

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO
CENTRO-OESTE**

CÉSAR AUGUSTO SOBRINHO

**O EFEITO DO SULFORAFANO NA INCIDÊNCIA DO CÂNCER DE CÓLON
ASSOCIADO A COLITE EM RATOS**

**CAMPO GRANDE
2020**

CÉSAR AUGUSTO SOBRINHO

**O EFEITO DO SULFORAFANO NA INCIDÊNCIA DO CÂNCER DE CÓLON
ASSOCIADO A COLITE EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso de Sul como requisito para a obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Carcinogênese experimental e estudos do câncer na região Centro-Oeste.

Orientador: Prof. Dr. Rondon Tosta Ramalho.

**CAMPO GRANDE
2020**



Ata de Defesa de Dissertação
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste
Mestrado

Aos treze dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte, às catorze horas, no Anfiteatro I da FAMED, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Rondon Tosta Ramalho (UFMS), Ricardo Dutra Aydos (UFMS) e Wilson de Barros Cantero (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho do aluno: **CESAR AUGUSTO SOBRINHO**, CPF 36842044120, Área de concentração em Tecnologia e Saúde, do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**O efeito do sulforafano na incidência do câncer de cólon associado a colite em ratos**" e orientação de Rondon Tosta Ramalho. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra ao aluno que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR

Dr. Rondon Tosta Ramalho (Interno)

Dr. Joaquim Dias da Mota Longo (Interno) (Suplente)

Dr. Ricardo Dutra Aydos (Interno)

Dr. Wilson de Barros Cantero (Externo)

ASSINATURA

AVALIAÇÃO

_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

RESULTADO FINAL:

☒ Aprovação

☐ Aprovação com revisão

☐ Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Presidente da Banca Examinadora

Aluno

DEDICATÓRIA

À minha amada esposa, Joelma, e aos meus dois filhos queridos, Gabriel e Rafael. As três pessoas mais importantes em minha vida, por quem tenho eterna gratidão por serem tudo o que realmente eu preciso para viver bem neste mundo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, o nosso Pai celestial, por ter me dado a oportunidade de vir a este mundo, com saúde, com capacidade, mas acima de tudo, com muita vontade de ser uma pessoa cada vez melhor. Agradeço a ele por ter me concedido as condições necessárias para cursar medicina nessa querida Universidade (UFMS), apesar de ser oriundo de uma família humilde e sem recursos. Obrigado Senhor por ter me dado uma família maravilhosa e cúmplice de todos os meus projetos de vida. Obrigado por ter me concedido também alguns amigos incondicionais, com os quais posso contar sempre que preciso.

Agradeço à minha família, por confiar em mim e me apoiar todo tempo, especialmente nos momentos de dificuldade e desânimo que diversas vezes passei ao longo da pesquisa. Obrigado a vocês, meus amores, por me ensinar lições de amor e resiliência, e por tolerarem silentes a minha ausência e os meus momentos de falta de paciência.

À minha esposa Joelma, minha melhor amiga e companheira de uma vida toda, que está ao meu lado desde o início desse projeto, obrigado por acreditar em mim e me impulsionar na direção dos meus objetivos.

Aos meus filhos, Gabriel e Rafael, criaturas que Deus confiou a mim e a minha esposa, com quem tenho a honra de compartilhar a convivência, experiências dessa vida, e ensinamentos que aprendi e que também tenho repassado a eles. Vocês são e sempre serão minha verdadeira fonte de inspiração para os projetos de nossas vidas. Joelma, Gabriel e Rafael, o meu amor por vocês é tamanho que essa dimensão terrena não pode definir ou quantificar, pois transcende os portões desse mundo. O carinho que tenho por vocês três está guardado em meu coração e será levado para toda a eternidade.

Ao Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos, por ter me aceitado no programa e ter confiado em mim, meu profundo agradecimento por ter me dado a honra de ter sido seu orientado na maior parte da pesquisa, e por ter contribuído com a minha formação técnica e ética, desde a graduação até os dias de hoje.

Ao Prof. Dr. Rondon Tosta Ramalho, do laboratório de carcinogênese experimental, por ter aceitado ser o meu orientador após o Prof. Dr. Ricardo Aydos ter se aposentado na UFMS. Prof. Rondon, sou muito grato por ter me apoiado nos momentos de dificuldade e ter me tranquilizado nas horas em que o desespero tentava arrombar a porta da minha tranquilidade, momentos em que o senhor o afugentava com sua calma e conhecimentos oportunos.

A Profa. Dra. Iandara Schettert Silva, por ter me emprestado seus conhecimentos veterinários, ter me ajudado nos momentos de dúvidas com os animais de laboratório, e por ter, tão gentilmente, cedido o espaço no seu laboratório de modelos animais, onde pude realizar o experimento e levar a termo minha pesquisa.

Ao Prof. Dr. Albert Schiavetto de Souza, professor e coordenador da INBIO da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, por aceitar realizar a análise e geração dos dados estatísticos que foram utilizados nessa pesquisa. Meu muito obrigado pela disponibilidade e por colocar dedicação e amor em tudo o que faz.

Ao Prof. Dr. Gilberto Facco, professor de patologia da Universidade Uniderp, que se dispôs a realizar a leitura das lâminas de histologia dessa pesquisa, e com quem tive o prazer de rever muitos conceitos histológicos que já haviam sido depositados nas prateleiras do esquecimento.

Ao Dr. Luiz Carlos Takita, médico patologista e meu amigo, que também se dispôs a realizar a leitura das lâminas de histologia, revisão que foi solicitada pelo Prof. Dr. Gilberto Facco. Dr. Takita, agradeço por dispor do seu precioso tempo para me ajudar a concluir meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Guido Marks, por ter cedido o azoximetano que utilizei para induzir a carcinogênese colorretal nos animais de laboratório.

Ao Marcelo Barbosa Neves e Alessandra de Figueiredo Gonçalves, colegas de curso de mestrado, que me ajudaram com as pesquisas e também com os cuidados com os animais, meu muito obrigado a vocês dois.

Ao Evair Moisés de Lima Santiago, iniciante científico, que me ajudou com a pesquisa e também com o manejo dos animais. Você teve um papel importante na execução desse trabalho. Sou muito grato a você.

À colega de mestrado e médica veterinária, Liliane de Mello Santos Bochenek, por ter prestado assistência, ter trabalhado e nos orientado nos dois dias de eutanásia nos animais da pesquisa.

A todos os integrantes do biotério central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, por me acompanhar e orientar no manejo dos animais de laboratório, quando estes ainda não se encontravam maduros o suficiente para serem levados para o laboratório de modelos animais da Profa. Iandara.

EPÍGRAFE

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos ou as dificuldades. Se estivermos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho”.

(Dalai Lama)

RESUMO

Sobrinho, C. A. O efeito do sulforafano na incidência do câncer de cólon associado a colite em ratos. Campo Grande, 2020. [Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Objetivo: Esse trabalho teve como objetivo principal analisar a ação do sulforafano (SFN) na incidência do câncer de cólon associado a colite em ratos.

Método: Os resultados desse estudo foram obtidos através do experimento em modelo animal. O trabalho foi realizado na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no município de Campo Grande, no período compreendido entre março de 2018 até janeiro de 2020. Nesse trabalho, foram utilizados 74 ratos de laboratório da raça Wistar machos com idade variando entre 8 a 10 semanas e pesando entre 250-300 gramas. Os 74 animais foram distribuídos em dois grandes grupos, 37 desses animais foram randomicamente alocados em um grupo denominado “experimento de câncer colorretal associado a colite”, e receberam azoximetano (AOM) com o objetivo de induzir o aparecimento de câncer colorretal (CCR). Os demais 37 animais foram colocados em outro grupo denominado de “experimento apenas colite”, que não receberam o azoximetano. Os ratos dos dois grandes grupos receberam dextran sulfato de sódio (DSS) a 2,5% na água de beber do dia 10 ao dia 45 (3 ciclos de 7 dias de DSS, alternados por 2 ciclos de 7 dias de água de torneira) com o objetivo de induzir a colite nos 74 animais. Os 37 ratos do grupo câncer associado a colite foram distribuídos em 2 grupos (19 ratos receberam o sulforafano por gavagem em dias alternados por 9 dias, e 18 ratos receberam água destilada AD por gavagem, no mesmo volume e nos mesmos dias). Os 37 ratos do grupo apenas colite foram divididos em 2 grupos (19 ratos receberam o sulforafano (SFN) por gavagem em dias alternados por 9 dias, e 18 ratos receberam AD por gavagem, no mesmo volume e nos mesmos dias). No décimo dia de experimento, os 37 ratos do grupo câncer associado a colite receberam 1 única dose de 10 mg/Kg de AOM intraperitoneal, e cada um dos dois grandes grupos de 37 animais (Câncer associado a colite, e apenas colite) foi subdividido em 4 subgrupos. No experimento câncer associado a colite: Subgrupo 1 – 10 ratos receberam o SFN por gavagem em dias alternados por 35 dias, Subgrupo 2 – 9 animais receberam AD pelo mesmo período, Subgrupo 3 – 9 ratos receberam o SFN e Subgrupo 4 – 9 ratos receberam AD. No experimento apenas colite: Subgrupo 5 – 10 ratos receberam o SFN por gavagem em dias alternados por 35 dias, Subgrupo 6 – 9 animais receberam AD pelo mesmo período, Subgrupo 7 – 9 ratos receberam o SFN e Subgrupo 8 – 9 ratos receberam AD. O estudo dos dois grandes grupos foi dividido em fases e cada uma delas recebeu uma denominação: do dia 1 ao 9 do experimento chamou-se fase pré-indução, do dia 10 ao 45 fase de indução, do dia 45 ao 76 fase pós-indução, e nos dias 76 e 77 foi realizada a eutanásia de todos os ratos. Após a eutanásia, seus cólons foram removidos para análise macroscópica e microscópica, e lâminas de histologia foram confeccionadas para permitir a classificação histopatológica das lesões neoplásicas/pré-neoplásicas e inflamatórias encontradas, visando a comparação dos achados entre os dois grandes grupos e nos subgrupos.

Resultados: Os animais que receberam o AOM e DSS desenvolveram focos de criptas aberrantes (FCA) e colite, e quando tratados com o SFN na forma de suplemento alimentar para humanos (Antes e durante a fase de indução do câncer associado a colite), não tiveram redução na incidência de FCA nem de inflamação. Os animais que receberam o SFN tiveram mais inflamação intestinal observada na histologia pela presença de placa linfóide reacional, discreto grau de inflamação, atrofia de cripta e dilatação de vasos linfáticos, e tiveram mais sinais clínicos de colite, como diarreia e diarreia com sangue. O único efeito protetivo do SFN observado nesse trabalho foi a redução da ulceração de mucosa ($p=0,027$), que foi um dos parâmetros de inflamação intestinal estudado.

Conclusão: O SFN utilizado nessa pesquisa (Suplemento alimentar para humanos) não reduziu a incidência de câncer associado a colite em ratos Wistar induzido por AOM e DSS, pelo contrário aumentou a incidência de inflamação nos animais que receberam o SFN.

Palavras-chave: Sulforafano. Câncer de cólon. Colite. Azoximetano. Dextran Sulfato de Sódio.

ABSTRACT

Sobrinho, C. A. The effect of sulforaphane on the incidence of colon cancer associated with colitis in rats. Campo Grande, 2020. [Dissertation - Postgraduate Program in Health and Development in the Midwest Region of the Federal University of Mato Grosso do Sul].

Objective: This study aimed to analyze the action of sulforaphane (SFN) on the incidence of colon cancer associated with colitis in rats.

Method: The results of this study were obtained through an animal model experiment. The work was carried out at the Faculty of Medicine of the Federal University of Mato Grosso do Sul, in Campo Grande city, from March 2018 to January 2020. In this work, 74 male Wistar laboratory rats aged ranging from 8 to 10 weeks and weighing between 250-300 grams. The 74 animals were divided into two large groups, 37 of these animals were randomly allocated to a group called “colitis-associated colorectal cancer experiment”, and received azoxymethane (AOM) in order to induce the appearance of colorectal cancer (CRC). The remaining 37 animals were placed in another group called “colitis only experiment”, which did not receive azoxymethane. The rats of the two large groups received 2.5% dextran sodium sulfate (DSS) in drinking water from day 10 to day 45 (3 cycles of 7 days of DSS, alternated by 2 cycles of 7 days of tap water) with the objective of inducing colitis in 74 animals. The 37 rats in the cancer group associated with colitis were divided into 2 groups (19 rats received sulforaphane by gavage every other day for 9 days, and 18 rats received distilled water AD by gavage, in the same volume and on the same days). The 37 rats in the colitis only group were divided into 2 groups (19 rats received sulforaphane (SFN) by gavage on alternate days for 9 days, and 18 rats received AD by gavage, in the same volume and on the same days). On the tenth day of the experiment, the 37 rats in the cancer group associated with colitis received 1 single dose of 10 mg / kg of intraperitoneal AOM, and each of the two large groups of 37 animals (Cancer associated with colitis, and only colitis) was subdivided into 4 subgroups. In the colitis-associated cancer experiment: Subgroup 1 - 10 rats received SFN by gavage on alternate days for 35 days, Subgroup 2 - 9 animals received AD for the same period, Subgroup 3 - 9 rats received SFN and Subgroup 4 - 9 rats received AD. In the colitis only experiment: Subgroup 5 - 10 rats received SFN by gavage on alternate days for 35 days, Subgroup 6 - 9 animals received AD for the same period, Subgroup 7 - 9 rats received SFN and Subgroup 8 - 9 rats received AD. The study of the two large groups was divided into phases and each one received a name: from day 1 to 9 of the experiment it was called the pre-induction phase, from day 10 to 45 the induction phase, from day 45 to 76 post-induction phase induction, and on days 76 and 77, all rats were euthanized. After euthanasia, their colons were removed for macroscopic and microscopic analysis, and histology slides were made to allow the histopathological classification of the neoplastic / pre-neoplastic and inflammatory lesions found, aiming to compare the findings between the two large groups and in the subgroups.

Results: The animals that received AOM and DSS developed outbreaks of aberrant crypts (FCA) and colitis, and when treated with SFN as a food supplement for humans (Before and during the cancer-inducing phase associated with colitis), had a reduction in the incidence of FCA or inflammation. The animals that received the SFN had more intestinal inflammation observed in histology due to the presence of reactive lymphoid plaque, slight degree of inflammation, crypt atrophy and dilation of lymphatic vessels, and had more clinical signs of colitis, such as diarrhea and bloody diarrhea. The only protective effect of SFN observed in this work was the reduction of mucosal ulceration ($p = 0.027$), which was one of the parameters of intestinal inflammation studied.

Conclusion: The SFN used in this research (Food supplement for humans) did not reduce the incidence of cancer associated with colitis in Wistar rats induced by AOM and DSS, on the contrary it increased the incidence of inflammation in the animals that received the SFN.

Keywords: Sulforaphane. Colon cancer. Colitis. Azoxymethane. Dextran Sodium Sulfate.

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% - Porcento

µm - Micrômetro

100x - Aumento de 100 vezes ao microscópio óptico

400x - Aumento de 400 vezes ao microscópio óptico

40x – Aumento de 40 vezes ao microscópio óptico

A9 – Animal número 9

AD – Água destilada

ad libitum – À vontade

DNA – Deoxyribonucleic Acid

AhR - Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator

AICR – American Institute for Cancer Research

AOM - Azoximetano

AREG – Amphiregulin

Bad - Proteína D associada a BCL-2

Bax - Proteína X associada a BCL-2

CAC – Câncer associado a colite

CCR – Câncer colorretal

CDT - Cytolethal Distending Toxin

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

cm - Centímetro

c-Myc – Proto-oncogene Myc

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

Cul3 - Complexo de ubiquitina E3 ligase dependente de culina-3

DCA – Deoxycholic Acid

DII – Doença Inflamatória Intestinal

DSS – Dextran sulfato de sódio

EREG – Epiregulin

ERK – Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase

et al. – E outros

FCA – Foco de cripta aberrante

FTP – Feeding Tube Polypropylene

G5 – Subgrupo 5

GSL – Glicosinolato

GST – Glutathione S-transferase
H⁺ - Hídrón
H₂S – Sulfeto de hidrogênio
HDAC - Histone Deacetylase
HIF – Hypoxia-Inducible Factor
HIF- α – Hypoxia-Inducible Factor Alpha
HO-1 – Heme Oxygenase-1
HSO₄⁻ - Íon hidrogenossulfato
IL-23 – Interleucina 23
IL-1 – Interleucina 1
IL-6 – Interleucina 6
Keap1 - Kelch-Like ECH-Associated Protein 1
Kg - Quilograma
LC3 – Microtubule-Associated Protein 1A/1B-Light Chain 3
MAMP - Microbe-Associated Molecular Pattern
mg – Miligrama
min. – Minuto
mL – Mililitro
mm - Milímetro
MMP-9 - Matrix Metalloproteinase-9
MPO - Myeloperoxidase
MS – Ministério da Saúde
NADP - Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NF- κ B – Nuclear Factor Kappa B
NLR - NOD-Like Receptors
nº - Número
NQO1 - NAD(P)H quinone oxidoreductase 1
Nrf2 - Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2
OMS – Organização mundial de saúde
p - Nível descritivo ou probabilidade de significância
p21 – Proteína 21 supressora de tumor
RCU – Retocolite ulcerativa
RNAP – Ribonucleic Acid Polymerase
RNS - Reactive Nitrogen Species

ROS - Reactive Oxygen species
SCFA – Short Chain Fatty Acids
SF 0,9% - Solução fisiológica a 0,9%
SFN – Sulforafano
SOD – Superóxido dismutase
SPSS - Statistical Package for Social Sciences
STAT3 - Signal Transducer and Activator of Transcription 3
Th17 cell – Linfócito T helper 17
TLR – Toll-like Receptor
TNF – Tumor Necrosis Factor
TNF- α - Tumor Necrosis Factor Alpha
Tregcell – Regulatory T Cell
UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
USA. – United States of America
VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor
 γ -GCL – γ -Glutamylcysteine ligase

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Incidência e mortalidade do câncer colorretal em homens em alguns países do mundo.....	19
Figura 2:	Incidência e mortalidade do câncer colorretal em mulheres em alguns países do mundo.....	20
Figura 3:	Comparação entre a eubiose e disbiose intestinal e sua relação com a inflamação e carcinogênese.....	21
Figura 4:	Mecanismos pelos quais a microbiota intestinal modula a carcinogênese...	22
Figura 5:	Índice de atividade histológica da retocolite ulcerativa (RCU).....	24
Figura 6:	Características colonoscópicas e histológicas dos focos de cripta aberrante.....	26
Figura 7:	Evolução da lesão pré-neoplásica (Foco de Cripta Aberrante) até o câncer colorretal metastático.....	27
Figura 8:	Aspecto histológico da cripta normal e aberrante.....	28
Figura 9:	Aspecto colonoscópico e anátomo-patológico macroscópico do câncer colorretal.....	29
Figura 10:	Modelo de câncer colorretal associado e colite induzido pelo azoximetano e dextran sulfato de sódio.....	30
Figura 11:	Representação esquemática da reação química de hidrólise da Glicorafanina em Isotiocianato Sulforafano.....	31
Figura 12:	Mecanismos antioxidante, anti-inflamatório e pró-apoptótico do sulforafano.....	33
Figura 13:	Gráfico do efeito randômico do consumo de vegetais crucíferos e risco de câncer colorretal em estudos de caso-controle.....	34
Figura 14:	Gráfico do efeito fixo do consumo de vegetais crucíferos e risco de câncer colorretal em estudos prospectivos.....	35
Figura 15:	Ilustração demonstrando a interferência do sulforafano nas diversas fases da carcinogênese.....	36
Figura 16:	Vias de sinalização do sulforafano na redução da angiogênese e metástase, e na ativação da autofagia tumoral.....	37
Figura 17:	Delineamento da pesquisa no grupo de animais em experimento de câncer associado a colite (Azoximetano e Dextran Sulfato de Sódio).....	41
Figura 18:	Delineamento da pesquisa no grupo de animais em experimento apenas colite (Somente Dextran Sulfato de Sódio).....	42
Figura 19:	Necropsia do animal nº 8 do subgrupo 1, mostrando a perfuração esofágica.....	49
Figura 20:	Quadro contendo o número de animais que tiveram diarreia e diarreia com sangue no experimento câncer colorretal associado a colite.....	50
Figura 21:	Gráfico da evolução do peso dos subgrupos de animais durante o experimento de câncer colorretal associado a colite.....	52
Figura 22:	Foto do momento da necrópsia do animal nº 7 do subgrupo 3, mostrando a perfuração esofágica.....	53
Figura 23:	Quadro contendo o número de animais que tiveram diarreia e diarreia com sangue no experimento apenas colite.....	54
Figura 24:	Gráfico da evolução do peso dos subgrupos de animais durante o experimento apenas colite.....	56
Figura 25:	Foto de segmento de cólon de 3 cm contendo uma lesão macroscópica solitária de 0,8 x 0,3 cm.....	57

Figura 26:	Foto de dois segmentos de cólon do mesmo animal contendo lesões macroscópicas.....	57
Figura 27:	Foto de uma lesão polipoide exofítica de cólon medindo 9 x 4 mm.....	58
Figura 28:	Fotomicrografia da mucosa colorretal de espessura preservada e com criptas não patológicas.....	60
Figura 29:	Fotomicrografia da mucosa colorretal de espessura preservada e com dilatação de vaso linfático.....	61
Figura 30:	Fotomicrografia de um adenoma de cólon.....	62
Figura 31:	Fotomicrografia de foco de cripta aberrante (FCA).....	63
Figura 32:	Fotomicrografia de uma grande placa linfóide invadindo e causando erosão na mucosa.....	64
Figura 33:	Fotomicrografia de vaso linfático da submucosa dilatado e contendo linfócitos e linfa no seu interior.....	65
Figura 34:	Fotomicrografia de foco de cripta aberrante (FCA).....	66
Figura 35:	Fotomicrografia de foco de cripta aberrante (FCA).....	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1:	Evolução média dos pesos dos subgrupos de animais (gramas) do experimento câncer colorretal associado a colite.....	51
Tabela 2:	Evolução média dos pesos dos subgrupos de animais (gramas) do experimento apenas colite.....	55
Tabela 3:	Resultados das alterações histopatológicas, tanto de lesões pré-neoplásicas/câncer como de sinais inflamatórios, em cada um dos subgrupos experimentais avaliados neste estudo.....	59

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1.	Epidemiologia do câncer colorretal.....	18
2.2.	Disbiose como fator desencadeador do câncer colorretal.....	20
2.3.	A relação entre inflamação do cólon e neoplasia.....	22
2.4.	Aspectos histológicos e colonoscópicos da lesão pré-neoplásica do câncer colorretal.....	24
2.5.	Azoximetano e Dextran Sulfato de Sódio como indutores de câncer colorretal associado a colite em modelos animais.....	28
2.6.	Características químicas dos glicosinolatos e seus derivados (Sulforafano).....	30
2.7.	Mecanismos de ação do Sulforafano.....	31
2.8.	O efeito do sulforafano no risco de câncer colorretal em humanos.....	33
2.9.	A ação do sulforafano nas diversas fases da carcinogênese.....	35
2.10.	O sulforafano atenua a colite induzida pelo dextran sulfato de sódio.....	37
3.	OBJETIVO GERAL.....	38
3.1.	Objetivos específicos.....	38
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1.	Aspectos éticos.....	39
4.2.	Tipo de pesquisa.....	39
4.3.	Local da pesquisa.....	39
4.4.	Animais.....	39
4.5.	Delineamento da pesquisa experimental em modelo animal.....	40
4.6.	Pré-indução do câncer colorretal associado a colite.....	43
4.7.	Indução do câncer colorretal associado a colite utilizando Azoximetano e Dextran Sulfato de Sódio.....	43
4.8.	Pós-indução do câncer colorretal associado à colite.....	44
4.9.	4.9. Pré-indução apenas colite.....	44
4.10.	Indução apenas da colite usando Dextran Sulfato de Sódio.....	44
4.11.	Pós-indução da colite	45
4.12.	Eutanásia.....	45
4.13.	Análise morfológica macroscópica dos cólons.....	46
4.14.	Formolização e preparo dos segmentos de cólon.....	46
4.15.	Preparo das lâminas de histologia.....	46
4.16.	Análise histopatológica das lâminas.....	46
4.17.	Análise estatística.....	47
5.	RESULTADOS.....	49
5.1.	Experimento de câncer colorretal associado a colite.....	49
5.2.	Experimento apenas de colite.....	53
5.3.	5.7. Análise morfológica macroscópica e sob microscopia estereoscópica dos cólons.....	56
5.4.	Análise histopatológica.....	58
6.	DISCUSSÃO.....	68
7.	CONCLUSÃO.....	71
8.	REFERÊNCIAS.....	72
9.	ANEXOS.....	77

1. INTRODUÇÃO

A oncogênese intestinal guarda uma estreita relação com as doenças inflamatórias do intestino, fatores genéticos, fatores ambientais tais como estilo de vida, tipo de dieta predominantemente consumida, e microbiota intestinal (SANTOS Jr, 2007).

