**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**

STEFÂNIA BOVO MINTO

Avaliação da imunoexpressão de metalotioneína e ciclooxigenase-2 na fase precoce da carcinogênese experimental colônica associada à desnervação mientérica

**Ribeirão Preto
2016**

STEFÂNIA BOVO MINTO

Avaliação da imunoexpressão de metalotioneína e ciclooxigenase-2 na fase precoce da carcinogênese experimental colônica associada à desnervação mientérica

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

*Área de concentração: Patologia.
Opção: Patologia Experimental.*

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia

VERSÃO CORRIGIDA

A versão original encontra-se disponível no Departamento de Patologia e Medicina Legal – FMRP-USP

RIBEIRÃO PRETO

2016

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.

Bovo Minto, Stefânia.

Avaliação da imunoexpressão de metalotioneína e ciclooxigenase-2 na fase precoce da carcinogênese experimental colônica associada à desnervação mientérica. 2016.

73p. : il. ; 30 cm.

Versão Corrigida.

Orientador: Garcia, Sérgio Britto.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia experimental.

Stefânia Bovo Minto

Avaliação da imunoexpressão de metalotioneína e ciclooxigenase-2 na fase precoce da carcinogênese experimental colônica associada à desnervação mientérica

*Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.
Área de concentração: Patologia Experimental.*

Banca Examinadora

1)Prof.(a). Dr.(a).:_____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2)Prof.(a). Dr.(a).:_____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3)Prof.(a). Dr.(a).:_____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e ao Espírito Santo, sempre presente em minha vida e de minha família, sendo suporte e fonte inesgotável de luz.

À minha amada família, principalmente aos meus pais Maristela B. Minto e João E. Minto, e irmã Slana B. Minto, por todo o amor, apoio e por sempre me incentivarem e acreditarem em mim, muito obrigada. Vocês são meus maiores exemplos.

Ao meu namorado e melhor amigo Teilor Martins, por toda a paciência, parceria e amor compartilhados em mais uma etapa de minha vida, meu eterno obrigada.

Ao meu orientador, Prof^o Dr. Sérgio Britto Garcia: serei eternamente grata pela oportunidade concedida; por toda a confiança em mim depositada; por toda a ajuda e ensinamentos, que só contribuem para o meu crescimento profissional e como pessoa; por ser exemplo profissional a todos os alunos.

À Rô (Rosângela O. Lopes), por ser uma verdadeira amiga, presente em todos os momentos; à Érika P. D. Gual, por seu exemplo de força; Muito obrigada à vocês duas por toda a ajuda com as técnicas histológicas e com a execução do presente trabalho;

Às amigas que o mestrado me proporcionou: à Andrea S. D. Terada, por toda a ajuda e por compartilhar histórias, momentos e risadas; à Isabela C. S. Marques, por toda a ajuda neste trabalho e pelas incontáveis risadas; à Célia R. L. Marino, por ser uma amiga para todas as horas; à Nádia C. Noronha, por todos os ensinamentos; aos amigos Ana Carolina Alvarenga, Everton Félix, Carolina L. Carezzatto, Laís Natario, Mariane L. Quaglio e Áureo Favaretto Júnior, por toda a alegre convivência e ajuda.

A todas as amigas que o Departamento de Patologia me proporcionou. Funcionários, colaboradores e alunos, muito obrigada por tudo.

Carlos Henrique C. Ribeiro e Ana Carolina L. Veloni, amigos de biotério, muito obrigada por toda a ajuda de sempre e pela dedicação pelo que fazem. Toda a atenção, auxílio, e ensinamentos foram de grande valia em meu crescimento.

A CAPES, por todo o suporte financeiro e por proporcionar a realização deste trabalho.

***“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil.
No entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”
(Albert Einstein)***

MINTO, S.B. **Avaliação da imunexpressão de metalotioneína e ciclooxigenase-2 na fase precoce da carcinogênese experimental colônica associada à desnervação mientérica, 2016.** Dissertação. Departamento de Patologia e Medicina Legal – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar os efeitos da inflamação e das expressões de metalotioneínas (MTs) e ciclooxigenase-2 (COX-2) na desnervação associada à carcinogênese experimental colônica, através da avaliação de imunexpressão de COX-2, mieloperoxidase (MPO), neutrophil elastase (NE) e cluster de diferenciação 68 (CD68). Ainda, para analisar a presença de mutações e de danos ao material genético, realizou-se a técnica de imunoistoquímica para identificação de células imunomarcadas para MTs e histonas gamma-H2AX (H2AX). 52 ratos machos Wistar foram divididos em seus respectivos grupos: C (controle), B (controle dos animais desnervados), D (aplicação de DMH 30 mg/Kg ou 125 mg/Kg), BD (Cloreto de benzalcônio 0,3% na serosa intestinal, com posterior aplicação de DMH) e DB (aplicação de DMH, com posterior administração de BAC), sendo subdivididos de acordo com o tempo em que foram mortos, sendo: 24 horas, 72 horas (para avaliação da fase de iniciação) e 20 dias (para avaliação da fase de promoção). Como resultado, a desnervação foi capaz de proteger as células colônicas contra os efeitos desse carcinógeno, o que pode ser observado através da diminuição significativa da imunomarcagem de MTs e de H2AX nos grupos desnervados. Ainda, através do aumento do número de células positivamente marcadas para MPO, NE e CD68, neutrófilos, macrófagos e/ou monócitos podem estar estritamente relacionados ao papel protetor da desnervação contra o câncer em um período de 20 dias após administração do DMH, uma vez que os animais desnervados apresentaram uma significativa diminuição desses marcadores. A desnervação aumentou o número de células imunomarcadas para MTs em animais que receberam apenas a aplicação do DMH e foram mortos após 20 dias – o que possivelmente diminuiu a expressão de COX-2 encontrada nesse estudo. Assim, sugere-se que os possíveis mecanismos protetores desempenhados pela desnervação contra o câncer sejam: (i) o aumento de MTs – conhecidamente protetoras à célula, e (ii) atuação da desnervação sobre o processo inflamatório, mais especificamente sobre neutrófilos e macrófagos e/ou monócitos.

Palavras-chave: Carcinogênese colônica experimental, Desnervação mientérica, Inflamação.

MINTO, S.B. **Immunoexpression assessment of methallothionein and cyclooxygenase-2 on early colonic experimental carcinogenesis associated to myenteric denervation, 2016.** Master's dissertation. Department of Pathology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2016.

ABSTRACT

This study evaluated the effects of inflammation and expression of metallothionein (MTs) and cyclooxygenase-2 (COX-2) on denervation associated to colonic experimental carcinogenesis by immunohistochemical evaluation of COX-2, myeloperoxidase (MPO), neutrophil elastase (NE) and cluster of differentiation 68 (CD68). Also, to analyze the presence of mutations and damage to DNA, was performed the immunohistochemical technique to identify positive immunostained cells for MTs and histone gamma-H2AX (H2AX). 52 male Wistar rats were divided into their respective groups: C (control), CB (control related to denervated animals), D (application of DMH 30 mg/Kg or 125 mg/kg), BD (0.3% benzalkonium chloride administration in the intestinal serosa, and subsequent application of DMH) and DB (application of DMH with subsequent administration of BAC, in serous). The animals were subdivided according to euthanasia time: 24 hours, 72 hours (for evaluation of the initiation phase of the carcinogenesis process) and 20 days (for assessment of promoting phase). As result, the denervation process was able to protect colonic cells against the carcinogen effects, which can be seen through the significant decrease in immunostained cells for MTs and H2AX. Moreover, through the increased expression of MPO, NE and CD68, we found that neutrophils, macrophages and/or monocytes are closely related to inflammation on development of early colonic experimental carcinogenesis (20 days groups) - which was reverted by denervation. The denervation increased the number of immunostained cells for MTs in denervated animals that received application of DMH - what could possibly decreased COX-2 expression found in this study. Thus, it is suggested that the possible protective mechanisms performed by denervation against cancer are: (i) increased MTs - known to be protective to the cell, and (ii) actuation on inflammatory process, more specifically on neutrophils and macrophages and/or monocytes.

Key-words: Colonic experimental carcinogenesis, Myenteric denervation, Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquematização dos grupos experimentais.....	34
Figura 2: Expressão imunoistoquímica de gamma-H2AX.....	40
Figura 3: Fotomicrografias da imunomarcção para H2AX	41
Figura 4: Expressão imunoistoquímica de MPO.....	42
Figura 5: Fotomicrografias da imunomarcção para MPO.....	43
Figura 6: Expressão imunoistoquímica de NE.....	44
Figura 7: Expressão imunoistoquímica de COX-2 no epitélio colônico.....	46
Figura 8: Expressão imunoistoquímica de COX-2 estromal.....	46
Figura 9: Fotomicrografias da imunomarcção para NE e COX-2.....	47
Figura 10: Expressão imunoistoquímica de CD68.....	48
Figura 11: Criptas colônicas inteiras com imunomarcção para metalotioneína..	50
Figura 12: Expressão imunoistoquímica difusa de metalotioneínas no epitélio colônico.....	50
Figura 13: Fotomicrografias da imunomarcção para MTs.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peso inicial e taxa de mortalidade.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs -	Antiinflamatórios não-esteróides
AOM -	Azoxymethane
APC -	Adenomatous polyposis coli
BAC -	Benzalkonium chloride
BHT -	Butylated hydroxy toluene
BRAF -	Proto-oncogene B-raf
COX-1 -	Ciclooxigenase-1
COX-2 -	Ciclooxigenase-2
COX-3 -	Ciclooxigenase - 3
CCR -	Câncer colorretal
CD4+ -	Cluster of Differentiation 4 positive
CD8+ -	Cluster of Differentiation 8 positive
CD68 -	Cluster of Differentiation 68
C-myc -	Cell-myc
DAB -	3,3'- diaminobenzidina
DNA -	Deoxyribonucleic acid
DMH -	1,2-dimetilhidrazina
EROs -	Espécies reativas do oxigênio
ERNs -	Espécies reativas do nitreogênio
Gamma-H2AX -	Histona gamma 2AX
H.E. -	Hematoxilina-Eosina
IL-1 beta -	Interleucina 1- beta
IL-17 -	Interleucina 17
IL-23 -	Interleucina 23
k-ras-	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
LOX -	Lipoxigenase
MCA -	Methylcholanthrene1
MLH1 -	MutLhomolog 1
MMP-8 -	Matrix metalloproteinase - 8
MNNG -	N-Metil-N-nitroso-N-guanidina
MPO -	Mieloperoxidase

MT -	Metalotioneína
NaCl -	Cloreto de Sódio
NE -	Neutrophil Elastase
PI-3K -	Phosfatidilinositol-3-kinase
PBS -	Phosphate Buffered Saline
PCNA -	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PGE-2 -	Prostaglandina E-2
PMN -	Polimorfunucleares
P1GF -	Placent Derived Growth Factor
SNC -	Sistema Nervoso Central
SNE -	Sistema Nervoso Entérico
TAN1 -	Tumor-associated neutrophils1
TAN2 -	Tumor associated neutrophils 2
TNF- α -	Tumoral Necrosis Factor – alfa
TNF- β -	Tumoral Necrosis Factor – beta
VEGF -	Vascular Endolthelial Growth Factor
Wnt -	Wingless-type

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Câncer de cólon: contextualização.....	14
1.2 Carcinogênese colorretal.....	15
1.3 Inflamação e carcinogênese.....	18
1.4 Ciclooxigenase-2.....	19
1.5 Metalotioneínas.....	21
1.6 Inflamação no papel protetor da desnervação contra a carcinogênese.....	22
1.6.1 Neutrófilos.....	22
1.6.2 Neutrophil elastase.....	24
1.6.3 Macrófagos e monócitos.....	25
1.6.4 Cluster de diferenciação 68.....	26
1.6.5 Mieloperoxidase.....	27
1.7 Avaliação de danos ao material genético.....	27
1.7.1 Histona gamma-H2AX.....	27
1.8 Desnervação mientérica.....	28
2 JUSTIFICATIVA.....	31
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 Animais e procedimentos.....	33
4.2 Delineamento experimental.....	33
4.3 Modelo experimental de carcinogênese colônica.....	35
4.4 Modelo experimental de desnervação mientérica.....	35
4.5 Coleta e processamento do material.....	36
4.6 Reações Imunoistoquímicas.....	37
4.7 Análises imunoistoquímicas.....	38
4.8 Análises Estatísticas.....	38

5 RESULTADOS.....	39
5.1 Análise da imunomarcção de gamma-H2AX.....	40
5.2 Análise da imunomarcção de MPO.....	42
5.3 Análise da imunomarcção de NE.....	44
5.4 Análise da imunomarcção de COX-2.....	45
5.5 Análise da imunomarcção de CD68.....	48
5.6 Análise da imunomarcção de MTs.....	49
6 DISCUSSÃO.....	52
7 CONCLUSÃO.....	57
8 REFERÊNCIAS.....	58
9 ANEXO.....	71

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de cólon: contextualização

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mundialmente mais comum em homens (total de casos: 746.000 – representando 10% do total) e o segundo em mulheres (total de casos: 614.000, representando 9,2% do total). Pelo menos 55% do total de casos mundiais ocorrem em regiões bem desenvolvidas economicamente, sendo comum na Austrália e Nova Zelândia, por exemplo, e pouco comum na África Ocidental. Com relação a sua mortalidade, possui maiores taxas (52%) também em regiões bem desenvolvidas economicamente – o que reflete, de maneira preocupante, um prognóstico ruim nessas regiões (Ferlay *et al.*, 2015). No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (Instituto Nacional do Câncer, 2016), são estimados para o ano de 2016 34.280 novos casos de CCR, sendo 16.660 em homens e 17.620 em mulheres. Esses dados representam um risco estimado de 16,84 novos casos a cada 100 mil homens e 17,10 novos casos a cada 100 mil mulheres. Com relação aos homens, O CCR é o segundo tipo de câncer mais frequente na região sudeste do país e o terceiro nas regiões sul e centro-oeste, ocupando a quarta posição nas regiões nordeste e norte do Brasil. Com relação às mulheres, é o segundo tipo de câncer mais freqüente na região sudeste e na região sul do país, sendo o terceiro tipo mais freqüente nas regiões centro-oeste, nordeste e norte do país (Instituto Nacional do Câncer, 2016). Portanto, podemos afirmar que o câncer de cólon está entre as malignidades com as mais altas taxas de incidência (Atkin *et al.*, 2010; Li e Lai, 2009) mundiais, que seu diagnóstico tardio se deve principalmente a sua pobre sintomatologia (Habr-Gama, 2005) e que, ainda, sua incidência aumenta proporcionalmente à idade (Baena e Salinas, 2015).

