do **Título de Doutor** em Ciências.

Área de concentração: Clínica cirúrgica
Orientador: Prof. Dr. Omar Féres

RIBEIRÃO PRETO
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Machado, Vanessa Foresto

Avaliação da carcinogênese retal induzida por N-Metil-N-Nitrosoguanidina e efeito da oxigenoterapia hiperbárica adjuvante à quimioterapia

75 p. : il 20 ; 30 cm

Tese de Doutorado, Programa de Clínica Cirúrgica. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Orientador: Féres, Omar.

1. Neoplasia colorretal. 2. Oxigenoterapia hiperbárica.

DEDICATÓRIAS

Dedico ao meu filho Lucas, por me permitir vivenciar a maternidade e me ensinar o significado da palavra AMOR.

Dedico aos meus pais, Carlos e Cleide, pelo presente de sua presença na minha vida, por apoiarem minhas decisões mais difíceis e serem exemplo de amor incondicional.

Dedico ao meu irmão, Rafael, por me fazer acreditar que os sonhos podem ser realizados.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Omar Féres, que esteve presente em toda a minha jornada, desde a faculdade e residência, se tornou um grande amigo, acreditou em mim e me ajudou a crescer na ciência, vida profissional e pessoal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a DEUS, por me dar luz e sabedoria, para que pudesse realizar este trabalho e tantas outras missões na minha vida.

Ao Prof Dr José Joaquim Ribeiro da Rocha, pelos seus ensinamentos diários sobre os doentes, doenças e mistérios da nossa existência.

A todos os médicos assistentes da divisão de proctologia que estiveram presentes na minha formação: Dr Luiz Renato Camperoni, Dr Ricardo Garcia (*in memorian*), Dra Ana Luiza Normanha, Dr Paulo Henrique Pisi, Dr Rogério Serafim Parra, Dr Marley Feitosa e Dr Antonio Balestrim Filho.

Aos colegas Marley Feitosa e Rogério Serafim Parra, por me ajudarem na confecção deste trabalho.

Ao Prof Dr Sergio Britto Garcia e sua equipe, por me ajudarem na análise histopatológica e imunohistoquímica deste estudo.

Ao Prof Dr Thiago Cunha e sua equipe, por gentilmente me ceder espaço em seu laboratório para realização de etapas do experimento.

Aos pós graduandos, Stephania Minto e Caio Abner, por me ajudarem em etapas cruciais do meu experimento.

À querida secretária da Divisão de Proctologia, Marlene Lúcio, por ser sempre tão amigável, prestativa e disposta a ajudar.

A todos os funcionários do laboratório de cirurgia experimental e do biotério da FMRP-USP, por não medirem esforços para ajudar na realização deste experimento, mesmo que à noite ou final de semana.

À secretária da pós-graduação, Juliana, por ser sempre tão solícita.

A todos os amigos e familiares, muito obrigada por fazerem parte da minha vida.

RESUMO

Machado, Vanessa Foresto; **Avaliação da carcinogênese retal induzida por N-metil-N-nitrosoguanidina e efeito da oxigenoterapia hiperbárica adjuvante à quimioterapia.**

Tese (doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2019.

INTRODUÇÃO: a hipóxia tumoral pode comprometer o resultado da quimioterapia no tratamento do câncer colorretal devido a estímulo de angiogênese e liberação de fatores de crescimento tumoral. A suplementação de oxigênio em regime hiperbárico pode potencializar o efeito da quimioterapia nesses casos. **OBJETIVO:** avaliar o efeito da oxigenoterapia hiperbárica combinada à quimioterapia no tratamento de câncer colorretal em camundongos. **METODOLOGIA:** Trata-se de um estudo experimental com 60 camundongos C57BL6 que foram divididos em 5 grupos: 1) grupo controle: 15 animais submetidos a instilação de solução salina intrarretal, 2) grupo MNNG: 15 animais submetidos a instilação de MNNG intrarretal, 3) grupo 5FU: 10 animais submetidos a instilação de MNNG intrarretal e tratados com 5-fluororacil (5FU), 4) grupo OHB: 10 animais submetidos à instilação de MNNG intrarretal e tratados com oxigenoterapia hiperbárica (OHB), 5) grupo 5FU+OHB: 10 animais submetidos a instilação de MNNG intrarretal e tratamento com 5FU e OHB. Os grupos controle e carcinógeno foram avaliados com exame endoscópico nas semanas 4 e 8 e a eutanásia foi realizada após 12 semanas. Os demais grupos passaram por exame endoscópico na semana 12 e, após, foram tratados por 2 semanas antes da eutanásia. Os cólons dos animais foram removidos para análise histológica e imunohistoquímica com dosagem de BAX, HIF1 α , CD44 e survivina. **RESULTADOS:** o grupo MNNG apresentou a maior taxa de criptas displásicas (8,6%, $p < 0,0001$) e a menor taxa de criptas necróticas (0,13%, $p < 0,0001$). O grupo 5FU+OHB apresentou a maior taxa de células apoptóticas por cripta displásica (10,4%, $p < 0,0001$) e maior taxa de espaços criptais vazios (3,1%, $p < 0,0001$). O grupo 5FU apresentou a maior expressão de HIF1 α (11%, $p < 0,0001$), CD44 (6,5%, $p < 0,0001$) e survivina (14,1%, $p < 0,0001$). A expressão de BAX foi maior no grupo 5FU+OHB (20,2%, $p < 0,05$). **CONCLUSÃO:** a oxigenoterapia hiperbárica potencializou o efeito do 5-FU no tratamento de neoplasia colorretal experimental em camundongos.

Palavras chave: oxigênio hiperbárico, neoplasia colorretal, quimioterapia

Abstract

MACHADO, Vanessa Foresto- Evaluation of retal carcinogenesis induced by N-metil-N-nitrosoguanidine and effect of adjuvant hyperbaric oxygenotherapy on chemotherapy.

Tese (doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2019.

Introduction: Tumor hypoxia may compromise the efficacy of chemotherapy in the treatment of colorectal cancer due to the stimulation to angiogenesis and release of tumor growth factors. Hyperbaric oxygen (HBO) supplementation may increase the effect of chemotherapy in these cases.

Objective: to evaluate the effect of combined hyperbaric oxygen therapy and 5-fluorouracil (5FU) in the treatment of murine colorectal cancer induced by rectal instillation of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG).

Methods: 60 C57BL6 mice were divided into 5 groups: 1) CONTROL group – 15 animals submitted to rectal instillation of saline solution; 2) MNNG group – 15 animals submitted to rectal instillation of MNNG; 3) 5FU group – 10 animals submitted to rectal instillation of MNNG and treated with 5FU; 4) HBO group – 10 animals submitted to rectal instillation of MNNG and treated with HBO; and 5) HBO+5FU group – 10 animals submitted to rectal instillation of MNNG and treated with combined HBO and 5FU. Control and MNNG groups were endoscopic evaluated in weeks number 4 and 8 and euthanasia was carried out after 12 weeks. All other groups were endoscopic evaluated after 12 weeks and then treated for 2 weeks before the euthanasia and the removal of the colon. Histological features and immunohistochemical expression (BAX, HIF-1, CD44 and survivin) were performed in all specimens.

Results: MNNG group had the highest rate of dysplastic crypts (8.6%, $p < 0.0001$) and the lowest necrotic crypt index (0.13%; $p < 0.0001$). 5FU+HBO group had the highest index of apoptotic cells by dysplastic crypt (10.4%; $p < 0.0001$) and rate of empty crypt spaces (3.1%; $p < 0.0001$). 5FU group presented the highest expression of HIF1 (11%; $p < 0.0001$), CD44 (6.5%; $p < 0.0001$) and surviving (14.1%; $p < 0.0001$). Expression of BAX was higher in 5FU+OHB group (20.2%; $p < 0.05$).

Conclusion: Hyperbaric Oxygen enhanced the effect of 5-FU in the treatment of experimental colorectal cancer.

Key words- hyperbaric oxygen, colorectal cancer, chemotherapy.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Escore inflamatório dos grupos controle e MNNG nas semanas 4 e 8. $p<0,001$ na comparação entre os grupos.	41
Gráfico 2- Número de tumores nos grupos controle e MNNG nas semanas 4 e 8. $p<0,05$ na comparação entre os grupos.	41
Gráfico 3- Escore inflamatório dos grupos tratamento com 12 semanas. $P>0,05$	42
Gráfico 4- Número de tumores dos grupos tratamento com 12 semanas. $p>0,05$	42
Gráfico 5- Índice de criptas displásicas. MNNG x tratamento $p<0,0001$. OHB x 5FU+OHB- $p<0,05$	43
Gráfico 6- Índice de células apoptóticas por criptas displásicas. MNNG x 5FU/ 5FU+OHB - $p<0,0001$; 5FU+OHB x 5FU/ OHB- $p<0,0001$	44
Gráfico 7- Índice de criptas necróticas. MNNG x 5FU/ 5FU+OHB- $p<0,0001$; 5FU+OHB x 5FU/ OHB- $p<0,0001$	44
Gráfico 8- Índice de espaços criptais acelulares (vazios). 5FU+OHB x 5FU/ OHB- $p<0,0001$	45
Gráfico 9- Índice de células positivas para HIF-1. 5FU x demais grupos- $p<0,0001$	46
Gráfico 10- Índice de células positivas para CD44. 5FU x demais grupos ($p<0,0001$).	47
Gráfico 11- Índice de células positivas para BAX. 5FU+OHB X demais grupos ($p<0,05$)	48
Gráfico 12- Índice de células positivas par Survivina. 5FU X demais grupos ($p<0,0001$)	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016, por sexo, exceto pele não melanoma no Brasil. Extraído da estimativa do INCA 2018.....	15
Figura 2. Representação especial das taxas ajustadas de incidência de CCR por 100.000, estimadas para o ano de 2018, segundo Unidade da Federação.....	16
Figura 3. A) Câmara hiperbárica multiplace. B) Câmara hiperbárica monoplace.	18
Figura 4. Relação entre pressão ambiente e o conteúdo arterial de O ₂	19
Figura 5. Resumo dos fatores induzidos por hipóxia que influenciam no crescimento e progressão tumoral.....	20
Figura 6. Aplicação de MNNG intrarretal	26
Figura 7. Camundongo anestesiado para realização da retoscopia	27
Figura 8. Equipamento de endoscopia	27
Figura 9. Escala de avaliação colorretal esdoscópica em camundongos.	29
Figura 10. Câmara hiperbárica experimental.....	30
Figura 11- Esquema de uma sessão de OHB.	31
Figura 12- Delineamento experimental do controle da carcinogênese	32
Figura 13- Delineamento experimental dos grupos tratamento	33
Figura 14- Eutanásia e laparotomia exploradora	34
Figura 15- Aspecto endoscópico de cólon normal e de tumor de cólon induzido por MNNG.	40
Figura 16- Imagem histológica H&E do grupo MNNG+5FU mostrando um espaço criptal acelular (vazio).	45
Figura 17- Expressão do HIF-1 α na neoplasia de reto induzida pelo MNNG.....	46
Figura 18- Expressão do CD44 estroma na neoplasia de reto induzida por MNNG.....	47
Figura 19- expressão de BAX na neoplasia de reto induzida po MNNG	48
Figura 20- Expressão de survivina na neoplasia de reto induzida por MNNG	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5FU- 5- fluorouracil