O câncer colorretal (CCR) é bastante prevalente no Brasil, e atualmente, não é mais uma exclusividade de pacientes idosos, sendo atualmente encontrado em pessoas com idade até antes dos 30 anos. Sendo uma doença silenciosa no seu início, muitas pessoas quando a descobrem, já apresentam comprometimento à distância (Metástases), o que reduz bastante as expectativas de cura e também de sobrevida a longo prazo (RÊGO *et al.*, 2012).

O impacto social, familiar e econômico do CCR é extremamente destrutivo pois muitos pacientes, quando acometidos, ainda se encontram na fase produtiva de suas vidas, sendo obrigados a se afastarem de suas atividades laborais e familiares para um tratamento longo, desgastante e nem sempre eficaz. Isso sem mencionar a redução importante na qualidade de vida que alguns desses pacientes são submetidos em virtude da quimioterapia, radioterapia e cirurgias mutilantes, por exemplo, as grandes ressecções intestinais associadas a colostomias definitivas (NICOLUSSI; SAWADA, 2008).

O entendimento acerca da relação existente entre a alimentação e a saúde está cada vez mais evidente e o interesse a despeito dos efeitos protetores dos nutrientes sobre determinadas doenças crônico-degenerativas, como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e outras, é crescente nos dias atuais (CARVALHO *et al.*, 2006).

Com a globalização e facilidade de acesso às informações científicas, está havendo uma tendência crescente no consumo de alimentos ditos fisiologicamente ativos, também conhecidos como funcionais, ou seja, aqueles que possuem a capacidade de exercer efeitos metabólicos benéficos à saúde (HASLER, 1998).

Uma substância denominada sulforafano (SFN), encontrada em grande quantidade nos vegetais crucíferos como o brócolis, couve de Bruxelas, repolho, agrião e outros, tem sido estudada como agente anticarcinogênico, por ser capaz de promover neutralização de radicais livres de oxigênio e apoptose de células pré-neoplásicas e neoplásicas (ULLAH, 2015; VEERANKI *et al.*, 2013; STEINKELLNER *et al.*, 2001; VERHOEVEN *et al.*, 1997).

Apesar de haver indícios de que o consumo de alimentos ricos em SFN possa reduzir a incidência de tumores de cólon, ainda não há uma comprovação científica realmente convincente que possa recomendar sua utilização formal em quimioprevenção e tratamento em humanos (CLARKE; DASHWOOD; HO, 2008).

Portanto, o efeito do SFN na incidência do câncer de cólon associado à colite constitui-se um desafio em saúde ainda não bem esclarecido, já que existem poucos estudos indicando um efeito protetivo, realmente importante do SFN contra o CCR em seres humanos, e ainda não há evidências robustas que recomendem sua utilização na prevenção e tratamento dessa patologia.

Em face desses motivos, estudamos o efeito do SFN na prevenção do CCR associado à colite em ratos. A escolha desse bioativo deveu-se ao fato dele apresentar efeitos protetivos contra o câncer de cólon em alguns poucos trabalhos experimentais em cobaias e *in vitro*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Epidemiologia do câncer colorretal

O câncer colorretal é uma neoplasia que acomete o cólon, o reto e o ânus, cuja taxa de mortalidade vem se elevando progressivamente em todos os estados brasileiros. A taxa de mortalidade por essa doença foi de 7,98 óbitos/100 mil habitantes em 2014. As regiões Sul e Sudeste foram as que tiveram as maiores taxas de mortalidade, e o sexo feminino foi o que teve a maior prevalência em todas as regiões do Brasil (MENEZES *et al.*, 2016).

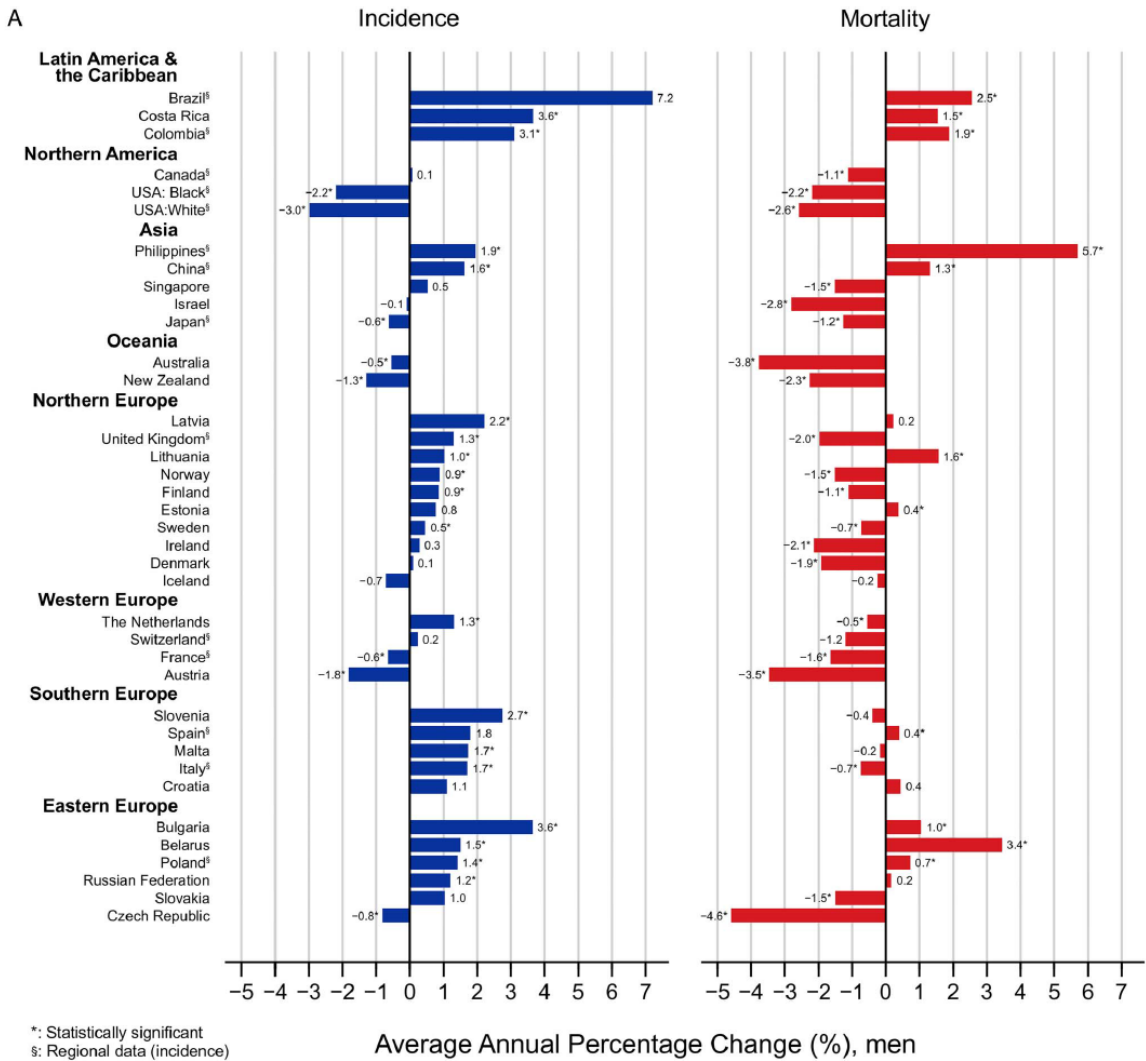
Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) demonstram que o CCR está entre as dez maiores causas de mortalidade e morbidade no mundo e no Brasil (ARNOLD *et al.*, 2016).

O CCR é a terceira neoplasia maligna mais comumente diagnosticada e a quarta causa principal de mortes relacionadas ao câncer no mundo, e espera-se que seu impacto aumente em 60%, gerando uma expectativa de 2,2 milhões de novos casos e 1,1 milhão de mortes até 2030 (ARNOLD *et al.*, 2016).

O Brasil é o país com a maior incidência de CCR em ambos os sexos no mundo e o terceiro maior em mortalidade, além disso, no sexo masculino perde apenas para as Filipinas e Bielorrússia (ARNOLD *et al.*, 2016).

A figura 1 demonstra a incidência e mortalidade do CCR em homens no mundo e na América do Sul, onde o Brasil figura como líder no parâmetro incidência (Os valores na frente de cada barra representam a variação percentual anual média da incidência e mortalidade por CCR no período mais recente de 10 anos, tanto no gráfico dos homens quanto no das mulheres).

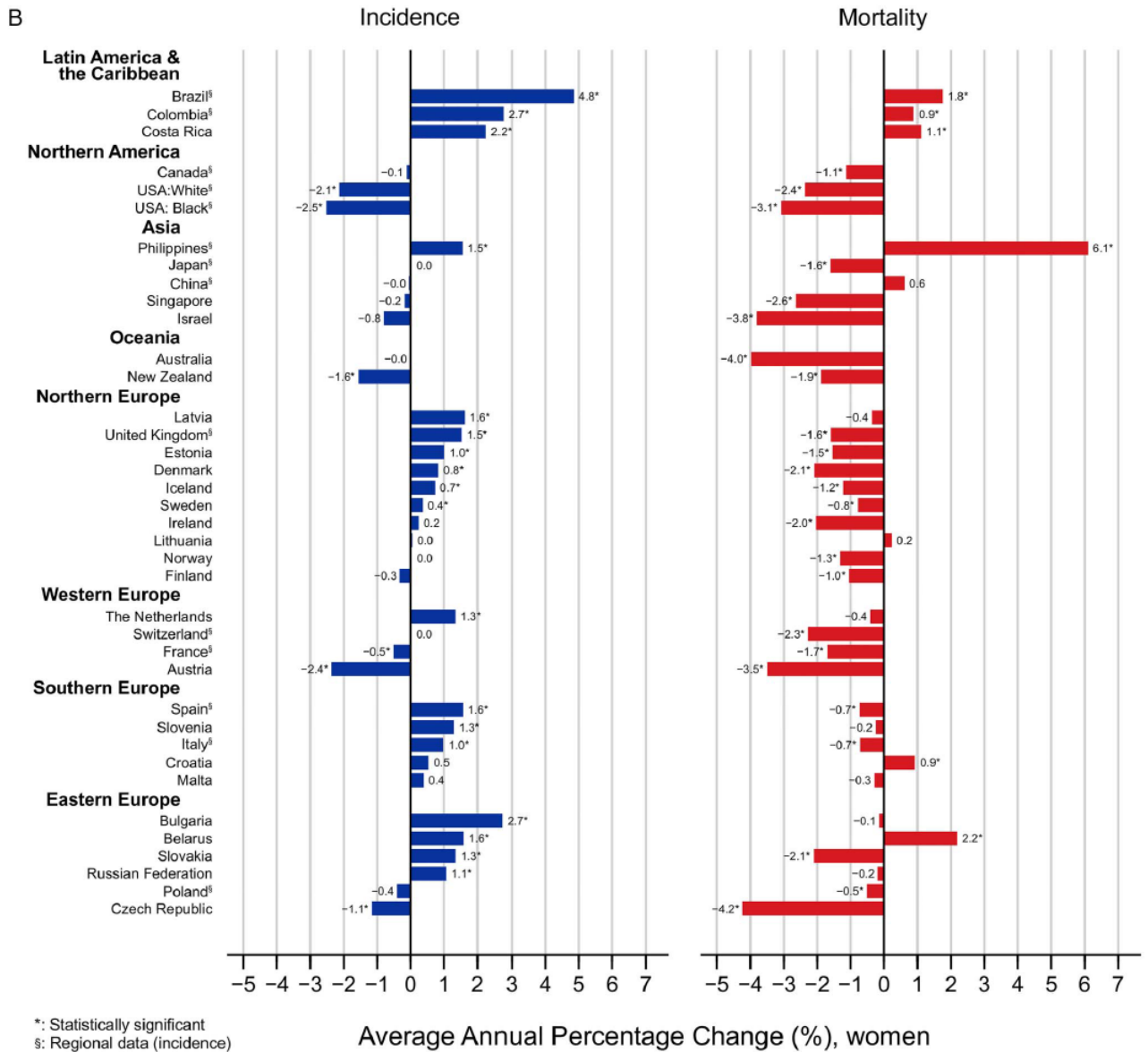
Figura 1. Incidência e mortalidade do câncer colorretal em homens em alguns países do mundo.



Fonte: Arnold *et al.* (2016).

A figura 2 demonstra a incidência e mortalidade do CCR em mulheres no mundo e na América do Sul, onde o Brasil, novamente, figura como líder na incidência, e na mortalidade perde apenas para as Filipinas e Bielorrússia.

Figura 2. Incidência e mortalidade do câncer colorretal em mulheres em alguns países do mundo.



Fonte: Arnold *et al.* (2016).

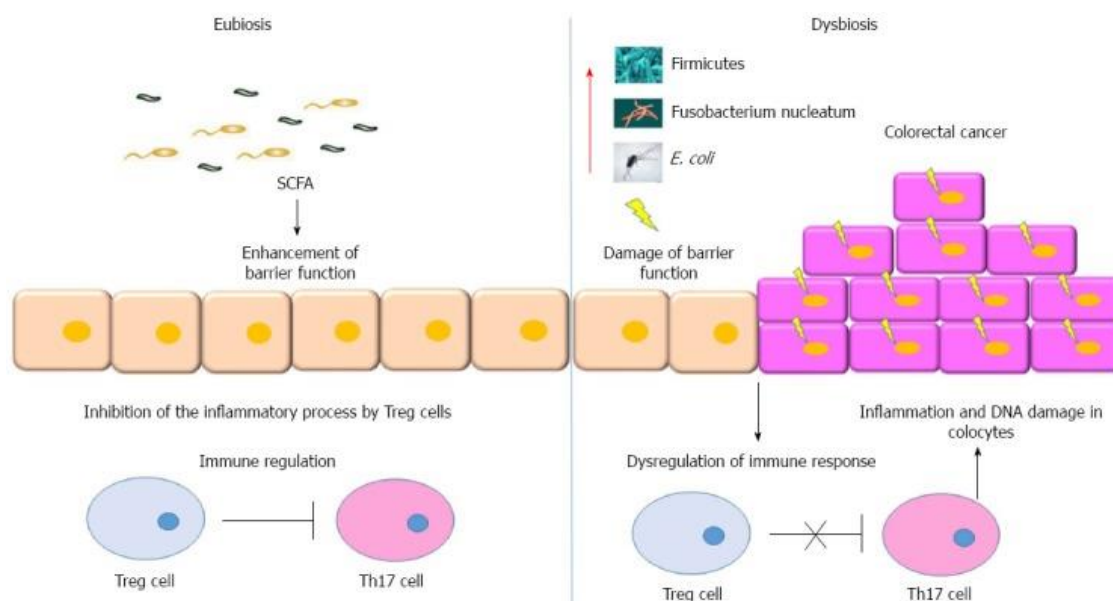
2.2. Disbiose como fator desencadeador do câncer colorretal

Evidências imunológicas e bioquímicas relacionadas com a disbiose (Alterações na população de bactérias intestinais com a proliferação de espécies nocivas à saúde, que podem produzir toxinas, proteínas estranhas e inflamação intestinal) permitem a compreensão geral do mecanismo sobre o qual se baseia o desenvolvimento de CCR. Esses achados sugerem que há uma estreita conexão entre a disbiose, doença inflamatória intestinal e CCR. Até agora, o papel direto ou indireto das bactérias na indução de danos genômicos em colonócitos não está totalmente elucidado, e vários ensaios clínicos estudaram a ação preventiva e terapêutica dos probióticos no tratamento de doenças digestivas. Sabe-se que os probióticos podem inibir processos inflamatórios e carcinogênicos

através de várias vias de sinalização, incluindo o reequilíbrio da resposta imune do hospedeiro e a atividade antiproliferativa em células tumorais (TOMASELLO *et al.*, 2014).

A figura 3 demonstra que quando existe eubiose (Equilíbrio da microbiota intestinal), o epitélio intestinal hospeda uma microbiota rica e equilibrada que promove a função de barreira. A disbiose microbiana, por outro lado, favorece a produção de genotoxinas e metabólitos associados à oncogênese. Além disso, a disbiose induz à desregulação das respostas imunes que causam a promoção da inflamação e da carcinogênese intestinal (TOMASELLO *et al.*, 2014).

Figura 3. Comparação entre a eubiose e disbiose intestinal e sua relação com a inflamação e carcinogênese.

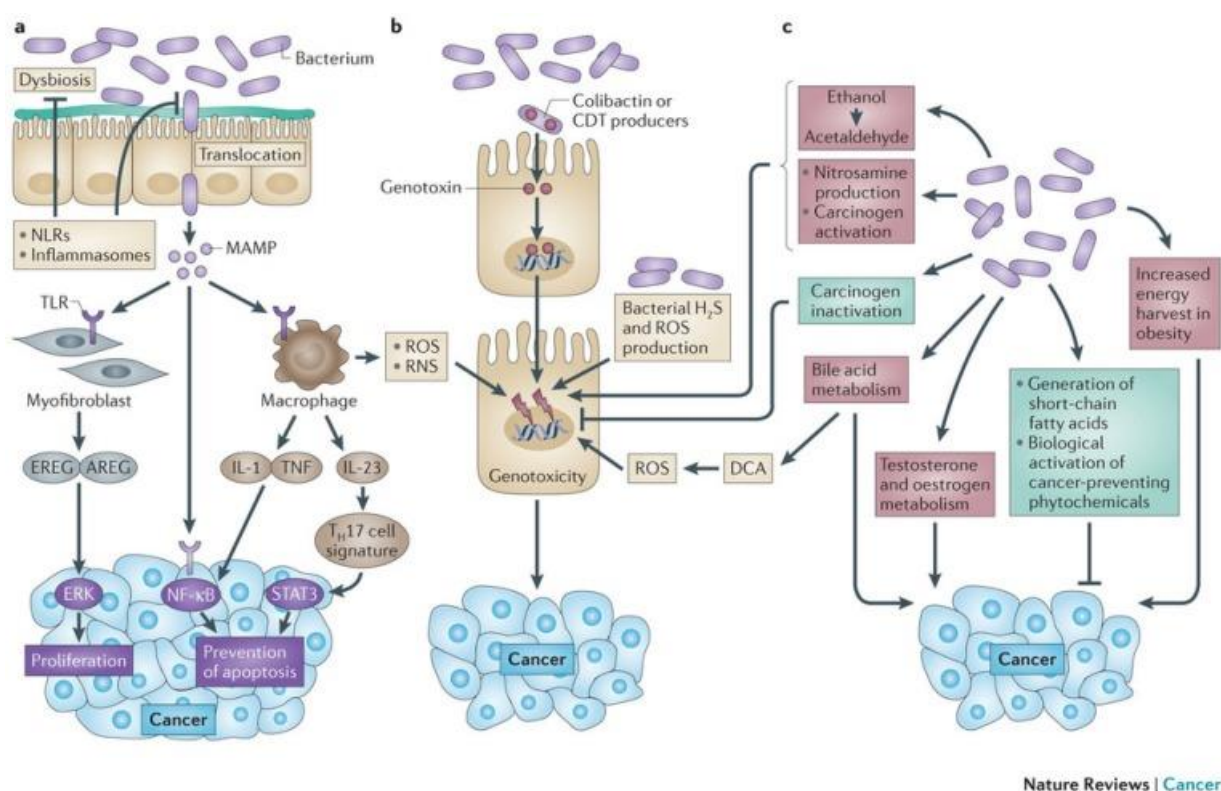


Fonte: Tomasello *et al.* (2014).

A figura 4 mostra que a microbiota intestinal promove a carcinogênese através de diferentes mecanismos. Na seção (a), a disbiose e a inflamação induzidas pelo MAMP (Padrão molecular associado a micro-organismos) ativam os TLR (Toll-like receptor) e os NLR (NOD-like receptor) através de internalização das bactérias para a região da submucosa, que desencadeia a ativação de macrófagos que irão produzir ROS (Espécies reativas de oxigênio) e RNS (Espécies reativas de nitrogênio), que possuem ação genotóxica. Na seção (b) pode-se observar que os efeitos prejudiciais ao DNA das células epiteliais são mediados por toxinas bacterianas como a colibactina e a CDT (Toxina distensora citoletal), por possuir ação direta sobre o DNA das células do epitélio intestinal. Por outro lado, as ROS (Espécies reativas de oxigênio) e RNS (Espécies Reativas de Nitrogênio) produzidas pelos macrófagos envolvidos na inflamação e por H₂S (Ácido sulfídrico) e ROS produzidos pelas bactérias disbióticas, atacam diretamente o DNA epitelial.

Na seção (c) observa-se que as rotas metabólicas de ativação de toxinas como acetaldeídos e nitrosaminas, pelas bactérias danosas, culminam com a genotoxicidade, que é pré-requisito para a carcinogênese. No entanto, a microbiota probiótica pode mediar efeitos preventivos (em verde) através da inativação de agentes cancerígenos e produção de AGCC (Ácidos graxos de cadeia curta), como butirato e propionato, que são utilizados como alimento pelos colonócitos (RASKOV; BURCHARTH; POMMERGAARD, 2017).

Figura 4. Mecanismos pelos quais a microbiota intestinal modula a carcinogênese.



Fonte: Raskov; Burcharth; Pommergaard (2017).