A obesidade (Tárraga López, Albero e Rodríguez-Montes, 2014), a falta de exercícios físicos (Brenner e Hoffmeister, 2014) e uma dieta desbalanceada representam fatores essenciais para a susceptibilidade ao CCR, sendo a dieta considerada o principal fator – com uma relação de 35% (Brenner e Hoffmeister, 2014). O consumo exagerado de carne vermelha e/ou processada (Sutandyo, 2010), a deficiência no consumo de peixes (Vargas e Thompson, 2012), frutas, vegetais (Vauzour *et al.*, 2010) e fibras (Jacobs, 1986) culminam em alterações orgânicas

diversas, aumentando significativamente os riscos de desenvolvimento de diversas patologias e cânceres, incluindo o CCR. O consumo inadequado de carnes vermelhas e/ou processadas contribui para a formação de aminas aromáticas heterocíclicas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, compostos n-nitrosos, ferro heme e, ainda, contribui para que ocorra um aumento na resistência à insulina, o que provoca uma maior liberação de ácidos biliares secundários – fatores desencadeantes da carcinogênese colorretal (Baena e Salinas, 2015).

1.2 Carcinogênese colorretal

O cólon ou intestino grosso é constituído por sete porções distintas, sendo elas: ceco, cólon proximal, cólon transversal, cólon distal, cólon sigmóide, reto e canal anal. Sua parede é composta por quatro camadas, do lúmen para o exterior: mucosa, submucosa, muscular própria e a serosa. A mucosa é composta pelas denominadas “criptas de Lieberkuhn” – estruturas formadas por células epiteliais colunares dispostas em formato de invaginações na mucosa, exercendo a função de absorção e de conformação epitelial. Milhões de criptas compõem o cólon, sendo que cada uma é composta por aproximadamente 250 células (Booth e Potten, 2000). Cada cripta é constituída por colonócitos, que são responsáveis pela absorção colônica, por células caliciformes (ou células de Globet), que são responsáveis pela secreção de muco e por células enteroendócrinas, secretoras de hormônios. Assim, demonstradas a anatomia, funcionalidade e a composição celular do cólon, a carcinogênese colônica, pode ser dividida didaticamente em 3 fases distintas, sendo elas as fases de iniciação, promoção e progressão. Essa visão da carcinogênese como um processo derivado de diferentes fases foi lançada entre os anos 80 e 90, através de experimentação animal (Luebeck e Hazelton, 2002). De acordo com essa divisão, a iniciação ocorre da seguinte maneira: geralmente células-tronco (podendo ser outro tipo celular), que sofreram lesões (“hits”) em seu genoma por substâncias carcinogênicas, se tornam malignas através da perda funcional de um ou dois genes supressores tumorais. Então, essa célula iniciada pode sofrer apoptose, como um mecanismo de autodefesa frente às mutações ou pode evoluir para a fase de promoção tumoral, fazendo com que a perda de funcionalidade genética culmine na desregulação da homeostase e do volume celular regular tecidual. A promoção pode

ocorrer de maneira autônoma ou através de estímulos emitidos por fatores endógenos, como interleucinas e hormônios, e/ou por meio de fatores exógenos, como o ambiente em que o indivíduo se expõe. Assim, nesta fase as células iniciadas sofrem um processo de expansão clonal, no qual são originados clones descendentes da célula-tronco mutada, com características hiper-proliferativas. Tais eventos permitem o acúmulo e a fixação de mutações no tecido (Fearon e Vogelstein, 1990; Barker *et al.*, 2009), sendo o resultado final desse processo a criação de uma célula maligna, capaz de progredir rapidamente para um tumor visível (Luebeck e Hazelton, 2002). Com o intuito de melhor estabelecer os mecanismos de desenvolvimento do CCR, foi proposto pelos pesquisadores Fearon e Vogelstein (1990) que a carcinogênese colônica se desenvolveria a partir de uma cadeia de eventos mutagênicos, denominados de “sequência adenoma-adenocarcinoma” (Fearon e Vogelstein, 1990). Neste modelo, o primeiro gene a sofrer mutação e desencadear o processo de carcinogênese é o gene APC, que é relacionado à regulação de β -catenina, a apoptose e ao controle do ciclo celular, por exemplo. Em resumo, a proteína APC sinaliza a Via Wnt, promovendo sua ativação, resultando em um acúmulo de β -catenina no citoplasma. A β -catenina livre se liga, então, à proteína do fator de transcrição formando um complexo que migra para o núcleo celular, culminando em aumento da expressão do gene cMyc, resultando em aumento da proliferação celular - que é um dos primeiros eventos detectados na carcinogênese de cólon (Campbell *et al.*, 2003). Há indícios de proliferação celular principalmente em focos de cripta aberrante (Polyak *et al.*, 1996; Corpet e Pierre, 2005), presentes tanto no cólon de roedores tratados com carcinógenos químicos quanto no ser humano acometido por câncer de colon (Pretlow *et al.*, 1991; Alrawi *et al.*, 2006). O segundo gene a sofrer mutação na carcinogênese colônica é o k-ras, favorecendo também a proliferação celular, neoplasia e anaplasia. Existe, ainda, uma segunda via de mutações que desenvolvem o CCR, denominada “via de instabilidade de microssatélites”, que é relacionada a defeitos no reparo *mismatch* do DNA. Basicamente, esta via ocorre através da combinação de alguns fatores, sendo eles: a instabilidade de microssatélites, a mutação no gene BRAF e a metilação de alvos específicos (como MLH1). O *mismatch* do DNA é um processo de reparo que atua como um fator protetor ao desenvolvimento de cânceres. Portanto, se há um defeito nesse processo, há também um aumento na probabilidade de

desenvolvimento dessa patologia (Buermeyer *et al.*, 1999). Curiosamente, os genes k-ras e p53 não se encontram mutados nesta via, diferentemente do modelo adenoma-adenocarcinoma. Outra via de desenvolvimento do CCR ainda é relatada com menor incidência do que as anteriores, porém, com malignidade muito superior. Essa via foi descrita primeiramente em 1947 por Helwig, o qual definiu como carcinoma “*de novo*” todo carcinoma originado a partir de uma via na qual a mucosa colônica, por exemplo, poderia gerar diretamente um carcinoma, sem a realização dos passos pré-estabelecidos por Fearon e Vogelstein na sequência adenoma-adenocarcinoma (Helwig, 1947). Ou seja: o carcinoma se desenvolve diretamente na mucosa colorretal, sem a formação prévia de lesões pré-neoplásicas. Esse tipo de CCR possui maior incidência de células aneuplóides (75%), possuindo, portanto, um maior grau de malignidade quando comparado a CCR desenvolvido a partir do modelo proposto por Fearon e Vogelstein ou por defeitos no reparo *mismatch* do DNA. O modelo de carcinoma *de novo* é de extrema importância ao presente estudo, uma vez que um estudo realizado no ano de 1981 mostrou previamente que a maioria de adenocarcinomas induzidos por DMH experimentalmente foram de perfil invasivos, encontrados microscopicamente de modo frequente na mucosa plana, ou seja: sem a formação prévia de pólipos adenomatosos (Maskens e Dujardin-Loits, 1981). Desse modo, carcinoma “*de novo*” é o modelo reproduzido na carcinogênese colorretal experimental induzida pelo DMH. Assim, devido à importância do câncer de cólon e às suas altas taxas de incidência, modelos de carcinogênese experimental são desenvolvidos a fim de esclarecer e evidenciar os mecanismos envolvidos nessa neoplasia. Esses modelos experimentais são divididos em dois grupos basicamente, sendo que o primeiro grupo é referente ao CCR induzido geneticamente e o segundo grupo referente ao CCR induzido quimicamente. Geralmente, os modelos geneticamente induzidos de CCR são utilizados para o estudo da polipose adenomatosa familiar e de síndromes hereditárias relacionadas ao CCR. Por outro lado, os modelos quimicamente induzidos de formação do CCR são utilizados para melhor entendimento do CCR esporádico (Kasdagly *et al.*, 2014). Os carcinógenos utilizados nos modelos experimentais químicos de indução de CCR são substâncias capazes de induzir o desenvolvimento de cânceres através de metilação na guanidina, de alquilação ou de mutações específicas no DNA da célula iniciada, sendo que os carcinógenos mais comumente utilizados mundialmente são o

azoximetano (AOM) e a 1,2-dimetilhidrazina (DMH). A DMH induz a formação de focos de criptas aberrantes (FCA), lesões caracterizadas pelo aumento no tamanho das criptas, revestimento epitelial mais espesso que o normal e aumento na zona peri-críptica. Essas lesões foram descritas primariamente por Bird, em 1987 (Bird, 1987) e são encontradas geralmente nos segmentos retal e mediano do cólon em animais tratados com o DMH.

1.3 Inflamação e carcinogênese

As células inflamatórias são alguns dos principais componentes de um microambiente tumoral, exercendo um papel crucial nas fases de promoção, progressão e metástases tumorais (Grivennikov, Greten e Karin, 2010). Portanto, existem determinadas características inflamatórias relacionadas ao câncer, incluindo a presença de células e mediadores inflamatórios no tecido tumoral, remodelamento tecidual e angiogênese, por exemplo (Balkwill, Charles e Mantovani, 2005). A imunidade inata inapropriada induz a ocorrência de infiltrado celular na mucosa digestiva, por exemplo. Essa infiltração é composta por leucócitos PMN, células dendríticas, células *natural-killer* (NK) e linfócitos T. A intensidade desse infiltrado inflamatório depende diretamente da fase em que se encontra a doença digestória em questão (Sandborn *et al.*, 2002). Hofman (Hofman, 2010) elucida em seu artigo que atualmente o papel da inflamação crônica no início da carcinogênese gastrointestinal é bem estabelecido, sendo que a inflamação é capaz de atuar como um fator independente. Contudo, os diferentes eventos celulares e moleculares que ocorrem durante o processo inflamatório na carcinogênese ainda não são bem compreendidos, fazendo-se necessária a realização de mais estudos para elucidar os mesmos. A relação direta entre os sintomas clínicos das doenças gastrointestinais e a presença de leucócitos polimorfonucleares (PMN) na mucosa digestiva já foi demonstrada anteriormente pela literatura. Por exemplo: períodos de diarreia aguda estão fortemente associados a uma elevada migração transendotelial dos leucócitos PMN em direção ao lúmen intestinal (Hofman, 2010). Leucócitos PMN produzem a enzima elastase (Sato *et al.*, 2006), que facilita a invasão da matriz extracelular pela célula tumoral e promovem a liberação de fatores pró-angiogênicos, criando um microambiente favorável para a progressão tumoral. A

ativação das células imunes frente a estímulos inflamatórios promove a liberação de citocinas, quimiocinas, espécies reativas do oxigênio (EROs) e do nitrogênio (ERNs), resultando na oxidação de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios – fatores capazes de induzir a formação de lesões mutagênicas ao DNA. Na carcinogênese colônica associada à colite, por exemplo, as EROs e ERNs podem contribuir de forma efetiva para ocorrência de mutações no gene p53, podendo, portanto, dificultar o processo de reparo *mismatch* do DNA, culminando em câncer (Meira *et al.*, 2008). Além disso, a infiltração e o acúmulo de neutrófilos e de macrófagos e/ou monócitos são fatores presentes durante a inflamação local nas doenças inflamatórias intestinais (Roncucci *et al.*, 2008).

Nesse sentido, demonstrada a importância da inflamação durante a carcinogênese, faz-se necessário a verificação do mecanismo protetor desempenhado pela desnervação mientérica, bem como se este possui relação com o bloqueio e/ou diminuição de processos inflamatórios. Para isso, a análise de tipos celulares essenciais no início e na fase resolutive inflamatória, como neutrófilos e macrófagos e/ou monócitos, através da imunomarcagem de neutrophil elastase, mieloperoxidase e *cluster* de diferenciação 68 é de extrema importância. Para avaliação da efetividade e da citotoxicidade do carcinógeno utilizado no presente estudo, é essencial a realização de análises de marcadores que detectem danos ao material genético, como por exemplo, a histona gamma-H2AX. Para avaliar presença de mutações celulares, bem como de um possível potencial protetor à célula, metalotioneínas serão estudadas no mecanismo protetor desempenhado pela desnervação contra a carcinogênese. Para análise do potencial de progressividade tumoral e também de participação inflamatória durante a carcinogênese, a imunomarcagem para a enzima ciclooxigenase-2 é necessária. O parâmetro estudado foi a análise da imunomarcagem celular dos marcadores acima citados, que serão melhor elucidados a seguir.

1.4 Ciclooxigenase-2

Geralmente os neutrófilos são os tipos celulares predominantes no infiltrado inflamatório, uma vez que se encontram em maior quantidade no sangue, possuem resposta mais rápida frente à ação de quimiocinas e se ligam com maior facilidade à

moléculas de adesão, auxiliando o desenvolvimento do processo inflamatório. A via da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) contribui para que ocorra um acúmulo de neutrófilos no sítio inflamatório, e, quando há aumento nos índices de prostaglandina E-2 (PGE-2), um produto oriundo da via da COX-2, ocorre consequentemente um favorecimento da carcinogênese colorretal através da ativação da via Wnt (Mutoh *et al.*, 2002; Sinicropo e Gill, 2004; Castellone, Teramoto e Gutkind, 2006; Stenson, 2007). Assim, a metabolização do ácido aracdônico pela COX-2 aumenta consideravelmente a síntese de PG em tumores intestinais (Fournier e Gordon, 2000). Eicosanóides originados a partir do ácido araquidônico atuam como mediadores lipídicos e são os primeiros sinais liberados frente à injúria ou à um estímulo inflamatório. Desse modo, existem duas famílias de enzimas, as COX e as lipoxigenases (LOX) que têm como função exercer a metabolização desse ácido para que ocorra a formação de lipídios autocóides (que possuem atividades essenciais fisiológicas ao organismo) (Funk, 2001). Existem duas isoformas das enzimas COX: a primeira, COX-1, é fisiologicamente constitutiva, enquanto a segunda, COX-2, é indutiva, ou seja: possui níveis de expressão significativamente elevados na presença de injúria tissular ou de processos inflamatórios (Yaksh *et al.*, 2001); (Perazella e Tray, 2001). Ainda, existe a COX-3, que ao contrário das COX-1 e 2, não produz substâncias pró-inflamatórias, mas sim antiinflamatórias (Willoughby, Moore e Colville-Nash, 2000). Citocinas, fatores de crescimento e estimuladores tumorais fazem com que ocorra uma superexpressão de COX-2, demonstrando, portanto, a importância do estudo dessa enzima no câncer e em diversas patologias relacionadas aos processos inflamatórios (Kummer e Coelho, 2002). Os inibidores seletivos da COX-2, celecoxibe e rofecoxib podem inibir a angiogênese – fator-chave no desenvolvimento tumoral (Tsujii *et al.*, 1998), demonstrando a importância dos mesmos como alternativas terapêuticas no estudo do câncer. Tumores colorretais, tanto em humanos, quanto em animais, apresentam conhecidamente níveis de expressão da COX-2 elevados – enquanto a mucosa intestinal normal apresenta níveis muito baixos ou indetectáveis (Eberhart *et al.*, 1994; Kutchera *et al.*, 1996). A expressão de COX-2 contribuiu significativamente para o aumento do potencial tumorigênico de células epiteliais, através do aumento de adesão à matriz extracelular e de resistência à apoptose exercidos pelas mesmas (Tsujii e Dubois, 1995). Ao comparar modelos de camundongos nulos para COX-2

com camundongos que induzem polipose intestinal e com *wild-types*, foi observada uma diminuição no número e no tamanho de pólipos nos camundongos que não obtinham essa enzima, quando comparados com os outros dois grupos (Oshima *et al.*, 1996). Todos esses achados corroboram com a hipótese que a COX-2 desempenha importantes funções no crescimento e/ou progressão do CCR. Em conclusão, pode-se afirmar que: i) a COX-2 pode atuar como um agente promotor tumoral no intestino; ii) uma elevação na expressão gênica de COX-2 pode ser decorrência de desregulações no gene APC, sugerindo a participação dessa enzima na carcinogênese e iii) a inibição específica da COX-2 é uma alternativa considerável para a prevenção de câncer. Assim, apesar de vários estudos na literatura mencionarem a COX-2 na inflamação relacionada ao câncer, os mecanismos pelos quais sua via medeia funções diversificadas no organismo são desconhecidos. Contudo, sugere-se que a inibição dessa enzima possa limitar a progressividade do CCR, uma vez que a indução dessa patologia ocorre através da ativação crônica da COX-2. Destaca-se na literatura a necessidade de maiores estudos relacionados a essa enzima para que ocorra uma ampliação em torno do conhecimento de seus mecanismos (Dubois *et al.*, 1998).