ATM- atmosfera

BAX- Bcl-2 associated protein X

CCR- câncer colorretal

CD44- Cluster of differentiation 44

FMRP- USP- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

HCRP- Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto

HIF-1 α - Hypoxia inducible factor

H&E - hematoxilina-eosina

INCA- Instituto Nacional do Câncer

MNNG- N-metil-N-nitrosoguanidina

OHB- oxigenoterapia hiperbárica

PAF- Polipose adenomatosa familiar

Sumário

1- Introdução	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1. Animais	25
3.2- Carcinógeno	25
3.3- Procedimento anestésico para avaliação endoscópica.....	26
3.4- Avaliação endoscópica	27
3.5 - Aplicação do quimioterápico	30
3.6- Oxigenoterapia hiperbárica.....	30
3.7- Delineamento experimental	31
3.7.1 Carcinogênese:	31
3.7.2 Tratamento	32
3.8- Eutanásia e coleta do material.....	33
3.9- Avaliação macroscópica e microscópica.	34
3.10- Avaliação imunohistoquímica	35
3.10.1- HIF-1 α (Hypoxia inducible factor).....	35
3.10.2- CD44 (Cluster of differentiation 44)	35
3.10.3- Survivina.....	36
3.10.4- BAX (Bcl-2 associated protein X)	36
3.11- Análise estatística	38
4- RESULTADOS.....	39
4.1- Endoscópicos	40
4.2- Histológico.....	43
4.2.1- Índice de criptas displásicas	43
4.2.2- Índice de células apoptóticas por criptas displásicas.....	43
4.2.3- Índice de criptas necróticas.....	44
4.2.4- Índice de espaços criptais acelulares	45
4.3- Imunohistoquímico.....	46
4.3.1- Índice de células positivas para HIF-1	46
4.3.2- Índice de células positivas para CD44 (estromal).....	47
4.3.3- índice de células positivas para BAX	48
4.3.4- Índice de células positivas para SURVIVINA	49
5- DISCUSSÃO	51

5.1- Achados endoscópicos	52
5.2- Achados histológicos	54
5.3- Achados Imunohistoquímicos.....	55
5.3.1- HIF-1 α	55
5.3.2- CD44.....	56
5.3.3- Bax	57
5.3.4- SURVIVINA	58
5.4-Considerações finais	58
6- CONCLUSÃO	60
7- REFERÊNCIAS	62
ANEXOS	69
Anexo 1- Protocolo de liberação do controle de experimentação animal 185/2014.....	70
Anexo 2- Tabela dos achados endoscópicos	71
Anexo 3- Análise estatística	74

1- Introdução

O adenocarcinoma é a principal neoplasia maligna do trato digestório. Possui relevância mundial uma vez que é a terceira neoplasia maligna mais comumente diagnosticada e a quarta principal causa de morte por câncer. O padrão de incidência difere entre os sexos, com taxas de 20,6/100.000 para os homens e 14,3/100.000 para as mulheres (BRAY *et al.*, 2018). Enquanto a maioria dos casos novos (55%) ocorre nos países com maior grau de desenvolvimento, a maior proporção dos óbitos (52%) é observada naqueles menos desenvolvidos, refletindo a baixa sobrevida nessas regiões. No Brasil estimaram-se 17.380 casos novos de câncer colorretal (CCR) em homens e 18.980 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019 (figuras 1 e 2). É a terceira neoplasia maligna mais frequente em homens e o segundo entre as mulheres (INCA, 2019). Segundo Arnold *et al.*, o padrão de distribuição do CCR no Brasil é caracterizado pela elevação das taxas de incidência e mortalidade que pode ser explicado pela rápida transição econômica, com maior exposição aos fatores de risco. Outros fatores que contribuem para o maior impacto da doença são a falta de um programa nacional de rastreamento e dificuldades de acesso ao tratamento no nível terciário de atenção à saúde (ARNOLD *et al.*, 2017).

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016, por sexo, exceto pele não melanoma no Brasil. Extraído da estimativa do INCA 2018.

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 2. Representação espacial das taxas ajustadas de incidência de CCR por 100.000, estimadas para o ano de 2018, segundo Unidade da Federação. Adaptado da estimativa do INCA 2018.

A investigação do CCR em adultos assintomáticos e sem fatores de risco deve ser iniciada aos 50 anos com uma das seguintes opções: pesquisa de sangue oculto nas fezes ou teste imunoquímico fecal (FIT) anualmente, colonoscopia a cada 10 anos, enema opaco baritado a cada 5 anos ou colonoscopia por tomografia computadorizada a cada 5 anos (SMITH *et al.*, 2015). A colonoscopia tem sido utilizada como método preferencial, por se tratar de exame diagnóstico com elevada acurácia e que possibilita uso de medidas terapêuticas, como remoção de pólipos com potencial de malignização (INCA, 2019).

O CCR é uma doença multifatorial influenciada por fatores genéticos, ambientais e relacionados ao estilo de vida. Cerca de um terço dos pacientes com a doença apresentam história familiar de neoplasia colorretal (CARETHER *et al.*, 2015). Em 5% dos casos, podem-se identificar síndromes hereditárias bem definidas, dentre as quais podemos destacar a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) e a Síndrome de Lynch (BROSENS *et al.*, 2015). No entanto, a maior parte dos pacientes apresenta a forma esporádica da doença, caracterizada por tumores em idade mais avançada (mais comumente após a sexta década de vida), ausência de um agrupamento familiar importante, sem associação com doença inflamatória intestinal e cuja

patogênese é influenciada por fatores externos e comportamentais (WATSON *et al.*, 2011).

Em pacientes com diagnóstico de CCR, a diminuição do impacto da doença pode ser obtida através da instituição precoce do tratamento. Atualmente, o CCR pode ser tratado por meio de uma combinação de cirurgia, quimioterapia e radioterapia. O objetivo principal da cirurgia é a exérese completa do tumor primário com linfadenectomia regional (em bloco) dos linfonodos que drenam a região da neoplasia (ASCRS, 2016).

A quimioterapia no CCR pode ter três finalidades: tratamento neoadjuvante, adjuvante ou paliativo. O 5-Fluorouracil (5FU) é a primeira linha de tratamento e a quimioterapia mais comum para CCR metastático. É usado na maioria das vezes em associação com drogas moduladoras, como é o caso do ácido folínico. O tratamento adjuvante visa à erradicação de metástases ocultas ou micrometástases (MCQUADE *et al.*, 2017).

Os primeiros indícios de que o tratamento quimioterápico combinado poderia resultar em melhores desfechos, se empregados após a cirurgia, surgiram a partir de dados publicados por Laurie *et al.* Na ocasião, o levamisole era de uso corrente como droga anti-helmíntica e possuía propriedades imunomoduladoras que justificaram sua combinação empírica ao 5FU, resultando em redução do risco de recorrência no grupo que recebeu ambas as drogas e uma tendência a ganho de sobrevida (LAURIE *et al.*, 1989).

Com a evolução da quimioterapia, foi descoberto que a combinação com Irinotecan, um inibidor potente da topoisomerase 1, aumenta a sobrevida livre de doença. Apesar do benefício, as quimioterapias tradicionais ainda são comumente acompanhadas de mucosite, mielossupressão, neurotoxicidade e alterações hematológicas. Mais recentemente, novas terapias como o bevacizumabe, um anticorpo monoclonal que interfere na angiogênese, e o cetuximabe, um anticorpo monoclonal que age no EGFR, foram adicionadas ao arsenal de tratamento do CCR (LIN *et al.*, 2015).

A combinação de radioterapia e quimioterapia em regime de neoadjuvância representou outro marco no tratamento de tumores de reto médio e baixo, oferecendo a possibilidade de uma regressão tumoral parcial ou total, vindo a se constituir como um elemento terapêutico capaz de reduzir os

índices de recidiva local e aumentar a sobrevida, além de diminuir o índice de cirurgias mutiladoras, como a amputação abdômino-perineal do reto (ZHENG *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2014).

Apesar do tratamento multimodal, a sobrevida global em 5 anos chega no máximo a 67%, sendo apenas 14% na presença de metástases à distância (SIEGEL *et al.*, 2019). Portanto, justificam-se esforços em busca de novas terapias adjuvantes que visam aumentar a sobrevida global. Dentre essas medidas têm-se investigado o papel da oxigenoterapia hiperbárica em combinação com quimioterápicos.

A oxigenoterapia hiperbárica (OHB) é uma modalidade terapêutica empregada em afecções inflamatórias, isquêmicas e infecciosas há mais de 50 anos e consiste na respiração de oxigênio puro (100%), em pressão ambiente maior que uma pressão atmosférica absoluta (1 ATA) (UHMS, 2014). Isto se torna possível dentro de uma câmara de paredes rígidas e hermeticamente fechada, que pode ser pressurizada com ar comprimido ou oxigênio puro, chamada câmara hiperbárica. As câmaras podem ser configuradas para acomodar um paciente (*"monoplace"*- monopaciente) ou acomodar vários pacientes (*"multiplace"*- multipaciente) (D'AGOSTINO DIAS *et al.*, 2008) (Figura 3).

Figura 3. A) Câmara hiperbárica multiplace. B) Câmara hiperbárica monoplace. Fotos cedidas pelo Centro de Medicina Hiperbárica-Hospital São Paulo-Ribeirão Preto-SP.

O conceito de colocar uma pessoa em uma câmara pressurizada com intenção terapêutica foi formulado pelo clérigo britânico Henshaw, em 1662, em uma câmara que denominava Domicilium. Ele acreditava que toda

doença aguda responderia com o aumento da pressão e as doenças crônicas, com ar rarefeito. Em 1879, o cirurgião francês chamado Fontaine construiu uma câmara operatória móvel que poderia ser pressurizada, porém, só começou a ser utilizada em ambiente hospitalar a partir de 1930 (KINDWALL *et al.*, 2009).

Por meio das concentrações teciduais elevadas de oxigênio obtêm-se efeitos terapêuticos específicos que são: estimulação da lise bacteriana pelos leucócitos, aumento da proliferação de fibroblastos e de colágeno e neovascularização de tecidos isquêmicos ou irradiados (MARX *et al.*, 1990).

O oxigênio é transportado no sangue através de sua ligação com a hemoglobina e em parte dissolvido no plasma. Esta porção dissolvida no plasma é tão pequena que em condições habituais tem valor desprezível. Quando se eleva a níveis hiperbáricos, a hemoglobina não aumenta sua capacidade de saturação com o oxigênio, porém a quantidade de oxigênio dissolvido no plasma aumenta gradativamente, o que pode alcançar até 6 volumes %, o que corresponde a todo consumo de oxigênio normal (Figura 4) (D'AGOSTINO DIAS *et al.*, 2008).

Figura 4. Relação entre pressão ambiente e o conteúdo arterial de O₂.

A OHB foi a princípio contraindicada no tratamento de tumores malignos devido à crença de que poderia estimular o crescimento tumoral através da reoxigenação de células tumorais hipóxicas e aumentar a

neovascularização. Além disso, sugeria-se existir um mecanismo de genotoxicidade como resultado da OHB. Por outro lado, devido à alta taxa de replicação celular e presença de vascularização irregular e tortuosa, existem várias áreas hipóxias em um único tumor, o que pode ser fator de estímulo a angiogênese e ao crescimento tumoral e ser causa de resistência de quimioterapia e radioterapia (DARUWALLA *et al.*, 2006) (figura 5). A fim de melhorar a eficácia dos tratamentos, estudos estão sendo realizados na tentativa de eliminar o ambiente hipóxico do tumor, no qual está adaptado para se desenvolver.

Figura 5. Resumo dos fatores induzidos por hipóxia que influenciam no crescimento e progressão tumoral. Adaptado de Moen et al (MOEN *et al.*, 2012)

Estudos sobre o efeito da OHB no crescimento tumoral mostraram efeitos contraditórios. Alguns reportaram efeito estimulatório de tumores após sessões de OHB, com aumento de metástases em pacientes com neoplasia cervical (DECOSSE *et al.*, 1966; MCMILLAN *et al.*, 1989). Entretanto, outros estudos mostraram que a OHB apresentou efeito inibitório no tumor ou nenhum efeito (DARUWALLA *et al.*, 2006; GOIS *et al.*, 2012; WATSON *et al.*, 1978).