2.3. A relação entre inflamação do cólon e neoplasia

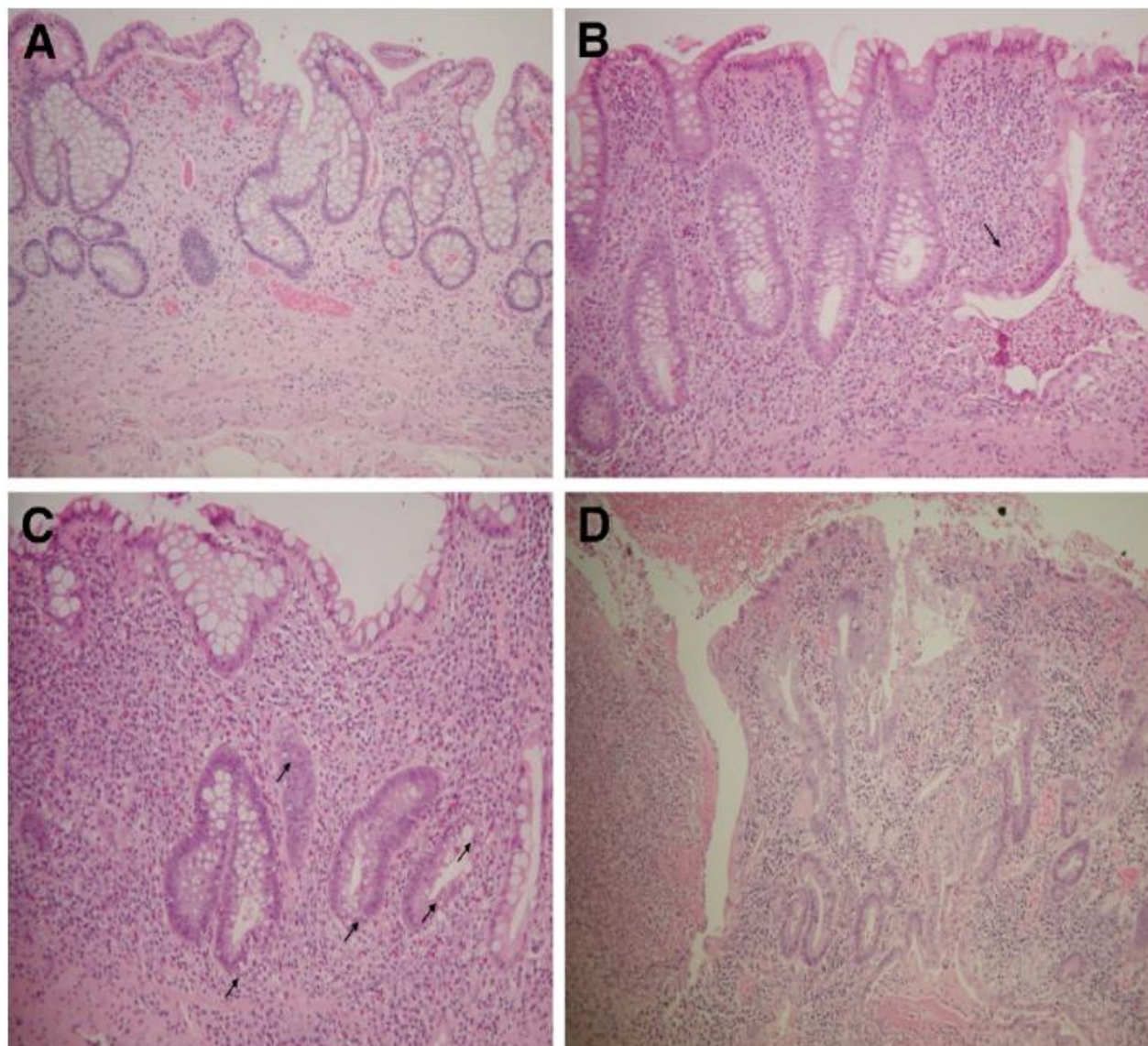
Existe uma estreita relação entre inflamação do cólon e neoplasia, embora haja pouca dúvida que a inflamação crônica promova o câncer de cólon, seus mecanismos celulares e microbianos envolvidos ainda não são claros. Evidências experimentais indicam que os sistemas imunológicos inatos e adaptativos têm um papel na patogênese do câncer associado à colite, e que a flora bacteriana também contribui (ULLMAN; ITZKOWITZ, 2011).

Uma metanálise envolvendo somente estudos de coorte demonstrou que os portadores de retocolite ulcerativa (RCU) tem um risco 2,4 vezes maior de desenvolver um CCR, o que representa uma ocorrência geral de CCR de 1,6% (incluindo casos esporádicos) durante os primeiros 14 anos de acompanhamento.

Esses dados podem ser utilizados com a finalidade de adotar estratégias de enfrentamento e prevenção do câncer nesta população de pacientes (JESS; RUNGOE; PEYRIN–BIROULET, 2012).

A figura 5 exemplifica o Índice de Atividade Histológica da Retocolite Ulcerativa (RCU). Estas micrografias de cortes histológicos de biópsias de cólon mostram exemplos do grau de inflamação histológica comumente observada na mucosa de pacientes com RCU. A fotomicrografia (A) mostra colite inativa, sem criptite e sem abscessos na cripta. A fotomicrografia (B) mostra colite levemente ativa com infiltração de neutrófilos em 50% das criptas, mas sem úlceras ou erosões. A seta em (B) mostra uma cripta com infiltração neutrofílica. A fotomicrografia (C) mostra colite moderadamente ativa com infiltração de neutrófilos em 50% das criptas ou seções transversais, mas sem úlceras ou erosões. As setas em (C) mostram neutrófilos na cripta. A fotomicrografia (D) mostra colite severamente ativa, com erosão ou ulceração da mucosa, e independentemente de outras características, aqui a colite é considerada severamente ativa devido a presença de ulceração (ULLMAN; ITZKOWITZ, 2011).

Figura 5. Índice de Atividade Histológica da Retocolite Ulcerativa (RCU).



Fonte: Ullman; Itzkowitz (2011).

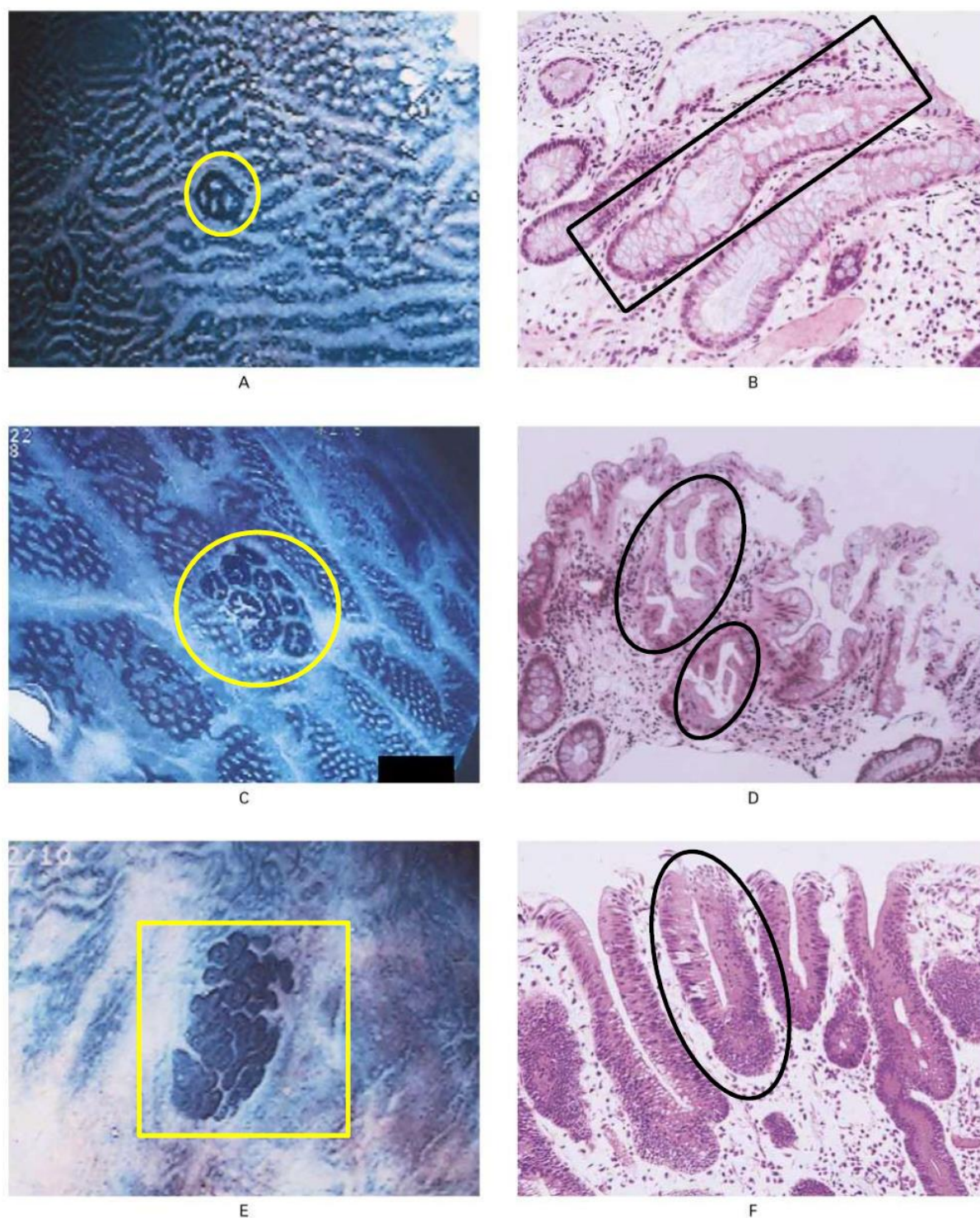
2.4. Aspectos histológicos e colonoscópicos da lesão pré-neoplásica do câncer colorretal

Os focos de cripta aberrante (ACF) são considerados as primeiras lesões pré-neoplásicas na progressão do CCR. A evolução do carcinoma na mucosa colorretal normal começa quando alterações genéticas causam diferenciação desregulada e proliferação descontrolada das células das criptas (RONCUCCI *et al.*, 1991; TAKAYAMA *et al.*, 1998).

A figura 6 ilustra as características colonoscópicas e histológicas dos focos de cripta aberrante, e na imagem “A”, a colonoscopia com coloração em azul de metileno revela um pequeno foco consistindo em quatro criptas com lúmens semicirculares ou ovais, que estão destacadas por um halo amarelo.

Na imagem colonoscópica, as criptas aberrantes coraram-se com azul mais escuro, são maiores e tem um revestimento epitelial mais espesso e uma zona peri-críptica maior que as criptas normais. Histologicamente, há um ligeiro aumento, irregularidade e alongamento dos ductos, que são achatados, coincidindo com as características relatadas anteriormente de focos de criptas aberrantes sem displasia e sem hiperplasia, que estão destacados por um retângulo preto (Fotomicrografia “B”, hematoxilina e eosina, X 180). A imagem “C” mostra um foco médio composto por 13 criptas, cada uma com formato de asteroide ou fenda, que estão destacadas por um halo amarelo. Histologicamente, há um padrão luminal serrilhado, característico de focos de criptas aberrantes com hiperplasia, que estão destacadas por dois halos pretos (Fotomicrografia “D”, hematoxilina e eosina, × 150). A imagem “E” mostra um foco grande com aproximadamente 40 criptas deformadas e levemente elevadas na mucosa (Destacado por um quadrado amarelo). O revestimento epitelial é mais espesso do que o dos focos mostrados nas imagens “A” e “C”, e cada lúmen está colapsado ou não de forma distinta, e o exame histológico demonstra que houve a perda da polaridade nuclear, existe hiperchromatismo dos núcleos e estratificação dos núcleos do epitélio da cripta, achados concordantes com as características relatadas anteriormente de focos de criptas aberrantes displásicas, que estão destacados por um halo preto (Fotomicrografia “F”, hematoxilina e eosina, X 120).

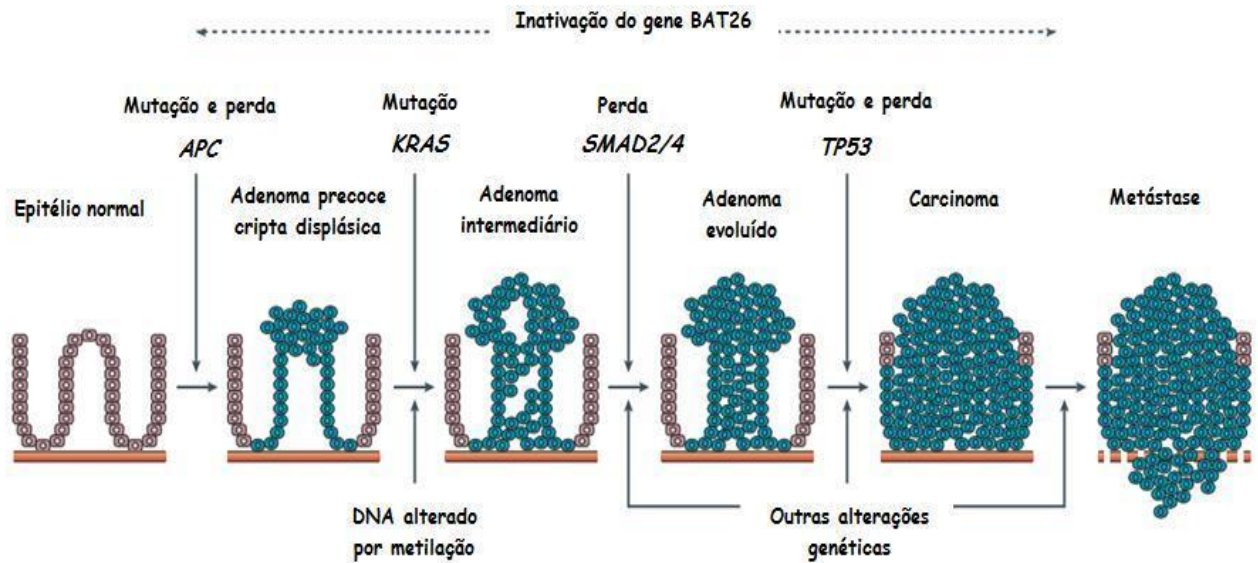
Figura 6. Características colonoscópicas e histológicas dos focos de cripta aberrante.



Fonte: Adaptado de Takayama *et al.* (1998).

A figura 7 ilustra de maneira simplificada como o epitélio colorretal normal evolui até o CCR metastático após suas células sofrerem uma sequência de mutações gênicas, lesão do DNA e outras alterações genéticas como a perda da expressão gênica da proteína supressora tumoral p53.

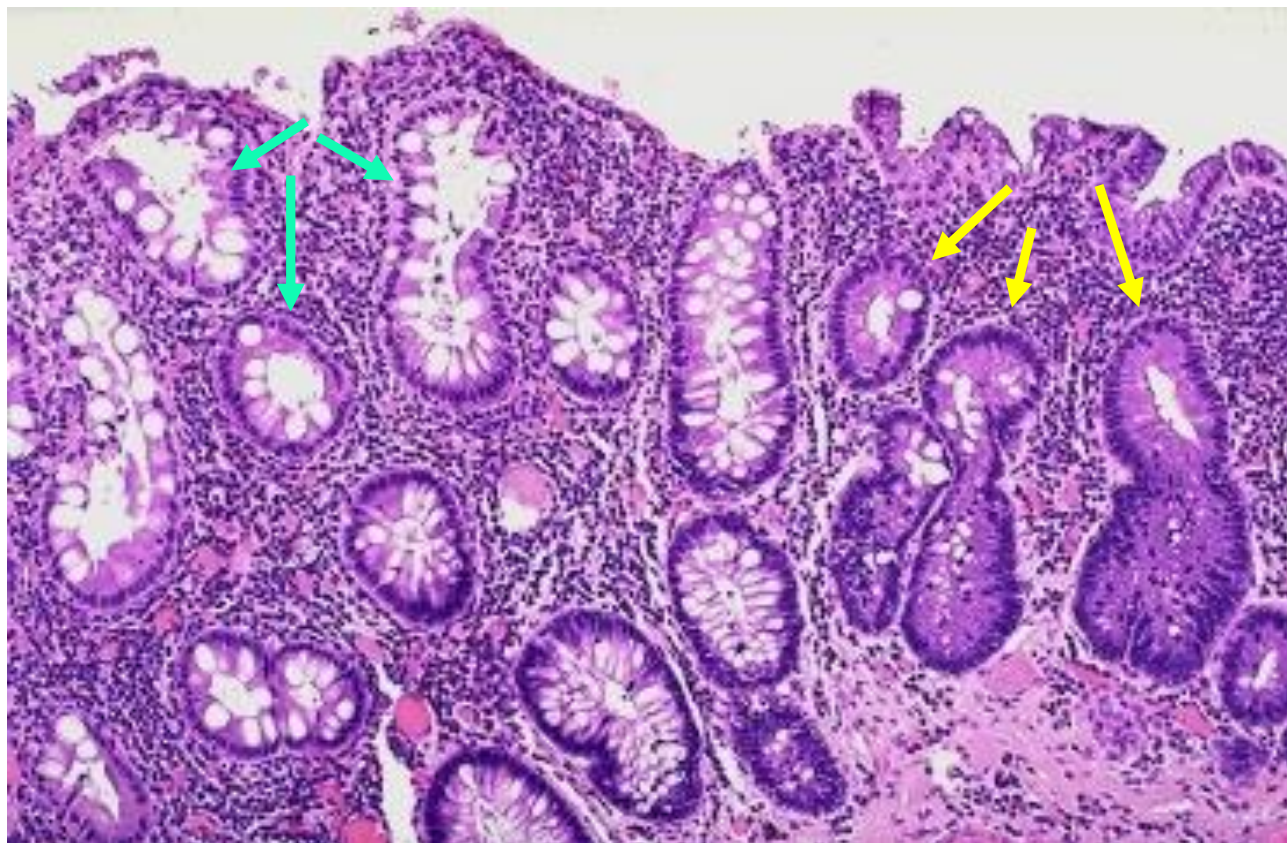
Figura 7. Evolução da lesão pré-neoplásica (Foco de Cripta Aberrante) até o câncer colorretal metastático.



Fonte: Sequetto (2012).

A figura 8 é uma fotomicrografia de um corte histológico de mucosa colorretal em que coexistem criptas normais (Setas verdes) ao lado de criptas aberrantes (Setas amarelas). As criptas normais têm a luz mais aberta, uma população maior de células caliciformes e núcleos bem polarizados na base da célula, enquanto que as criptas aberrantes demonstram um padrão pseudo-estratificado de suas células, citoplasma mais escuro, escassez de células caliciformes e luz reduzida.

Figura 8. Aspecto histológico da cripta normal e aberrante.



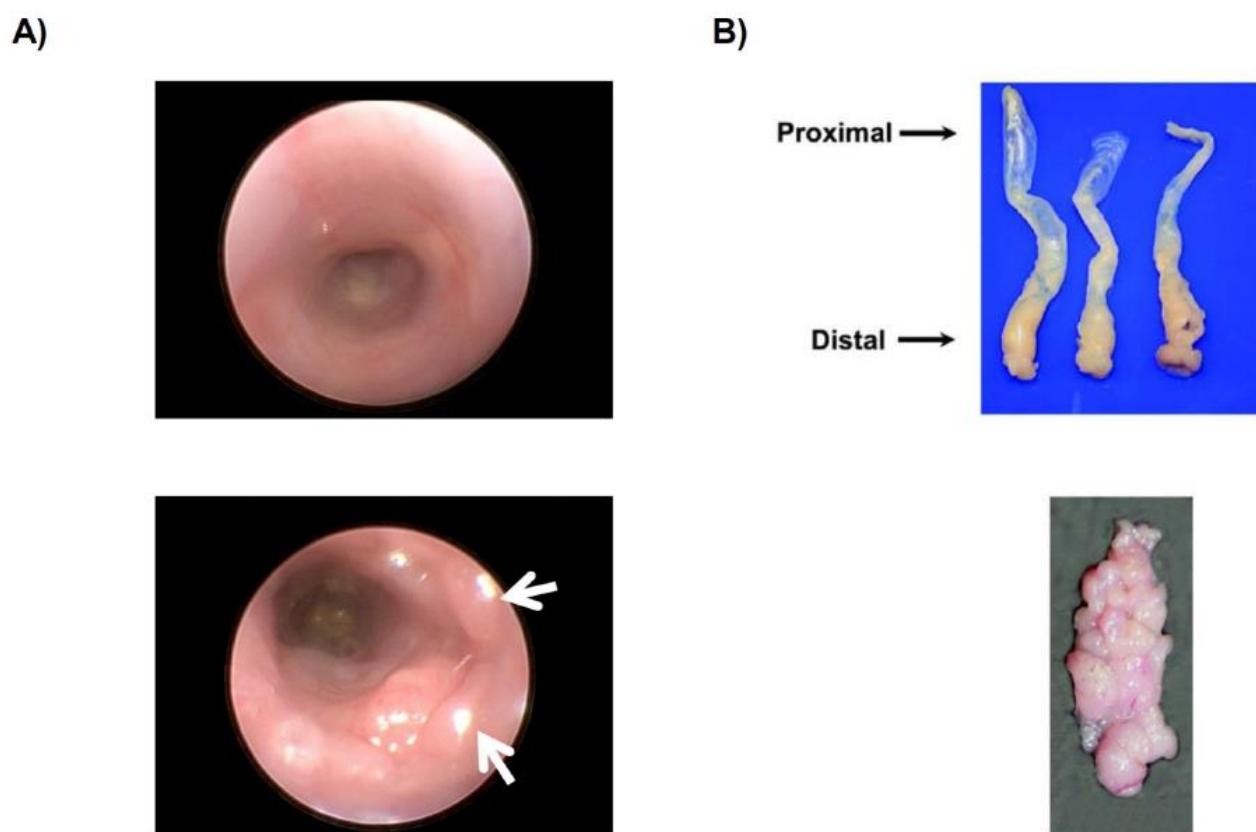
Fonte: Adaptado de Klatt (2020).

2.5. Azoximetano e Dextran Sulfato de Sódio como indutores de câncer colorretal associado a colite em modelos animais.

As principais vantagens do modelo de indução do CCR associado a colite pelo Azoximetano (AOM) associado ao Dextran Sulfato de Sódio (DSS) incluem um cronograma relativamente curto e precisão de modelagem, visto que as tumorações podem se desenvolver em apenas 10 semanas, além disso, a histopatologia dos tumores induzidos por AOM/DSS guarda estreita relação com aqueles apresentados espontaneamente pelos seres humanos, pois os tumores são localizados distalmente no cólon e são adenocarcinomas invasivos. O modelo AOM/DSS tem sido fundamental para desvendar a patogênese do CCR a partir do entendimento das vias de sinalização da carcinogênese (PARANG, BARRET, WILLIAMS, 2017).

Na figura 9 estão ilustrados na seção (A) o aspecto colonoscópico normal da mucosa colorretal (Imagem superior), e abaixo os adenomas, e na seção (B) três intestinos estão abertos (Imagem superior) e exibem mucosa proximal e distal normais, e na imagem inferior, diversas tumorações macroscópicas são observadas no cólon distal aberto.