1.5 Metalotioneínas

As metalotioneínas (MT) representam um grupo de proteínas intracelulares que se localizam em um *cluster* no cromossomo 16q13 em humanos (Cherian, Jayasurya e Bay, 2003), ricas em cisteína e de baixo peso molecular que atuam na ligação e na detoxificação de íons de metais pesados, exercendo, portanto, atividade protetora para a célula (Kägi, 1991; Masters *et al.*, 1994). Em tecidos normais, a expressão dessa proteína é praticamente indetectável, exceto em células epiteliais renais, da tireóide e mioepitelial (Jasani e Elmes, 1991; Ofner *et al.*, 1994), as quais podem apresentar níveis baixos de expressão dessa proteína. Existem quatro tipos de MT, classificados de MT-I até MT-IV, sendo que as MT expressas em tumores são a MT-I e MT-II (Kuraguchi, Thomas e Williams, 1997). Em diversos tipos de câncer ocorre uma hiperexpressão de MT, de acordo com o grau do tumor e com a atividade proliferativa das células tumorais (Theocharis *et al.*, 2004). Tumores de mama, rim, pulmão, bexiga urinária, cervical, endometrial, nasofaríngeo, de pele e

melanoma são exemplos de cânceres que apresentam expressão elevada dessa proteína (Pedersen *et al.*, 2009). O pré-tratamento de camundongos portadores de câncer de bexiga com sais de zinco provocou um aumento na expressão de MTs tanto no tecido normal, quanto no tecido tumoral destes animais. Nesse mesmo estudo, quando os autores injetaram um inibidor de cystationase nos animais, houve uma redução na expressão de MTs promovida pelo zinco e, ainda, uma diminuição na resistência às drogas (Satoh *et al.*, 1994). Entretanto, existem exceções: alguns tipos de tumores podem apresentar uma diminuição na expressão dessa proteína, como por exemplo, tumores hepáticos, gástricos, do sistema nervoso central (SNC), da tireóide e CCR. Em um modelo de carcinogênese colorretal induzida pelo carcinógeno químico DMH, Jasani *et al.* (1988) observaram a presença de criptas isoladas difusas positivas para MTs, indicando um perfil de imunoexpressão restrito á algumas criptas que foi maior após 5 dias da aplicação de DMH, diminuindo ao passar do tempo, até atingir uma redução significativa. Contrariamente, a frequência de criptas totalmente marcadas pela MTs aumentou de maneira significativa e gradativa, à partir dos 5 dias até atingir 30 dias após o DMH. Com esse estudo, os autores demonstraram que a expressão de MTs nas criptas é hereditária e clonal, uma vez que criptas parcialmente marcadas evoluíram para totalmente marcadas ao passar do tempo. Ainda, foi proposto que o aumento na expressão de MTs é relacionado a mutações somáticas de células-tronco (Jasani *et al.*, 1998). Dessa forma, a quantificação de criptas inteiramente marcadas por MT possibilita um método para se estimar o número de células que foram iniciadas pela ação do carcinógeno químico, ou seja, é uma forma de se estimar quantitativamente a iniciação da carcinogênese em uma determinada situação experimental.

1.6 Inflamação no papel protetor da desnervação contra a carcinogênese

1.6.1 Neutrófilos

Os leucócitos polimorfonucleares (PMN), grupo celular em que se enquadram os neutrófilos, possuem papel conhecido no desenvolvimento de diversas doenças do trato gastrointestinal associadas à inflamação, destacando a importância do estudo patológico deste tipo celular (Grisham, Everse e Janssen, 1988). Essas células

sintetizam e armazenam dentro de seus grânulos citoplasmáticos uma grande quantidade de serinas proteinases (como a neutrophil elastase, por exemplo), enzimas (como a mieloperoxidase - MPO, por exemplo), lisozimas e EROs. Os neutrófilos são células que trafegam em tecidos periféricos, sofrem transmigração, apoptose e são, então, fagocitados por macrófagos, sendo que o processo de apoptose ocorre após os neutrófilos entrarem no tecido, desaparecendo após 24 a 48 horas. Nesse sentido, os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para um sítio inflamatório, sendo conhecidamente importantes na inflamação aguda (Soehnlein e Lindbom, 2010; Phillipson e Kubes, 2011; Amulic *et al.*, 2012). São consideradas células de vida relativamente curta, sendo que sua meia vida corresponde a cerca de uma hora e meia na circulação de camundongos e oito horas na circulação de humanos (Zeidler *et al.*, 2009; Dotta, Tassone e Badolato, 2011). De qualquer forma, os neutrófilos são capazes de armazenar mediadores citotóxicos, como as EROs, agentes perfuradores de membrana, proteases e mediadores solúveis de morte celular, como por exemplo o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), a interleucina 1-beta (IL-1 β) e interferons em seu interior, sendo que os todos esses mediadores induzem a morte de células tumorais, induzindo sua apoptose ou lise e mediando os fenômenos de rejeição tumoral e da memória imune antitumoral (Borregaard, 2010). Existem dois tipos de neutrófilos que são associados à ocorrência de tumores: os neutrófilos associados a tumores tipo 1 (TAN1), que exercem atividade antitumoral, e os neutrófilos associados a tumores tipo 2 (TAN2), que exercem funções pró tumorais (Fridlender *et al.*, 2009; Mantovani, 2009). Assim, de acordo com a proporção de TAN1 ou TAN2 em um determinado carcinoma, seu nível de progressão tumoral pode variar (Hofman, 2010). Com relação a sua atividade pró-tumoral, a produção de elastases (Sato *et al.*, 2006), por exemplo, favorece a invasão da matriz extracelular pelas células tumorais. Ainda, promovem a liberação de fatores pró-angiogênicos, criando um microambiente favorável para que ocorra a progressão tumoral (Ardi *et al.*, 2007; Murdoch *et al.*, 2008). Em adição a esses fatores, conhecidamente os tumores necessitam do processo de angiogênese para que seu crescimento seja conciso e persistente. Os TAN2 podem estimular a angiogênese através da liberação de fatores pró-angiogênicos, como por exemplo, VEGF, metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) e pelo fator de crescimento placentário P1GF (Carmeliet, 2005; Ribatti, 2008; Nozawa, Chiu e Hanahan, 2006).

Com relação à ação antitumoral dos neutrófilos, destacam-se a produção de defensinas e os danos oxidativos na membrana provocados pelas EROs derivadas destes tipos celulares, que facilitam a lise da célula tumoral – processo denominado de citotoxicidade neutrofílica (que parece ser seletiva para células cancerosas, não agindo em fibroblastos normais, por exemplo (Gerrard, Cohen e Kaplan, 1981; Lichtenstein *et al.*, 1989; Zivkovic *et al.*, 2005). Em 1992, um estudo mostrou que os neutrófilos recrutados para o pulmão após determinada infecção poderiam ser metabolicamente ativados durante a iniciação da carcinogênese pulmonar e que, a presença de MPO nos grânulos primários de neutrófilos pode contribuir para toxicidade ou para a carcinogênese (Petruska *et al.*, 1992). Há evidências, segundo Piccard (Piccard, Muschel e Opdenakker, 2012), que os neutrófilos estão envolvidos na rejeição tumoral pelo organismo do hospedeiro e na memória imune antitumoral – esta através de interações com os linfócitos CD8+ e/ou CD4+. Os neutrófilos ainda exercem efeito protetor em camundongos contra o desenvolvimento tumoral: a ausência de MMP-8 (conhecidamente produzida pelos neutrófilos) aumentou a incidência de câncer de pele induzido por carcinógenos químicos. Além disso, a presença de MMP-8 no tecido previne a ocorrência de inflamação crônica, caracterizada pelo influxo de neutrófilos no sítio onde foi injetado carcinógeno (Balbín *et al.*, 2003). Em suma, pode-se concluir que os neutrófilos podem atuar contra as células tumorais basicamente através de três formas: 1) indução de citotoxicidade; 2) assistência na rejeição tumoral e 3) memória imune antitumoral. Para aperfeiçoar os tratamentos terapêuticos na área do câncer em geral, se faz necessário entender os papéis dos neutrófilos nas fases iniciais, de desenvolvimento e progressão tumorais, bem como na metástase (Piccard, Muschel e Opdenakker, 2012).

1.6.2 Neutrophil elastase

A NE é uma serina proteinase liberada durante a degranulação celular, sendo suas principais funções a eliminação de microorganismos invasores e atuação na inflamação. Os genes que codificam a NE localizam-se em um cluster no cromossomo 19 em humanos e no cromossomo 10 em camundongos (Zimmer *et al.*, 1992; Belaaouaj *et al.*, 1997). Essa serina proteinase foi utilizada no presente estudo

para confirmação da presença de neutrófilos nas amostras intestinais estudadas. Um estudo mostrou que a NE induziu a proliferação celular tumoral, sendo que essa indução foi significativamente reduzida ao administrar-se um inibidor da NE ou em co-cultura de células tumorais juntamente á neutrófilos nulos para NE. Esse efeito exercido por essa proteinase no crescimento tumoral é dependente da phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K) (Houghton *et al.*, 2010). A NE se localiza em endossomos intra-celulares (Gregory *et al.*, 2012) e induz a proliferação e a capacidade migratória das células tumorais (Wada *et al.*, 2007). A NE pode ser produzida até mesmo por células tumorais. Um imunoenensaio foi realizado para verificar essa hipótese, e, surpreendentemente, mostrou que linhagens de células tumorais de câncer de mama e de pulmão são capazes de produzir NE (Yamashita *et al.*, 1994; Yamashita *et al.*, 1996).

1.6.3 Macrófagos e monócitos

Os macrófagos são células fagocitárias que desempenham seu papel na imunidade inata e são originárias de monócitos recrutados do sangue periférico para os tecidos, diferenciando-se em macrófagos. Foram descritos primeiramente por Ellie Metchnikoff como tipos celulares responsáveis pela fagocitose de elementos invasores (Chernyak e Tauber, 1988). Assim como os neutrófilos, os macrófagos também são divididos em macrófagos associados ao tumor (TAM) do tipo 1 e do tipo 2, sendo, juntamente aos linfócitos T, as células imunes presentes em maior quantidade no microambiente tumoral. Schmidt *et al.* (2012) realizaram um estudo de revisão em que estabeleceram que 468 pacientes com CCR apresentavam um pior prognóstico da doença na presença de macrófagos (Schmidt *et al.*, 2012). Ainda neste estudo de revisão, os autores citam que os macrófagos promovem a migração da célula tumoral, sua invasão e metástase – demonstrando, portanto, a importância do estudo destes tipos celulares no câncer, além de seu conhecido papel na inflamação e imunidade inata. Em humanos, os macrófagos caracterizam-se através da presença de CD16, CD163, CD312 e, principalmente, de CD68 (Qian e Pollard, 2010) – que será avaliado no presente estudo. Monócitos circulantes no sangue realizam o monitoramento da presença de moléculas derivadas de patógenos invasores e, quando há detecção, os monócitos migram para o tecido e iniciam o

recrutamento de outras células efetoras da imunidade para que seja possível o início da resposta imune (Auffray *et al.*, 2007). Através da presença do fator estimulador de colônia-1, os monócitos que então migraram para o tecido se diferenciam em macrófagos – os quais exercem diversas funções, como a eliminação do patógeno e cicatrização de feridas (Tushinski *et al.*, 1982).

Nas fases iniciais do processo inflamatório ocorre a ativação de macrófagos, que são capazes de reagir frente aos sinais liberados por citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e substâncias liberadas de patógenos. Assim, estes sinais fazem com que os macrófagos dêem início ao recrutamento de outros tipos celulares imunes para o sítio inflamatório, bem como a inibição do desenvolvimento do patógeno em questão. Ao ocorrer a completa resolução da infecção ou injúria, com subsequente eliminação do patógeno, os macrófagos ainda se mostram essenciais nas fases resolutivas da inflamação, principalmente por prevenirem futuros danos teciduais no local de injúria. Desta forma, demonstrada a importância desses tipos celulares no início e na resolução da inflamação, e pelos mesmos estarem presentes em grande quantidade no microambiente tumoral, avaliar os efeitos da inflamação na desnervação sobre a carcinogênese experimental colônica se faz essencial.