Feldmeier *et al.* sugeriram que a OHB não exerce interferência sobre os tumores malignos, seja ela estimulatória ou inibitória. Afirmaram, ainda, que seria provável o benefício em terapia adjuvante no câncer, mas que seriam necessários estudos posteriores (FELDMEIER *et al.*, 2003). Um

estudo experimental dirigido para mensuração do crescimento, proliferação, apoptose e microvasculatura tumorais demonstrou que a OHB não teve efeito estimulatório tumoral e não promoveu metástases à distância (DARUWALLA *et al.*, 2006).

Frente aos achados controversos da oxigenoterapia hiperbárica no câncer, o presente estudo propôs-se a analisar os efeitos da OHB na carcinogênese e no tratamento quimioterápico em um modelo murino. O uso de roedores como modelos experimentais de câncer colorretal (CCR) tem sido amplamente aceito devido à sua similaridade com humanos (BALMAIN *et al.*, 2000). Há várias vantagens na indução de neoplasias para estudo da carcinogênese nesses animais, incluindo uma indução rápida e reprodutível dos tumores, além da possibilidade de estudo da sequência adenoma-carcinoma, como ocorre nos humanos (TAKETO *et al.*, 2009).

2- Objetivos

- 1- Avaliar aspectos endoscópicos e imunohistoquímicos da carcinogênese química em camundongos induzida pelo MNNG.
- 2- Avaliar a ação da oxigenoterapia hiperbárica na neoplasia de cólon em camundongos tratados com 5FU.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética Experimental em Animal (CETEA) da FMRP- USP, protocolo 185/2014, e os animais utilizados foram mantidos segundo as normas dessa comissão (anexo 1).

3.1. Animais

No experimento, foram utilizados 60 camundongos da espécie C57BL6, com idade inicial de 8 semanas e cerca de 20g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Estes animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Cirurgia e Anatomia em condições de temperatura ambiente constante 24°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), ciclo noite-dia 12:12 h e umidade relativa do ar de 60-70%. Os animais foram alimentados com dieta padrão Purina® e água de torneira *ad libitum* e acomodados em grupos de 5 animais por gaiola; mantiveram-se nessas condições por um período de adaptação de uma semana, após o que os animais foram randomizados em 5 grupos:

1. Grupo controle (15 animais)
2. Grupo MNNG (15 animais)
3. Grupo 5FU (10 animais)
4. Grupo OHB (10 animais)
5. Grupo 5FU+OHB (10 animais)

3.2- Carcinógeno

No presente estudo, o N-metil-N-nitrosoguanidina (MNNG) foi aplicado nos animais no dia 0 de experimento, na dose de 100 mg/Kg. Foi realizado diluição em água destilada. Os animais foram mantidos em decúbito ventral e realizado a aplicação de 100 μL intrarretal utilizando um cateter número 6 (figura 6).

O MNNG é um composto alquilnitrosamida com ação carcinogênica química de ação direta com alta afinidade e capacidade de metilação a regiões específicas no DNA e tem sido utilizado para indução de tumores colônicos. É um composto que não necessita de metabolização para ativação e funciona como um potente carcinógeno tópico. A instilação intrarretal, em roedores, induz a tumores colorretais. Em ratos e camundongos, a maioria

das lesões são pólipos séssies. Maurin *et al* mostraram que a administração intrarretal de MNNG na dose de 1 a 3 mg/rato/semana por 20 semanas induziu tumores em 100% de ratos F344 fêmeas, sendo que 43% eram adenocarcinomas e 57% adenomas. A maioria dos adenocarcinomas era bem diferenciada, infiltrando a submucosa. O maior desafio desse modelo experimental foi a dificuldade da instilação intrarretal da substância e a da precisão da quantidade do carcinógeno instilada (MAURIN *et al.*, 2007).

Figura 6. Aplicação de MNNG intrarretal

3.3- Procedimento anestésico para avaliação endoscópica

Os animais foram anestesiados com isoflurano inalatório associado a oxigênio 100% em um fluxo de 0,5ml/min e posicionados em decúbito ventral. Durante todo o procedimento, permaneceram em capela inalando continuamente o anestésico para que se mantivessem anestesiados durante todo o procedimento. Após o exame, foram mantidos em observação e despertaram em cerca de 3 minutos (figura 7).

Figura 7. Camundongo anestesiado para realização da retoscopia

3.4- Avaliação endoscópica

O procedimento endoscópico foi realizado com equipamento de endoscopia (TELE PACK VET X LED, Karl Storz®, Alemanha), que consiste de endoscópio rígido de 1.9 mm de diâmetro, fonte de luz, câmera e monitor. (figura 8).

Figura 8. Equipamento de endoscopia TELE PACK VET X LED, Karl Storz®, Alemanha. *Fonte: karlstorz.com*

Realizou-se lavagem intestinal com 2 ml de solução fisiológica, usando-se uma seringa com abocath número 22, imediatamente antes do procedimento, já com o animal anestesiado.

Antes da introdução do endoscópio, foi avaliada a região perianal, investigando-se se havia lesões. Após a introdução do endoscópio, foi necessário insuflação de ar (utilizando-se uma seringa de 3 ml) para melhor visualização das paredes do cólon e reto, tomando o cuidado para não provocar distensão abdominal ou perfuração intestinal. Utilizando-se o endoscópio rígido, foi possível examinar do reto à flexura esplênica.

A fim de padronizar os achados dos exames endoscópicos, ao menos três escalas já foram criadas para avaliar tanto colite (BECKER *et al.*, 2005; KODANI *et al.*, 2013; PICKERT *et al.*, 2009) como a progressão tumoral (HENSLEY *et al.*, 2009; KODANI *et al.*, 2013).

Nesse trabalho, optou-se por utilizar a escala de Kodani *et al.* (KODANI *et al.*, 2013) que integra a progressão da colite com o aparecimento de lesões neoplásicas (figura 9). A escala leva em conta três principais componentes:

- 1- Extensão e severidade da inflamação colorretal (baseada em achados perianais, transparência da parede, sangramento da mucosa e lesões focais) em uma escala de 0 a 12.
- 2- Marcações quantitativas das lesões tumorais (usando gráficos e mapeamentos).
- 3- Identificação de diferentes tipos de lesões endoscópicas ou complicações da colonoscopia (usando-se identificadores decimais de 0.0 a 0.9).

Além disso, a partir da segunda casa decimal, foi somado o número de lesões encontradas por animal. Por exemplo, se fossem encontradas três lesões, seria somado 0,003; se fossem encontradas 12 lesões seria somado 0,012, e assim por diante.

Os achados estão descritos na tabela do anexo 2.

Figura 9. Escala de avaliação colorretal endoscópica em camundongos. Extraído de KODANI *et al.*, 2013)

Endoscopic Evaluation of Colorectal Health in Mice*

Experiment: _____ Date of Birth of the Mouse: _____

Mouse ID: _____ Day of Treatment: _____ Scored by: _____ Date: _____

**SCHOOL OF MEDICINE
CASE WESTERN RESERVE
UNIVERSITY**

Score	Perianal Findings Diarrhea, blood, prolapse?	Wall Transparency Is the colon transparent?	Intestinal Bleeding Any mucosal bleeding?	Focal Lesions Erosions, ulcers?
0 normal	No ☐	Yes, Small/large vessels are visible. ☐	No ☐	No ☐
1	Yes Diarrhea/fecal clumps ☐	Yes; however Most small vessels cannot be seen. ☐	Yes Contact bleeding, due to endoscopic trauma. ☐	Yes Edematous areas of mucosa ☐
2	Yes Bloody anal discharge. ☐	Not sure Only very large vessels are seen. ☐	Note that lack of lubricant or excessive endoscopic manipulation can cause contact bleeding in healthy mice. ☐	Yes Erosion / reddened area(s) ☐
3 severe	Yes Rectal prolapse. Granulation. Fistula. ☐	Not at all Thickened appearance of mucosa. Blood vessels cannot be seen. ☐	Yes Spontaneous bleeding, not due to endoscopic trauma. ☐	Yes Ulcers (often with white material) / Stricture ☐

****D-PECS:** Yes ___ No ___; if proximal colitis add 1+0.9

Inflammation score: _____

Map tumors (●) and ulcers (○):

Record tumor protrusions into the gut lumen:

number of tumors

% protrusion into lumen diameter (a/b*100)

Observations:

Anesthesia: _____

Chromoendoscopy: Yes ___ No ___

Biopsy: Yes ___ No ___

Decimal identifiers:

- ☐ 0.0 - no special findings
- ☐ 0.1 - perianal fistula
- ☐ 0.2 - erosion
- ☐ 0.3 - ulceration
- ☐ 0.4 - intestinal stricture
- ☐ 0.5 - flat low-height mass or tumor
- ☐ 0.6 - protruding mass or tumor
- ☐ 0.7 - tear / perforation
- ☐ 0.8 - death of animal
- ☐ 0.9 - other _____

Inflammation score
+ highest decimal identifier
+ number of lesions:

Total score: _____

*Using digital identifiers: e.g., normal mouse with 'contact bleeding' and 7 'protruding tumors', (1+0.6+0.007), the total score should be 1.607. **D-PECS, Distal-Proximal Endoscopic Colitis Scoring System approach. See Kodani T, Rodriguez-Palacios A, et al., *Journal of Visual Experimentation*, September 2013 for details.

3.5 - Aplicação do quimioterápico

O 5-fluorouracil foi aplicado nos animais dos grupos 5FU e 5FU+OHB, uma vez por semana, nas semanas 12 e 13. Foi utilizado 5FU na dose de 50mg/ml, diluída em soro fisiológico 0,9% e aplicado intraperitoneal na dose 100mg/Kg.

O preparo da solução e sua administração foram realizados com equipamentos de proteção individual (aventais, luvas, óculos de proteção e máscara).

3.6- Oxigenoterapia hiperbárica

A câmara hiperbárica experimental está localizada no Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP e foi construída segundo as normas internacionais (ASME VIII), com pressurização podendo alcançar até 7.0 ATM com capacidade de 20 animais por sessão (figura 10). A pressão ambiente foi considerada como 1 ATM, levando-se em conta no início das sessões. A OHB foi iniciada da semana 12 do experimento nos grupos OHB e 5FU+OHB.

Figura 10. Câmara hiperbárica experimental.

Após a câmara ser lacrada, iniciou-se a pressurização durante 15 minutos com oxigênio até a pressão da câmara atingir 2.0 ATM. O tratamento sob esta pressão estendeu-se por 60 minutos. Iniciou-se, então, a

descompressão, abrindo-se a válvula de despressurização durante 15 minutos. Os animais foram mantidos em observação por 30 minutos, após cada sessão. As sessões foram repetidas com intervalo de 24 horas, totalizando 10 sessões (Figura 11).

Figura 11- Esquema de uma sessão de OHB. P: Pressurização lenta (15 minutos), Fundo: 60 minutos de tempo de fundo (2 ATM), D: Despressurização lenta em 15 minutos. Duração total da sessão: 90 minutos, numa concentração de 100% de oxigênio. P: Pressurização; D: Despressurização; ATM: Atmosfera (pressão). Nos experimentos foram feitas dez sessões de oxigênio hiperbárico, sendo uma vez ao dia por dez dias.