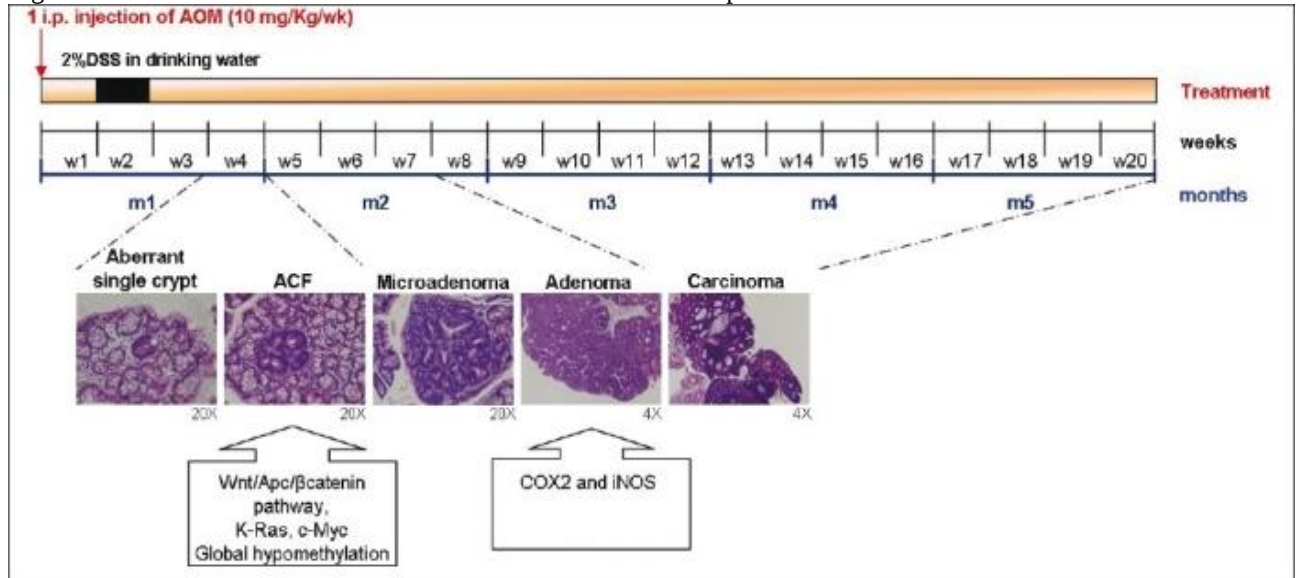
Figura 9. Aspecto colonoscópico e anátomo-patológico macroscópico do cancer colorretal.



Fonte: Parang, Barret, Williams (2017).

A figura 10 exemplifica o modelo de carcinogênese experimental associada a colite induzida em ratos pelo AOM/DSS realizado por Robertis, Massi, Fasio (2011). Nesse estudo pode-se observar que uma única dose de azoximetano 10 mg/Kg foi administrada no primeiro dia do experimento, e que o DSS a 2% foi oferecido na água de beber por 7 dias na segunda semana do estudo. Nota-se que até a quarta semana só são encontrados criptas aberrantes simples e focos de criptas aberrantes. Da quinta até a sétima semana foram encontrados microadenomas e adenomas, e da oitava até a vigésima semana foram observados carcinomas.

Figura 10. Modelo de câncer colorretal associado e colite induzido pelo azoximetano e dextran sulfato de sódio.



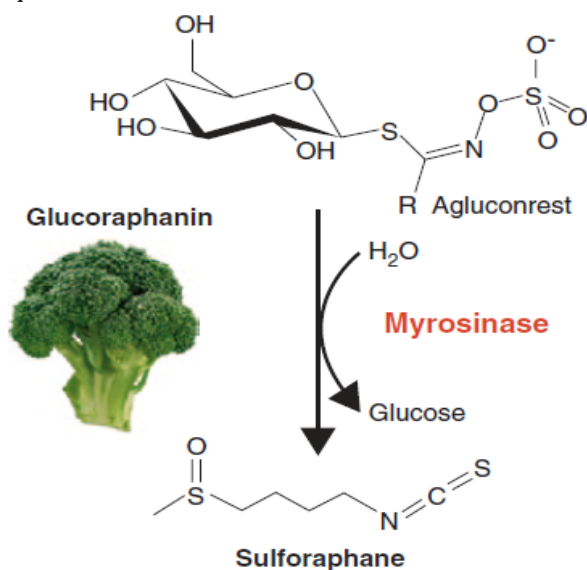
Fonte: Robertis, Massi, Fasio (2011).

2.6. Características químicas dos glicosinolatos e seus derivados (Sulforafano)

O brócolis e os demais vegetais crucíferos (Couve-flor, couve, couve de Bruxelas, rabanete, agrião, repolho, etc) são fontes de substâncias fitoquímicas (Compostos fenólicos, carotenoides, selênio e vitaminas) capazes de promover quimioprevenção contra alguns tipos de neoplasias. Isto se deve ao fato desses alimentos serem ricos em glicosinolatos, que são bioativos potencialmente anticarcinogênicos e antioxidantes (LATTÉ; APPEL; LAMPEN, 2011; VERHOEVEN *et al.*, 1997).

Por ocasião da mastigação, os glicosinolatos presentes nos vegetais crucíferos são hidrolizados pela enzima mirosinase, presente na própria planta, liberando o sulforafano, que é a forma bioativa do vegetal (HERR *et al.*, 2012; ULLAH, 2015). A figura 11 mostra a reação química de hidrólise que ocorre durante a mastigação quando a mirosinase remove a molécula de glicose da glicorafanina, tendo como produto final uma molécula de glicose e uma molécula de sulforafano.

Figura 11. Representação esquemática da reação química de hidrólise da Glicorafanina em Sulforafano.



Fonte: Herr *et al.* (2012).

A Glicorafanina e o Sulforafano (SFN) são os dois principais isotiocianatos possuidores de atividade biológica reconhecida pelos estudos atuais (ARES; NOZAL; BERNAL, 2013).

2.7. Mecanismos de ação do Sulforafano

O SFN é um bioativo dietético que exerce ação anticarcinogênica contra várias doenças malignas, incluindo o câncer de cólon, próstata, bexiga e pulmão. Os efeitos quimiopreventivos do SFN foram atribuídos a vários mecanismos, dentre eles, a capacidade que tem em regular a atividade antioxidante e desintoxicante de substâncias cancerígenas através da indução do fator nuclear derivado de eritróide-2, o Nrf2, através de vias de sinalização específicas (JOHNSON *et al.*, 2017).

O SFN inibe os fatores de transcrição do fator indutor de hipóxia (HIF) -1- α , fator nuclear-kappa-B (NFkB) e Proto-oncogenemyc (c-Myc), resultando na regulação negativa dos principais sinalizadores angiogênicos e metastáticos, deprimindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a Metalopeptidase da matriz 9 (MMP-9), reduzindo o potencial angiogênico e metastático do tumor. Além disso, o SFN induz o recrutamento e expressão da proteína 1-Light Chain-3(LC3) para autofagossomos, aumentando assim a ativação da via de autofagia, promovendo a morte de células tumorais (MOKHTARI *et al.*, 2018).

Ratos que consumiram uma dieta enriquecida com Glicosinolatos (GSL) tiveram uma forte indução do gene AhR (Receptor de hidrocarboneto aril), cujo alvo é a cripta do cólon, atenuando a colite e reduzindo a formação de tumor colorretal (LIPPMANN *et al.*, 2014).

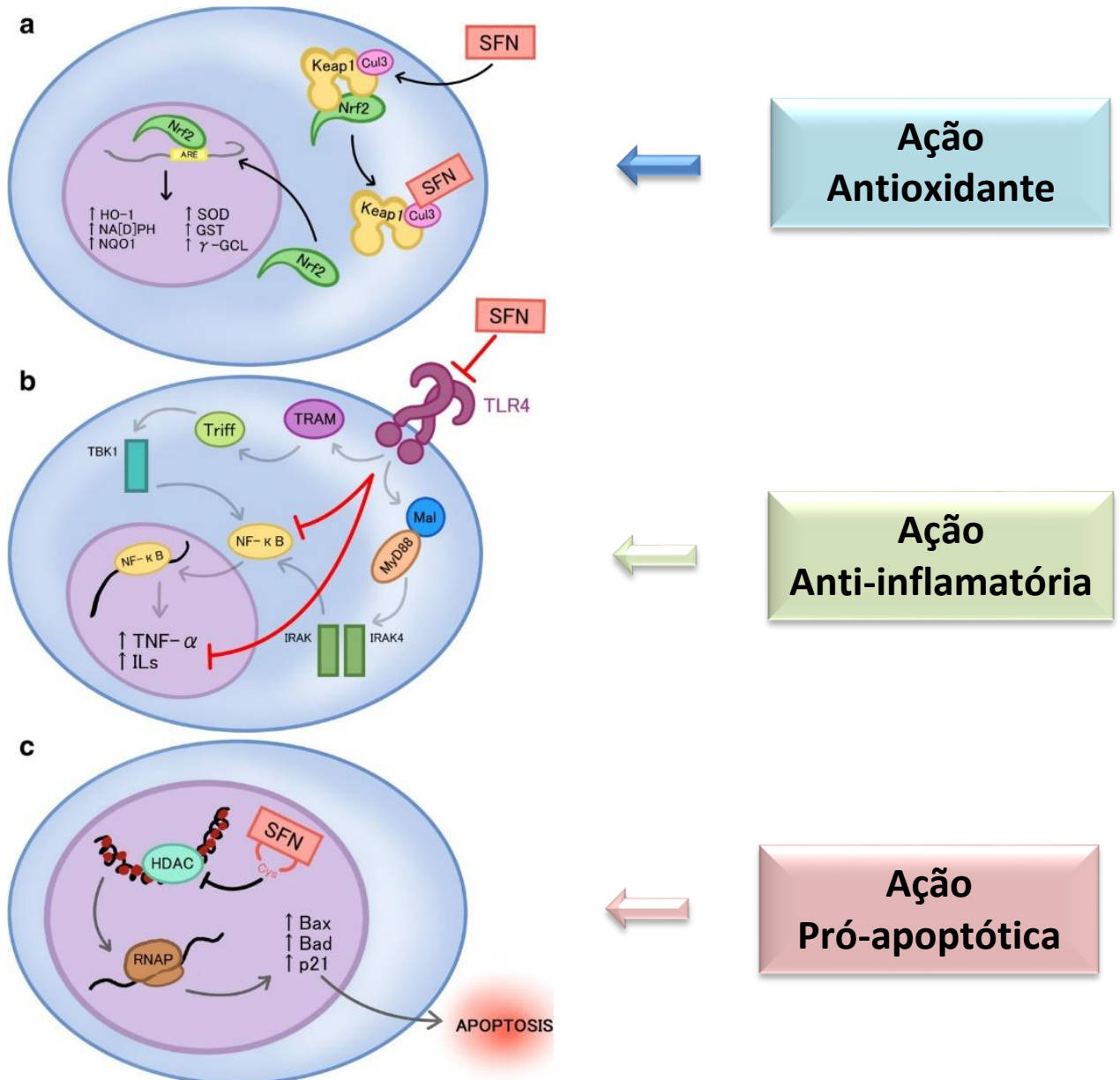
O SFN possui pelo menos três principais mecanismos moleculares anticarcinogênicos descritos. O primeiro mecanismo (Seção “a” da figura 12) refere-se à sua ação antioxidante que ocorre quando o SFN se liga ao cofator Cul3 (Integrante do complexo proteico formado pela Keap1 + Nrf2), no citoplasma, levando a liberação do Nrf2 (Fator nuclear eritróide-2), que em liberdade, migra para o núcleo celular e provoca a transcrição de vários genes desintoxicantes de fase 2, por exemplo a NADP quinona-redutase-1, Glutathione-S-transferase, e Heme oxigenase-1 (MOKHTARI *et al.*, 2018).

O segundo mecanismo (Seção “b” da figura 12) está relacionado a atividade anti-inflamatória que ocorre quando o SFN se liga ao receptor de membrana TLR4 (Toll-like recepto- 4) inibindo a sua cascata de sinalização subsequente que, quando funcionante, causa a ativação do fator de transcrição NF- κ B e consequente produção de proteínas pró-inflamatórias como o TNF- α (Fator de necrose tumoral alfa) e Interleucinas (MOKHTARI *et al.*, 2018).

O terceiro mecanismo protetivo do SFN (Seção “c” da figura 12), refere-se à ação moduladora epigenética que acontece quando o SFN vai até o núcleo celular e acopla-se à enzima HDAC (Histona desacetilase) inibindo-a, o que ocasiona o aumento da transcrição de fatores pró-apoptóticos como a Bax (Proteína X associada a BCL-2), Bad (Proteína D associada a BCL-2) e p21 (Proteína 21supressora de tumor), levando a apoptose de células pré-neoplásicas e neoplásicas (MOKHTARI *et al.*, 2018).

A figura 12 ilustra os três principais mecanismos biomoleculares de ação do SFN, demonstrando a sequência de eventos moleculares envolvidos nos efeitos antioxidante, anti-inflamatório e pró-apoptótico.

Figura 12. Mecanismos antioxidante, anti-inflamatório e pró-apoptótico do sulforafano.



Fonte: Adaptado de Mokhtari *et al.* (2018).

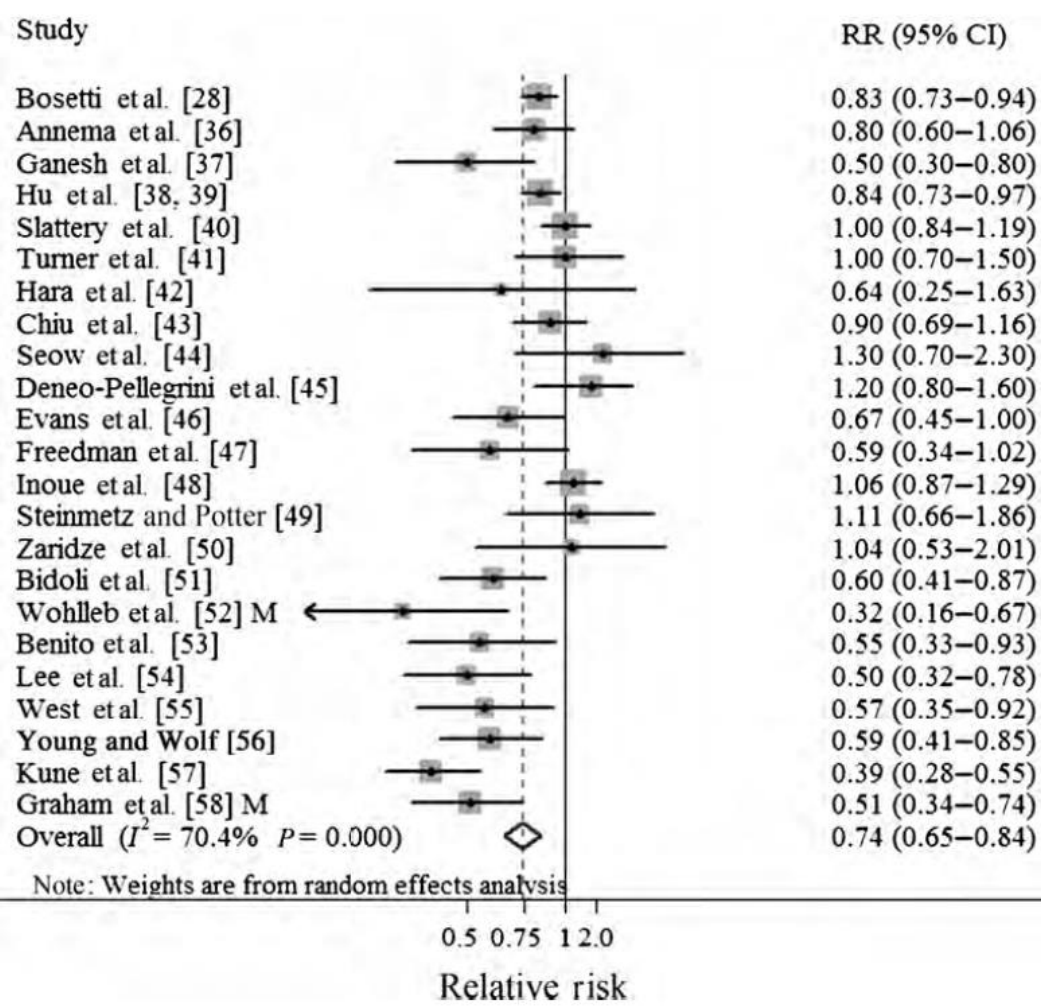
2.8. O efeito do sulforafano no risco de câncer colorretal em humanos

Uma metanálise que incluiu 24 estudos de caso-controle e 11 estudos prospectivos em humanos, constatou que houve uma associação inversa entre o alto consumo de vegetais crucíferos e o risco de CCR em humanos. Quando todos os estudos foram agrupados, verificou-se uma associação significativamente inversa entre a ingestão de vegetais crucíferos (RR: 0,82; intervalo de confiança de 95% 0,75–0,90) e o risco de CCR. A análise específica para couve e brócolis produziu resultados semelhantes.

Quando analisados separadamente, os estudos de caso-controle da ingestão de vegetais crucíferos produziram resultados semelhantes, e os resultados dos estudos prospectivos mostraram significância estatística limítrofe. Além disso, associações inversas significativas também foram observadas no câncer de cólon de localidade distal, tanto em estudos prospectivos quanto em caso-controle (WU *et al.*, 2013).

A figura 13 contém o gráfico que demonstra o modelo de efeito randômico do consumo de vegetais crucíferos e risco de CCR em estudos de caso-controle. Os quadrados indicam riscos relativos específicos do estudo (O tamanho do quadrado reflete o peso estatístico específico do estudo); linhas horizontais indicam IC% de 95%; o diamante indica a estimativa resumida do risco relativo com seu IC de 95%. IC: intervalo de confiança; M: masculino; RR: risco relativo.

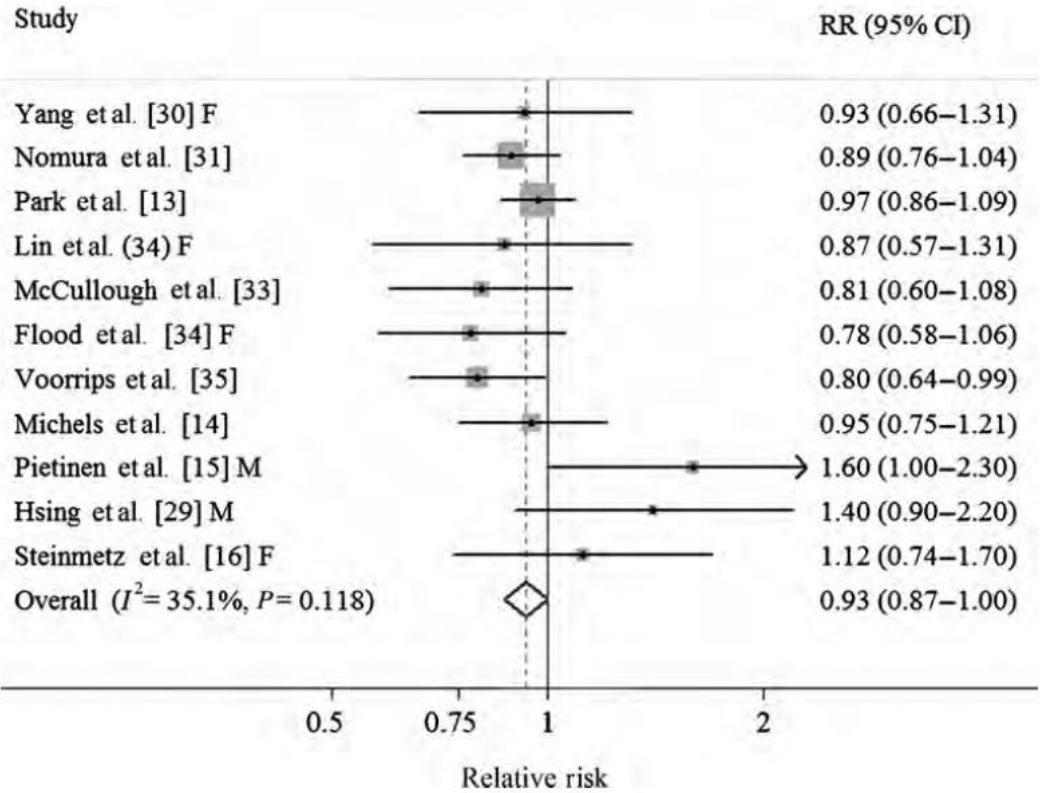
Figura 13. Gráfico do efeito randômico do consumo de vegetais crucíferos e risco de câncer colorretal em estudos de caso-controle.



Fonte: Wu *et al.* (2013).

A figura 14 contém o gráfico que demonstra o modelo de efeito fixo do consumo de vegetais crucíferos e risco de câncer colorretal em estudos prospectivos. Os quadrados indicam riscos relativos específicos do estudo (O tamanho do quadrado reflete o peso estatístico específico do estudo); linhas horizontais indicam IC% de 95%; o diamante indica a estimativa resumida do risco relativo com seu IC de 95%. IC: intervalo de confiança; F: feminino; M: masculino; RR: risco relativo.

Figura 14. Gráfico do efeito fixo do consumo de vegetais crucíferos e risco de câncer colorretal em estudos prospectivos.

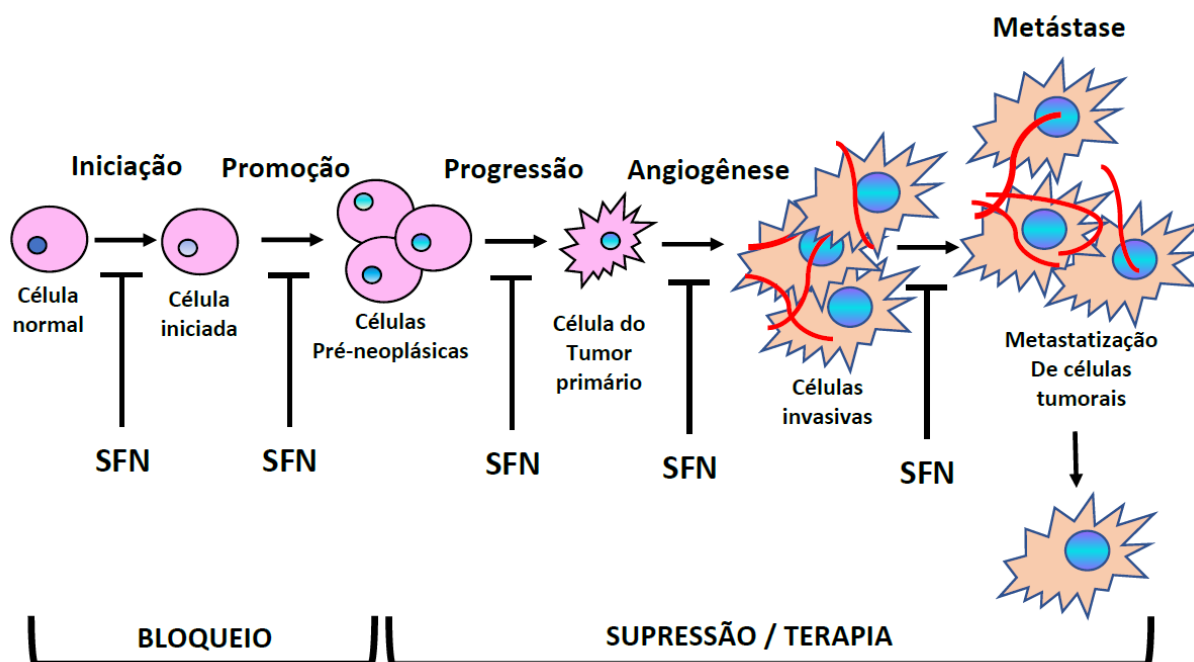


Fonte: Wu *et al.* (2013).