1.6.4 Cluster de diferenciação 68

O cluster de diferenciação 68 (CD68) é uma proteína expressa em macrófagos e monócitos, que se liga à lipoproteínas de baixa densidade. É uma proteína humana homóloga do macrosialin (equivalente ao CD68, porém em camundongos) e é amplamente utilizado como marcador seletivo de macrófagos e monócitos (Gottfried *et al.*, 2008). Níveis de expressão elevados de CD68 são frequentemente relacionados com altas taxas de metástases e de angiogênese (Leek *et al.*, 1996). Um estudo realizado em 2012 elucida que pacientes apresentaram uma maior sobrevida relacionada à presença de metástases quando havia menores índices de marcação para CD68 (Jézéquel *et al.*, 2012). Desse modo, por ser um marcador seletivo de macrófagos e monócitos, o CD68 foi utilizado no presente estudo a fim de detectar a presença desses tipos celulares na inflamação durante a carcinogênese.

1.6.5 Mieloperoxidase

Para avaliação da presença de neutrófilos e macrófagos e/ou monócitos nas amostras colônicas deste trabalho, utilizou-se a imunomarcação para MPO. A MPO é a enzima mais abundante presente nos grânulos de neutrófilos e também é encontrada em macrófagos e/ou monócitos, sendo responsável pela formação de ácido hipoclorídrico citotóxico a partir da reação do ânion clorídrico juntamente ao peróxido de hidrogênio proveniente do processo de “burst respiratório”. Através da indução e síntese de MPO e de metaloproteinases (MMPs) (incluindo a síntese de *neutrophil collagenase* – MMP-8), as interleucinas IL-23 e IL-17 ativam as células. Essa síntese contribui juntamente às serinas proteinases, para o desenvolvimento da destruição tecidual devido à atividade proteolítica desempenhada (Mariani, Sena e Roncucci, 2014). Um estudo clínico realizado em 2008 mostrou que havia maiores níveis de expressão de MPO em doenças inflamatórias intestinais, sendo progressivamente maior em adenomas ou câncer quando comparados ao cólon normal. Ainda, pacientes com CCR apresentavam maior número de células positivas para MPO (Roncucci *et al.*, 2008), demonstrando, portanto, a importância do estudo desta da MPO na inflamação relacionada ao câncer.

1.7 Avaliação de danos ao material genético

1.7.1 Histona gamma-H2AX

A exposição de uma célula normal à radiação ionizante, substâncias químicas genotóxicas ou à drogas radiomiméticas, como os quimioterápicos, podem provocar quebras na fita dupla de DNA, que por sua vez são as formas de danos mais graves ao material genético (Khanna e Jackson, 2001). Quando há falhas no reparo dessas quebras pode ocorrer instabilidade genômica, anormalidades cromossômicas e alterações genéticas – fatores que induzem a tumorigênese. Existem histonas próximas aos locais de quebra na fita do DNA que rapidamente são fosforiladas frente à quebra da fita dupla - as denominadas “histonas gamma-H2AX”. Ao ocorrer quebras na fita, ocorre um acúmulo de gamma-H2AX no núcleo celular e posterior disseminação das mesmas ao longo de dezenas de quilobases de DNA,

flanqueando o local do material genético que sofreu a quebra. Assim, as células flanqueadas por essa histona são reparadas de maneira mais lenta que as células normais e apresentam rearranjos grosseiros de cromossomos, exercendo importante papel na amplificação da cascata de sinalização de respostas aos danos ao DNA e na manutenção da instabilidade genômica. Por microscopia de fluorescência é possível observar aglomerados nucleares de gamma-H2AX, que recebem o nome de “focos de danos ao DNA”. O número de focos por núcleo celular reflete o número de quebras na fita dupla do DNA (Rogakou *et al.*, 1998) E em humanos, a gamma-H2AX é expressa em lesões pré-cancerosas (Gorgoulis *et al.*, 2005). Desse modo, utilizamos no presente estudo a imunomarcagem para a histona gamma-H2AX por ser um marcador específico para danos genotóxicos, que pode ser utilizado em rastreamentos de câncer.

1.8 Desnervação mientérica

O sistema nervoso entérico é uma rede neural composta por aproximadamente 5×10^8 neurônios, os quais distribuem-se em mais de 5 classes diferentes e controlam todas as funções intestinais, como por exemplo, a motilidade (Furness *et al.*, 2006). É formado pelo plexo mientérico (também denominado “plexo de Auerbach”) e pelo plexo submucoso (também denominado “plexo de Meissner”). O primeiro situa-se entre a camada longitudinal externa e a camada muscular interna, e é responsável pela regulação do músculo liso. O segundo situa-se entre a camada circular interna e a mucosa e exerce a função de regulação do fluxo sanguíneo e da liberação de secreções intestinais. O SNE é totalmente independente do sistema nervoso central (SNC), uma vez que todos os elementos responsáveis pela motilidade intestinal, por exemplo, são exclusivos desse órgão e pertencentes ao SNE (Furness *et al.*, 2012). Devido á complexidade e importância do SNE e seus componentes, o estudo do mesmo e de seus integrantes em diversas patologias, principalmente no câncer, se torna crucial.

Nesse sentido, uma das alternativas de estudo desse sistema seria a promoção da desnervação intestinal pelo cloreto de benzalcônio (BAC). Os sais de benzalcônio compreendem um grupo de alquilaminas tensoativas carregadas positivamente (Patarca *et al.*, 2000), sendo que o BAC é um potente detergente catiônico que

possui propriedades bactericidas e atua através da destruição da célula bacteriana por toxicidade epitelial. Por essa propriedade, é amplamente utilizado como anti-séptico cirúrgico. Além disso, o BAC é também um surfactante, ou seja: possui a capacidade de reduzir a tensão superficial da água. Essa substância foi descrita primeiramente no ano de 1950 como “um agente desinfetante para a pele” (Price, 1950). Contudo, apenas nos anos 70 esse surfactante foi amplamente estudado. No ano de 1975, por exemplo, Imamura et al. desenvolveram um modelo de aganglionose experimental em um segmento proximal colônico que induziu a realização de megacólon, no qual se observou uma desnervação total da área – dados importantes para o estudo da desnervação atual (Imamura *et al.*, 1975). Em 1978, Sato et al. relataram que a administração de BAC na serosa intestinal culminava em uma injúria irreversível das células nervosas intra-murais, resultando em lesões degenerativas que desapareciam algumas semanas após a aplicação do BAC (Sato *et al.*, 1978). Em 1979, Sakata et al. destacaram a importância do uso de BAC como um agente de desnervação intestinal, classificando-o como um agente surfactante catiônico, que atuaria através de lesões na membrana celular – o que resultaria em uma despolarização do transporte ativo de sódio, provocando danos celulares potencialmente irreversíveis (Sakata *et al.*, 1979). Esse modelo de desnervação foi testado também em outros locais do trato gastrointestinal, como no íleo (Garcia *et al.*, 1995) no esôfago (Febrônio *et al.*, 1997), no jejuno (Zucoloto *et al.*, 1988; Carvalho *et al.*, 2006), no estômago (Sobreira *et al.*, 2002; Polli-Lopes *et al.*, 2003; Zucoloto *et al.*, 2002) e como um modelo utilizado para aumento da superfície absorptiva intestinal na síndrome do intestino curto (Garcia *et al.*, 1999). O BAC é uma substância seletiva para neurônios mientéricos. Entretanto, os mecanismos pelos quais ele exerce essa seletividade são desconhecidos (Sakata *et al.*, 1979; Fox, Epstein e Bass, 1983). A desnervação pelo BAC desempenha efeitos variados no organismo em que esta técnica é realizada. Por exemplo, é descrito na literatura que a desnervação por BAC culmina em hiperplasia epitelial duodenal e do cólon descendente, aumentando, portanto, a espessura da mucosa intestinal (Sato *et al.*, 1978; Sakata *et al.*, 1979; Zucoloto *et al.*, 1988; Zucoloto *et al.*, 1997). Em 1996, Garcia et al. observaram uma redução significativa na incidência de tumores induzidos pelo carcinógeno DMH através da desnervação do cólon distal com essa substância (Garcia *et al.*, 1996). Hanani et al., em 2003, mostraram que o plexo

mientérico é capaz de se regenerar após ablação química pela administração do BAC, o que sugere, interessantemente, que células-tronco podem se diferenciar em neurônios (Hanani *et al.*, 2003). Uma vez que neurônios possuem a capacidade de alteração estrutural, química e/ou funcional de seus fenótipos para manter a homeostasia (Giaroni *et al.*, 1999; Lomax, Fernandez e Sharkey, 2005), isso indicaria que a desnervação interfere inclusive no processo de neuroplasticidade. A desnervação pelo BAC também promove hipertrofia e hiperplasia da camada muscular lisa (Fox, Epstein e Bass, 1983), bem como da mucosa intestinal, com um aumento significativo na taxa de produção das células das criptas (Zucoloto *et al.*, 1988). Ainda, provoca alterações na proliferação de células epiteliais, no índice de marcação positiva para PCNA (Buttow *et al.*, 2003) e aumento na quantidade de fibras colágenas e elásticas em modelo de megaíleo experimental (Borges *et al.*, 2008). A desnervação por BAC exerce um papel crucial no entendimento da carcinogênese intestinal, uma vez que ocorre significativa diminuição na incidência tumoral após administração deste surfactante, em modelos de carcinogênese experimental química com os carcinógenos DMH e MNNG. Uma possível explicação seria o fato de que a depleção neuronal causada pela desnervação perturbaria as atividades neurais funcionais básicas, controlando a liberação de neuropeptídeos, sinais celulares (como a liberação de citocinas) e a angiogênese (Garcia *et al.*, 1996; Polli-Lopes *et al.*, 2003). Em conclusão, pode-se afirmar que a desnervação protege contra a carcinogênese química colônica, uma vez que, por exemplo, em modelos de megacólon chagásico ocorre diminuição dos indícios de desenvolvimento de câncer (Oliveira *et al.*, 2001; Garcia, 2009). Um estudo realizado por Garcia *et al.*, que envolveu mais de 800 casos clínicos, não apresentou nem mesmo a existência de lesões pré-neoplásicas nos cólons dos pacientes com megacólon, corroborando ainda mais com o fato de que em humanos não há achados de câncer em megacólon chagásico – o qual é causado pela desnervação (Garcia *et al.*, 2003). Estudos experimentais com animais indicaram também o mesmo resultado apresentado no estudo clínico (Garcia *et al.*, 1996; Vespúcio *et al.*, 2008). Ainda, achados similares foram encontrados no estômago (Sobreira *et al.*, 2002; Zucoloto *et al.*, 2002; Polli-Lopes *et al.*, 2003). Nesse sentido, embora esteja claro que exista o fenômeno de proteção contra o câncer ocasionado pela desnervação, ainda não existem estudos que abordem os mecanismos pelos quais isso ocorra.

2. JUSTIFICATIVA

A desnervação conhecidamente inibe a ocorrência de câncer tanto em modelos animais, quanto em seres-humanos. Ainda, uma enorme variedade de componentes inflamatórios contribui para o desenvolvimento de CCR, incluindo a presença de importantes células inflamatórias no microambiente tumoral. Nesse sentido, o estabelecimento da presença de células positivamente marcadas para COX-2, MTs e importantes componentes inflamatórios faz-se essencial para o melhor entendimento relacionado ao efeito protetor da desnervação contra o CCR.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi a avaliação do envolvimento de MTs e COX-2 no mecanismo de proteção contra a carcinogênese colônica desempenhado pela desnervação mientérica induzida pela aplicação tópica de BAC, bem como a avaliação da influência de componentes inflamatórios nesse mecanismo protetor.

3.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar a influência da inflamação sobre a desnervação na carcinogênese colônica, através da imunomarcagem de COX-2, que conhecidamente apresenta-se aumentada no câncer;
- II. Determinar a presença de células mutadas pelo carcinógeno químico DMH, através da imunomarcagem de MTs. Ainda, através desta análise, é possível determinar se os mecanismos envolvidos na proteção contra o câncer desempenhada pela desnervação ocorrem na fase precoce (iniciação) da carcinogênese;
- III. Analisar a expressão por imunoistoquímica da gamma-H2AX para identificar se há presença de danos severos ao material genético, devido administração do carcinógeno DMH;
- IV. Avaliar a presença de células positivamente marcadas para MPO para confirmação da presença de neutrófilos e monócitos/macrófagos nas amostras colônicas;
- V. Estimar a infiltração de neutrófilos e monócitos/macrófagos através de imunomarcações para NE e CD68, respectivamente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e procedimentos:

Modelos animais são amplamente utilizados e extremamente necessários no estudo de diversas doenças (Suzui, Morioka e Yoshimi, 2013), incluindo o CCR. Através destes, estudos se tornam mais fidedignos, uma vez que todo mecanismo ou objeto de interesse é estudado no organismo vivo. Nesse sentido, foram utilizados 52 ratos machos da linhagem Wistar, pesando aproximadamente 140g no início do experimento. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Tanto a realização dos procedimentos experimentais quanto a permanência dos animais ocorreram no biotério do Departamento de Patologia desta universidade. Os animais permaneceram em gaiolas plásticas, sendo o número máximo cinco animais por unidade e foram mantidos em condições de controle de temperatura (entre 24°C - 28°C), ciclo noite-dia 12:12horas. Os animais foram alimentados com ração padrão para roedores e com água *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados, manipulação e permanência dos animais ocorreram segundo as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP.

4.2 Delineamento experimental

Os grupos do presente estudo são compostos por:

- I. Grupo “C” (n=6): é o grupo controle, no qual não foi realizado nenhum procedimento.
- II. Grupo “B” (n=6): é o grupo controle do BAC, o qual foi submetido somente à administração deste surfactante.
- III. Grupo “D” (n=18): os animais receberam uma única aplicação do DMH 125mg/Kg, via intra-peritoneal, e foram sub-divididos em “D-24h” (n=6), “D-72h” (n=6)”. Ainda, receberam uma única aplicação de DMH 30 mg/Kg para

realização do grupo “D-20 dias (n=6)”. As subdivisões foram realizadas de acordo com o tempo em que os animais foram mortos.

- IV. Grupo “BD” (n=17): animais submetidos à aplicação de BAC 0,3% e, após 1 semana, ao DMH 30 mg/Kg. Este grupo também foi sub-dividido de acordo com o tempo de eutanásia após aplicação do DMH, sendo: “BD-24h” (n=6), “BD-72h” (n=5) e “BD-20 dias (n=6)”.
- V. Grupo “DB-20 dias” (n=5): neste grupo, inverteu-se a ordem do grupo anterior, sendo primeiramente aplicado DMH 30 mg/Kg e, após 1 semana, houve administração de BAC 0,3%. A eutanásia deste grupo ocorreu após 20 dias da aplicação do DMH.

Figura 1: Esquematisação dos grupos experimentais. Exemplificação dos grupos de animais utilizados no presente trabalho, bem como dos procedimentos neles realizados.