3.7- Delineamento experimental

3.7.1 Carcinogênese:

1. **Grupo controle** - Quinze animais que foram submetidos à instilação de solução salina intrarretal no dia 0. Realizou-se retoscopia nas semanas 4 e 8 e a eutanásia na semana 12 (figura12)

2. **Grupo MNNG-** Quinze animais que foram submetidos à instilação de MNNG na dose de 100mg/Kg intrarretal no dia 0. Realizou-se a retoscopia nas semanas 4 e 8 e a eutanásia na semana 12 (figura 12)

Figura 12- Delineamento experimental do controle da carcinogênese

3.7.2 Tratamento

1- Grupo 5FU- Dez animais que foram submetidos à instilação de MNNG na dose de 100mg/Kg intrarretal no dia 0. Realizou-se retoscopia na semana 12. Após, receberam uma aplicação semanal de 5FU intraperitoneal na dose de 100mg/kg por 2 semanas e foram submetidos à eutanásia na semana 14 (figura 13)

2- Grupo OHB - Dez animais que foram submetidos à instilação de MNNG na dose de 100mg/Kg intrarretal no dia 0. Realizou-se retoscopia na semana 12. Após, foram submetidos a 10 sessões de OHB (1 vez ao dia por 10 dias) e à eutanásia na semana 14 (figura 13).

3- Grupo 5FU + OHB - Dez animais que foram submetidos à instilação de MNNG na dose de 100mg/Kg intrarretal no dia 0. Realizou-se retoscopia na semana 12. Após, receberam uma aplicação semanal de 5FU intraperitoneal na dose de 100mg/kg por 2 semanas, foram submetidos a 10 sessões de OHB e à eutanásia na semana 14 (figura 13).

Figura 13- Delineamento experimental dos grupos tratamento

3.8- Eutanásia e coleta do material

Os animais foram submetidos à eutanásia com 12 ou 14 semanas de experimento, de acordo com o grupo escolhido, através de aplicação de dose letal de xilasina e ketamina intramuscular. A seguir, foram submetidos à laparotomia mediana com posterior isolamento e retirada do cólon distal (figura 14). Os animais foram congelados a -8°C no biotério do Departamento de Cirurgia e Anatomia, e após encaminhado para o Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) onde foram incinerados.

Após a retirada da peça, os cólons foram abertos a partir de sua borda mesentérica, limpos com solução salina (NaCl 0,9%) e cuidadosamente estendidos em uma placa de vidro para realização dos cortes e armazenamento. Os cólons foram, então, posicionados entre papéis de filtro previamente identificados, que foram imediatamente imersos em solução de formol a 10% para fixação do material em um período de 48 a 72 horas. Depois de fixadas, as amostras foram submetidas à desidratação através de submersão em crescentes concentrações de alcoóis. Os materiais foram

submetidos a banhos de xilol 100% para que ocorresse sua diafanização. Os cólons processados foram incluídos em parafina para realização dos cortes histológicos para confecção das lâminas. Através de um micrótomo rotativo, os blocos de parafina contendo as amostras colônicas foram cortados a uma espessura de 4 μ m (micrômetros), aderidos à lâminas salinizadas e levados à estufa aquecida a 60°C para otimização da adesão do material na lâmina. Anteriormente à técnica de imunoistoquímica ou coloração por H&E, as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas. Finalmente, a recuperação antigênica do material foi realizada através de método físico-químico, por exposição do material à vaporização em solução-tampão de citrato, com o pH 6,0.

Figura 14- Eutanásia e laparotomia exploradora

3.9- Avaliação macroscópica e microscópica.

As peças foram fixadas em formol tamponado a 10% e posteriormente foram incluídas em blocos de parafina (5 μ de espessura), identificados e as

lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E) para avaliação histológica.

As análises macroscópica e microscópica foram feitas pelo mesmo patologista, habilitado e experiente. Todas as peças e as lâminas foram mantidas com suas identificações ocultas para não saber a qual grupo o animal pertencia.

Na análise macroscópica, foi analisado edema e hiperemia da mucosa e presença de tumores.

Na análise microscópica, foi realizado contagem do índice de criptas displásicas, índice de células apoptóticas por criptas displásicas, índice de criptas necróticas e índice de espaços criptais acelulares.

3.10- Avaliação imunohistoquímica

Para avaliação imunohistoquímica escolhemos os seguimentos marcadores:

3.10.1- HIF-1 α (Hypoxia inducible factor)

É um heterodímero composto por duas subunidades: HIF-1 α e HIF-1 β . Tanto a função da HIF-1 α como a sua degradação é regulada pelo nível de oxigênio intracelular. Em um ambiente hipóxico, não ocorre a degradação da HIF-1 α pela enzima prolil-hidroxilável. Ela permanece estável no citoplasma, transloca para o núcleo celular onde se combina com a subunidade HIF-1 β e torna-se um fator de transcrição, iniciando transcrição de centenas de genes, com funções fisiológicas ou patológicas. A função desses genes inclui promoção de crescimento celular, transformação celular, angiogênese e apoptose (TOFFOLI *et al.*, 2008). Na última década, estudos confirmaram que a superexpressão do HIF-1 α está associado a pior prognóstico na neoplasia, uma vez que a hipóxia é característica comum nos tumores sólidos (ZHANG *et al.*, 2015).

3.10.2- CD44 (Cluster of differentiation 44)

É uma molécula de adesão transmembrana que age como um receptor para o ácido hialurônico. Foi descoberto que o CD44 é um dos marcadores de células tronco em muitos tumores sólidos, incluindo o CCR

(PONTA *et al.*, 2003). Tem também grande importância na regulação da adesão celular, crescimento, diferenciação, migração e angiogênese, e contribui na progressão tumoral promovendo invasão e metástase. Muitos estudos mostraram que a expressão de CD44 está relacionada com doença avançada e de pior prognóstico (HUH *et al.*, 2009; VISCA *et al.*, 2002; ZOLLER *et al.*, 2011), enquanto outros estudos não mostraram relação entre a expressão do CD44 e a progressão do CCR (HEIDER *et al.*, 1993; YLAGAN *et al.*, 2000).

3.10.3- Survivina

É uma proteína inibidora de apoptose que age regulando tanto a apoptose quanto o ciclo celular. Observou-se que a survivina aumenta a resistência tumoral por vários estímulos anti-apoptóticos, por mecanismos dependentes ou independentes de caspase. Em células neoplásicas, elevados níveis de survivina sugerem uma alta taxa de proliferação celular, níveis reduzidos de apoptose, resistência a quimioterapia e aumento da taxa de recidiva tumoral. A expressão da survivina nos tecidos normais é baixa se comparado com a expressão em células tumorais, o que a torna um alvo na terapia anticâncer (FUKUDA *et al.*, 2006).

3.10.4- BAX (Bcl-2 associated protein X)

BAX é uma proteína pró-apoptótica da família Bcl-2 (B-cell lymphoma protein 2). É um ativador mitocondrial que media a liberação do citocromo c. Este se junta a APAF-1 formando um complexo ativo que recruta a procaspase-9, levando a morte celular através da ativação da cascata da caspase (FRIEDRICH *et al.*, 2001; GROSS *et al.*, 1999). Jansson *et al.* dosaram os níveis de BAX na mucosa do cólon normal e no adenocarcinoma de cólon em diversos estágios, desde restrito a mucosa até metastático. Eles notaram que a expressão de BAX está aumentada nos tumores quando comparado ao tecido normal (JANSSON *et al.*, 2002). Cobanoglu *et al.* apresentaram resultados semelhantes, mostrando que os níveis eram maiores nos adenocarcinomas quando comparado aos adenomas (COBANOGLU *et al.*, 2015).

A técnica de imunoistoquímica foi realizada em cortes histológicos colônicos transversais, aquecidos a 60°C durante 75 minutos, e ocorreu através da reação antígeno-anticorpo, seguida da reação com marcador visível ao microscópio. Para a marcação dos cortes histológicos, estes foram aderidos em lâminas salinizadas, desparafinizados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de etanol até água. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato pH 6,0 (em panela de vapor) por 20 minutos. Para inibir reações com peroxidases teciduais, peróxido de hidrogênio a 3% foi adicionado sobre as lâminas. Para a realização do bloqueio de ligações teciduais inespecíficas – o que poderia causar marcação inespecífica, utilizou-se soro normal de cavalo diluído em solução-tampão de fosfato (PBS) pH 7,4 (PBS), em uma concentração de 10%. Entre cada etapa as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS para evitar formação de precipitados. As lâminas foram incubadas com seus respectivos anticorpos primários: Bax (B-9) (SC- 7480 - Santa Cruz Biotechnology – CA, USA), HIF-1 Alpha (Biocare Medical - USA), CD44 (clone NCL-CD44-2 - Novocastra, USA) e Survivina (D-8) (SC-17779; Santa Cruz Biotechnology – CA, USA) em câmara úmida e escura, durante 2 horas. Após lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário biotinilado durante 30 minutos e, após nova lavagem, foram incubadas com polímero conjugado também por 30 minutos. Para revelação, as lâminas receberam solução reagente contendo o cromógeno DAB (3,3'- diaminobenzidina), durante 1 a 3 minutos, até o aparecimento de precipitado de coloração marrom – atribuída à redução do DAB pela reação. Todos os reagentes são disponibilizados com PicTure™ Max PolymerDetection Kit (Invitrogen- Carlsbad, CA, USA). As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris diluída por cerca de 1 minuto e desidratadas e diafanizadas novamente. Para montagem das lâminas, utilizou-se Entelan.

A contagem das células positivamente marcadas (que apresentavam coloração marrom) foi feita manualmente com uso de microscópio óptico da marca Zeiss, em objetiva de aumento de 400x, e considerou-se toda a extensão de cada corte. Todas as avaliações imunoistoquímicas foram realizadas em células das criptas colônicas.

3.11- Análise estatística

Os dados foram analisados empregando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software In., San Diego, CA, EUA). Foi aplicado o teste D'Agostinho-Pearson para verificar a distribuição normal de dados, apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). Na vigência de uma distribuição normal, utilizou-se a análise por One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Para comparação dos escores macroscópico e microscópico entre os grupos de interesse, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney, com variabilidade reduzida. A probabilidade de $p < 0.05$ foi considerada estatisticamente significativa, com nível de significância de 5% para demonstrar diferença entre os dados (anexo 3).

4- RESULTADOS

4.1- Endoscópicos

Os animais foram submetidos a exames endoscópicos ao longo do experimento de acordo com o que foi descrito no item materiais e métodos. Todos os exames foram gravados para avaliação *a posteriori* (figura 15). Para classificação dos achados, foi utilizada a escala americana para colite e tumor colorretal validada por Kodani *et al* (KODANI *et al.*, 2013).

Os achados endoscópicos dos grupos estão descritos de acordo com os gráficos abaixo. Os grupos tratamento (5FU, OHB e 5FU+OHB) foram submetidos ao exame endoscópico antes de iniciar o tratamento.

Figura 15- A- aspecto endoscópico de cólon normal. B- Aspecto endoscópico de tumor de cólon induzido por MNNG.

I- Grupo carcinogênese

Na comparação entre os grupos controle e MNNG, houve diferença estatística no escore inflamatório ($p < 0,001$) e no número de tumores ($p < 0,05$) tanto com 4 semanas como com 8. Em relação ao grupo MNNG, houve diferença estatística quando comparado com 4 e 8 semanas o escore inflamatório ($p < 0,05$) (gráficos 1 e 2).

Gráfico 1- Escore inflamatório dos grupos controle e MNNG nas semanas 4 e 8. $p < 0,001$ na comparação entre os grupos.

Gráfico 2- Número de tumores nos grupos controle e MNNG nas semanas 4 e 8. $p < 0,05$ na comparação entre os grupos.

II- Grupos tratamento

A análise das colonoscopias dos animais dos grupos 5FU, OHB e 5FU+OHB imediatamente antes de serem submetidos ao tratamento (12 semanas) não mostrou diferença estatística tanto em relação ao escore inflamatório quanto ao número de tumores (gráficos 3 e 4).