2.9. A ação do sulforafano nas diversas fases da carcinogênese

O SFN interfere no processo de carcinogênese afetando as 3 fases da progressão do tumor, a iniciação, promoção e progressão, e suprime os 2 passos finais da carcinogênese, isto é, a angiogênese e a metástase (JUGE; MITHEN; TRAKA, 2007), conforme demonstrado na figura 15 (Desenho adaptado para o português).

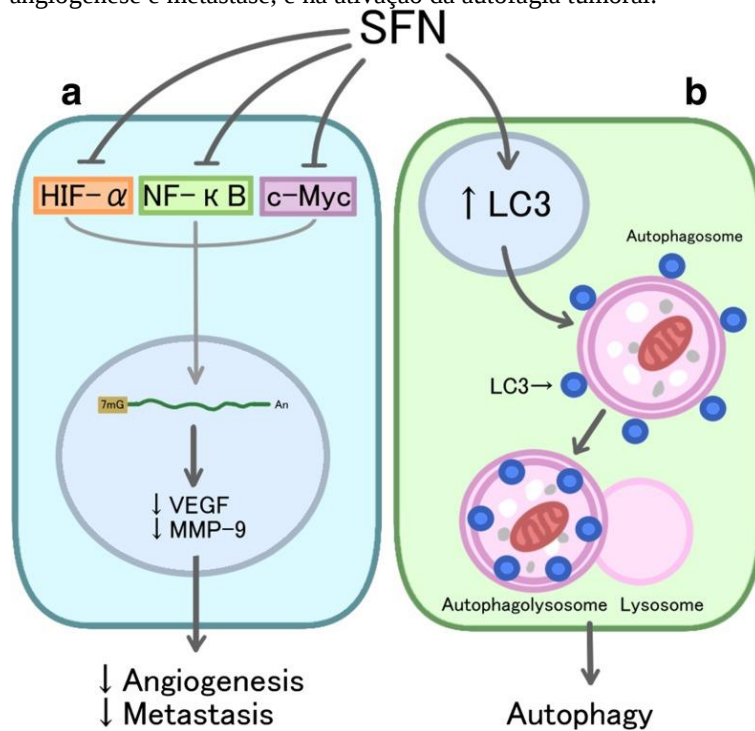
Figura 15 – Ilustração demonstrando a interferência do sulforafano nas diversas fases da carcinogênese.



Fonte: Adaptado de Juge, Mithen, Traka (2007).

A figura 14 ilustra como o SFN interfere nos mecanismos de atenuação da angiogênese e metástase, e na via de sinalização que termina em autofagia da célula tumoral. Na figura “a” o SFN bloqueia a ação do HIF- α (Hypoxia-Inducible Factor Alpha), NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B) e do c-Myc (Proto-oncogene Myc), esse bloqueio leva a redução na transcrição de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) e MMP-9 (Matrix Metallopeptidase-9) que são substâncias promotoras da angiogênese e da metástase respectivamente, assim sendo, sua redução leva a diminuição da angiogênese e metástase nas células neoplásicas. Na figura “b” o SFN estimula a produção de LC3 (Microtubule-Associated Protein 1A/1B-Light Chain 3) citoplasmático, que migra e se adere a parede do autofagossomo que na sequência atrai o lisossomo formando o complexo autofagolisossomo que causa a autofagia na célula tumoral.

Figura 16. Vias de sinalização do sulforafano na redução da angiogênese e metástase, e na ativação da autofagia tumoral.



Fonte: Mokhtari *et al.* (2018).

2.10. O sulforafano atenua a colite induzida pelo dextran sulfato de sódio

Um estudo experimental alemão realizado em ratos, revelou que a oferta de SFN antes da indução da colite pelo Dextran Sulfato de Sódio (DSS), confere proteção contra colite, e estes efeitos protetores foram confirmados macroscopicamente, microscopicamente e em nível molecular (WAGNER *et al.*, 2013).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação do SFN na incidência do câncer de cólon associado à colite em ratos.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar a ação do dextran sulfato de sódio (DSS) na indução de colite em ratos;
- Avaliar a ação do Sulforafano (SFN) na prevenção ou redução da colite pelo DSS em ratos;
- Avaliar a ação do DSS e Azoximetano (AOM) na indução do câncer de cólon associado à colite em ratos;
- Avaliar a ação do Sulforafano na redução da incidência de câncer de cólon associado à colite em ratos;
- Descrever as alterações morfológicas macroscópicas e histopatológicas ocorridas nos cólons dos ratos tratados e não tratados com Sulforafano.
- Avaliar se o uso do Sulforafano interfere na incidência e intensidade das complicações clínicas da colite em ratos, associada ou não com câncer de cólon, como a perda de peso, diarreia, sangue nas fezes, hiporreatividade, piloereção e hiporexia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foram protocolados na Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMS (CEUA -UFMS), tendo recebido aprovação com o número 989/2018 na data de 29/10/2018 (Certificado de aprovação no anexo 1).

4.2. Tipo de pesquisa

Trata-se de um estudo experimental em modelo animal.

4.3. Local da pesquisa

O estudo foi realizado no Laboratório de Modelos Experimentais de Doenças do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste/FAMED da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no município de Campo Grande – MS, no período compreendido entre março de 2018 até dezembro de 2019.

4.4. Animais

Nesse estudo utilizamos 74 ratos Wistar que foram distribuídos em dois grandes grupos distintos de animais, o grupo de animais que foi induzido câncer de cólon associado à colite (37 animais), e o grupo de animais que foi induzido apenas colite (37 animais).

Em cada um desses grupos foram utilizados 37 ratos machos entre 8-10 semanas de idade (Adultos) e pesando entre 250-300 gramas, disponibilizados pelo Biotério Central do Instituto de Biociências da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

O número de animais por grupo foi calculado considerando um $p < 0,05$, poder de teste de 95%, desvio máximo de 15% e uma diferença máxima entre os grupos de 30%, e devido ao procedimento de indução tumoral com o azoximetano possuir elevada toxicidade, consideramos perder até 20% dos animais durante o experimento. Sendo assim, o número total de animais e o número de animais por grupo foi calculado segundo a seguinte fórmula: $N = n + N \times f$ (ENG, 2003).

O experimento foi conduzido no Laboratório de Modelos Experimentais de Doenças do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Nesse laboratório, os animais permaneceram alojados em duas estantes ventiladas, com controle eletrônico de temperatura em 23°, e iluminação artificial com luz branca em ciclo claro-escuro de 12 horas.

Cada grupo com 3 animais foi mantido na mesma caixa durante todo o experimento (Caixas de polipropileno medindo 41 x 34 x 16 cm, com grade de inox, com local para comedouro, e bebedouro de vidro com bico de inox). Nestas caixas foram mantidas uma camada de 2 cm de maravalha esterilizada e seca servindo como cama para o conforto dos animais. Estas caixas foram lavadas com água corrente e sabão líquido neutro, e em seguida foram desinfetadas com álcool 70% a cada 3 dias. A cama foi trocada a cada 3 dias e substituída por maravalha nova com o objetivo de remover as fezes e urina dos animais proporcionando conforto e reduzindo a carga de amônia urinária, e, conseqüentemente, a chance de adoecimento por contato prolongado com as fezes e urina. Água fresca de torneira, quando pura, foi trocada a cada 2 dias e a ração oferecida foi a Nuvilab CR-1 (QUIMTIA BRASIL FEED – Colombo – PR - BRASIL).

4.5. Delineamento da pesquisa experimental em modelo animal

Os dois esquemas a seguir representam o delineamento do trabalho, e como ele foi concebido, baseando-se nas diversas fases do estudo e na linha do tempo da experimentação animal (Figura 17 e 18)

Figura 17. Delineamento da pesquisa no grupo de animais em experimento de câncer associado a colite (Azoximetano e Dextran Sulfato de Sódio).

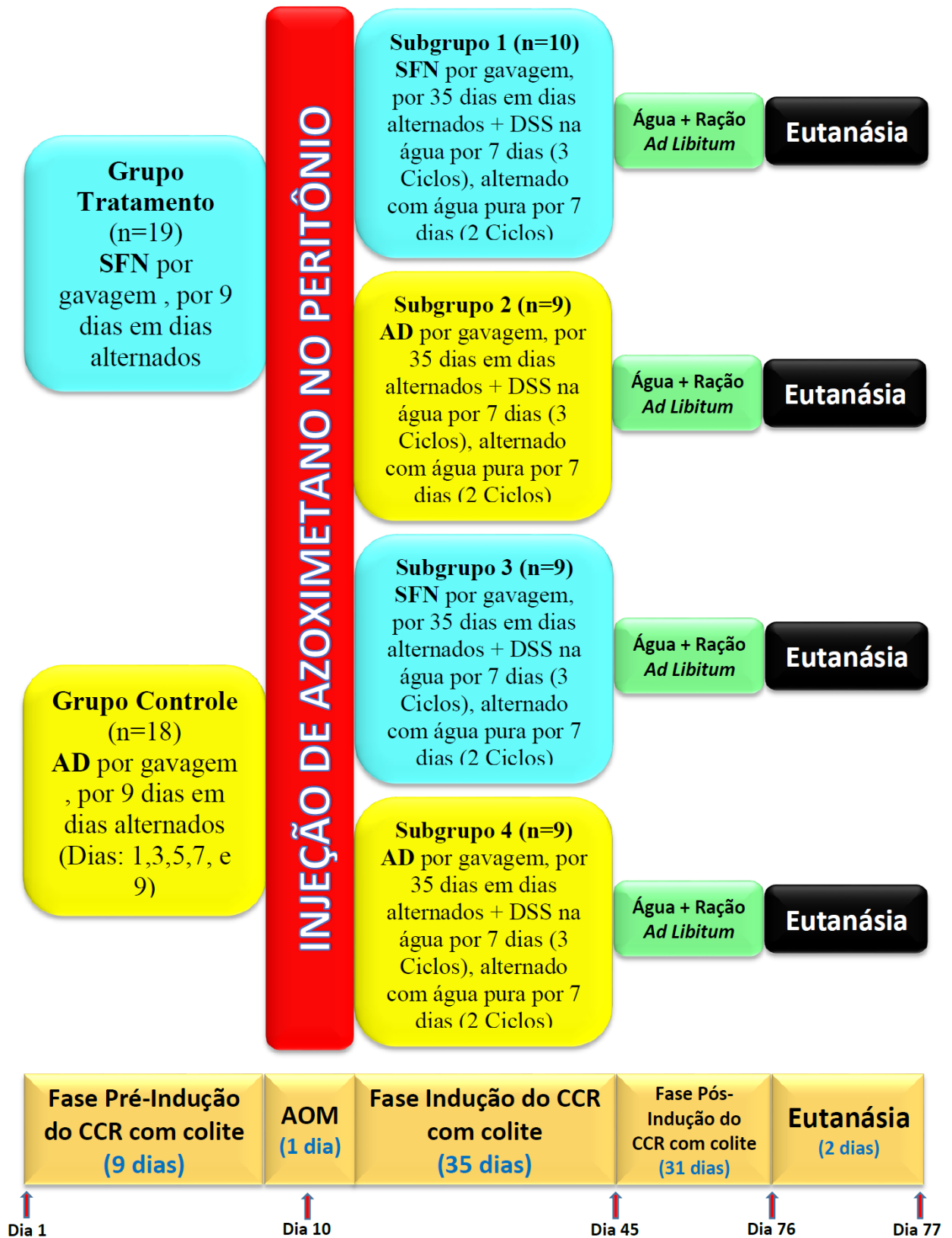
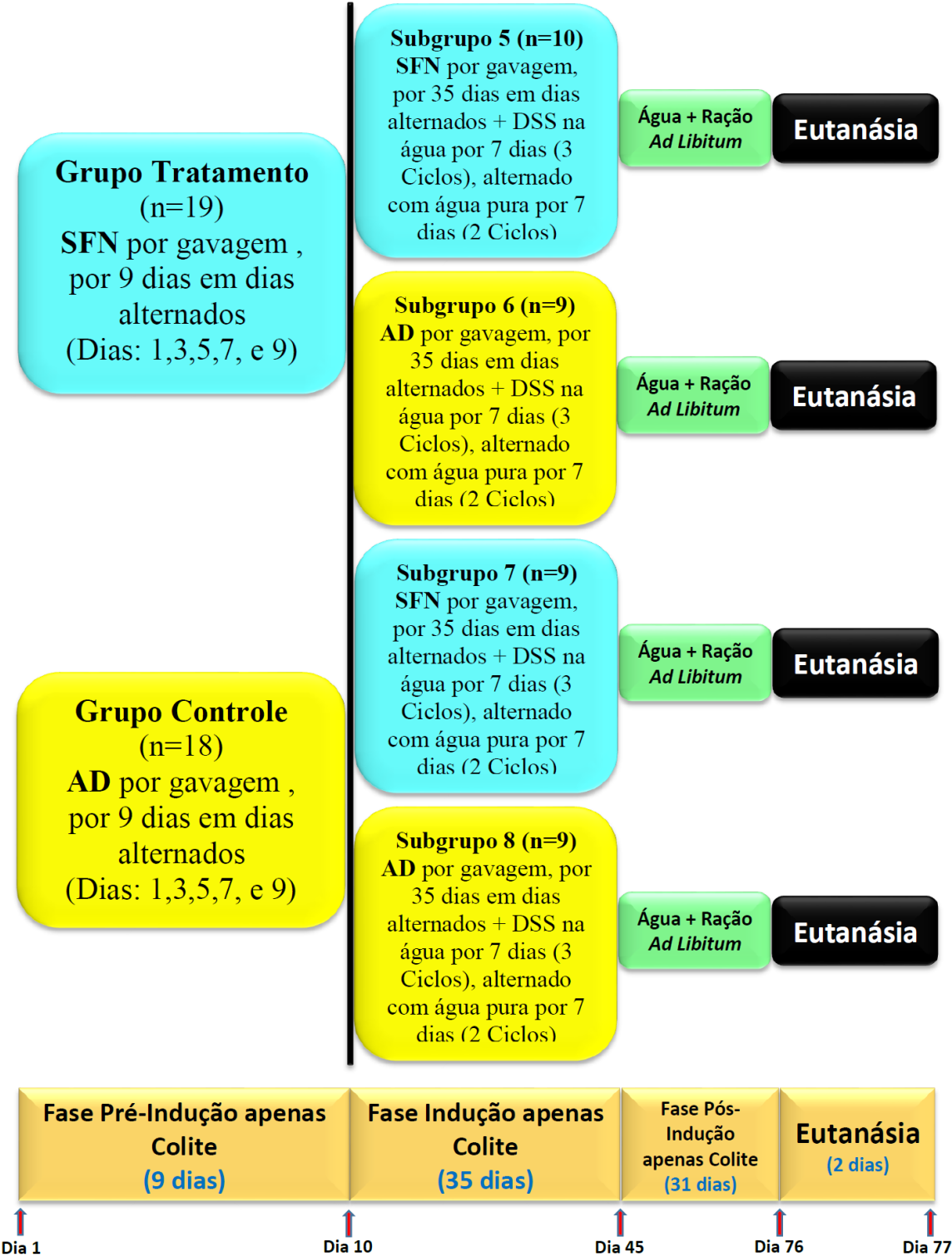


Figura 18. Delineamento da pesquisa no grupo de animais em experimento apenas colite (Somente Dextran Sulfato de Sódio).



4.6. Pré-indução do câncer colorretal associado a colite

Nessa fase foram utilizados 37 animais, 19 no grupo tratamento e 18 no grupo controle.

Através de gavagem, em dias alternados, o grupo de animais denominado tratamento (19 animais), recebeu o Sulforafano suplemento alimentar para humanos (Numedica Advancing Nutrition, Oklahoma – USA) na dose de 80 mg/Kg/dose (LI *et al.*, 2013) por 9 dias (Dias: 1,3,5,7 e 9), totalizando 5 aplicações. Para realizar a gavagem, foram utilizados tubos de polipropileno flexíveis com protetor de ponta, de tamanho específico para ratos Wistar (Feeding Tubes Polypropylene for Rodents - FTP-15-100) de 100 x 3 mm (Instech Laboratories - Plymouth Meeting, Pennsylvania – USA), com o objetivo de reduzir o desconforto dos animais e diminuir os riscos de complicações da gavagem (Perfuração esofágica, laceração esofágica e gástrica, e canulação inadvertida da traquéia).

O grupo de animais denominado controle (18 animais), recebeu apenas água destilada (AD) estéril no mesmo volume, nos mesmos dias e pelo mesmo período que o grupo tratamento.

Nessa fase, todos os animais foram pesados uma vez por semana, e foram examinados todos os dias, uma vez por dia, em busca de sinais de aspiração pulmonar decorrente da gavagem, sendo a taquipnéia e a respiração audível, os principais sinais dessa complicação (DAMSCH *et al.*, 2011).

4.7. Indução do câncer colorretal associado a colite utilizando Azoximetano e Dextran Sulfato de Sódio

Nessa fase foram utilizados os mesmos animais da fase anterior (Pré-indução do câncer colorretal associado a colite - 37 animais, 19 no grupo tratamento e 18 no grupo controle).

Para a indução do câncer associado a colite (CAC), todos os animais (37 ratos) receberam uma injeção intraperitoneal (Quadrante posterior direito do abdome) de Azoximetano (AOM – Laboratório Sigma-Aldrich) na dose única de 10 mg/Kg diluído em 1 ml de solução salina a 0.9%, utilizando-se uma seringa de 1 ml e agulha 25x5 mm (TANAKA *et al.*, 2003).

Em seguida foi disponibilizado aos ratos de ambos os grupos (Tratamento 19 ratos e controle 18 ratos), de maneira exclusiva e *ad libitum*, por 3 ciclos de sete dias consecutivos, água contendo Dextran Sulfato de Sódio (DSS) a 2,5% (Laboratório Xi'na Kerui Biochemical Co., LTD, China), intercalados por 2 ciclos de 1 semana de água potável de torneira, com a finalidade de induzir inflamação intestinal (KIM *et al.*, 2012).

A fase em que os animais receberam o DSS, do dia 10 até o dia 45, foi denominada de fase de indução do CCR associado a colite.

Na fase de indução, os 2 grupos iniciais, tratamento (n=19) e controle (n=18), foram redistribuídos, cada um deles, em dois novos grupos, passando a ser designados de subgrupos, com 9 ou 10 animais em cada subgrupo, que foram nomeados de: subgrupo 1 (10 animais), subgrupo 2 (9 animais), subgrupo 3 (9 animais) e subgrupo 4 (9 animais).

Durante a fase de indução (35 dias), os ratos do subgrupo 1 foram tratados com o SFN por gavagem, em dias alternados e na mesma dosagem que na fase de pré-indução (80 mg/Kg/dose). Os animais do subgrupo 2 só receberam água destilada (AD) pela mesma via (Gavagem) no volume de 2 ml/dose, em dias alternados. Os animais do subgrupo 3 receberam o SFN nos moldes do subgrupo 1, e por último, os ratos do subgrupo 4 receberam AD nos moldes do subgrupo 2.

Após o término da fase de indução (Dia 45), os animais permaneceram recebendo apenas ração padrão e água fresca de torneira à vontade.

Todos os animais foram pesados uma vez por semana, e foram examinados todos os dias, uma vez por dia.

4.8. Pós-indução do câncer colorretal associado à colite

Do dia 46 até o dia 76, todos os animais receberam apenas ração e água fresca de torneira *ad libitum*, foram pesados uma vez por semana, e examinados uma vez por dia.

4.9. Pré-indução apenas de colite

Nessa fase foram utilizados 37 animais, 19 no grupo tratamento e 18 no grupo controle.

Através de gavagem, o grupo de animais denominado tratamento (19 animais), recebeu o SFN na dose de 80 mg/Kg/dose por 9 dias, em dias alternados (Dias 1,3,5,7 e 9), totalizando 5 aplicações.

O grupo de animais denominado controle (18 animais), recebeu apenas água destilada (AD) estéril no mesmo volume, nos mesmos dias e pelo mesmo período que o grupo tratamento.

Todos os animais foram pesados uma vez por semana, e examinados todos os dias, 1 vez por dia.

4.10. Indução apenas da colite usando Dextran Sulfato de Sódio

Nessa fase foram utilizados os mesmos animais da fase anterior (Fase de pré-indução apenas colite - 37 animais, 19 no grupo tratamento e 18 no grupo controle).

Para a indução apenas da colite foi disponibilizado aos ratos de ambos os grupos (Tratamento 19 ratos + controle 18 ratos), de maneira exclusiva e *ad libitum* por 3 ciclos de sete dias consecutivos, água contendo Dextran Sulfato de Sódio (DSS) a 2,5% (Laboratório Xi'na Kerui Biochemical Co., LTD, China), intercalados por 2 ciclos de 1 semana de água potável de torneira, com a finalidade de induzir inflamação intestinal (KIM *et al.*, 2012).

A fase em que os animais receberam o DSS, do dia 10 até o dia 45, foi denominada de fase de indução apenas da colite.

Na fase de indução, os 2 grupos iniciais, tratamento e controle, foram subdivididos, cada um deles, em dois novos grupos, passando a ser designados de subgrupos, com 9 ou 10 animais em cada subgrupo, que foram nomeados de: subgrupo 5 (10 animais), subgrupo 6 (9 animais), subgrupo 7 (9 animais) e subgrupo 8 (9 animais).

Durante a fase de indução (35 dias), os ratos do subgrupo 5 foram tratados com o SFN por gavagem, em dias alternados e na mesma dosagem que na fase de pré-indução (80 mg/Kg/dose). Os animais do subgrupo 6 só receberam água destilada (AD) pela mesma via (Gavagem) no volume de 2 ml/dose, em dias alternados. Os animais do subgrupo 7 receberam o SFN nos moldes do subgrupo 5, e por último, os ratos do subgrupo 8 receberam AD nos moldes do subgrupo 6.

Todos os animais foram pesados uma vez por semana, e examinados todos os dias, uma vez por dia.

4.11. Pós-indução da colite

Do dia 46 até o dia 76, todos os animais receberam apenas ração e água fresca de torneira *ad libitum*, foram pesados uma vez por semana, e examinados uma vez por dia.

4.12. Eutanásia

No dia 76 e 77 do experimento, todos os 72 animais que restaram vivos (35 animais do grupo câncer associado à colite + 37 animais do grupo apenas colite) foram eticamente submetidos à eutanásia com sobredose anestésica letal (3x a dose anestésica), por injeção única intraperitoneal de Xilazina 60 mg/Kg e Quetamina 300 mg/Kg (Volume total variando entre 2 -3,5 ml), utilizando-se seringa de 5 ml e agulha 25x5 mm, e em seguida foram submetidos à exanguinação por punção cardíaca (LEARY *et al.*, 2013).