4.3 Modelo experimental de carcinogênese colônica

O carcinógeno químico de escolha ao presente trabalho foi a 1,2-dimetilhidrazina (DMH) por ser metabolizado e ativado no fígado, por atuar através da metilação do DNA e por ser altamente específico para a indução de CCR em roedores. Além disso, o DMH induz as fases de iniciação e promoção da carcinogênese colônica em ratos de maneira dose-dependente, promovendo CCR (Maskens e Dujardin-Loits, 1981; Shirai *et al.*, 1985).

Assim, a DMH (Symetrical Dimethylhydrazine Dihydrochloride, SIGMA®) foi dissolvida em água destilada e preparada na concentração de 125 mg/Kg e 30mg/Kg. Foi escolhida uma alta dose (125 mg/Kg) deste carcinógeno para avaliação mais fidedigna da presença de danos citotóxicos. A aplicação de carcinógeno nos animais ocorreu por via intra-peritoneal, logo após o preparo do mesmo, a fim de evitar oxidação dos componentes da fórmula.

A solução de DMH foi preparada no dia de sua administração, utilizando-se luvas de procedimento nitrílicas, avental e máscaras descartáveis durante todo o preparo e aplicação do carcinógeno. Os descartes dos equipamentos de proteção individual e dos objetos utilizados no preparo desta solução foram devidamente realizados em lixo branco hospitalar, encaminhado para incineração.

4.4 Modelo experimental de desnervação mientérica

A desnervação mientérica ocorreu através da aplicação tópica de BAC (Benzyltrimethyl Tetradecyl Ammonium Chloride, SIGMA®), conforme técnica padronizada por Zucoloto *et al.* (Zucoloto *et al.*, 1997). Como pré-tratamento anestésico, os animais receberam por via intramuscular uma associação de Acepran (0,5 a 1mg/Kg) e Diazepan (0,1 mg/Kg). Lidocaína (2%) foi aplicada localmente para amenizar possíveis desconfortos no momento da incisão. A anestesia foi realizada com associação de Ketamina (25mg/Kg) e Xilazina (5mg/Kg), via intra-muscular – o que permitiu que os animais ficassem anestesiados por aproximadamente 80 minutos. Em seguida, os animais foram submetidos a uma laparotomia da linha

média, com aproximadamente 3 cm de extensão. Um segmento do cólon distal de aproximadamente 4 cm foi isolado e, com o auxílio de pinças, uma gaze umedecida com BAC a 0,3% foi envolta no segmento, permanecendo durante 30 minutos (Sakata *et al.*, 1979). Quando necessário, foi realizada a reaplicação de BAC por gotejamento. Após esse período, toda a cavidade peritoneal foi lavada com solução salina estéril (NaCl 0,9%) para evitar necrose em órgãos subjacentes. Em casos de fibrilação ventricular, Atropina (0,04mg/Kg) foi administrada via sub-cutânea. A parede abdominal foi reconstruída por sutura em dois planos (muscular e cutâneo).

4.5 Coleta e processamento do material

Os animais foram mortos em câmara de CO₂ e submetidos à laparotomia mediana com posterior isolamento e retirada do cólon distal. Assim, 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 para armazenamento nas cassetes. Os cólons foram então posicionados entre papéis de filtro dentro de cassetes 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, então, submetidos a banhos de xilol 100% para que ocorresse sua diafanização. Os cólons processados foram incluídos em parafina para a 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 µm (micrômetros), aderidos à lâminas silanizadas e levados à estufa aquecida a 60°C para otimização da adesão do material na lâmina. Anteriormente à técnica de imunistoquímica 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.

4.6 Reações imunoistoquímicas

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 silanizadas, 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: COX-2 (anti-COX2 mouse monoclonal NCL-COX-2 [4H12]; Novocastra®; 1:200), H2AX (anti-gammaH2AX phospho S140 [3F2] Abcam®; 1:200) , MT (anti-MT mouse monoclonal - clone E-9; DAKO®; 1:200), MPO (anti-MPO Heavy Chain, goat polyclonal, clone E-15, Santa Cruz Biotechnology®; 1:200), NE (anti-Neutrophil elastase ab21595, Abcam ®; 1:500) e CD68 (anti-CD68 antibody [KP1] ab955; 1:200), 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). 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.

4.7 Análises imunoistoquímicas

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.

Para avaliação de células positivamente marcadas para COX-2, MTs, MPO, NE e CD-68 foram analisados os citoplasmas das amostras colônicas, sendo que a marcação de cada anticorpo localiza-se, respectivamente: nas membranas microssomais e do retículo endoplasmático; nas membranas que envolvem o complexo de Golgi; nos lisossomos; na matriz extracelular e em membranas celulares, lisossomais e endossômicas. Para avaliação de gamma-H2AX, avaliou-se o núcleo celular, uma vez que essa histona atua como um marcador de quebras na fita-dupla do DNA.

*Observação 1: a imunomarcação para MTs pode ser tanto citoplasmática quanto nuclear.

4.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através da utilização do *software* GraphPadPrism 5.0 (San Diego, Califórnia). Os resultados foram submetidos à análise de variância por ANOVA de uma via (*one-way*) e expressos em média $\pm$ desvio padrão da média, sendo considerados estatisticamente significantes valores com $P < 0,05$.

*Observação 2: As amostras referentes aos grupos controle (C) e controle-benzalcônio (CB) do presente estudo já haviam sido coletadas previamente por nosso laboratório e foram utilizados nesse estudo para a comparação com os grupos referentes ao presente estudo.

5. RESULTADOS

Durante a realização de todos os procedimentos nenhum animal apresentou sinais clínicos de doença ou alterações comportamentais. Os animais foram pesados anteriormente ao procedimento cirúrgico, sendo a média aproximada de pesos 140g.

Os animais que receberam DMH (grupo “D”) apresentaram baixa mortalidade, já que apenas 4 animais referentes ao grupo “D-24h” morreram (7%). Os animais submetidos ao procedimento cirúrgico para desnervação (BD e DB) representaram, em conjunto, taxa de mortalidade aproximada de 23%, visto que i) a administração de BAC 0,3% possivelmente excessiva na cavidade peritoneal causou peritonite nos mesmos e ii) alguns animais não sobreviveram ao protocolo anestésico durante o procedimento cirúrgico. Macroscopicamente, os cólons dos animais desnervados apresentaram um alargamento e aumento na espessura quando em comparação aos demais grupos.

Tabela 1: Peso inicial e taxa de mortalidade. O peso é apresentado em gramas $\pm$ desvio padrão. A mortalidade é apresentada em porcentagem, relacionada ao número total de animais iniciais.

Grupos exp.	Peso inicial (g)	Mortalidade (%)
<i>D24h</i>	141,66 $\pm$ 9,83	7
<i>D72h</i>	140,83 $\pm$ 11,49	0
<i>D20 dias</i>	139,83 $\pm$ 7,16	0
<i>BD 24h</i>	135,8 $\pm$ 10,56	3,5
<i>BD 72h</i>	147,8 $\pm$ 3,56	3,5
<i>BD 20 d</i>	149,8 $\pm$ 2,31	7
<i>DB 20 d</i>	147 $\pm$ 5,14	8,7

5.1 Análise da imunomarcção de H2AX

Houve aumento no número de células que expressaram H2AX em todos os grupos quando comparados aos grupos controles (C e CB), sendo que este aumento iniciou-se no grupo D-24h, permanecendo até o grupo DB-20d – o que indica que a DMH foi capaz de induzir danos severos no material genético (quebras na fita dupla de DNA) das células das criptas, sendo que no grupo D-20d houve muito mais células imunomarcadas para essa histona, quando em comparação com as fases iniciais da carcinogênese (D-24h e D-72h) ($P < 0,0001$) (Figuras 2 e 3). A desnervação foi capaz de atenuar a imunoexpressão da gamma-H2AX quando em comparação ao D-20d ($P < 0,0001$), mostrando que a desnervação pode exercer um papel protetor contra danos na fita dupla de DNA ocasionados pela DMH.

Figura 2 - Expressão imunoistoquímica de gamma-H2AX. Número de células positivas/10 criptas. Análise por one-way ANOVA. Há aumento na expressão de gamma-H2AX nos grupos D-24h, D-72h e D-20 dias, sendo maior neste último grupo, que foi bloqueado pela desnervação ($P < 0,0001$).

Figura 3 -- Fotomicrografias da imunomarcagem para H2AX. Marcação nuclear de células epiteliais das criptas colônicas, representada pela coloração marrom. A) Grupo controle; B) Grupo D-24h; marcação intensa de H2AX. C) Grupo D-72h; D) Grupo D-20d com marcação excessiva de H2AX; seta indicando cripta com marcação excessiva de H2AX; seta indicando cripta com marcação intensa. E) Grupo BD-24h; F) Grupo BD-72h; G) Grupo BD-20d: diminuição visível da marcação; H) Grupo DB-20d.

5.2 Análise da imunomarcção de MPO

Houve um aumento no número de células imunomarcadas para MPO em todos os grupos de 20 dias (D-20d, BD-20d e DB-20d), quando comparados ao controle e aos demais – que não apresentaram marcação alguma ($P < 0,0001$). Isso sugere que há presença de neutrófilos, monócitos e/ou macrófagos durante a carcinogênese colônica, porém não precocemente. O grupo D-20d apresentou um maior número de células marcadas para MPO quando em comparação aos outros grupos de 20 dias – o que foi atenuado pela desnervação, como observado nas figuras 4 e 5 (grupos BD-20 dias e DB-20 dias) ($P < 0,0001$).

Figura 4 - Expressão imunoistoquímica de MPO. Número de células positivas/100 espaços inter-criptais. Análise por one-way ANOVA. O gráfico mostra o significativo aumento na expressão de MPO no grupo D-20 dias quando comparados aos grupos BD-20 dias e DB-20 dias ($P < 0,0001$).

Figura 5 - Fotomocriografias da imunomarcção para MPO. Marcação citoplasmática de células epiteliais das criptas colônicas, representada pela coloração marrom. A) Grupo controle; B) Grupo D-24h; C) Grupo D-72h; cripta desorganizada indicada pelas seta; D) Grupo D-20d; E) BD-24h; F) Grupo BD-72h; G) BD-20d; H) Grupo DB-20d.

5.3 Análise da imunomarcção de NE

A imunomarcção de NE foi realizada com o intuito de confirmar a presença de neutrófilos nos tecidos colônicos. Assim, como elucidado nas figuras 6 e 9, os grupos de animais mortos 20 dias após a administração do DMH (D-20d, BD-20d e DB-20d) apresentaram maior número de células positivamente marcadas para NE, quando comparados aos grupos controle e aos demais (que não apresentaram expressão alguma) ($P < 0,0001$). O grupo D-20d foi o que apresentou maior número de células positivamente marcadas, como mostra as figuras 6 e 9. A desnervação foi capaz de atenuar esse aumento de maneira significativa ($P < 0,0001$), sugerindo sua atuação sobre os neutrófilos presentes no microambiente tumoral.

Figura 6 - Expressão imunoistoquímica de NE. Número de criptas positivamente marcadas/100 criptas. Análise por one-way ANOVA. Nitidamente, o grupo D-20 dias apresentou um significativo aumento na expressão da NE quando comparado aos grupos de animais desnervados ($P < 0,0001$).

5.4 Análise da imunomarcção de COX-2

A imunomarcção de COX-2 em células epiteliais colônicas foi significativamente maior no grupo D-20 dias ($P < 0,0001$) (Figura 7), não mostrando diferença de imunomarcção entre os grupos precoces de carcinogênese experimental colônica (D-24h e D-72h)(Figura 11).

A desnervação foi capaz de inibir de maneira significativa essa indução, como podemos observar nas figuras 7 e 8 ($P < 0,0001$), e na figura 11 (Figura 11 – I, J, K e L).

Com relação à análise de células estromais positivamente marcadas para COX-2 (Figura 8), o grupo que apresentou maior número de células positivamente marcadas para COX-2 também foi o D-20 dias, quando comparado aos demais grupos ($P < 0,0001$). A variância entre os três grupos referentes aos animais mortos 20 dias após administração do DMH (D-20 dias, BD-20 dias e DB-20 dias) apresentou $P < 0,0089$.

Figura 7 - Expressão imunoistoquímica de COX-2 no epitélio colônico. Número de células positivas/100 criptas. Análise por one-way ANOVA. O grupo D-20 dias mostrou um forte aumento na expressão da COX-2 quando comparado aos demais ($P < 0,0001$).

Figura 8 - Expressão imunoistoquímica de COX-2 estromal. Número de células positivas/100 criptas. Análise por one-way ANOVA. O grupo D-20 dias mostrou um forte aumento na expressão da COX-2 quando comparado aos demais ($P < 0,0001$).

Figura 9 - Fotomicrografias da imunomarcção para NE e COX-2. Marcação citoplasmática de células epiteliais das criptas colônicas, representada pela coloração marrom. Figuras A,B e C – marcação para NE, onde: A) Grupo D-20d, com intensa marcação para NE; B) Grupo BD-20d e C) Grupo DB-20d. Figuras D, E, F, G, H, I, J, K, L –imunomarcção para COX-2, onde: D) Controle e E) Controle benzalcônio demonstram pouca ou nenhuma marcação; F) D-24h; G) D-72h; H) D-20d; marcação intensa quando comparado aos outros grupos demonstrada pela forte coloração marrom; I) BD-24h; J) BD-72h; K) BD-20d e L) DB-20d apresentaram aumento na marcação para COX-2, porém não tão significativo quanto o grupo D-20d (figura E).

5.5 Análise da imunomarcção de CD68

A análise da imunomarcção de células colônicas para CD68 mostrou um aumento significativo do número de células que expressaram esse marcador nos grupos referentes aos animais mortos 20 dias após aplicação do DMH (D-20d, BD-20d, DB-20d) com relação aos grupos controles e aos demais ($P < 0,0001$). Os grupos desnervados (BD-20d e DB-20d) mostraram uma forte atenuação de células positivamente marcadas para CD68, sendo que a variância entre os 3 grupos apresentou $P = 0,0003$ (Figura 10). Estes resultados indicam que a desnervação anteriormente ou após a administração do carcinógeno DMH pode ser capaz de atenuar macrófagos e/ou monócitos – elucidando o papel protetor da desnervação na carcinogênese colônica experimental, através de sua atuação sobre componentes inflamatórios.

Figura 10 - Expressão imunoistoquímica de CD68. Número de criptas positivamente marcadas/ 100 espaços inter-criptais. Análise por one-way ANOVA. O grupo D-20d mostrou um forte aumento de células positivamente marcadas para CD68 quando comparado aos outros grupos de 20 dias ($P < 0,0001$).