Gráfico 3- Escore inflamatório dos grupos tratamento com 12 semanas. $P>0,05$

Gráfico 4- Número de tumores dos grupos tratamento com 12 semanas. $p>0,05$

4.2- Histológico

4.2.1- Índice de criptas displásicas

O grupo MNNG apresentou maior número de criptas displásicas se comparado com todos os grupos tratamento (5FU, OHB e 5FU+OHB)- ANOVA $p < 0,0001$. Em relação aos grupos tratamento, houve diferença significativa quando comparado os grupos OHB e 5FU+OHB- ANOVA $p < 0,05$ (Gráfico 5).

Gráfico 5- Índice de criptas displásicas. MNNG x tratamento $p < 0,0001$. OHB x 5FU+OHB- $p < 0,05$.

4.2.2- Índice de células apoptóticas por criptas displásicas

O grupo MNNG apresentou menor índice de células apoptóticas por criptas displásica quando comparado aos grupos 5FU e 5FU+OHB ($p < 0,0001$). Em relação aos grupos tratamento, o grupo 5FU+OHB apresentou maior índice de células apoptóticas comparado com os grupos 5FU e OHB ($p < 0,0001$) (Gráfico 6).

Gráfico 6- Índice de células apoptóticas por criptas displásicas. MNNG x 5FU/ 5FU+OHB - $p<0,0001$; 5FU+OHB x 5FU/ OHB- $p<0,0001$.

4.2.3- Índice de criptas necróticas

O grupo MNNG apresentou menor índice de criptas necróticas quando comparado aos grupos 5FU e 5FU+OHB ($p<0,0001$). O grupo 5FU+OHB apresentou maior índice de células apoptóticas quando comparado aos outros grupos tratamento ($p<0,0001$) (Gráfico 7).

Gráfico 7- Índice de criptas necróticas. MNNG x 5FU/ 5FU+OHB- $p<0,0001$; 5FU+OHB x 5FU/ OHB- $p<0,0001$.

4.2.4- Índice de espaços criptais acelulares

O grupo 5FU+OHB apresentou grande número de espaços criptais vazios quando comparado aos demais grupos tratamento ($p<0,0001$), indicativo de morte celular completa da cripta (Gráfico 8 e Figura 16).

Gráfico 8- Índice de espaços criptais acelulares (vazios). 5FU+OHB x 5FU/ OHB- $p<0,0001$.

Figura 16- Imagem histológica H&E do grupo MNNG+5FU mostrando um espaço criptal acelular (vazio).

4.3- Imunohistoquímico

4.3.1- Índice de células positivas para HIF-1 α

O grupo MNNG não apresentou diferença significativa do índice de células positivas para HIF-1 α quando comparado com os grupos OHB e 5FU+OHB. O grupo 5FU apresentou maior índice de células positivas para HIF1 α quando comparado com todos os outros grupos ($p<0,0001$). Não houve diferença significativa entre os grupos OHB e 5FU+OHB (Gráfico 9 e Figura 17).

Gráfico 9- Índice de células positivas para HIF-1 α . 5FU x demais grupos- $p<0,0001$.

Figura 17- Expressão do HIF-1 α na neoplasia de reto induzida pelo MNNG: 1- MNNG; 2- 5FU; 3- OHB; 4- 5FU+OHB

4.3.2- Índice de células positivas para CD44 (estromal)

Houve significância estatística quando comparado o grupo 5FU a todos os outros ($p<0,0001$). Porém não houve diferença entre os outros grupos. (Gráfico 10 e Figura 18)

Gráfico 10- Índice de células positivas para CD44. 5FU x demais grupos ($p<0,0001$).

Figura 18- Expressão do CD44 estroma na neoplasia de reto induzida por MNNG. 1- MNNG; 2- 5FU; 3- OHB; 4- 5FU+OHB

4.3.3- índice de células positivas para BAX

O grupo 5FU+OHB apresentou o maior índice de células positivas para BAX quando comparado com os demais grupos ($p<0,05$). Não houve diferença entre o grupo OHB e o grupo MNNG ($p>0,05$) (Gráfico 11, Figura 19).

Gráfico 11- Índice de células positivas para BAX. 5FU+OHB X demais grupos ($p<0,05$)

Figura 19- Expressão de BAX na neoplasia de reto induzida po MNNG: 1- MNNG; 2- 5FU; 3- OHB; 4- 5FU+OHB.

4.3.4- Índice de células positivas para SURVIVINA

O grupo 5FU apresentou maior índice de células positivas para survivina quando comparado com todos os outros grupos ($p<0,0001$). O grupo OHB não apresentou diferença estatística quando comparado com o grupo controle ($p>0,05$) (Gráfico 12 e Figura 20).

Gráfico 12- Índice de células positivas par Survivina. 5FU X demais grupos ($p<0,0001$)

Figura 20- Expressão de survivina na neoplasia de reto induzida por MNNG: 1- MNNG; 2- 5FU; 3- OHB: 4-5FU+OHB

5- DISCUSSÃO

Apesar dos avanços do tratamento do câncer colorretal, a terapia adjuvante ainda causa muitos efeitos colaterais, tem um custo elevado e alto índice de resistência tumoral. A quimioterapia com 5FU é a primeira linha para o tratamento adjuvante do CCR. Ainda assim, a taxa de resposta para CCR avançado é de apenas 5 a 10% (JOHNSTON *et al.*, 2001), enquanto quando combinado com oxaliplatina ou irinotecano essa taxa aumenta para 40 a 50% (GIACCHETTI *et al.*, 2000). Atualmente, buscam-se novas drogas ou alternativas para potencializar a resposta aos quimioterápicos no câncer colorretal. Nesse sentido, a oxigenoterapia hiperbárica surge como opção e o presente estudo é o primeiro a analisar o efeito adjuvante do oxigênio a 100% e sob pressão, no tratamento dos tumores colorretais. Optou-se pelo modelo murino, uma vez que a oncogênese induzida pelo MNNG é similar ao que ocorre em seres humanos.

5.1- Achados endoscópicos

Classicamente, para avaliação da carcinogênese e monitorização da progressão tumoral em modelos animais, utilizam-se parâmetros clínicos não invasivos, como perda ponderal, ingesta hídrica, aceitação da dieta, diarreia ou hematoquezia que são úteis, porém podem apresentar muitos vieses e são pouco objetivos (NEURATH *et al.*, 2010).

No presente estudo, utilizou-se a endoscopia baixa como método de avaliação da mucosa colônica, por se tratar de um exame objetivo e de escolha para rastreamento de tumores colorretais (REX *et al.*, 2017).

Exames endoscópicos em camundongos estão sendo usados como instrumento de avaliação de tumores de cólon e reto experimentais por mais de uma década. Têm a vantagem de proporcionar resultados mais objetivos em relação à progressão tumoral ou de colite se comparados com os parâmetros clínicos clássicos. Além disso, a endoscopia permite avaliações sequenciais em um mesmo animal, podendo realizar medidas de tumores ou biópsias sucessivas, o que não é possível quando comparado ao método histológico, em que é necessário eutanaziar o animal (E.H. HUANG, 2002; KODANI *et al.*, 2013). Com biópsias seriadas em tumores ou em modelos experimentais de colite, há possibilidade de realização do exame celular e molecular, auxiliando o estudo da sequência adenoma-adenocarcinoma e os meios de interferir nesse processo (OLSON *et al.*, 2014).

Além de biópsias, o canal de trabalho pode ser usado para aplicar substâncias diretamente sobre o tumor ou à área inflamada e avaliar sua evolução no tratamento comparando com a aplicação de placebo. Também pode-se realizar injeção de células tumorais humanas ou murinas na submucosa para o desenvolvimento de tumores ortotópicos no cólon e reto do animal (ZIGMOND *et al.*, 2011).

A maior dificuldade da realização de endoscopia baixa em camundongos é o pequeno diâmetro do cólon desses animais, no entanto o método já se mostrou seguro, reprodutível e rápido. Neste estudo, foi realizado um total de 60 retoscopias em 30 camundongos, com apenas um óbito nas primeiras 24h após o exame (1,66%). Hensley *et al.* (HENSLEY *et al.*, 2009) realizaram 175 exames em 32 camundongos com 5 óbitos (2,9%), sendo 3 durante o procedimento e 2 nas primeiras 24h. Apesar de ser um método invasivo, a análise *in vivo* da progressão da colite e do número e tamanho dos tumores em um mesmo animal diminui custos e número de animais de experimentação (MARTINO *et al.*, 2016).

A avaliação endoscópica e padronização com protocolos não substitui a análise histopatológica, mas fornece uma alternativa de monitorização do animal e das lesões de mucosa no animal ainda vivo, porém, ao comparar biópsias sucessivas e o escore endoscópico em um mesmo animal com colite com o decorrer dos dias de experimento, nota-se um aumento da inflamação em ambos os métodos de avaliação (ERNST *et al.*, 2015).

No Brasil, o uso da imagem endoscópica *in vivo* em animais de experimentação, assim como outros meios de avaliação não invasiva do cólon de animais, como ultrassom, ressonância nuclear magnética e tomografia computadorizada, apesar de promissor, ainda é pouco utilizada principalmente pela dificuldade de aquisição do material pelos grandes centros de pesquisa.

No presente estudo, após a aplicação do MNNG, notou-se piora do escore inflamatório e aumento do número de tumores, de forma progressiva, ao longo de 8 semanas. De forma semelhante, Kodani *et al.* induziram colite com DSS 3% (Dextran sulfato de sódio), e demonstraram piora progressiva da inflamação colorretal nos animais, porém sem formação de tumores (KODANI *et al.*, 2013).

Em 2005, Becker *et al.* associaram DSS 3% com azoximetano e os animais foram avaliados nos dias 0, 20, 40, 60 e 80. Foram utilizadas duas escalas diferentes para classificação dos exames endoscópicos. A primeira avaliava a

progressão da colite e, a segunda, o número e tamanho dos tumores. Tumores macroscópicos foram vistos a partir do dia 40. Antes disso, foi usado cromoendoscopia que conseguiu diferenciar áreas de inflamação de criptas aberrantes, ou seja, lesões pré-malignas (BECKER *et al.*, 2005).

Não existem estudos que avaliaram a carcinogênese murina induzida por MNNG através de endoscopia digestiva. No entanto, sabe-se que se trata de um potente carcinógeno tópico e que sua instilação intrarretal em roedores na dose de 1 a 3 mg/rato/semana por 20 semanas induziu tumores em 100% dos animais, sendo 43% adenocarcinomas e 57% adenomas (MAURIN *et al.*, 2007).

5.2- Achados histológicos

A aplicação do MNNG na mucosa colônica induz à inflamação, o que predispõe ao surgimento de adenomas e displasia. No cólon, o processo inicial é caracterizado pelo surgimento de criptas aberrantes ou displásicas e posteriormente, focos de criptas aberrantes. A partir destas alterações iniciais, a interação dos componentes celulares e moleculares do microambiente tumoral permite a progressão e desenvolvimento do tumor (DE LERMA *et al.*, 2014).

Criptas displásicas são consideradas a fase mais inicial da sequência adenoma-adenocarcinoma, o que permite seu uso para estudos de neoplasia colorretal (PRETLOW *et al.*, 2005). Maurin *et al.* realizaram um estudo da carcinogênese colorretal com MNNG e notaram aumento significativo no número de criptas displásicas, o que mostrou que o carcinógeno um bom agente para estudo do CCR (MAURIN *et al.*, 2007). No presente estudo, os animais foram submetidos à instilação de MNNG intrarretal e após 12 semanas foram encontradas criptas displásicas no cólon e reto de todos os animais. Após o tratamento, notou-se efeito benéfico tanto nos animais submetidos ao 5FU exclusivo quanto no grupo em que houve associação do 5FU com OHB, demonstrado pela diminuição do índice de criptas displásicas, que foi mais importante no grupo com tratamento combinado. Acredita-se que o menor número de criptas displásicas deva-se ao maior índice de apoptose por cripta displásica e ao maior número de criptas necróticas, que foi mais evidente no grupo 5FU+OHB. Não foram encontrados na literatura trabalhos associando 5FU e OHB em neoplasia colorretal, entretanto, Refaat *et al.* (REFAAT *et al.*, 2015) e Patyar *et al.* (PATYAR *et al.*, 2017) demonstraram que em grupos

experimentais de CCR tratados com 5FU houve redução significativa do número de criptas displásicas e aumento da apoptose, quando comparado com os grupos controles.