4.13. Análise morfológica macroscópica dos cólons

Assim que os animais foram sendo submetidos a eutanásia, seus abdomens foram abertos e seus cólons foram removidos e preparados para análises macroscópicas e microscópicas posteriores.

A análise macroscópica compreendeu os seguintes procedimentos:

a) Foi removido apenas o cólon (Segmento compreendido entre a válvula ileocecal e o reto), o mesmo foi colocado sobre a bancada de inox, com uma tesoura cirúrgica foi aberto pela sua borda antimesentérica longitudinalmente em toda a sua extensão, e em seguida foi lavado com SF 0,9%.

b) O cólon aberto foi colocado sobre uma placa de polipropileno branca, em linha reta, e próximo a uma régua graduada, e os segmentos que continha alguma lesão macroscópica suspeita foram fotografados.

c) Em seguida o cólon aberto foi colocado sob um microscópio estereoscópico (JVC – Victor Company of Japan Ltda, Modelo TK-C720EC) e inspecionado, no aumento número 20, ao longo de toda a extensão em busca de lesões suspeitas de serem tumores ou focos inflamatórios, e os segmentos suspeitos foram seccionados e separados para serem formolizados para posterior análise histológica.

4.14. Formolização e preparo dos segmentos de cólon

a) A medida que os segmentos de cólon suspeitos foram sendo removidos, eles foram colocados sobre uma placa de polipropileno branca, e imediatamente, foram pincelados com uma solução de formalina tamponada a 10%.

b) A medida que enrijeciam, os fragmentos de tecido foram acondicionados em frascos plásticos transparentes e individuais com tampas, contendo formalina tamponada a 10%, que foram identificados e guardados, em caixas de papelão e ao abrigo da luz, para análises histológicas posteriores.

4.15. Preparo das lâminas de histologia

Cada segmento de cólon foi corado com Hematoxilina-Eosina, incluído em blocos de parafina, e em seguida cortado em micrótomo na espessura de 5 µm e montado sobre lâmina de vidro coberta por lamínula, e então encaminhados ao patologista para análise histopatológica.

4.16. Análise histopatológica das lâminas

Os aspectos histopatológicos considerados para fins de análise estatística nesse estudo foram divididos em dois grupos: O grupo de lesões pré-neoplásicas/câncer e o grupo de lesões inflamatórias.

O grupo de lesões pré-neoplásicas/câncer contemplou 4 parâmetros histopatológicos:

- 1 – Criptas aberrantes
- 2 – Presença de adenoma
- 3 – Displasia de baixo grau
- 4 – Displasia de alto grau

O grupo de lesões inflamatórias contemplou 5 parâmetros histopatológicos:

- 1 – Grau de inflamação
- 2 – Ulceração de mucosa
- 3 – Placa linfoide reacional
- 4 – Atrofia de criptas
- 5 – Dilatação de vasos linfáticos

Foram preparados dois grupos de lâminas com os cólons dos 72 ratos. Um grupo foi denominado de “segmento principal”, e é compreendido por 72 lâminas (Uma lâmina de cada animal, com apenas 1 segmento de cólon de cada animal). Cada lâmina contém em sua superfície 2 cortes obtidos do mesmo fragmento, mas em 2 níveis diferentes da espessura da peça. Os fragmentos do grupo principal foram obtidos ressecando-se um segmento, pré-determinado, de cólon de 3 cm de comprimento, exatamente 2 cm acima do reto.

O segundo grupo foi denominado de “segmentos secundários”, e é compreendido por um ou mais segmentos (1-3 segmentos) retirados somente dos animais que apresentaram lesão suspeita macroscópica ou visualizada ao microscópio estereoscópico. Esses fragmentos foram retirados de locais acima do segmento principal até o ceco. São no total 58 lâminas montadas com 1 a 3 cortes em cada lâmina, e cujos segmentos foram obtidos de 58 animais que apresentaram lesões suspeitas acima do segmento principal.

4.17 Análise estatística

A avaliação da associação entre os grupos experimentais e as alterações histológicas, tanto de lesões pré-neoplásicas/câncer como de sinais inflamatórios nos cólons dos animais, foi realizada por meio do teste do QUI-QUADRADO, com correção de BONFERRONI, quando necessária.

Os demais resultados das variáveis avaliadas neste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico SPSS, versão 24.0, considerando um nível de significância de 5% (SHOTT, 1990).

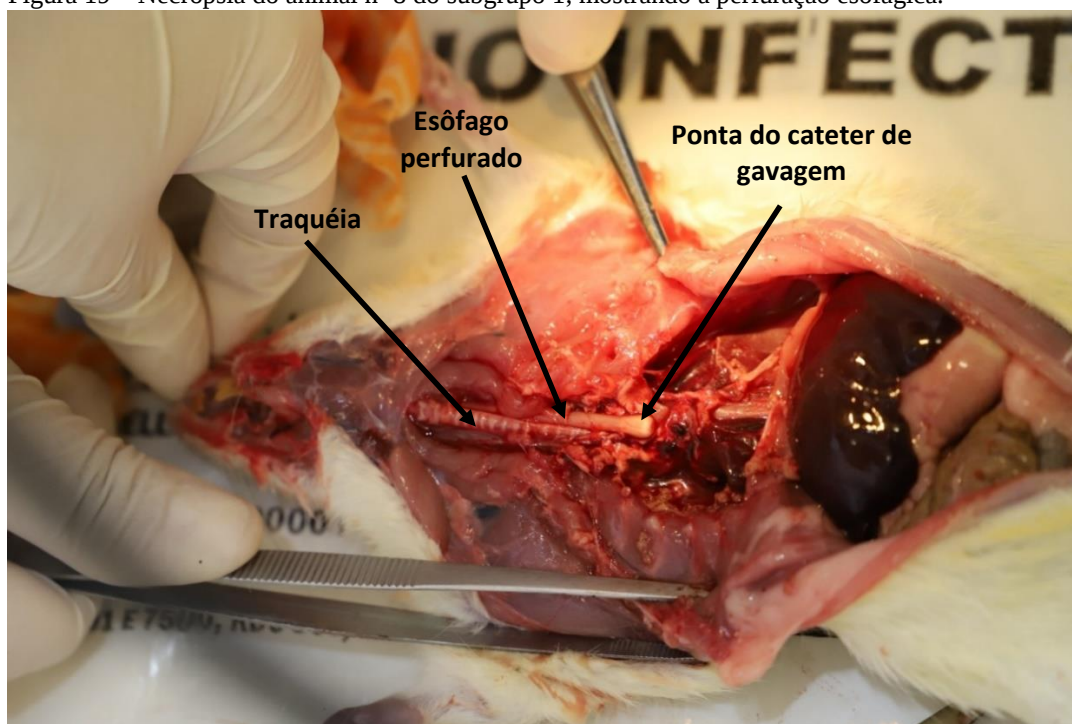
Para a avaliação da evolução dos pesos dos animais, em seus respectivos subgrupos, foi realizado teste ANOVA de uma via para variância com pós-teste de TUKEY-KRAMER com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Experimento de câncer colorretal associado a colite

O animal nº 8 do subgrupo 1 morreu por complicação da gavagem (Perfuração esofágica) no 3º dia de experimento, na fase de pré-indução do câncer associado a colite (Dia 17/04/19). A figura 19 mostra uma foto do momento da necropsia, o animal com o tórax e abdome abertos, e o local exato onde o cateter de gavagem perfurou o esôfago torácico e causou a morte do animal.

Figura 19 – Necrópsia do animal nº 8 do subgrupo 1, mostrando a perfuração esofágica.



Na fase pré-indutiva (9 dias) as seguintes alterações foram observadas: 1 animal ficou atordoado após a contenção antes da gavagem, 1 rato foi encontrado morto na caixa, com sinais de luta, e com parte da cabeça destruída por canibalismo, 1 apresentou refluxo do SFN pela boca logo após a gavagem, 1 teve o cateter de gavagem manchado de sangue ao ser removido, 1 animal ficou atordoado por alguns poucos segundos após a gavagem e em 1 animal o cateter não conseguiu chegar no estômago e o conteúdo foi injetado no esôfago.

Na fase indução (35 dias), houveram diversas complicações relacionadas ao manejo dos animais, incluindo a gavagem e a colite induzida pelo DSS, e estas complicações estão descritas a seguir: Três animais apresentaram diarreia, 2 apresentaram diarreia com sangue e 1 regurgitou o conteúdo da gavagem.

A figura 20 especifica quantos animais de cada subgrupo tiveram diarreia e diarreia com sangue no experimento CCR associado a colite.

Figura 20. Quadro contendo o número de animais que tiveram diarreia e diarreia com sangue no experimento câncer colorretal associado a colite.

Subgrupo	Conteúdo da gavagem	Diarreia	Diarreia com sangue
1	SFN – SFN	8	1
2	SFN – AD	0	0
3	AD – SFN	0	1
4	AD - AD	1	1

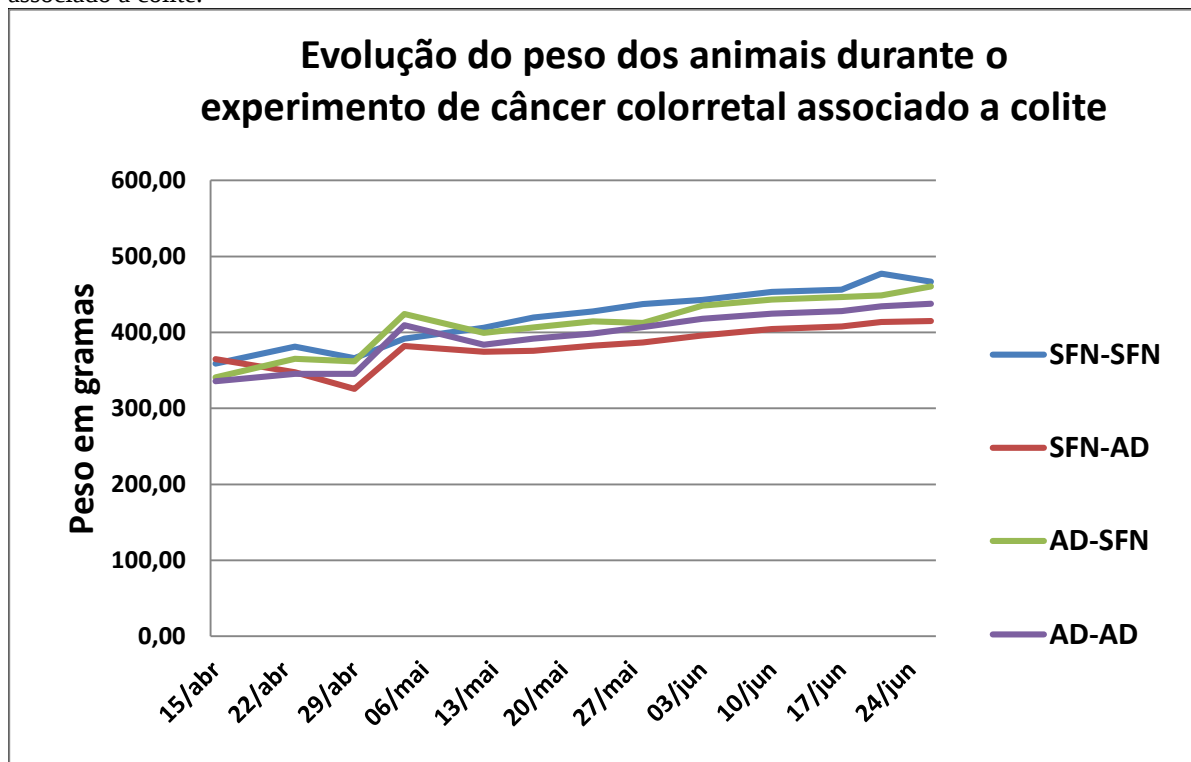
A tabela 1 mostra a evolução média dos pesos dos subgrupos de animais (em gramas) do experimento CCR associado a colite até o dia da eutanásia. Observamos que houve diferença estatisticamente muito significante somente nos subgrupos: 1 (SFN – SFN), 3 (AD – SFN) e 4 (AD – AD).

Tabela 1. Evolução média dos pesos dos subgrupos de animais (em gramas) do experimento câncer colorretal associado a colite ao longo de 13 semanas.

	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a	12 ^a	13 ^a
	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana
Subgrupo	Média [±] -DP												
1	358,70^a +/-34,30	381,33 +/-41,37	366,11 +/-47,53	391,77 +/-70,20	406,11 +/-47,49	419,44 +/-49,59	427,44 +/-49,34	437,33 +/-47,95	442,55 +/-46,01	453,33 +/-50,03	456,44 +/-47,97	477,11 +/-46,47	466,77^a +/-53,09
2	364.66 +/-25.37	347.33 +/-30.67	325.55 +/-29.08	381.88 +/-39.38	374.66 +/-38.11	375.55 +/-28.61	382.55 +/-27.85	386.77 +/-27.64	396.11 +/-27.81	404.22 +/-25.22	407.66 +/-29.53	413.55 +/-44.80	415.11 +/-34.81
3	340.88^b +/-31.09	365.33 +/-35.58	361.77 +/-34.33	424.00 +/-38.09	399.55 +/-38.49	406.44 +/-39.58	414.44 +/-42.27	412.55 +/-37.17	435.25 +/-44.42	443.12 +/-43.80	446.50 +/-47,04	448.50 +/-32.62	460.25^b +/-50,52
4	335.88^c +/-47.25	345.22 +/-35.94	345.22 +/-40.26	409.66 +/-40.92	383.88 +/-42.77	391.88 +/-43.99	398.44 +/-43.48	407.11 +/-45.81	417.77 +/-44.30	424.44 +/-44.99	428.00 +/-47.34	434.11 +/-43.57	437.77^c +/-44.64

(a), (b) e (c) demonstram diferença estatística muito significantes ($p < 0,001$).

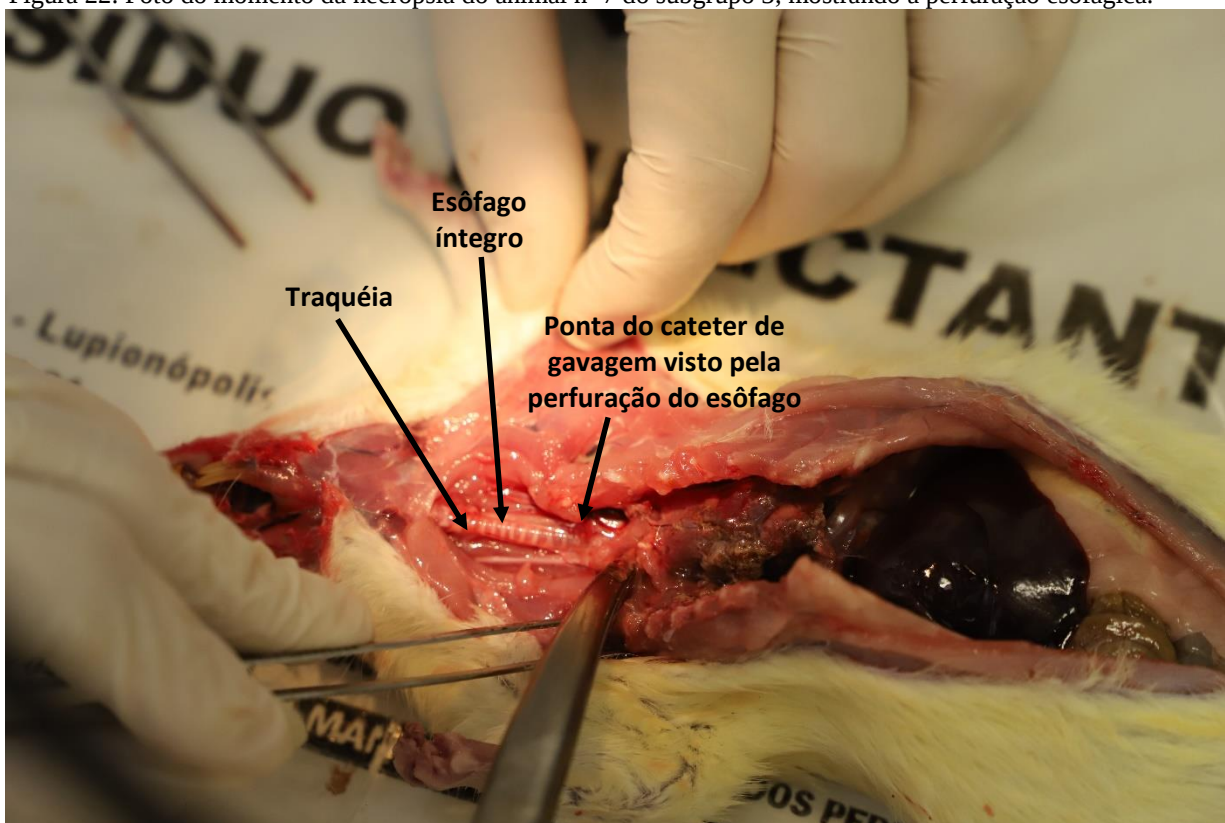
Figura 21–Gráfico da evolução do peso dos subgrupos de animais durante o experimento de câncer colorretal associado a colite.



Subgrupo 1 – SFN-SFN; Subgrupo 2 – SFN-AD; Subgrupo 3 – AD-SFN; Subgrupo 4 – AD-AD

Na fase pós-indução do CCR associado a colite o animal nº 7 do subgrupo 3 morreu de perfuração esofágica devido a complicação da gavagem no 46º dia do experimento (Dia 30/05/19). Esse animal foi necropsiado e foi evidenciado uma pequena perfuração no esôfago torácico por onde é possível ver parte da ponta do cateter de gavagem, conforme está demonstrado na figura 22.

Figura 22. Foto do momento da necrópsia do animal nº 7 do subgrupo 3, mostrando a perfuração esofágica.



Durante esses 31 dias da fase pós-indução, houveram diversas complicações relacionadas à carcinogênese, ao manejo dos animais e a colite induzida pelo DSS, e estas complicações estão descritas a seguir: 4 animais apresentaram diarreia, em 1 animal foi observado uma tumoração fibroelástica sub-axilar esquerda de 2,0 cm de diâmetro (De cor escura e no subcutâneo), em 1 animal foi observado uma tumoração fibroelástica inguinal esquerda (De 3,0 cm de diâmetro no subcutâneo) e em 1 animal foi verificado um aumento no volume testicular esquerdo com rubor e dor ao toque.

5.2. Experimento apenas de colite

Na fase pré-indução (9 dias), houveram diversas complicações relacionadas ao manejo dos animais, incluindo a gavagem, e estas complicações estão descritas a seguir: Três animais morderam e quebraram o cateter de gavagem, 2 ratos regurgitaram o conteúdo da gavagem, 1 rato ficou atordoado após a contenção, mas se recuperou em poucos segundos, 1 animal teve o cateter de gavagem manchado de sangue ao sair do estômago e 1 apresentou discreto sangramento nasal durante a gavagem.

Na fase indução (35 dias), houveram complicações relacionadas ao manejo dos animais, incluindo a gavagem e a colite induzida pelo DSS, e estas complicações estão descritas a seguir: 6 animais apresentaram diarreia, 2 animais regurgitaram o conteúdo da gavagem, 1 animal apresentou sinal de mordida na base da cauda (hematoma) e 1 animal teve o cateter de gavagem manchado de sangue ao sair do estômago.

A figura 23 especifica quantos animais de cada subgrupo tiveram diarreia e diarreia com sangue no experimento apenas colite.

Figura 23. Quadro contendo o número de animais que tiveram diarreia e diarreia com sangue no experimento apenas colite.

Subgrupo	Conteúdo da gavagem	Diarreia	Diarreia com sangue
5	SFN – SFN	9	0
6	SFN – AD	0	0
7	AD – SFN	4	0
8	AD - AD	0	0

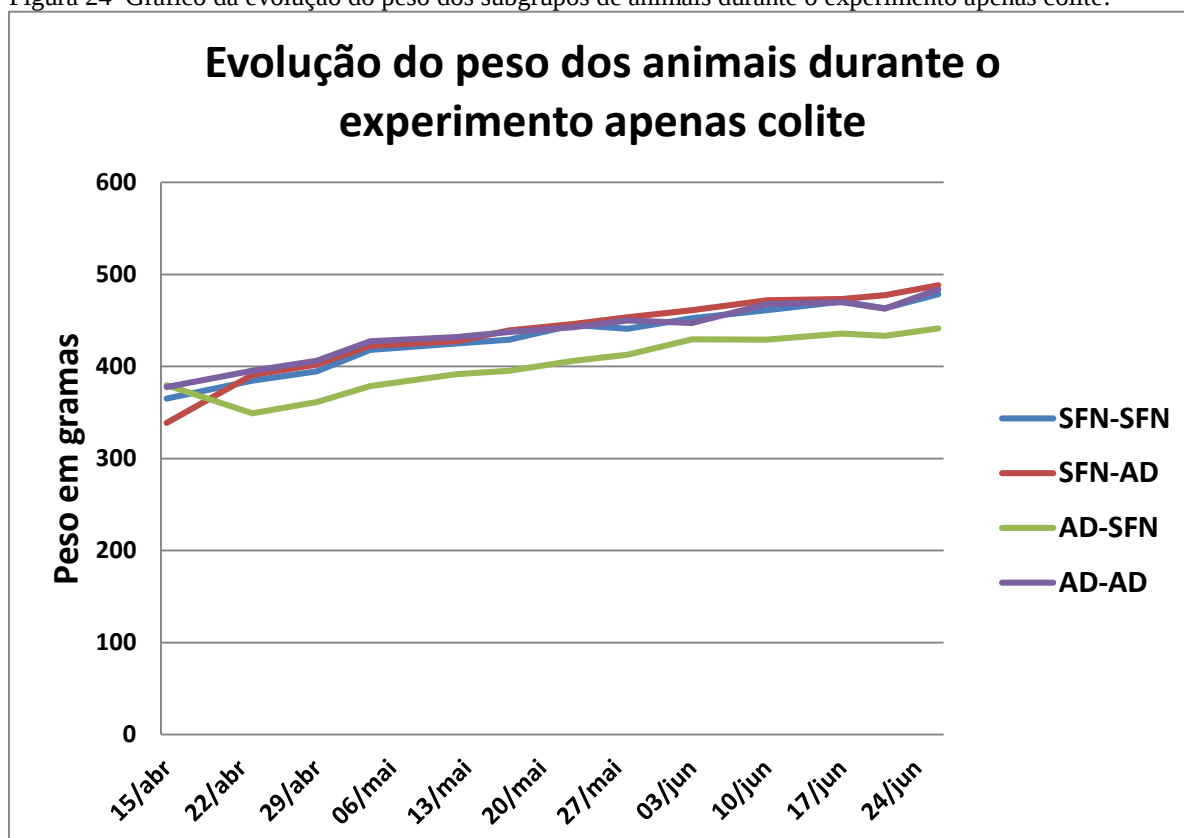
A tabela 2 mostra a evolução média dos pesos dos subgrupos de animais (em gramas) do experimento apenas colite até o dia da eutanásia. Observamos que houve diferença estatisticamente muito significativa em todos os 4 subgrupos: 1 (SFN – SFN), 2 (SFN – AD), 3 (AD – SFN) e 4 (AD – AD).