5.6 Análise da imunomarcção de MTs

Observou-se a existência de dois padrões distintos de imunoexpressão de MTs. O primeiro é a presença de criptas isoladas que contam com todas as suas células intensamente imuno-marcadas (Figura 13 - F), sendo que esse padrão foi denominado de marcação críptica. Essas criptas foram detectadas apenas nos animais tratados com DMH. A análise quantitativa mostrou que não houve diferença entre os grupos experimentais no que tange a essa forma de expressão de MTs ($P=0,3859$) (Figura 11).

Observou-se também a existência de outro padrão de imuno-marcação de MTs, afetando de modo difuso colonócitos isolados ou em grupos, os quais se constituem em minoria das células em uma determinada cripta. Esse padrão de marcação, denominado de difuso, em geral se manifesta nas células localizadas no terço médio ou superior das criptas, raramente envolvendo células da base. Além disso, a intensidade da coloração é pronunciadamente menor do que nos casos de marcação críptica. A quantificação dessas células mostrou que ocorre um aumento na imunomarcção difusa de MTs ($P<0,0001$) nos grupos de 20 dias (D-20 dias, BD 20 dias e DB 20 dias) (Figuras 12) em comparação aos demais. Além disso, foi observada a presença de vacuolização citoplasmática e de marcação difusa de MTs nas bases das criptas, sendo esta última também observada na submucosa colônica do grupo D-24h. No grupo D-72h observou-se uma diminuição da imuno-marcação difusa de MTs (Figura 13).

Figura 11: Criptas colônicas inteiras com imuno-marcação para metalotioneínas. Número de criptas positivamente marcadas/100 criptas. Análise por one-way ANOVA. Os grupos de 20 dias significativamente apresentaram maior expressão de MT em comparação ao grupo controle ($P < 0,0001$).

Figura 12: Expressão imunoistoquímica difusa de metalotioneínas no epitélio colônico. Número de células positivas / 100 criptas. Análise por one-way ANOVA. Podemos observar aumento estatístico na expressão de MT difusa nos grupos de 20 dias em comparação aos grupos controles ($P < 0,0001$) e aos demais.

Figura 13: Fotomicrografias da imunomarcção para MTs. Marcação citoplasmática/nuclear de células epiteliais das criptas colônicas, representada pela coloração marrom.. A) Grupo controle benzalcônio (CB) não apresenta marcação para MTs. B) Grupo D-24h; pouca imunomarcção para MTs; presença de vacuolização citoplasmática nas bases das criptas, indicada pelas setas; C) Grupo D-24h; D) Grupo D-72h; pouca imunomarcção difusa para MTs; E) Grupo D-20d apresenta criptas com expressão difusa de MTs, indicadas pelas setas; F) Grupo D-20d; criptas com total marcação de MTs (marcação críptica), indicada pela seta; G) Grupo BD-24h, com pouca marcação para MTs; H) Grupo BD-72h com pouca marcação para MTs; I) Grupo BD-20d: criptas apresentando marcação difusa de MTs indicada pelas setas; J) Grupo DB-20d: marcação difusa para MTs indicada pelas setas.

6. DISCUSSÃO

Para verificação da eficácia do tratamento dos animais com o carcinógeno químico DMH, avaliou-se a presença de danos severos ao material genético, através da técnica de imunoistoquímica para detecção de células positivamente marcadas para a histona gamma-H2AX, um eficaz marcador da presença de quebras na dupla fita de DNA, sendo utilizada, por exemplo, como biomarcador para a realização de análises dos efeitos do tratamento radioterápico (Sak e Stuschke, 2010). Como resultado no presente trabalho, foi encontrado um aumento na imunomarcagem dessa histona a partir de 24 horas após aplicação do carcinógeno DMH nos animais, estendendo-se por um período de 72 horas, atingindo índice de imunomarcagem mais intenso no grupo de animais submetidos ao DMH e mortos após um período de 20 dias (D-20 dias). Assim, confirmou-se a presença de danos ao material genético celular decorrentes da aplicação do DMH. Contudo, não houve diferenças entre os grupos desnervados ou não, mostrando que a eventual proteção conferida pela desnervação contra o câncer de cólon não ocorre por redução de danos citotóxicos produzidos pelo carcinógeno químico, mas sim devido a possíveis alterações metabólicas celulares. Isso foi confirmado pelo fato de não haver diferença significativa entre os grupos no que tange à marcação críptica de MTs, conforme será explicado a seguir.

Os resultados obtidos no presente estudo estão em concordância com a literatura que indica que a inflamação é um processo essencial para a ocorrência da carcinogênese (Balkwill, Charles e Mantovani, 2005; Mantovani, 2009; Grivennikov, Greten e Karin, 2010; Mariani, Sena e Roncucci, 2014), uma vez que importantes mediadores inflamatórios, como COX-2, MPO, NE e CD68 apresentaram-se significativamente aumentados nos grupos de animais que foram expostos ao carcinógeno químico DMH. O aumento na expressão desses marcadores inflamatórios nos tecidos colônicos, principalmente nos grupos de animais mortos após 20 dias da aplicação do DMH, sugere o envolvimento de neutrófilos, macrófagos e/ou monócitos na inflamação sobre a carcinogênese colônica experimental. As imunomarcações de MPO, NE e CD68 são utilizadas mundialmente para determinação da presença destes tipos celulares (Petruska *et al.*, 1992; Sato *et al.*, 2006; Vikis *et al.*, 2012; Gottfried *et al.*, 2008; Mahmoud *et al.*, 2012), que se

encontram conhecidamente aumentados em processos inflamatórios e imunológicos que ocorrem em decorrência de injúrias teciduais e perturbação homeostática – ambas que podem ser ocasionadas pela presença de um patógeno. Ainda, estes tipos celulares encontram-se presentes no microambiente tumoral, elucidando ainda mais a participação da inflamação na carcinogênese (Yamashita *et al.*, 1994). Zivkovic *et al.*, no ano de 2007, mostraram que neutrófilos do sangue periférico de camundongos que foram expostos às células de melanoma sofreram um grande *burst* oxidativo e que, ao isolarem esses neutrófilos *in vitro*, determinaram que estes são extremamente citotóxicos para as células tumorais (Zivkovic *et al.*, 2007). Nos achados do presente estudo, observou-se um significativo aumento de células colônicas que expressaram NE no grupo de animais em que foi administrado DMH, sugerindo a participação de neutrófilos durante a carcinogênese experimental colônica – corroborando com os resultados do trabalho de Zivkovic, no qual houve aumento no número de neutrófilos no microambiente tumoral. Esse aumento observado no presente trabalho foi revertido de maneira significativa pela desnervação – mecanismo o qual também reduziu de maneira significativa os aumentos nas imunoexpressões de MPO e CD68, encontrados nos grupos de animais mortos após 20 dias da aplicação do carcinógeno (D-20 dias). Portanto, sugere-se que um possível mecanismo pelo qual a desnervação atuaria, protegendo uma célula aparentemente normal contra a carcinogênese colônica, seria a inibição de neutrófilos, macrófagos e/ou monócitos. Por conseguinte, os achados do presente estudo reforçam a importância exercida pelo processo inflamatório na carcinogênese experimental colônica e, ainda, evidencia que a desnervação é capaz de proteger a evolução contra a carcinogênese atuando sobre a inflamação, a partir de 20 dias da exposição ao carcinógeno. Aparentemente, neutrófilos, macrófagos e/ou monócitos seriam fatores-chave envolvidos nesta proteção.

Como elucidado anteriormente, a COX-2 é um importante imunomarcador de processos inflamatórios, além de estar associada à promoção do câncer (Willoughby, Moore e Colville-Nash, 2000; Dubois *et al.*, 1998; Tsujii *et al.*, 1998). Em adição, sugere-se que a COX-2 possa estar relacionada à transformação de uma célula normal para uma célula maligna, apresentando níveis elevados de marcação também nas fases iniciais da carcinogênese (Fournier e Gordon, 2000). Um estudo realizado em 1995 por Dubois *et al.* mostrou que a expressão de COX-2 contribuiu

significativamente para o aumento do potencial tumorigênico de células epiteliais, através do aumento de adesão à matriz extracelular e de resistência à apoptose exercidos pelas mesmas (Tsujii e Dubois, 1995). Ao compararem modelos de camundongos nulos para COX-2 com camundongos que induzem polipose intestinal e camundongos *wild-types*, foi observada uma diminuição no número e no tamanho de pólipos nos camundongos que não obtinham essa enzima (Oshima *et al.*, 1996). Nesse sentido, a imunexpressão de COX-2 foi avaliada no presente trabalho a fim de elucidar seu papel durante o papel protetor promovido pela desnervação com o agente surfactante BAC contra a inflamação na carcinogênese experimental colônica e também como um marcador carcinogênico. Como resultado, encontrou-se aumento no número de células imunomarcadas para COX-2 principalmente no grupo referente aos animais que receberam o DMH e foram mortos 20 dias após sua aplicação. Esse aumento sugere que a COX-2 é um fator relacionado à promoção carcinogênica. A desnervação nitidamente atenuou os aumentos nos números de células positivamente marcadas para COX-2 epiteliais e estromais, encontrados nos grupos de animais mortos após um período de 20 dias da administração da DMH. Este achado sugere que o período da carcinogênese experimental colônica em que há maior intensidade na imunomarcagem dessa enzima seria de aproximadamente 20 dias após exposição ao carcinógeno utilizado no presente trabalho. Além disso, o presente estudo está em concordância com trabalhos na literatura que sugerem que a expressão de COX-2 encontra-se elevada em tumores colorretais tanto em humanos, quanto em animais (Eberhart *et al.*, 1994; Kutchera *et al.*, 1996).

Além da histona gamma-H2AX, as MTs também são utilizadas na detecção de alterações no material genético decorrentes da exposição celular a determinado agente carcinogênico. Desse modo, as MTs são proteínas que desempenham papel protetor para a célula normal através da destoxificação celular e são utilizadas como marcadores da presença de mutações em células-tronco e também diminuem a resistência às drogas (Satoh *et al.*, 1994). Ainda, as MTs atuam como um fator endógeno defensivo contra danos ao DNA e, conseqüentemente, contra a carcinogênese induzida pelo carcinógeno químico benzo[a]pyreno (Takaishi *et al.*, 2009; Takaishi *et al.*, 2010).

Satoh *et al.*, em 1988, realizaram um estudo o qual avaliou os efeitos da indução de MTs na utilização da associação farmacológica de duas potentes drogas anti-

câncer utilizadas na quimioterapia: a cisplatina e a adriamicina. Como resultado, os autores relataram que os efeitos benéficos de uma pré-indução de MTs frente à administração dessas duas drogas podem aplicar-se à quimioterapia (Sato, Naganuma e Imura, 1988). Infecções e a administração de drogas antiinflamatórias não esteróides (AINEs) provocam um aumento na expressão de MTs no cólon de animais previamente tratados com DMH, com aumento relativo na expressão celular difusa de MTs na infecção por *Trypanosoma cruzi* (com conhecida ação antitumoral relacionada ao megacólon chagásico) associada ao AINE Nimesulide – o que sugere a ocorrência de um possível efeito cumulativo entre a infecção e a administração dessa droga (Escalante *et al.*, 2006). Na mucosa colônica normal e em transição, foi detectada imunoreatividade para MTs em enterócitos da superfície luminal e nas criptas (Theocharis *et al.*, 2004). No presente estudo, foi observado um aumento do número de células positivas para imunomarcagem de MTs nos grupos de animais que foram submetidos ao carcinógeno DMH e que foram mortos 20 dias após sua aplicação. Ainda, observou-se um aumento no número de células que apresentavam marcação difusa para MTs principalmente nas bases das criptas dos animais referentes ao grupo D-24h - indicando uma possível mutação das células-tronco localizadas na base criptal.

A desnervação provocou uma atenuação na expressão de MTs. Quando a desnervação induzida pelo BAC foi realizada anteriormente à administração do DMH (grupo BD-72h, por exemplo), observou-se uma diminuição do número de células positivas para MTs, em comparação ao grupo no qual houve administração de DMH nos animais, que foram mortos 72 horas após sua aplicação (D-72h). Em adição, os achados do presente estudo corroboram com o estudo realizado por Jasani *et al.* (1998), no qual os mesmos perfis de marcação para MTs (marcação críptica e marcação difusa) foram observados (Jasani *et al.*, 1998). A marcação críptica, na qual se observa total e intensa imunomarcagem das criptas, permite a estimativa da quantidade de células que sofreram iniciação pelo carcinógeno, uma vez que é indicativa de mutações. A marcação difusa de células isoladas para MTs pode estar relacionada a mecanismos gerais de estímulo na expressão dessa enzima, da mesma forma que ocorre com outras moléculas regulatórias, como TGF- β , COX-2 e outras. O provável efeito funcional dessa expressão de MTs deve ser uma maior proteção à célula contra efeitos deletérios da inflamação, conforme já foi relatado na

literatura (Escalante *et al.*, 2006; Inoue *et al.*, 2009). O aumento observado no presente trabalho dessa forma de expressão de MTs nos animais desnervados pelo BAC indica a existência de um possível mecanismo protetor contra a evolução do processo carcinogênico, conforme já mencionado na literatura (Theocharis *et al.*, 2004; Takaishi *et al.*, 2009). É possível, ainda, que o aumento de expressão de MTs possa ter influência inibitória na expressão de COX-2 nos animais desnervados, uma vez que há relatos nesse sentido na literatura (Youn *et al.*, 2002). Caso confirmado, esse mecanismo contribuiria para a inibição da carcinogênese nesse modelo experimental, mas estudos complementares serão necessários para confirmar essa hipótese.

A administração do carcinógeno químico DMH culminou em um aumento do número de células positivamente marcadas para gamma-H2AX e para COX-2 nos grupos de animais mortos 20 dias após administração do carcinógeno (D-20d, BD-20d, DB-20d), possivelmente em decorrência da administração do mesmo. Entretanto, o aumento de MTs observado principalmente no grupo de animais que foram mortos 20 dias após a administração do DMH (D-20 dias) foi atenuado pela desnervação, principalmente quando esta ocorreu anteriormente à aplicação deste carcinógeno (BD-20d). Dessa forma, sugerimos que a desnervação possa induzir um aumento nas MTs como um mecanismo de defesa do organismo do hospedeiro contra a célula tumoral, inibindo as expressões de COX-2.

Finalmente, a hipótese da existência de uma participação do processo inflamatório no papel protetor desempenhado pela desnervação contra a carcinogênese experimental colônica foi confirmada neste estudo, através da inibição desempenhada pela desnervação mientérica pelo BAC sobre as imunomarcações de NE, MPO, CD-68 e COX-2. Sugere-se que o aumento do número de células imunomarcadas para MTs encontrado nos grupos de animais que foram mortos em um período de 20 dias após a administração do DMH possa indicar que estas proteínas atuem sobre a COX-2, provocando uma diminuição em sua expressão, bem como sobre a histona gamma-H2AX e tipos celulares inflamatórios, culminado em amenização dos efeitos carcinogênicos. Posto isso, faz-se necessário a realização de mais estudos para a determinação do envolvimento de componentes inflamatórios e/ou da inibição da COX-2 pelo aumento de MTs no papel protetor desenvolvido pela desnervação contra a carcinogênese.