Outros achados do nosso experimento foram espaços criptais vazios no grupo em que foi realizado tratamento combinado. Não foram encontrados dados na literatura que pudessem explicar esses achados. Infere-se que devido ao aumento rápido da apoptose e da necrose das células displásica provocada pelo 5FU em conjunto com a OHB, houve um desaparecimento das células, mantendo a estrutura das criptas, o que pode ser visualizado na histologia.

5.3- Achados Imunohistoquímicos

5.3.1- HIF-1 α

Sabe-se que lesão e morte celular, como ocorre durante um tratamento quimioterápico, causa hipóxia. A diminuição da tensão de oxigênio no tecido tumoral, por vez, é o principal estímulo para a elevação dos níveis de HIF-1 α . Em altas concentrações, o HIF-1 α , por meio de VEGF, induz angiogênese, que pode ser um dos fatores para resistência ao tratamento ou recidiva tumoral (TANG *et al.*, 2004). Wu *et al.* mostraram, em um trabalho experimental, que o HIF-1 α está presente em 75% dos pacientes com CCR e que sua expressão aumenta significativamente em condições de hipóxia (WU *et al.*, 2010).

O fato da hipóxia modular o HIF-1 α é uma das razões do uso da OHB no tratamento de neoplasias e da inflamação intestinal. Parra *et al.* demonstraram que o HIF-1 α está aumentado na colite aguda experimental induzida pelo TNBS e que há redução nos valores após OHB (PARRA *et al.*, 2015).

Em neoplasias, a OHB altera o estado hipóxico do tumor e consequentemente altera o estímulo ao crescimento tumoral e angiogênese. Pouco se conhece sobre os efeitos da combinação de OHB e 5-FU nos níveis de HIF-1 α , entretanto, a OHB é capaz de reduzir a hipóxia tumoral induzida por radioterapia e quimioterapia.

Alguns autores, em estudo experimental, demonstraram que a radiação aumenta o nível e atividade do HIF-1 α a partir de 12 a 24h do tratamento, com pico após 48h. Mostraram também que o aumento do HIF-1 α é dose-dependente. Em animais que foram geneticamente modificados ou que tiveram inibição farmacológica da síntese do HIF-1 α antes da radioterapia, notou-se crescimento

significativamente mais lento em vários tumores estudados, após o término do tratamento (MOELLER *et al.*, 2004; MOELLER *et al.*, 2005).

No presente estudo, houve aumento da produção do HIF-1 α após o início do tratamento com 5FU quando comparado com o grupo em que foi apenas induzida a carcinogênese, o que se explica pela morte celular induzida pelo quimioterápico. Outro achado foi que a combinação da OHB ao 5FU impediu incremento dos níveis de HIF-1 α , o que pode ser entendido como fator antineoplásico.

5.3.2- CD44

As células tronco expressam um alguns marcadores de células estromais (ex. src homolog-2, -3 e -4), receptores de citocinas (ex. interleucina-1R e TNF- α R) e um grande número de moléculas de adesão, dentre elas, o CD44 (MIAO *et al.*, 2006). A descoberta de que células tronco têm tropismo por tumores foi marcante, nos últimos anos. As células tronco não apenas são recrutadas da medula óssea para o tumor, como chegam no sítio tumoral e podem se diferenciar em células como fibroblastos, macrófagos ou células perivasculares, que têm importante papel na progressão tumoral (SHINAGAWA *et al.*, 2017). O CD44, portanto, funciona como marcador de migração de células tronco para o tecido tumoral, que, por sua vez, associa-se a pior prognóstico.

No presente estudo, no grupo tratado com 5FU, houve um aumento significativo no índice de CD44 quando comparado ao grupo que recebeu apenas o carcinógeno, demonstrando que existe migração de células tronco para o sítio tumoral. Nos grupos que foram submetidos à OHB (isolada ou combinada com 5FU), não houve alteração significativa no índice de CD44. Marangoni *et al.*, em um estudo com carcinoma invasivo de mama, perceberam que ao associar um anticorpo anti-CD44 ao tratamento houve redução no crescimento tumoral. Mostraram, ainda, que na neoplasia de mama, foram identificadas células marcadas por CD44 em áreas periféricas mais vascularizadas com um aumento progressivo e significativo nas áreas hipóxicas e com necrose central, mostrando que a morte celular promove a migração de células tronco marcadas com CD44. Portanto, a migração das células tronco pode ter relação com a hipóxia (MARANGONI *et al.*, 2009). Em nosso estudo, a reversão da hipóxia por meio de OHB foi capaz de inibir esse deslocamento de

células tronco para o sítio tumoral, o que pode demonstrar um efeito antineoplásico do tratamento adjuvante com OHB.

5.3.3- Bax

O Bax é uma proteína pró-apoptótica e já foi reportado que, em alguns CCR, mutações no seu gene, causam defeitos no reparo do *DNA*, o que é detectado por mutações em sequências repetitivas (RAMPINO *et al.*, 1997). A baixa expressão da proteína pró-apoptótica Bax na maioria dos tumores de cólon tem sido correlacionada com baixa sobrevida dos pacientes (OGURA *et al.*, 1999).

Em nosso estudo, ao iniciar o tratamento tanto apenas com 5FU como combinado com OHB, notou-se aumento significativo dos níveis de Bax, quando comparado aos animais submetidos apenas à carcinogênese. Nota-se, ainda, que os níveis no grupo com terapia combinada foram significativamente maior do que no grupo tratado apenas com 5FU. Esses achados demonstram que tanto o tratamento com 5FU como combinado com OHB são eficazes no incremento nos níveis de Bax, o que é benéfico por seu efeito pro-apoptótico. Entretanto, chama a atenção o fato de a OHB combinada ao 5FU ter causado um aumento mais significativo dos níveis dessa proteína. Já a OHB isolada não ocasionou alteração nos níveis de Bax.

Foi sugerido por Nita *et al* que as taxas de Bcl-x e Bax podem estar relacionadas à quimiossensibilidade ao 5FU (NITA *et al.*, 1998), o que nos leva a inferir que a OHB pode ter levado ao aumento da sensibilidade ao 5FU. Estudaram, ainda, o papel das proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 na apoptose induzida por 5FU em linhagens celulares de CCR. Notou-se que antes do tratamento a expressão de Bax é muito pequena e apresenta um aumento significativo com o tratamento com o 5FU. Violtte *et al* também realizaram um trabalho semelhante com 8 linhagens celulares de CCR e perceberam que o Bax, combinado com os níveis do Bcl-2 e Bcl-x, podem ser marcadores relevantes para predizer a resposta ao tratamento com 5FU em algumas linhagens celulares de CCR (VIOLETTE *et al.*, 2017).

Por fim, o que se infere é que a OHB foi capaz de potencializar o efeito antineoplásico do 5FU mediado pela apoptose induzida por Bax.

5.3.4- SURVIVINA

A survivina é uma proteína inibidora da apoptose que é fortemente expressa na maioria dos tumores humanos e em tecidos fetais, e pouco expressa em tecidos adultos normais (AMBROSINI *et al.*, 1997).

No nosso estudo, após tratamento com 5FU isolado notou-se significativo aumento dos níveis de survivina, o que pode ser entendido como um escape tumoral após o uso do quimioterápico. Já no grupo em que se combinou a OHB ao 5FU observou-se menor incremento dos níveis de survivina, o que nos mostra que a OHB pode apresentar efeitos pró-apoptóticos por esta via.

Wu *et al* em um estudo experimental de CCR mostraram que, assim como o HIF-1 α , a survivina também é expressa em 68% dos CCR, e que os dois estão relacionados. Assim, a hipóxia aumenta a expressão tanto do HIF-1 α como da survivina, e a inibição do HIF-1 α resultou na atenuação da expressão da survivina. Portanto, o HIF-1 α pode ser um fator envolvido na expressão da survivina (WU *et al.*, 2010). Infere-se, então, que da mesma maneira que ocorre na expressão do HIF-1 α , a OHB também pode inibir a produção de survivina pelo tumor através do aumento dos níveis de oxigênio no tecido.

5.4- Considerações finais

A hipóxia tecidual tem papel importante no crescimento tumoral e na resistência ao tratamento. Resultados recentes mostraram que a OHB não induz ao crescimento tumoral, recorrência ou metástases. O uso da OHB como terapia adjuvante tem mostrado resultados promissores. A OHB adjuvante à radioterapia foi primeiramente testada em neoplasia de cabeça e pescoço no tratamento de lesões actínicas, com resultados satisfatórios. Em pacientes com tumores de cabeça e pescoço, submetidos ao tratamento combinado, percebeu-se melhor controle local e maior sobrevida global (WATSON *et al.*, 1978). Resultados parecidos foram obtidos em diversos outros sítios, incluindo bexiga, brônquios e colo do útero (CADE *et al.*, 1978).

O uso da OHB adjuvante ao 5FU já foi testado no tratamento de sarcoma (TAKIGUCHI *et al.*, 2001). A combinação de 5FU com OHB diminuiu

significativamente a progressão do crescimento tumoral quando comparado ao grupo que realizou tratamento apenas com 5FU. Em um modelo murino de câncer de mama, foi observado que o esquema combinado foi capaz de promover regressão de tumores (STUHR *et al.*, 2004). Apesar de transitório, o efeito da OHB é importante e uma única sessão aumenta a captação tecidual do 5FU imediatamente após a oxigenação (MOEN *et al.*, 2009).

A presença de inúmeros trabalhos na literatura sobre OHB e o tratamento de neoplasia mostra a constante busca de novas modalidades terapêuticas.

O presente estudo apresenta resultados inéditos e promissores. Entretanto, novas pesquisas precisam ser realizadas para que a OHB seja incluída como modalidade adjuvante no tratamento de CCR.

6- CONCLUSÃO

- 1- O uso do MNNG intrarretal provocou alterações endoscópicas e imunohistoquímicas compatíveis com carcinogênese
- 2- A oxigenoterapia hiperbárica potencializou o efeito do 5-FU no tratamento de neoplasia colorretal experimental em camundongos tanto pela avaliação histopatológica como imunohistoquímica.

7- REFERÊNCIAS

(UHMS), U. A. H. M. S. **Hyperbaric Oxygen Therapy Indications**. Thirteenth Edition ed. 2014. 978-1930536-73-9.

AMBROSINI, G.; ADIDA, C.; ALTIERI, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. **Nat Med**, 3, n. 8, p. 917-921, Aug 1997.

ARNOLD, M.; SIERRA, M. S.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I. *et al.* Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**, 66, n. 4, p. 683-691, Apr 2017.

ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery | ASCRS. 2016. Disponível em: <https://www.fascrs.org/ascrs-textbook-colon-and-rectal-surgery>.

BALMAIN, A.; HARRIS, C. C. Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. **Carcinogenesis**, 21, n. 3, p. 371-377, Mar 2000.

BECKER, C.; FANTINI, M. C.; WIRTZ, S.; NIKOLAEV, A. *et al.* In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy. **Gut**, 54, n. 7, p. 950-954, Jul 2005.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, 68, n. 6, p. 394-424, Nov 2018.

BROSENS, L. A.; OFFERHAUS, G. J.; GIARDIELLO, F. M. Hereditary Colorectal Cancer: Genetics and Screening. **Surg Clin North Am**, 95, n. 5, p. 1067-1080, Oct 2015.