Tabela 2 – Evolução média dos pesos dos subgrupos de animais (em gramas) do experimento apenas colite ao longo de 13 semanas.

	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a	12 ^a	13 ^a
	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana
Subgrupo	Média ⁺ /-DP												
5	365.30 ^a +/-19.23	384.60 +/-20.92	394.80 +/-21.45	418.10 +/-23.18	425.00 +/-22.74	429.30 +/-24.54	445.00 +/-27.32	441.10 +/-23.89	452.50 +/-26.05	461.10 +/-21.44	470.40 +/-23.66	463.30 +/-29.48	478.40 ^a +/-25.90
6	338.66 ^b +/-22.72	390.77 +/-16.59	401.88 +/-17.58	422.55 +/-21.42	427.44 +/-21.77	439.22 +/-24.18	446.22 +/-22.01	453.55 +/-24.54	461.22 +/-26.10	472.00 +/-27.22	473.22 +/-25.06	477.55 +/-26.89	488,33 ^b +/-25.51
7	379.88 ^c +/-19.63	349.11 +/-26.72	361.22 +/-26.50	378.88 +/-21.29	391.44 +/-26.16	395.55 +/-27.51	406.11 +/-29.27	412.66 +/-28.42	429.66 +/-30.15	429.11 +/-29.43	435.66 +/-32.35	433.44 +/-32.43	441.33 ^c +/-32.79
8	377.77 ^d +/-37.80	395.33 +/-41.91	406.22 +/-40.70	427.33 +/-40.55	432.00 +/-39.49	437.66 +/-41.58	442.66 +/-41.98	450.11 +/-41.63	447.11 +/-47.08	467.77 +/-43.25	470.00 +/-46.74	463.00 +/-50.96	483.66 ^d +/-45.63

(a), (b), (c) e (d), demonstram diferença estatística muito significantes ($p < 0,001$).

Figura 24–Gráfico da evolução do peso dos subgrupos de animais durante o experimento apenas colite.



Subgrupo 5 – SFN-SFN; Subgrupo 6 – SFN-AD; Subgrupo 7 – AD-SFN; Subgrupo 8 – AD-AD

Durante esses 31 dias da fase pós-indução, a única intercorrência observada foi a diarreia em 5 animais.

5.3. Análise morfológica macroscópica e sob microscopia estereoscópica dos cólons

Após serem removidos, os cólons foram abertos, lavados com SF 0,9% e inspecionados a olho nu e sob um microscópio estereoscópico. Desse procedimento resultou dois grupos de segmentos intestinais:

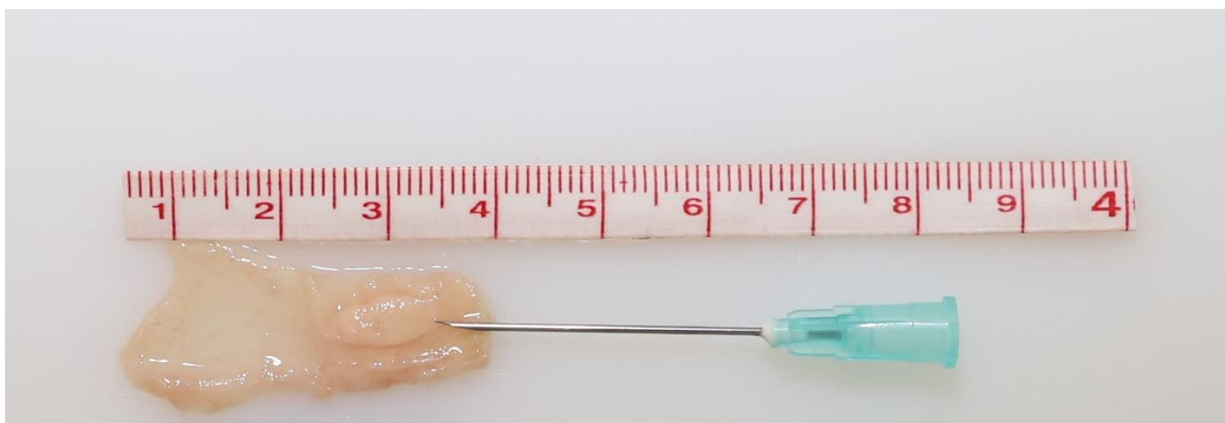
1º grupo – 72 segmentos principais (Um segmento de cólon de 3 cm de comprimento, exatamente 2 cm acima do reto), sendo um fragmento por animal.

2º grupo – 58 segmentos secundários (Um ou mais segmentos, de 1-3 segmentos, retirados de cada animal que apresentou lesão suspeita a olho nu e/ou ao microscópio estereoscópico. Esses fragmentos foram retirados de locais acima do segmento principal até o ceco.

A grande maioria das lesões macroscópicas a olho nu e/ou observadas à microscopia estereoscópica apresentava-se como uma leve elevação da mucosa, geralmente arredondada, de bordas bem definidas e de coloração um pouco mais pálida que a mucosa colorretal adjacente.

Muitos dos segmentos principais não apresentaram lesões macroscópicas a olho nu e nem à microscopia estereoscópica. A figura 25 mostra um segmento de cólon contendo uma dessas lesões macroscópicas descritas acima.

Figura 25. Foto de segmento de cólon de 3 cm contendo uma lesão macroscópica solitária de 0,8 x 0,3 cm.



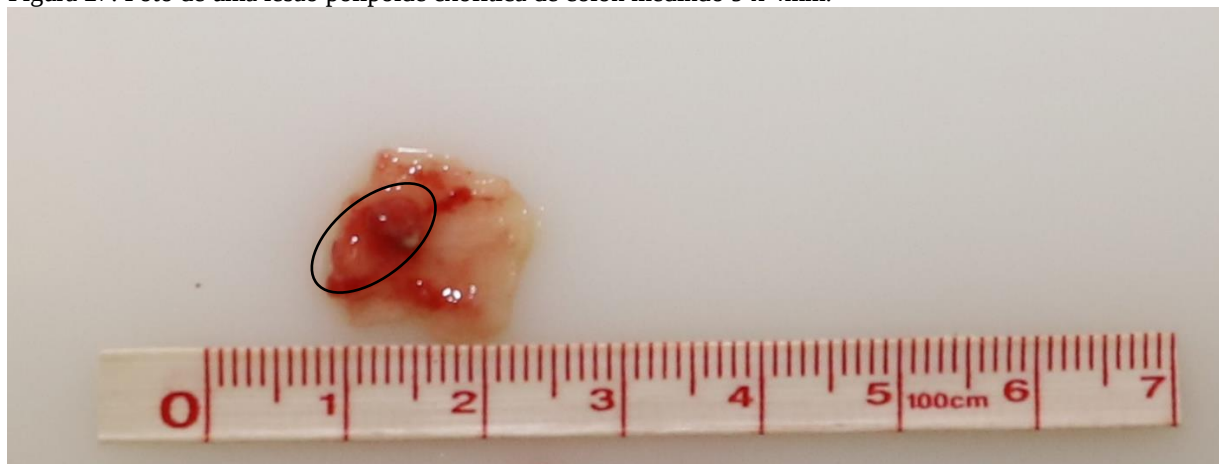
A figura 26 mostra dois segmentos de cólon, retirados do mesmo animal (Animal 9 do subgrupo 5), cada um deles contendo uma lesão macroscópica, sendo que a lesão da peça da esquerda mede 6 x 3mm e a da direita mede 3 x 1mm.

Figura 26. Foto de dois segmentos de cólon do mesmo animal contendo lesões macroscópicas.



Uma única lesão polipoide exofítica encontrada, mediu 9 x 4mm e estava projetada para a serosa (Animal 4 do subgrupo 1). Esse pólipó estava situado na serosa, que se encontrava com focos de hemorragia local, e a imagem está exibida na figura 27 realçada por uma elipse preta.

Figura 27. Foto de uma lesão polipoide exofítica de cólon medindo 9 x 4mm.



5.4. Análise histopatológica

Na tabela 3 estão apresentados os resultados das alterações histológicas, tanto de lesões pré-neoplásicas/câncer como de sinais inflamatórios, em cada um dos grupos experimentais avaliados neste estudo.

Não houve associação entre o grupo experimental e as lesões pré-neoplásicas/câncer do tipo a) criptas aberrantes (teste do qui-quadrado, $p=0,079$), b) adenomas (análise não possível), c) displasia de baixo grau ($p=0,079$) e d) displasia de alto grau (análise não possível).

Por outro lado, quanto aos sinais inflamatórios, houve associação significativa entre os grupos experimentais e a presença de ulceração mucosa nos cólons dos animais (teste do qui-quadrado, $p=0,027$), sendo que o percentual de animais que apresentou estas ulcerações no subgrupo 3 (100,0% - $n=3$) foi significativamente maior do que aqueles animais do subgrupo 1 (0,0% - $n=0$ – teste do qui-quadrado, com correção de Bonferroni, $p<0,05$). No entanto, não houve associação significativa entre o grupo experimental e os sinais inflamatórios do tipo a) discreto grau de inflamação (análise não possível), b) placa linfóide reacional ($p=0,192$), c) atrofia de criptas ($p=0,088$) e d) dilatação de vasos linfáticos ($p=0,146$).

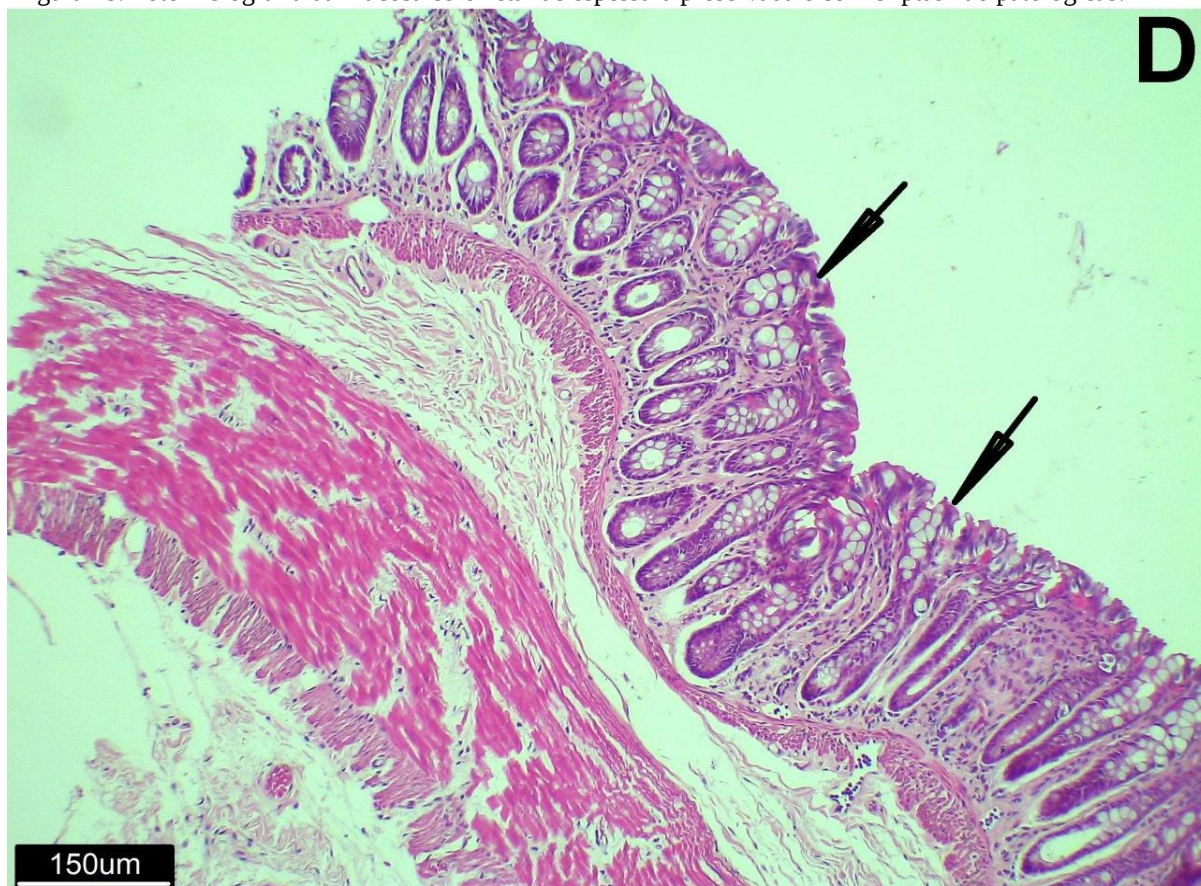
Tabela 3. Resultados das alterações histológicas, tanto de lesões pré-neoplásicas/câncer como de sinais inflamatórios, em cada um dos subgrupos experimentais avaliados neste estudo.

Alterações histopatológicas	Grupo experimental								Valor de p
	Subgrupo 1 (n=7)	Subgrupo 2 (n=7)	Subgrupo 3 (n=3)	Subgrupo 4 (n=6)	Subgrupo 5 (n=9)	Subgrupo 6 (n=8)	Subgrupo 7 (n=9)	Subgrupo 8 (n=9)	
Lesões pré-neoplásicas/câncer									
Criptas aberrantes	100,0 (7)	71,4 (5)	100,0 (3)	33,3 (2)	55,6 (5)	62,5 (5)	88,9 (8)	44,4 (4)	0,079
Adenoma	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-
Displasia de baixo grau	100,0 (7)	71,4 (5)	100,0 (3)	33,3 (2)	55,6 (5)	62,5 (5)	88,9 (8)	44,4 (4)	0,079
Displasia de alto grau	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-
Sinais inflamatórios									
Discreto grau de inflamação	100,0 (7)	100,0 (7)	100,0 (3)	100,0 (6)	100,0 (9)	100,0 (8)	100,0 (9)	100,0 (9)	-
Ulceração de mucosa	0,0 (0)b	42,9 (3)ab	100,0 (3)a	66,7 (4)ab	66,7 (6)ab	75,0 (6)ab	66,7 (6)ab	77,8 (7)ab	0,027
Placa linfoide reacional	100,0 (7)	57,1 (4)	100,0 (3)	50,0 (3)	77,8 (7)	50,0 (4)	88,9 (8)	77,8 (7)	0,192
Atrofia de criptas	100,0 (7)	71,4 (5)	100,0 (3)	100,0 (6)	100,0 (9)	75,0 (6)	100,0 (9)	100,0 (9)	0,088
Dilatação de vasos linfáticos	100,0 (7)	71,4 (5)	100,0 (3)	50,0 (3)	100,0 (9)	62,5 (5)	88,9 (8)	77,8 (7)	0,146

Os resultados estão apresentados em frequência relativa (frequência absoluta). Valor de “p” no teste do qui-quadrado. Letras diferentes na linha indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (teste do qui-quadrado, com correção de Bonferroni, $p < 0,05$).

Na figura 28, identificada com a letra “D”, temos a visão global de uma mucosa colorretal de espessura preservada e com criptas não patológicas (Destacadas pelas setas pretas).

Figura 28. Fotomicrografia da mucosa colorretal de espessura preservada e com criptas não patológicas.



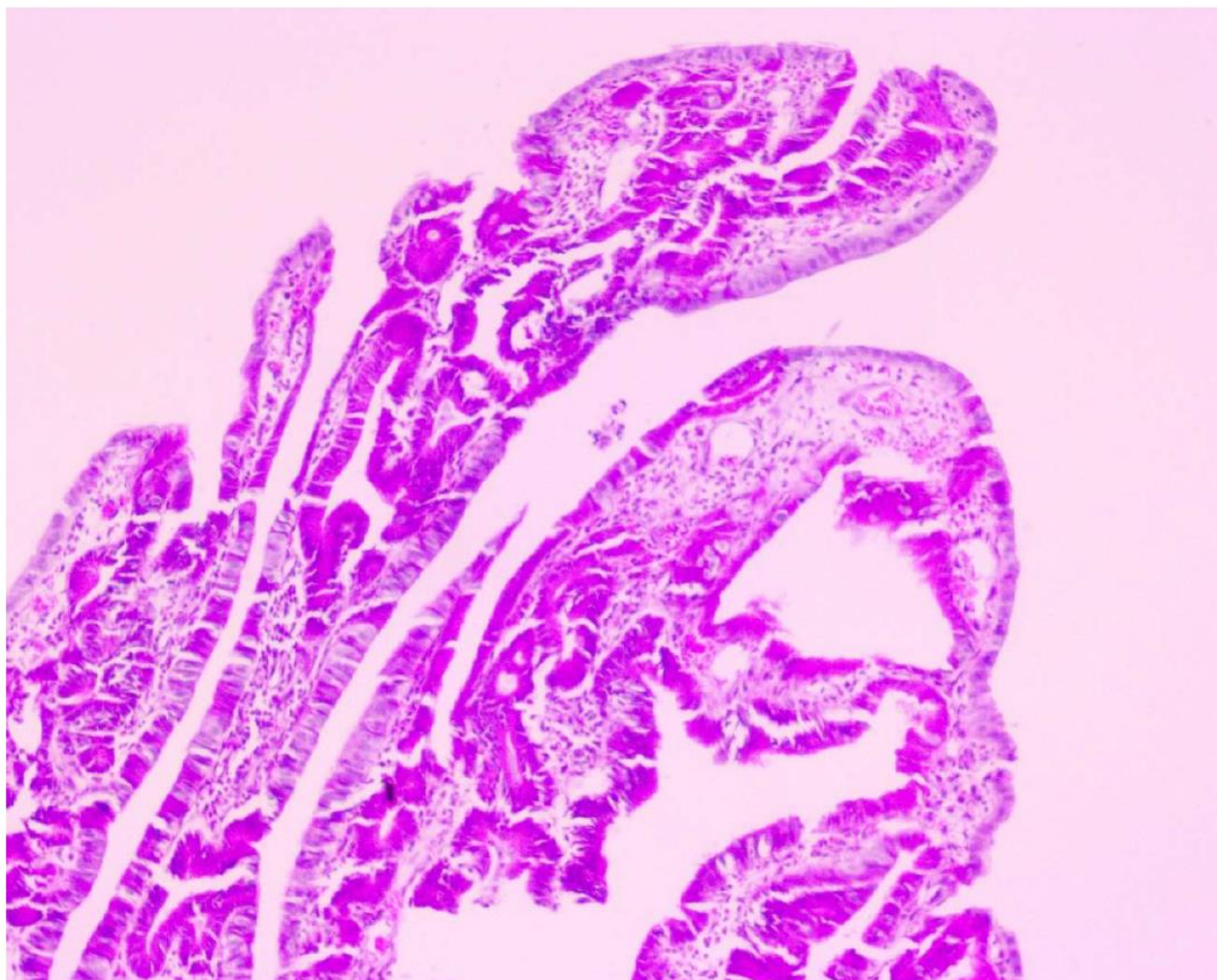
Na figura 29, identificada pela letra “B” observamos a mucosa colorretal de espessura preservada, na submucosa, a presença de um vaso linfático dilatado e repleto de linfócitos (Destacado por um halo preto), e observamos ainda criptas não aberrantes com o lúmen discretamente dilatado (Setas pretas).

Figura 29. Fotomicrografia da mucosa colorretal de espessura preservada e com dilatação de vaso linfático.



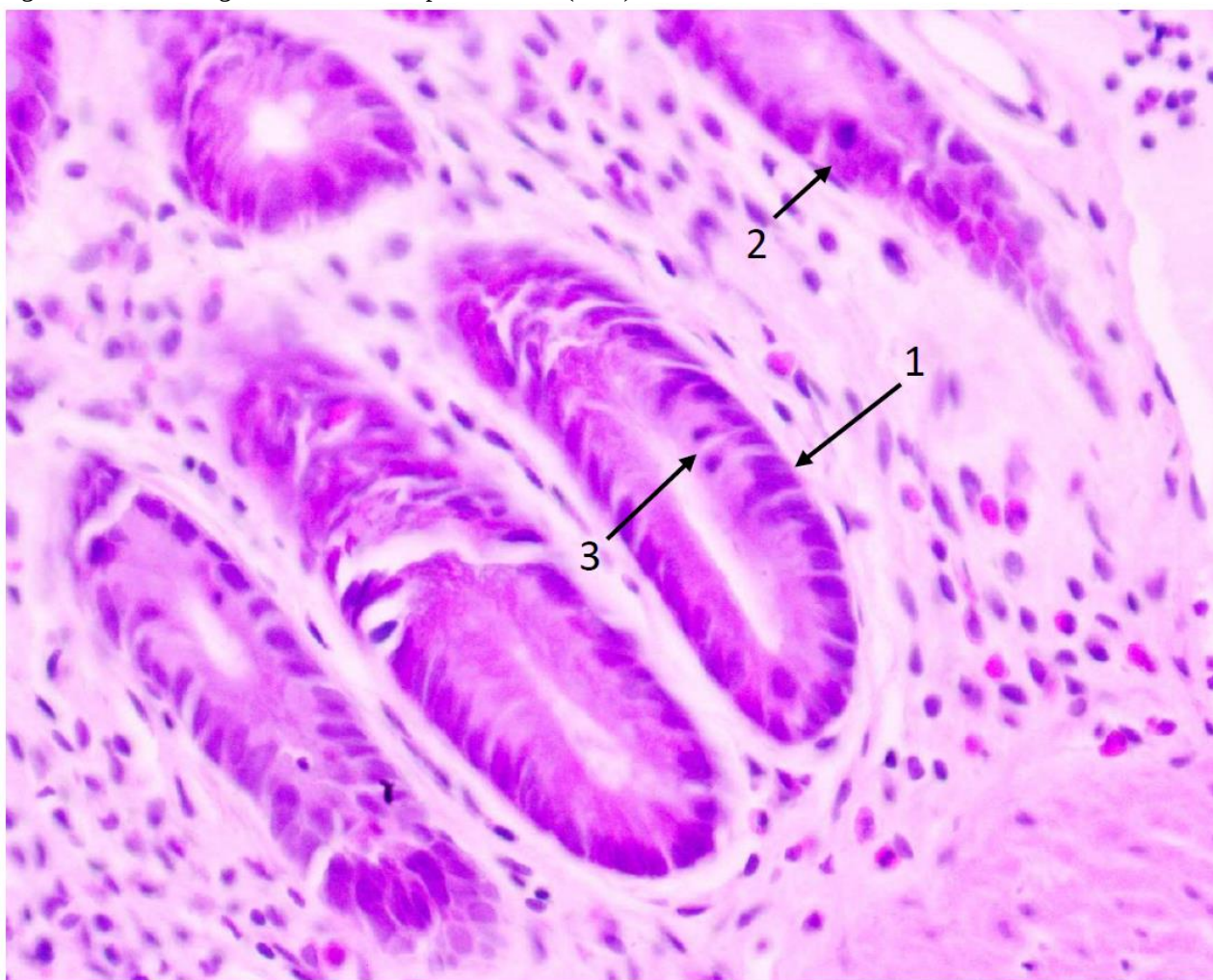
Na figura 30 observamos um adenoma tubular na mucosa colorretal do animal 4 do subgrupo 1. Essa lesão é caracterizada por apresentar estruturas tubuliformes com projeções polipóides acima do plano da mucosa. Também observamos a presença de revestimento cilíndrico com células de núcleos fusiformes, hipercromáticos, com pseudo-estratificação e poucas figuras de mitose.