7. CONCLUSÃO

Através do presente estudo conclui-se que:

1. A desnervação mientérica não influencia a fase de iniciação da carcinogênese colônica por DMH, uma vez que não houve alteração na expressão precoce de gamma-H2AX e na expressão críptica de MT nos animais desnervados;
2. Na carcinogênese colônica química, o aumento de expressão de COX-2 não está relacionado diretamente ao insulto citotóxico do carcinógeno, uma vez que não se detectam alterações morfológicas celulares e não há indução de células inflamatórias ou de expressão de COX-2 nas primeiras 24h após aplicação de DMH;
3. A desnervação mientérica leva a inibição da reação inflamatória associada à fase de pós-iniciação da carcinogênese induzida por DMH, sendo o fenômeno bem caracterizado após 20 dias da aplicação do carcinógeno, com diminuição do número de células positivamente marcadas para gamma-H2AX, NE, MPO, CD-68 e COX-2 nos grupos de animais desnervados;
4. O aumento de expressão difusa de MTs nos animais desnervados pode estar relacionado à inibição tanto da inflamação, como da carcinogênese, induzidas pela DMH.

8. REFERÊNCIAS

ALRAWI, S. J. et al. Aberrant crypt foci. **Anticancer Res**, v. 26, n. 1A, p. 107-19, 2006 Jan-Feb 2006. ISSN 0250-7005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16475686> >.

AMULIC, B. et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annu Rev Immunol**, v. 30, p. 459-89, 2012. ISSN 1545-3278. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22224774> >.

ARDI, V. C. et al. Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 51, p. 20262-7, Dec 2007. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077379> >.

ATKIN, W. S. et al. Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial. **Lancet**, v. 375, n. 9726, p. 1624-33, May 2010. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20430429> >.

AUFFRAY, C. et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. **Science**, v. 317, n. 5838, p. 666-70, Aug 2007. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17673663> >.

BAENA, R.; SALINAS, P. Diet and colorectal cancer. **Maturitas**, v. 80, n. 3, p. 258-64, Mar 2015. ISSN 1873-4111. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25619144> >.

BALBÍN, M. et al. Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. **Nat Genet**, v. 35, n. 3, p. 252-7, Nov 2003. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14517555> >.

BALKWILL, F.; CHARLES, K. A.; MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer Cell**, v. 7, n. 3, p. 211-7, Mar 2005. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15766659> >.

BARKER, N. et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. **Nature**, v. 457, n. 7229, p. 608-11, Jan 29 2009. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19092804> >.

BELAAOUAJ, A. et al. Characterization of the mouse neutrophil elastase gene and localization to chromosome 10. **Mamm Genome**, v. 8, n. 1, p. 5-8, Jan 1997. ISSN 0938-8990. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9021140> >.

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

51, Oct 1987. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3677050> >.

BOOTH, C.; POTTEN, C. S. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. **J Clin Invest**, v. 105, n. 11, p. 1493-9, Jun 2000. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10841502> >.

BORGES, L. F. et al. Differential distribution of some extracellular matrix fibers in an experimentally denervated rat megaileum. **Micron**, v. 39, n. 4, p. 397-404, Jun 2008. ISSN 0968-4328. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17433699> >.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657-70, Nov 2010. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21094463> >.

BRENNER, H.; HOFFMEISTER, M. [Colorectal cancer screening: evidence and implementation]. **Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz**, v. 57, n. 3, p. 302-6, Mar 2014. ISSN 1437-1588. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24562704> >.

BUERMEYER, A. B. et al. Mammalian DNA mismatch repair. **Annu Rev Genet**, v. 33, p. 533-64, 1999. ISSN 0066-4197. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10690417> >.

BUTTOW, N. C. et al. Substance P enhances neuronal area and epithelial cell proliferation after colon denervation in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 49, n. 10, p. 2069-2076, October 2003. ISSN 0163-2116. Disponível em: < <Go to ISI>://BIOABS:BACD200400026071 >.

CAMPLEJOHN, R. S. et al. Apoptosis, ageing and cancer susceptibility. **Br J Cancer**, v. 88, n. 4, p. 487-90, Feb 2003. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12592359> >.

CARMELIET, P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. **Oncology**, v. 69 Suppl 3, p. 4-10, 2005. ISSN 0030-2414. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16301830> >.

CARVALHO, C. E. et al. [Effects of intrinsic denervation of the jejunum after extensive enterectomy in the rat bowel syndrome]. **Acta Cir Bras**, v. 21, n. 1, p. 43-6, 2006 Jan-Feb 2006. ISSN 0102-8650. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16491222> >.

CASTELLONE, M. D.; TERAMOTO, H.; GUTKIND, J. S. Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer chemoprevention: the beta-catenin connection. **Cancer Res**, v. 66, n. 23, p. 11085-8, Dec 2006. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17145847> >.

CHERIAN, M. G.; JAYASURYA, A.; BAY, B. H. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. **Mutat Res**, v. 533, n. 1-2, p. 201-9, Dec 2003. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14643421> >.

CHERNYAK, L.; TAUBER, A. I. The birth of immunology: Metchnikoff, the embryologist. **Cell Immunol**, v. 117, n. 1, p. 218-33, Nov 1988. ISSN 0008-8749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3052859> >.

CORPET, D. E.; PIERRE, F. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. **Eur J Cancer**, v. 41, n. 13, p. 1911-22, Sep 2005. ISSN 0959-8049. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16084718> >.

DOTTA, L.; TASSONE, L.; BADOLATO, R. Clinical and genetic features of Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis (WHIM) syndrome. **Curr Mol Med**, v. 11, n. 4, p. 317-25, Jun 2011. ISSN 1875-5666. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21506920> >.

DUBOIS, R. N. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J**, v. 12, n. 12, p. 1063-73, Sep 1998. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9737710> >.

EBERHART, C. E. et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. **Gastroenterology**, v. 107, n. 4, p. 1183-8, Oct 1994. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7926468> >.

ESCALANTE, R. D. et al. Trypanosoma cruzi infection and/or administration of the nonsteroidal anti-inflammatory nimesulide increase the number of colonic crypts overexpressing metallothioneins in rat colon carcinogenesis. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 7, p. 895-9, Jul 2006. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16862280> >.

FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, n. 5, p. 759-67, Jun 1 1990. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2188735> >.

FEBRÔNIO, L. H. et al. Megaesophagus in rats. **Res Exp Med (Berl)**, v. 197, n. 2, p. 109-15, 1997. ISSN 0300-9130. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9380950> >.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, Mar 2015. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220842> >.

FOURNIER, D. B.; GORDON, G. B. COX-2 and colon cancer: potential targets for chemoprevention. **J Cell Biochem Suppl**, v. 34, p. 97-102, 2000. ISSN 0733-1959. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10762021> >.

FOX, D. A.; EPSTEIN, M. L.; BASS, P. SURFACTANTS SELECTIVELY ABLATE ENTERIC NEURONS OF THE RAT JEJUNUM. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 227, n. 2, p. 538-544, 1983 1983. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1983RQ45700040 >.

FRIDLENDER, Z. G. et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. **Cancer Cell**, v. 16, n. 3, p. 183-94, Sep 2009. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19732719> >.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1871-5, Nov 2001. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11729303> >.

FURNESS, J. et al. Effects of ischemia / reperfusion on the enteric nervous system and intestine. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 24, p. 8-8, Sep 2012. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000308435400026 >.

FURNESS, J. B. et al. The distribution of PKC isoforms in enteric neurons, muscle and interstitial cells of the human intestine. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 126, n. 5, p. 537-548, Nov 2006. ISSN 0948-6143. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000240980900002 >.

GARCIA, S. B. [Chagas' disease: 100 years of discovery and current thought of its discoverer]. **Arq Gastroenterol**, v. 46, n. 4, p. 249-51, 2009 Oct-Dec 2009. ISSN 1678-4219. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20232001> >.

GARCIA, S. B. et al. A retrospective study of histopathological findings in 894 cases of megacolon: what is the relationship between megacolon and colonic cancer? **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 45, n. 2, p. 91-3, 2003 Mar-Apr 2003. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12754574> >.

GARCIA, S. B. et al. Intrinsic myenteric denervation: a new model to increase the intestinal absorptive surface in short-bowel syndrome. **J Surg Res**, v. 85, n. 2, p. 200-3, Aug 1999. ISSN 0022-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10423319> >.

GARCIA, S. B. et al. The relationship between megacolon and carcinoma of the colon: An experimental approach. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 8, p. 1777-1779, Aug 1996. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996VD87500037 >.

GARCIA, S. B. et al. Experimental megaileum. **Res Exp Med (Berl)**, v. 195, n. 4, p. 249-53, 1995. ISSN 0300-9130. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8525076> >.

GERRARD, T. L.; COHEN, D. J.; KAPLAN, A. M. Human neutrophil-mediated cytotoxicity to tumor cells. **J Natl Cancer Inst**, v. 66, n. 3, p. 483-8, Mar 1981. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6937705> >.

GIARONI, C. et al. Plasticity in the enteric nervous system. **Gastroenterology**, v. 117, n. 6, p. 1438-1458, Dec 1999. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000083952500026 >.

GORGOU LIS, V. G. et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. **Nature**, v. 434, n. 7035, p. 907-13, Apr 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15829965> >.

GOTTFRIED, E. et al. Expression of CD68 in non-myeloid cell types. **Scand J Immunol**, v. 67, n. 5, p. 453-63, May 2008. ISSN 1365-3083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18405323> >.

GREGORY, A. D. et al. Clathrin pit-mediated endocytosis of neutrophil elastase and cathepsin G by cancer cells. **J Biol Chem**, v. 287, n. 42, p. 35341-50, Oct 2012. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22915586> >.

GRISHAM, M. B.; EVERSE, J.; JANSSEN, H. F. Endotoxemia and neutrophil activation in vivo. **Am J Physiol**, v. 254, n. 5 Pt 2, p. H1017-22, May 1988. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2834968> >.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-99, Mar 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303878> >.

HABR-GAMA, A. [Colorectal cancer: the importance of its prevention]. **Arq Gastroenterol**, v. 42, n. 1, p. 2-3, 2005 Jan-Mar 2005. ISSN 0004-2803. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15976902> >.

HANANI, M. et al. Regeneration of myenteric plexus in the mouse colon after experimental denervation with benzalkonium chloride. **Journal of Comparative Neurology**, v. 462, n. 3, p. 315-327, Jul 28 2003. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000183646700004 >.

HELWIG, E. B. The evolution of adenomas of the large intestine and their relation to carcinoma. **Surg Gynecol Obstet**, v. 84, n. 1, p. 36-49, Jan 1947. ISSN 0039-6087. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20278160> >.

HOFMAN, P. M. Pathobiology of the neutrophil-intestinal epithelial cell interaction: role in carcinogenesis. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 46, p. 5790-800, Dec 2010. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21154999> >.

HOUGHTON, A. M. et al. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. **Nat Med**, v. 16, n. 2, p. 219-23, Feb 2010. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20081861> >.

IMAMURA, K. et al. PATHOPHYSIOLOGY OF AGANGLIONIC COLON SEGMENT - EXPERIMENTAL STUDY ON AGANGLIONOSIS PRODUCED BY A NEW METHOD IN RAT. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 10, n. 6, p. 865-873, 1975 1975. ISSN 0022-3468. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1975BB69800002 >.

INOUE, K. I. et al. Metallothionein as an Anti-Inflammatory Mediator. **Mediators of Inflammation**, p. 7, 2009. ISSN 0962-9351. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000266377700001 >.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Disponível em:<<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>>. Acesso em: 02 abr. 2016.

JACOBS, L. R. Relationship between dietary fiber and cancer: metabolic, physiologic, and cellular mechanisms. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 183, n. 3, p. 299-310, Dec 1986. ISSN 0037-9727. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3025886> >.

JASANI, B. et al. Clonal overexpression of metallothionein is induced by somatic mutation in morphologically normal colonic mucosa. **J Pathol**, v. 184, n. 2, p. 144-7, Feb 1998. ISSN 0022-3417. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9602704> >.

JASANI, B.; ELMES, M. E. Immunohistochemical detection of metallothionein. **Methods Enzymol**, v. 205, p. 95-107, 1991. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1779829> >.

JÉZÉQUEL, P. et al. Validation of tumor-associated macrophage ferritin light chain as a prognostic biomarker in node-negative breast cancer tumors: A multicentric 2004 national PHRC study. **Int J Cancer**, v. 131, n. 2, p. 426-37, Jul 2012. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21898387> >.

KASDAGLY, M. et al. Colon carcinogenesis: influence of Western diet-induced obesity and targeting stem cells using dietary bioactive compounds. **Nutrition**, v. 30, n. 11-12, p. 1242-56, 2014 Nov-Dec 2014. ISSN 1873-1244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25280404> >.

KHANNA, K. K.; JACKSON, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. **Nat Genet**, v. 27, n. 3, p. 247-54, Mar 2001. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11242102> >.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. [Cyclooxygenase-2 inhibitors nonsteroid anti-inflammatory drugs: current issues.]. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 52, n. 4, p. 498-512, Jul 2002. ISSN 1806-907X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19479115> >.

KURAGUCHI, M.; THOMAS, G. A.; WILLIAMS, E. D. Somatic mutation of the glucose-6-phosphate dehydrogenase (g6pd) gene in colonic stem cells and crypt restricted loss of G6PD activity. **Mutat Res**, v. 379, n. 1, p. 69-75, Sep 1997. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9330624> >.

KUTCHERA, W. et al. Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. **Proc Natl Acad Sci U S A**,

v. 93, n. 10, p. 4816-20, May 1996. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8643486> >.

KÄGI, J. H. Overview of metallothionein. **Methods Enzymol**, v. 205, p. 613-26, 1991. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1779825> >.

LEEK, R. D. et al. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. **Cancer Res**, v. 56, n. 20, p. 4625-9, Oct 1996. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8840975> >.

LI, F. Y.; LAI, M. D. Colorectal cancer, one entity or three. **J Zhejiang Univ Sci B**, v. 10, n. 3, p. 219-29, Mar 2009. ISSN 1673-1581. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19283877> >.

LICHTENSTEIN, A. et al. Human neutrophil-mediated lysis of ovarian cancer cells. **Blood**, v. 74, n. 2, p. 805-9, Aug 1989. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2546632> >.