CADE, I. S.; MCEWEN, J. B. Clinical trials of radiotherapy in hyperbaric oxygen at Portsmouth, 1964--1976. **Clin Radiol**, 29, n. 3, p. 333-338, May 1978.

CARETHERS, J. M.; JUNG, B. H. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, 149, n. 5, p. 1177-1190.e1173, Oct 2015.

COBANOGLU, B.; CEYRAN, A. B.; SIMSEK, M.; ŞENOL, S. Immunohistochemical analysis of Bax and AIF in colorectal tumors. **Int J Clin Exp Med**, 8, n. 9, p. 16071-16076, 2015.

D'AGOSTINO DIAS, M.; FONTES, B.; POGGETTI, R. S.; BIROLINI, D. Hyperbaric oxygen therapy: types of injury and number of sessions--a review of 1506 cases. **Undersea Hyperb Med**, 35, n. 1, p. 53-60, Jan-Feb 2008.

DARUWALLA, J.; CHRISTOPHI, C. Hyperbaric oxygen therapy for malignancy: a review. **World J Surg**, 30, n. 12, p. 2112-2131, Dec 2006.

DARUWALLA, J.; CHRISTOPHI, C. The effect of hyperbaric oxygen therapy on tumour growth in a mouse model of colorectal cancer liver metastases. **European Journal of Cancer**, 42, n. 18, p. 3304-3311, 2006/12/01 2006.

DE LERMA BARBARO, A.; PERLETTI, G.; BONAPACE, I. M.; MONTI, E. Inflammatory cues acting on the adult intestinal stem cells and the early onset of cancer (review). **Int J Oncol**, 45, n. 3, p. 959-968, Sep 2014.

DECOSSE, J. J.; ROGERS, L. S. Influence of high-pressure oxygen and chemotherapy on the AMel 4 hamster melanoma. **Cancer Res**, 26, n. 2, p. 287-292, Feb 1966.

E.H. HUANG, J. J. C., R.L. WHELAN, Y.H. LIU, J.O. ROSENBERG, H. ROTTERDAM, A.M. SCHMIDT, D.M. STERN, K.A. FORDE. Colonoscopy in Mice. **Surgical Endoscopy And Other Interventional Techniques**, 16, n. 1, p. 22-24, 2002.

ERNST, M.; PREAUDET, A.; PUTOCZKI, T. Non-invasive Assessment of the Efficacy of New Therapeutics for Intestinal Pathologies Using Serial Endoscopic Imaging of Live Mice. *In: J Vis Exp*, 2015.

FELDMEIER, J.; CARL, U.; HARTMANN, K.; SMINIA, P. Hyperbaric oxygen: does it promote growth or recurrence of malignancy? **Undersea Hyperb Med**, 30, n. 1, p. 1-18, Spring 2003.

FRIEDRICH, K.; WIEDER, T.; VON HAEFEN, C.; RADETZKI, S. *et al.* Overexpression of caspase-3 restores sensitivity for drug-induced apoptosis in breast cancer cell lines with acquired drug resistance. **Oncogene**, 20, n. 22, p. 2749-2760, May 17 2001.

FUKUDA, S.; PELUS, L. M. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. 2006-05-01 2006.

GIACCHETTI, S.; PERPOINT, B.; ZIDANI, R.; LE BAIL, N. *et al.* Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. **J Clin Oncol**, 18, n. 1, p. 136-147, Jan 2000.

GOIS, E., JR.; DANIEL, R. A.; PARRA, R. S.; ALMEIDA, A. L. *et al.* Hyperbaric oxygen therapy reduces COX-2 expression in a dimethylhydrazine-induced rat model of colorectal carcinogenesis. **Undersea Hyperb Med**, 39, n. 3, p. 693-698, May-Jun 2012.

GROSS, A.; MCDONNELL, J. M.; KORSMEYER, S. J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes Dev**, 13, n. 15, p. 1899-1911, Aug 01 1999.

HEIDER, K. H.; HOFMANN, M.; HORS, E.; BERG, F. V. D. *et al.* A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. 1993-01-01 1993.

HENSLEY HH , M. C., CHANG WC , DEVARAJAN K , COOPER HS , CLAPPER ML. Endoscopic imaging and size estimation of colorectal adenomas in the multiple intestinal... - Abstract - Europe PMC. 2009-03-01 2009. Comparative Study.

HUH, J. W.; KIM, H. R.; KIM, Y. J.; LEE, J. H. *et al.* Expression of standard CD44 in human colorectal carcinoma: association with prognosis. **Pathol Int**, 59, n. 4, p. 241-246, Apr 2009.

INCA - Instituto Nacional de Cancer - Estimativa 2018. 2019. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2019/>.

JANSSON, A.; SUN, X. F. Bax expression decreases significantly from primary tumor to metastasis in colorectal cancer. **J Clin Oncol**, 20, n. 3, p. 811-816, Feb 01 2002.

JOHNSTON, P. G.; KAYE, S. Capecitabine: a novel agent for the treatment of solid tumors. **Anticancer Drugs**, 12, n. 8, p. 639-646, Sep 2001.

KINDWALL, E. P. **Hyperbaric Medicine Practice**. 3rd (third) Edition ed. Best Publishing Company, 2009-07-30 2009.

KODANI, T.; RODRIGUEZ-PALACIOS, A.; CORRIDONI, D.; LOPETUSO, L. *et al.* Flexible Colonoscopy in Mice to Evaluate the Severity of Colitis and Colorectal Tumors Using a Validated Endoscopic Scoring System. 2013/10/16 2013.

LAURIE, J. A.; MOERTEL, C. G.; FLEMING, T. R.; WIEAND, H. S. *et al.* Surgical adjuvant therapy of large-bowel carcinoma: an evaluation of levamisole and the combination of levamisole and fluorouracil. The North Central Cancer Treatment Group and the Mayo Clinic. **J Clin Oncol**, 7, n. 10, p. 1447-1456, Oct 1989.

LIN, C.; NG, H. L. H.; PAN, W.; CHEN, H. *et al.* Exploring Different Strategies for Efficient Delivery of Colorectal Cancer Therapy. *In: Int J Mol Sci*, 2015. v. 16, p. 26936-26952.

MARANGONI, E.; LECOMTE, N.; DURAND, L.; DE PINIEUX, G. *et al.* CD44 targeting reduces tumour growth and prevents post-chemotherapy relapse of human breast cancers xenografts. *In: Br J Cancer*, 2009. v. 100, p. 918-922.

MARTINO, L. D.; DAVE, M.; MENGHINI, P.; XIN, W. *et al.* Protective Role for TWEAK/Fn14 in Regulating Acute Intestinal Inflammation and Colitis-Associated Tumorigenesis. 2016-11-15 2016.

MAURIN, N.; FORGUE-LAFITTE, M. E.; LEVY, P.; ZIMBER, A. *et al.* Progression of tumors arising from large ACF is associated with the MUC5AC expression during rat colon MNNG carcinogenesis. **Int J Cancer**, 120, n. 3, p. 477-483, Feb 1 2007.

MCMILLAN, T.; CALHOUN, K. H.; MADER, J. T.; STIERNBERG, C. M. *et al.* The effect of hyperbaric oxygen therapy of oral mucosal carcinoma. **Laryngoscope**, 99, n. 3, p. 241-244, Mar 1989.

MCQUADE, R. M.; STOJANOVSKA, V.; BORNSTEIN, J. C.; NURGALI, K. Colorectal Cancer Chemotherapy: The Evolution of Treatment and New Approaches. **Curr Med Chem**, 24, n. 15, p. 1537-1557, 2017.

MIAO, Z.; JIN, J.; CHEN, L.; ZHU, J. *et al.* Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Biol Int**, 30, n. 9, p. 681-687, Sep 2006.

MOELLER, B. J.; CAO, Y. *et al.* Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: Role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. **Cancer Cell**, 5, n. 5, p. 429-441, 2004/05/01 2004.

MOELLER, B. J.; DREHER, M. R. *et al.* Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. **Cancer Cell**, 8, n. 2, p. 99-110, 2005/08/01 2005.

MOEN, I.; STUHR, L. E. B. Hyperbaric oxygen therapy and cancer—a review. *In: Target Oncol*, 2012. v. 7, p. 233-242.

MOEN, I.; TRONSTAD, K. J.; KOLMANNSSKOG, O.; SALVESEN, G. S. *et al.* Hyperoxia increases the uptake of 5-fluorouracil in mammary tumors independently of changes in interstitial fluid pressure and tumor stroma. **BMC Cancer**, 9, p. 446, Dec 17 2009.

NEURATH, M. F.; WITTKOPF, N.; WLODARSKI, A.; WALDNER, M. *et al.* Assessment of tumor development and wound healing using endoscopic techniques in mice. **Gastroenterology**, 139, n. 6, p. 1837-1843.e1831, Dec 2010.

NITA, M. E.; NAGAWA, H.; TOMINAGA, O.; TSUNO, N. *et al.* 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. **Br J Cancer**, 78, n. 8, p. 986-992, Oct 1998.

OGURA, E.; SENZAKI, H.; YAMAMOTO, D.; YOSHIDA, R. *et al.* Prognostic significance of Bcl-2, Bcl-xL/S, Bax and Bak expressions in colorectal carcinomas. **Oncol Rep**, 6, n. 2, p. 365-369, Mar-Apr 1999.

OLSON, T. J. P.; HADAC, J. N.; SIEVERS, C. K.; LEYSTRA, A. A. *et al.* Dynamic Tumor Growth Patterns in a Novel Murine Model of Colorectal Cancer. **Cancer Prev Res (Phila)**, 7, n. 1, p. 105-113, Jan 2014.

PARRA, R. S.; LOPES, A. H.; CARREIRA, E. U.; FEITOSA, M. R. *et al.* Hyperbaric oxygen therapy ameliorates TNBS-induced acute distal colitis in rats. **Med Gas Res**, 5, p. 6, 2015.

PATYAR, S.; PATYAR, R. R.; MEDHI, B.; KHANDUJA, K. L. Chemopreventive effect of artesunate in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *In: J Adv Pharm Technol Res*, 2017. v. 8, p. 102-107.

PICKERT, G.; NEUFERT, C.; LEPPKES, M.; ZHENG, Y. *et al.* STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. **J Exp Med**, 206, n. 7, p. 1465-1472, Jul 06 2009.

PONTA, H.; SHERMAN, L.; HERRLICH, P. A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 4, n. 1, p. 33-45, Jan 2003.

PRETLOW TP, P. T. Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): initiation of colorectal cancer? - Abstract - Europe PubMed Central. 2005-11-01 2005. Research Support, N.I.H., Extramural.

RAMPINO, N.; YAMAMOTO, H.; IONOV, Y.; LI, Y. *et al.* Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. **Science**, 275, n. 5302, p. 967-969, Feb 14 1997.

REFAAT, B.; EL-SHEMI, A. G.; KENSARA, O. A.; MOHAMED, A. M. *et al.* Vitamin D3 enhances the tumouricidal effects of 5-Fluorouracil through multipathway mechanisms in azoxymethane rat model of colon cancer. *In: J Exp Clin Cancer Res*, 2015. v. 34.

REX, D. K.; BOLAND, C. R.; DOMINITZ, J. A.; GIARDIELLO, F. M. *et al.* Colorectal Cancer Screening: Recommendations for Physicians and Patients from the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. **Am J Gastroenterol**, May 30 2017.

SHINAGAWA, K.; KITADAI, Y. *et al.* Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. **International Journal of Cancer**, 127, n. 10, p. 2323-2333, 2017.

SIEGEL, R. L., MILLER, K. D. AND JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA A Cancer J Clin**: 69: 67-34 p. 2019.

SMITH, R. A.; MANASSARAM-BAPTISTE, D.; *et al.* Cancer screening in the United States, 2014: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 64, n. 1, p. 30-51, 2015.