LOMAX, A. E.; FERNANDEZ, E.; SHARKEY, K. A. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 17, n. 1, p. 4-15, Feb 2005. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226572700003 >.

LUEBECK, E. G.; HAZELTON, W. D. Multistage carcinogenesis and radiation. **J Radiol Prot**, v. 22, n. 3A, p. A43-9, Sep 2002. ISSN 0952-4746. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12400946> >.

MAHMOUD, S. M. et al. Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. **J Clin Pathol**, v. 65, n. 2, p. 159-63, Feb 2012. ISSN 1472-4146. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22049225> >.

MANTOVANI, A. The yin-yang of tumor-associated neutrophils. **Cancer Cell**, v. 16, n. 3, p. 173-4, Sep 2009. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19732714> >.

MARIANI, F.; SENA, P.; RONCUCCI, L. Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 29, p. 9716-31, Aug 2014. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25110410> >.

MASKENS, A. P.; DUJARDIN-LOITS, R. M. Experimental adenomas and carcinomas of the large intestine behave as distinct entities: most carcinomas arise de novo in flat mucosa. **Cancer**, v. 47, n. 1, p. 81-9, Jan 1981. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7006791> >.

MASTERS, B. A. et al. Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 2, p. 584-8,

Jan 1994. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8290567> >.

MEIRA, L. B. et al. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. **J Clin Invest**, v. 118, n. 7, p. 2516-25, Jul 2008. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18521188> >.

MURDOCH, C. et al. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 8, p. 618-31, Aug 2008. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18633355> >.

MUTOH, M. et al. Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis. **Cancer Res**, v. 62, n. 1, p. 28-32, Jan 2002. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11782353> >.

NOZAWA, H.; CHIU, C.; HANAHAN, D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 33, p. 12493-8, Aug 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16891410> >.

OFNER, D. et al. Immunohistochemical metallothionein expression in colorectal adenocarcinoma: correlation with tumour stage and patient survival. **Virchows Arch**, v. 425, n. 5, p. 491-7, 1994. ISSN 0945-6317. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7850073> >.

OLIVEIRA, E. C. et al. Chronic Trypanosoma cruzi infection associated with low incidence of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 5, p. 737-40, May 2001. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11323392> >.

OSHIMA, M. et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). **Cell**, v. 87, n. 5, p. 803-9, Nov 1996. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8945508> >.

PATARCA, R. et al. Benzalkonium salts: Effects on G protein-mediated processes and surface membranes. **Critical Reviews in Oncogenesis**, v. 11, n. 3-4, p. 255-305, 2000. ISSN 0893-9675. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000168498600003 >.

PEDERSEN, M. et al. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. **Prog Histochem Cytochem**, v. 44, n. 1, p. 29-64, 2009. ISSN 0079-6336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19348910> >.

PERAZELLA, M. A.; TRAY, K. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: a pattern of nephrotoxicity similar to traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Am J Med**, v. 111, n. 1, p. 64-7, Jul 2001. ISSN 0002-9343. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11448662> >.

PETRUSKA, J. M. et al. Myeloperoxidase-enhanced formation of (+/-)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene-DNA adducts in lung tissue in vitro: a role of

pulmonary inflammation in the bioactivation of a procarcinogen. **Carcinogenesis**, v. 13, n. 7, p. 1075-81, Jul 1992. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1322250> >.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nat Med**, v. 17, n. 11, p. 1381-90, 2011. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22064428> >.

PICCARD, H.; MUSCHEL, R. J.; OPDENAKKER, G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 82, n. 3, p. 296-309, Jun 2012. ISSN 1879-0461. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21798756> >.

POLLI-LOPES, A. C. et al. Myenteric denervation reduces the incidence of gastric tumors in rats. **Cancer Letters**, v. 190, n. 1, p. 45-50, Feb 10 2003. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180877100006 >.

POLYAK, K. et al. Early alteration of cell-cycle-regulated gene expression in colorectal neoplasia. **Am J Pathol**, v. 149, n. 2, p. 381-7, Aug 1996. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8701978> >.

PRETLOW, T. P. et al. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. **Cancer Res**, v. 51, n. 5, p. 1564-7, Mar 1991. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1997197> >.

PRICE, P. B. BENZALKONIUM CHLORIDE (ZEPHIRAN CHLORIDE) AS A SKIN DISINFECTANT. **Archives of Surgery**, v. 61, n. 1, p. 23-33, 1950. ISSN 0004-0010. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1950UE42700004 >.

QIAN, B. Z.; POLLARD, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 39-51, Apr 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371344> >.

RIBATTI, D. The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review. **Angiogenesis**, v. 11, n. 3, p. 215-21, 2008. ISSN 1573-7209. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18568405> >.

ROGAKOU, E. P. et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. **J Biol Chem**, v. 273, n. 10, p. 5858-68, Mar 1998. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9488723> >.

RONCUCCI, L. et al. Myeloperoxidase-positive cell infiltration in colorectal carcinogenesis as indicator of colorectal cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 17, n. 9, p. 2291-7, Sep 2008. ISSN 1055-9965. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18768495> >.

SAK, A.; STUSCHKE, M. Use of γ H2AX and other biomarkers of double-strand breaks during radiotherapy. **Semin Radiat Oncol**, v. 20, n. 4, p. 223-31, Oct 2010. ISSN 1532-9461. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20832014> >.

SAKATA, K. et al. SELECTIVE DESTRUCTION OF INTESTINAL NERVOUS ELEMENTS BY LOCAL APPLICATION OF BENZALKONIUM SOLUTION IN THE RAT. **Experientia**, v. 35, n. 12, p. 1611-1613, 1979 1979. ISSN 0014-4754. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1979HY43400044 >.

SANDBORN, W. J. et al. A review of activity indices and efficacy endpoints for clinical trials of medical therapy in adults with Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 122, n. 2, p. 512-30, Feb 2002. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11832465> >.

SATO, A. et al. PATHOPHYSIOLOGY OF AGANGLIONIC COLON AND ANORECTUM - EXPERIMENTAL-STUDY ON AGANGLIONOSIS PRODUCED BY A NEW METHOD IN RAT. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 13, n. 4, p. 399-405, 1978 1978. ISSN 0022-3468. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1978FK94600013 >.

SATO, T. et al. Neutrophil elastase and cancer. **Surg Oncol**, v. 15, n. 4, p. 217-22, Dec 2006. ISSN 0960-7404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320378> >.

SATOH, M. et al. Modulation of resistance to anticancer drugs by inhibition of metallothionein synthesis. **Cancer Res**, v. 54, n. 20, p. 5255-7, Oct 1994. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7923149> >.

SATOH, M.; NAGANUMA, A.; IMURA, N. Metallothionein induction prevents toxic side effects of cisplatin and adriamycin used in combination. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 21, n. 2, p. 176-8, 1988. ISSN 0344-5704. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3349566> >.

SCHMIDT, T. et al. Macrophage-tumor crosstalk: role of TAMR tyrosine kinase receptors and of their ligands. **Cell Mol Life Sci**, v. 69, n. 9, p. 1391-414, May 2012. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22076650> >.

SHIRAI, T. et al. Modification by five antioxidants of 1,2-dimethylhydrazine-initiated colon carcinogenesis in F344 rats. **Carcinogenesis**, v. 6, n. 4, p. 637-9, Apr 1985. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3986966> >.

SINICROPE, F. A.; GILL, S. Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 23, n. 1-2, p. 63-75, 2004 Jan-Jun 2004. ISSN 0167-7659. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15000150> >.

SOBREIRA, L. F. R. et al. Effects of myenteric denervation on gastric epithelial cells and gastric emptying. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2493-2499, Nov 2002. ISSN 0163-2116. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000178529100020 >.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 6, p. 427-39, Jun 2010. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20498669> >.

STENSON, W. F. Prostaglandins and epithelial response to injury. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 23, n. 2, p. 107-10, Mar 2007. ISSN 0267-1379. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17268236> >.

SUTANDYO, N. Nutritional carcinogenesis. **Acta Med Indones**, v. 42, n. 1, p. 36-42, Jan 2010. ISSN 0125-9326. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20305331> >.

SUZUI, M.; MORIOKA, T.; YOSHIMI, N. Colon preneoplastic lesions in animal models. **J Toxicol Pathol**, v. 26, n. 4, p. 335-41, Dec 2013. ISSN 0914-9198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24526805> >.

TAKAISHI, M. et al. Protective role of metallothionein in benzo[a]pyrene-induced DNA damage. **J Toxicol Sci**, v. 34, n. 5, p. 449-58, Oct 2009. ISSN 1880-3989. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19797853> >.

TAKAISHI, M. et al. Involvement of metallothionein (MT) as a biological protective factor against carcinogenesis induced by benzo[a]pyrene (B[a]P). **J Toxicol Sci**, v. 35, n. 2, p. 225-30, Apr 2010. ISSN 1880-3989. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371973> >.

THEOCHARIS, S. E. et al. Metallothionein expression in human neoplasia. **Histopathology**, v. 45, n. 2, p. 103-18, Aug 2004. ISSN 0309-0167. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15279628> >.

TSUJII, M.; DUBOIS, R. N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. **Cell**, v. 83, n. 3, p. 493-501, Nov 1995. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8521479> >.

TSUJII, M. et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. **Cell**, v. 93, n. 5, p. 705-16, May 1998. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9630216> >.

TUSHINSKI, R. J. et al. Survival of mononuclear phagocytes depends on a lineage-specific growth factor that the differentiated cells selectively destroy. **Cell**, v. 28, n. 1, p. 71-81, Jan 1982. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6978185> >.

TÁRRAGA LÓPEZ, P. J.; ALBERO, J. S.; RODRÍGUEZ-MONTES, J. A. Primary and secondary prevention of colorectal cancer. **Clin Med Insights Gastroenterol**, v. 7, p. 33-46, 2014. ISSN 1179-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25093007> >.

VARGAS, A. J.; THOMPSON, P. A. Diet and nutrient factors in colorectal cancer risk. **Nutr Clin Pract**, v. 27, n. 5, p. 613-23, Oct 2012. ISSN 1941-2452. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22892274> >.

VAUZOUR, D. et al. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. **Nutrients**, v. 2, n. 11, p. 1106-31, Nov 2010. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22254000> >.

VESPÚCIO, M. V. et al. Intrinsic denervation of the colon is associated with a decrease of some colonic preneoplastic markers in rats treated with a chemical carcinogen. **Braz J Med Biol Res**, v. 41, n. 4, p. 311-7, Apr 2008. ISSN 1414-431X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18297187> >.

VIKIS, H. G. et al. Neutrophils are required for 3-methylcholanthrene-initiated, butylated hydroxytoluene-promoted lung carcinogenesis. **Mol Carcinog**, v. 51, n. 12, p. 993-1002, Dec 2012. ISSN 1098-2744. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22006501> >.

WADA, Y. et al. Neutrophil elastase induces cell proliferation and migration by the release of TGF-alpha, PDGF and VEGF in esophageal cell lines. **Oncol Rep**, v. 17, n. 1, p. 161-7, Jan 2007. ISSN 1021-335X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17143494> >.

WILLOUGHBY, D. A.; MOORE, A. R.; COLVILLE-NASH, P. R. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. **Lancet**, v. 355, n. 9204, p. 646-8, Feb 2000. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10696997> >.

YAKSH, T. L. et al. The acute antihyperalgesic action of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs and release of spinal prostaglandin E2 is mediated by the inhibition of constitutive spinal cyclooxygenase-2 (COX-2) but not COX-1. **J Neurosci**, v. 21, n. 16, p. 5847-53, Aug 2001. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11487607> >.

YAMASHITA, J. et al. Local increase in polymorphonuclear leukocyte elastase is associated with tumor invasiveness in non-small cell lung cancer. **Chest**, v. 109, n. 5, p. 1328-34, May 1996. ISSN 0012-3692. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8625686> >.

YAMASHITA, J. I. et al. Production of immunoreactive polymorphonuclear leucocyte elastase in human breast cancer cells: possible role of polymorphonuclear leucocyte elastase in the progression of human breast cancer. **Br J Cancer**, v. 69, n. 1, p. 72-6, Jan 1994. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8286213> >.

YOUN, J. et al. Metallothionein suppresses collagen-induced arthritis via induction of TGF-beta and down-regulation of proinflammatory mediators. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 129, n. 2, p. 232-239, Aug 2002. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000177647400006 >.

ZEIDLER, C. et al. Clinical implications of ELA2-, HAX1-, and G-CSF-receptor (CSF3R) mutations in severe congenital neutropenia. **Br J Haematol**, v. 144, n. 4, p. 459-67, Feb 2009. ISSN 1365-2141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120359> >.

ZIMMER, M. et al. Three human elastase-like genes coordinately expressed in the myelomonocyte lineage are organized as a single genetic locus on 19pter. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 17, p. 8215-9, Sep 1992. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1518849> >.

ZIVKOVIC, M. et al. Oxidative burst and anticancer activities of rat neutrophils. **Biofactors**, v. 24, n. 1-4, p. 305-12, 2005. ISSN 0951-6433. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16403992> >.

ZIVKOVIC, M. et al. Oxidative burst of neutrophils against melanoma B16-F10. **Cancer Lett**, v. 246, n. 1-2, p. 100-8, Feb 2007. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16564616> >.

ZUCOLOTO, S. et al. The relationship between myenteric neuronal denervation, smooth muscle thickening and epithelial cell proliferation in the rat colon. **Res Exp Med (Berl)**, v. 197, n. 2, p. 117-24, 1997. ISSN 0300-9130. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9380951> >.

ZUCOLOTO, S. et al. EFFECT OF CHEMICAL ABLATION OF MYENTERIC NEURONS ON INTESTINAL-CELL PROLIFERATION. **Cell and Tissue Kinetics**, v. 21, n. 4, p. 213-219, Jul 1988. ISSN 0008-8730. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1988T696100001 >.

ZUCOLOTO, S. et al. Topical application of benzalkonium chloride to the stomach serosa increases gastric emptying time, acid secretion, serum gastrin and size of the mucosa. **Apmis**, v. 110, n. 11, p. 795-801, Nov 2002. ISSN 0903-4641. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180804800005 >.

9. ANEXO

- Certificado de aprovação no Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação n° 169/2014, sobre o projeto intitulado "*A atividade de neurônios mioentéricos sobre o desenvolvimento da carcinogênese de cólon*", sob a responsabilidade do **Professor Doutor Sergio Britto Garcia** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 20 de outubro de 2014.

We certify that the protocol n° 169/2014, entitled "*The activity of myenteric neurons on the development of colon carcinogenesis*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 10/20/2014.

Ribeirão Preto, 20 de outubro de 2014.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da CEUA – FMRP - USP