STUHR, L. E.; IVERSEN, V. V.; STRAUME, O.; MAEHLE, B. O. *et al.* Hyperbaric oxygen alone or combined with 5-FU attenuates growth of DMBA-induced rat mammary tumors. **Cancer Lett**, 210, n. 1, p. 35-40, Jul 8 2004.

TAKETO, M. M.; EDELMANN, W. Mouse models of colon cancer. **Gastroenterology**, 136, n. 3, p. 780-798, Mar 2009.

TAKIGUCHI, N.; SAITO, N.; NUNOMURA, M.; KOUDA, K. *et al.* Use of 5-FU plus hyperbaric oxygen for treating malignant tumors: evaluation of antitumor effect and measurement of 5-FU in individual organs. **Cancer Chemother Pharmacol**, 47, n. 1, p. 11-14, 2001.

TANG, N.; WANG, L.; ESKO, J.; GIORDANO, F. J. *et al.* Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. **Cancer Cell**, 6, n. 5, p. 485-495, Nov 2004.

TOFFOLI, S.; MICHIELS, C. Intermittent hypoxia is a key regulator of cancer cell and endothelial cell interplay in tumours. **Febs j**, 275, n. 12, p. 2991-3002, Jun 2008.

VIOLETTE, S.; POULAIN, L. *et al.* Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-XL in addition to Bax and p53 status. **International Journal of Cancer**, 98, n. 4, p. 498-504, 2017.

VISCA, P.; DEL NONNO, F.; BOTTI, C.; MARANDINO, F. *et al.* Role and prognostic significance of CD44s expression in colorectal cancer. **Anticancer Res**, 22, n. 5, p. 2671-2675, Sep-Oct 2002.

WATSON, A. J.; COLLINS, P. D. Colon cancer: a civilization disorder. **Dig Dis**, 29, n. 2, p. 222-228, 2011.

WATSON, E. R.; HALNAN, K. E.; DISCHE, S.; SAUNDERS, M. I. *et al.* Hyperbaric oxygen and radiotherapy: a Medical Research Council trial in carcinoma of the cervix. **Br J Radiol**, 51, n. 611, p. 879-887, Nov 1978.

WU, X. Y.; FU, Z. X.; WANG, X. H. Effect of hypoxia-inducible factor 1-alpha on Survivin in colorectal cancer. **Mol Med Rep**, 3, n. 3, p. 409-415, May-Jun 2010.

YLAGAN, L. R.; SCHOLLES, J.; DEMOPOULOS, R. Cd44: a marker of squamous differentiation in adenosquamous neoplasms. **Arch Pathol Lab Med**, 124, n. 2, p. 212-215, Feb 2000.

ZHANG, W.; SHI, X.; PENG, Y.; WU, M. *et al.* HIF-1 α Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis through Direct Regulation of ZEB1 in Colorectal Cancer. *In*: **PLoS One**, 2015. v. 10.

ZHENG, J.; FENG, X.; HU, W.; WANG, J. *et al.* Systematic review and meta-analysis of preoperative chemoradiotherapy with or without oxaliplatin in locally advanced rectal cancer. **Medicine (Baltimore)**, 96, n. 13, p. e6487, Mar 2017.

ZHOU, Z. R.; LIU, S. X.; ZHANG, T. S.; CHEN, L. X. *et al.* Short-course preoperative radiotherapy with immediate surgery versus long-course chemoradiation with delayed surgery in the treatment of rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. **Surg Oncol**, 23, n. 4, p. 211-221, Dec 2014.

ZIGMOND, E.; HALPERN, Z.; ELINAV, E.; BRAZOWSKI, E. *et al.* Utilization of Murine Colonoscopy for Orthotopic Implantation of Colorectal Cancer. *In*: **PLoS One**, 2011. v. 6.

ZOLLER, M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? **Nat Rev Cancer**, 11, n. 4, p. 254-267, Apr 2011.

ANEXOS

Anexo 1- Protocolo de liberação do controle de experimentação animal 185/2014

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Meus Sistemas | Meus Dados | Sai

Controle Experimentação Animal

Visualização do Protocolo

Seja bem vindo(a) OMAR FERES

Protocolo

▼ Protocolos Emitidos

Dados do protocolo

Protocolo: 0185/2014

Título: EFEITOS DA COLITE ASSOCIADA À CARCINOGENESE DE CÓLON SOBRE A DETOXIFICAÇÃO TECIDUAL: MODULAÇÕES DETERMINANTES DA MANIFESTAÇÃO TUMORAL (FASE II)

Situação: DELIBERAÇÃO APROVADA

Emissor: OMAR FERES

Protocolo emitido

1 of 4

Find | Next

PROTOCOLO: 185/2014

SISTEMA DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

1. Finalidade para uso dos animais em experimentação

PROJETO PESQUISA

2. Data prevista para início e término do projeto.

Início: 10/12/2014

Término: 10/12/2016

3. Dados Docente Responsável

Emissor: Omar Feres

Docente Responsável: Omar Feres

Unidade: FMRP

Anexo 2- Tabela dos achados endoscópicos

Grupo controle- 1 mês							
Animal	Achados perianais	Transparência da parede	Sangramento intestinal	Lesões focais	identificador decimal	Numero de lesões focais	TOTAL
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0
Grupo controle- 2 meses							
Animal	Achados perianais	Transparência da parede	Sangramento intestinal	Lesões focais	identificador decimal	Numero de lesões focais	TOTAL
1	0	1	0	0	0	0	1
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	1	0	0	0	0	1
5	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0
13	0	1	0	0	0	0	1
14	0	0	0	0	0	0	0

Grupo MNNG- 1 mês							
Animal	Achados perianais	Transparência da parede	Sangramento intestinal	Lesões focais	identificador decimal	Numero de lesões focais	TOTAL
1	0	0	1	0	0	0	1
2	0	0	1	1	0,6	0,001	2,601
3	0	1	0	1	0	0	2
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	1	0	1	0	0	2

6	0	1	0	0	0	0	1
7	0	0	0	0	0	0	0
8	0	1	1	1	0	0	3
9	0	1	0	1	0,6	0,001	2,601
10	0	1	0	0	0	0	1
11	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	1	0	0	0	1
13	0	0	0	1	0	0	1
14	0	1	0	0	0	0	1
15	0	0	1	0	0	0	1
Grupo MNNG- 2 meses							
Animal	Achados perianais	Transparência da parede	Sangramento intestinal	Lesões focais	identificador decimal	Numero de lesões focais	TOTAL
1	0	1	0	1	0,6	0,001	2,601
2	0	1	1	1	0	0	3
3	0	1	1	1	0,6	0,001	3,601
4	0	0	1	1	0,6	0,001	2,601
5	0	1	0	1	0	0	2
6	0	0	1	0	0	0	1
7	0	1	0	1	0,6	0,001	2,601
8	0	1	0	0	0	0	1
9	0	1	1	1	0	0	3
10	0	1	0	0	0	0	1
11	0	1	0	0	0	0	1
12	0	1	1	0	0	0	2
13	0	1	0	1	0,6	0,001	2,601
14	0	1	1	0	0	0	2
15	0	1	0	1	0,6	0,002	2,602

Grupo 5-FU- 12 semanas							
Anima l	Achados perianais	Transparência da parede	Sangramento intestinal	Lesões focais	identificador decimal	Numero de lesões focais	TOTAL
1	0	1	0	0	0	0	1
2	0	1	1	1	0	0	3
3	0	1	1	1	0,6	0,001	3,601
4	0	1	0	1	0,6	0,001	2,601
5	0	1	0	0	0	0	1
6	0	1	0	1	0,6	0,003	2,603
7	0	0	0	0	0	0	0
8	0	1	0	1	0	0	2
9	0	1	0	1	0,6	0,02	2,62

Grupo OHB- 12 semanas							
Animal	Achados perianais	Transparência da parede	Sangramento intestinal	Lesões focais	identificador decimal	Numero de lesões focais	TOTAL
1	0	1	1	1	0,6	0,001	3,601
2	0	1	1	1	0	0	3
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	1	0	0	0	0	1
5	0	1	1	1	0	0	3
6	0	1	1	0	0	0	2
7	0	1	0	1	0	0	2
8	0	1	0	1	0	0	2
9	0	1	1	0	0	0	2

Grupo 5-FU+OHB- 12 semanas							
Animal	Achados perianais	Transparência da parede	Sangramento intestinal	Lesões focais	identificador decimal	Numero de lesões focais	TOTAL
1	0	1	0	0	0	0	1
2	0	1	0	1	0	0	2
3	0	1	1	1	0	0	3
4	0	1	0	1	0	0	2
5	0	1	0	1	0	0	2
6	0	1	1	1	0	0	3
7	0	1	1	1	0,6	0,001	3,601
8	0	1	1	0	0	0	2
9	0	1	1	1	0	0	3
10	0	1	1	0	0	0	2

Anexo 3- Análise estatística

	MNNG	HBO	5FU	5FU+HBO	p
Índice de criptas displásicas	8,6	4	3,25	1,6	ns
Índice de criptas necróticas	0,133	0,166	2	5,5	<0,0001
Índice de células apoptóticas por cripta displásica	2,067	3,167	5	10,4	<0,0001
Índice de espaços criptais vazios	-	0,166	0,5	3,1	<0,0001
Expressão do HIF1	3,733	1,667	11	3,4	<0,0001
Expressão do CD44	0,733	0,333	6,5	1,2	<0,0001
Expressão da Survivina	4,867	2,5	14,3	7,2	<0,0001
Expressão do BAX	6,267	5,667	11,75	20,2	<0,05

Índice de criptas displásicas	MNNG	HBO	5FU	5FU+OHB
MNNG	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001
HBO	<0,0001	-	ns	<0,05
5FU	<0,0001	ns	-	ns
5FU+OHB	<0,0001	<0,05	ns	-
Índice de células apoptóticas por cripta displásica	MNNG	HBO	5FU	5FU+OHB
MNNG	-	ns	<0,0001	<0,0001
HBO	ns	-	ns	<0,0001
5FU	<0,0001	ns	-	<0,0001
5FU+OHB	<0,0001	<0,0001	<0,0001	-
Índice de criptas necróticas	MNNG	HBO	5FU	5FU+OHB
MNNG	-	ns	<0,0001	<0,0001
HBO	Ns	-	<0,0001	<0,0001
5FU	<0,0001	<0,0001	-	<0,0001
5FU+OHB	<0,0001	<0,0001	<0,0001	-
Índice de espaços criptais vazios	MNNG	HBO	5FU	5FU+OHB
MNNG	-	-	-	-

HBO	-	-	ns	<0,0001
5FU	-	Ns	-	<0,0001
5FU+OHB	-	<0,0001	<0,0001	-
Expressão do HIF1	MNNG	HBO	5FU	5FU+OHB
MNNG	-	ns	<0,0001	ns
HBO	Ns	-	ns	ns
5FU	<0,0001	<0,0001	-	<0,0001
5FU+OHB	ns	ns	<0,0001	-
Expressão do CD44	MNNG	HBO	5FU	5FU+OHB
MNNG	-	ns	<0,0001	ns
HBO	Ns	-	ns	ns
5FU	<0,0001	<0,0001	-	<0,0001
5FU+OHB	ns	ns	<0,0001	-
Expressão da Survivina	MNNG	HBO	5FU	5FU+OHB
MNNG	-	<0,05	<0,0001	<0,01
HBO	<0,05	-	<0,0001	<0,0001
5FU	<0,0001	<0,0001	-	<0,0001
5FU+OHB	<0,01	<0,0001	<0,0001	-
Expressão do BAX	MNNG	HBO	5FU	5FU+OHB
MNNG	-	ns	<0,001	<0,05
HBO	Ns	-	<0,001	<0,05
5FU	<0,001	<0,001	-	<0,05
5FU+OHB	<0,05	<0,05	<0,05	-