Figura 30. Fotomicrografia de um adenoma de cólon.



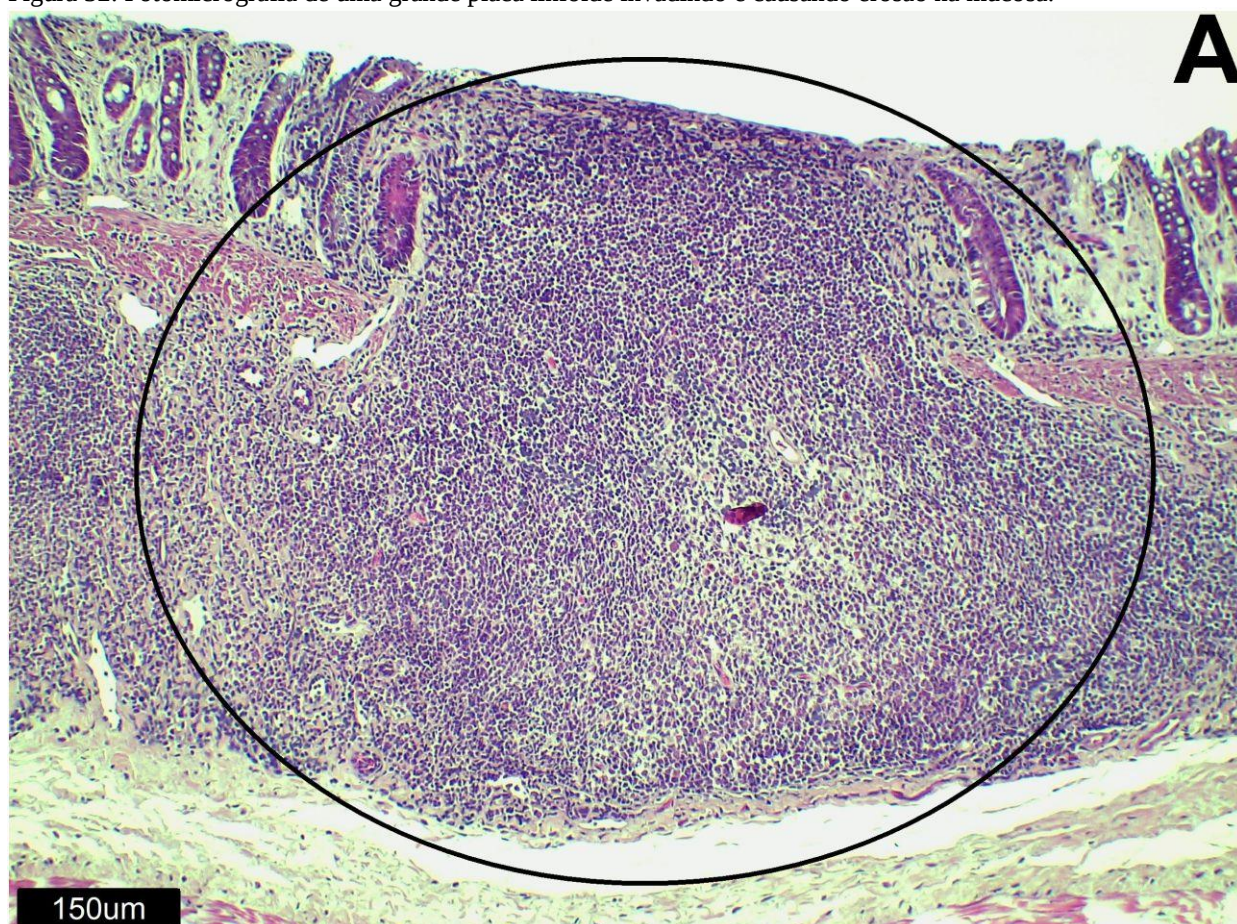
Na figura 31 observamos 4 criptas alongadas com células cilíndricas, núcleos fusiformes/ovais (Seta 1), basofílicos e discretamente pseudo-estratificados (Seta 2), com citoplasma acidófilo e com algumas figuras de mitose (Seta 3). A essa descrição denomina-se “Foco de Cripta Aberrante”.

Figura 31. Fotomicrografia de foco de cripta aberrante (FCA).



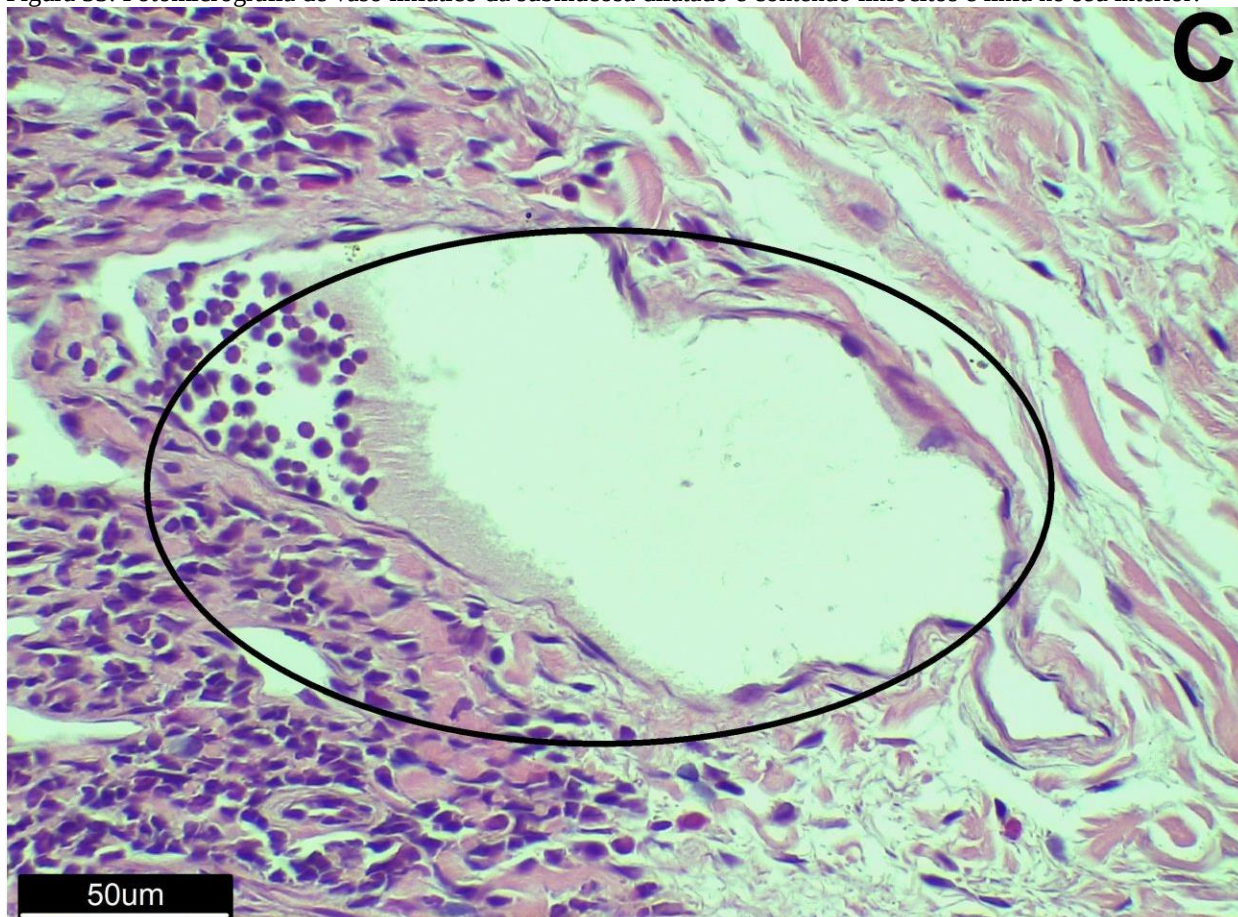
Na figura 32 identificada com a letra “A” está presente uma grande placa linfóide oriunda da submucosa que se apresenta com hiperplasia do tipo reacional, e que se projeta em direção à superfície da mucosa, erodindo-a e nivelando-se ao nível da mesma (Destacada por um halo preto).

Figura 32. Fotomicrografia de uma grande placa linfóide invadindo e causando erosão na mucosa.



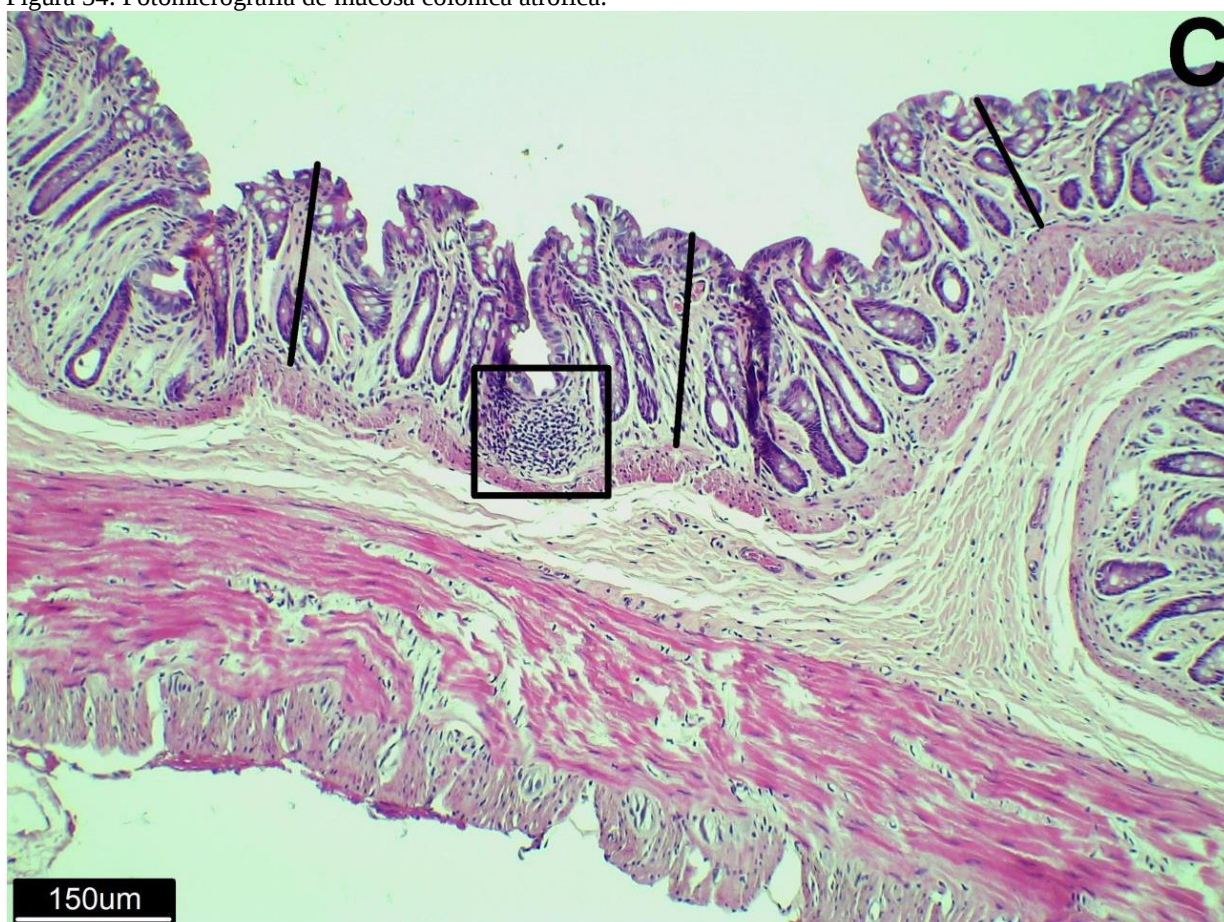
Na figura 33 identificada com a letra “C”, no centro da imagem, observa-se na região da submucosa um vaso linfático bastante dilatado contendo no seu interior linfa e linfócitos (Destacado por uma elipse preta).

Figura 33. Fotomicrografia de vaso linfático da submucosa dilatado e contendo linfócitos e linfa no seu interior.



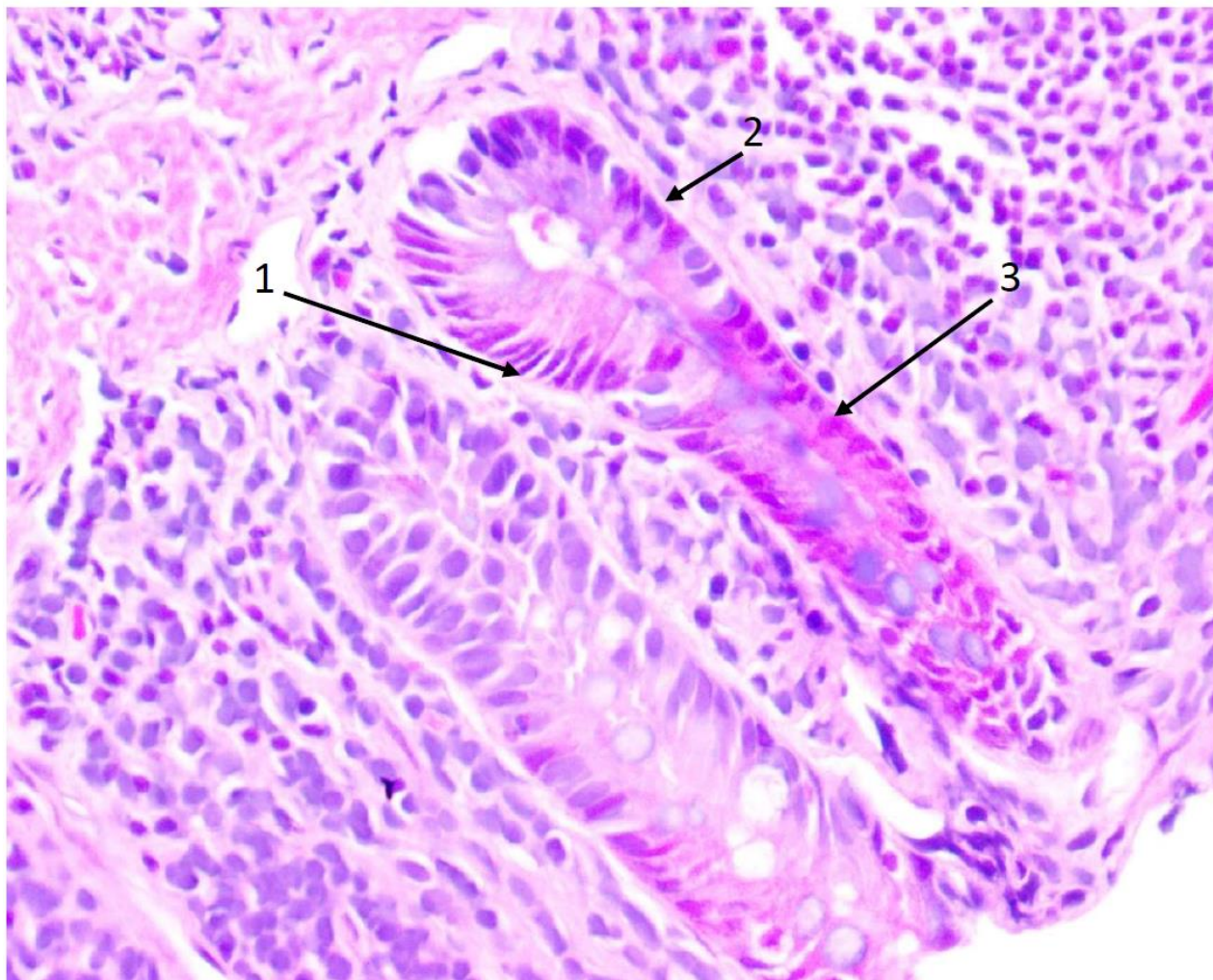
Na figura 34 identificada pela letra “C” temos uma visão global de um segmento de mucosa colorretal atrófica caracterizado por achatamento vilositário. As hastes pretas evidenciam adelgaçamento da mucosa, observa-se um foco de infiltrado linfocitário junto a base de uma cripta glandular no centro da imagem (Destacado por um quadrado preto).

Figura 34. Fotomicrografia de mucosa colônica atrófica.



Na figura 35 observa-se que a cripta superior da imagem apresenta FCA caracterizado por conter células cilíndricas com núcleos fusiformes/ovais (Seta 1), basofílicos e discretamente pseudo-estratificados (Seta 2), com citoplasma acidófilo e com algumas figuras de mitose (Seta 3).

Figura 35. Fotomicrografia de foco de cripta aberrante (FCA).



6. DISCUSSÃO

O Sulforafano é encontrado em grandes quantidades em vegetais crucíferos (Brócolis, couve, couve de Bruxelas, repolho, agrião e outros) e, informações científicas acumuladas sugerem que esses vegetais possuem potencial interessante para prevenção do câncer *in vitro* e *in vivo*. Além disso, um crescente corpo de evidências está relacionando suas propriedades quimiopreventivas contra o câncer através de mecanismos epigenéticos, em particular, sua potente atividade inibidora da Histona Desacetilase (HDAC), aumentando a acetilação total de histonas, bem como a acetilação de histonas específicas de certos genes promotores, como o p21 (GRAY, 2016).

Ao contrário dos trabalhos encontrados na literatura, que utilizaram o SFN na forma *in natura*, como vegetais frescos liofilizados (CHEN, CHEN, BOYCE, 1995; RIJKEN *et al.*, 1999; SMITH, MITHEN, JOHNSON, 2003), ou em formulação química farmacêutica (HU *et al.*, 2006; RAJENDRAN *et al.*, 2015), nós utilizamos em nosso experimento o SFN na forma de suplemento alimentar (Extrato de sementes de brócolis liofilizados contendo SFN), disponibilizado no mercado dos Estados Unidos da América como suplemento alimentar para uso humano.

Não há na literatura nenhum trabalho científico que tenha analisado os efeitos desse tipo de apresentação de SFN em CCR associado a colite em ratos.

A administração de DSS na água potável produz colite aguda ou crônica, dependendo do protocolo de administração, e os animais que recebem DSS exibem perda de peso, diarreia, e às vezes até diarreia com sangue e sangramento retal. Na colite experimental, a gravidade da doença é frequentemente correlacionada com o aumento na atividade da Mieloperoxidase (MPO), e níveis mais altos de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) são observados. (KIM *et al.*, 2012).

Yanaka, Hyodo, Yamamoto (2006) concluíram que a ingestão diária de brotos de brócolis ricos em sulforafano impede a formação de tumores do cólon em camundongos tratados com DSS e azoximetano, e melhora a colite. Em nosso estudo, entretanto, não observamos estes efeitos. Pelo contrário, os animais que receberam o SFN suplemento comercial apresentaram mais parâmetros inflamatórios histológicos nos cólons (Discreto grau de inflamação de mucosa e submucosa, atrofia de criptas, placas linfóides reacionais e dilatação de vasos linfáticos) e mais sinais clínicos como diarreia e diarreia com sangue. Entretanto, o único efeito protetivo do SFN observado nesse trabalho foi a redução da ulceração de mucosa ($p=0,027$), um dos parâmetros de inflamação intestinal estudados.

Os focos de cripta aberrante (FCA) diferem das criptas circundantes normais porque são discretamente salientes sobre a superfície da mucosa e se coram mais escuro do que a mucosa adjacente. Além disso, as criptas são maiores que o normal, e com uma distância reduzida entre elas, e alguns FCA em vez de abaulados, podem ser planos ou côncavos, mas ainda assim coram mais intensamente pelo escuro que a mucosa ao seu redor, permitindo o seu reconhecimento. Nos FCA típicos as criptas têm uma dilatação suave da sua luz, apresentam hiperplasia e têm abertura luminal serrilhada (FENOGLIO-PREISER; NOFFSINGER, 1999).

Chung *et al.* (2000), estudando a administração oral de SFN em ratos, observaram que houve redução na formação de focos de criptas colorretais aberrantes induzidas pela ação do Azoximetano. Em seu estudo foram utilizadas altas e baixas doses do extrato da planta contendo o SFN, o que levou a queda de 83,6% e 82,2% nas criptas totais nos ratos alimentados com 500 mg/kg e 250 mg/kg de SFN, respectivamente. Entretanto, tal fato não se confirmou no nosso experimento pois não foi observado redução na formação de focos de criptas aberrantes nos cólons dos animais desse estudo.

Yanaka *et al* (2019) observaram que a administração diária de brotos de brócolis crus (Contendo glicosinatos de sulforafano a 2.200 ppm/kg/dia) por 24 semanas suprimiu a formação de FCA microscópicos e tumores macroscópicos nos cólons de camundongos pré-tratados com AOM, efeito que não foi observado em nossa pesquisa, onde o tempo de administração do SFN foi de 45 dias (6,4 semanas).

A Retocolite Ulcerativa (RCU) e a doença de Crohn compreendem um conjunto de distúrbios inflamatórios crônicos, idiopáticos, imunológicos e recidivantes do trato gastrointestinal humano, denominados Doença Inflamatória Intestinal (DII). Embora os fatores etiológicos envolvidos na perpetuação da DII permaneçam incertos, o desenvolvimento de vários modelos animais fornece novos conhecimentos para desvendar o início e a progressão da DII. Vários modelos de colite induzida por produtos químicos são amplamente utilizados em escala laboratorial, e além disso, esses modelos imitam com certa fidelidade as características morfológicas, histopatológicas e sintomáticas da DII humana. Entre os modelos de colite induzida por produtos químicos, podemos citar a colite induzida pelo DSS, que é uma das mais amplamente utilizadas (RANDHAWA; SINGH; JAGGI, 2014).

O tratamento com SFN antes da indução da colite por DSS minimizou significativamente a perda de peso e o índice de atividade da doença em comparação com os ratos controle (Solução salina), além disso, a análise macroscópica e microscópica do cólon revelou atenuação da inflamação nos animais pré-tratados com SFN (WAGNER *et al.*, 2013).

No nosso experimento, entretanto, não observamos esses efeitos do SFN, pelo contrário, os animais que receberam o SFN suplemento alimentar para humanos apresentaram mais diarreia (Figura 15 e 18), tiveram alterações histopatológicas equivalentes ao grupo que recebeu AD (Tabela 3), e muitos animais perderam peso (Anexos 2,3,6 e 7).

Num trabalho publicado em janeiro de 2017, os pesquisadores Parang, Barret e Williams (2017) induziram CCR associado a colite usando DSS a 3% (3 ciclos de 6 dias, alternados com 16 dias de recuperação com água de torneira) e AOM (12 mg/Kg em dose única, um dia antes do início do uso da DSS) em camundongos C57BL e observaram múltiplos tumores macroscópicos com 10 semanas de experimento. O desenho do nosso experimento foi muito parecido com o desses três autores, no entanto, em nossos ratos Wistar só houve o desenvolvimento de um adenoma solitário de 9 x 4mm.

O SFN utilizado nessa pesquisa (Suplemento alimentar para humanos) não apresentou efeito protetivo contra o CCR associado a colite em ratos, desta forma, é recomendável que estudos de isolamento e quantificação de seus constituintes sejam realizados antes de se empreender novos estudos utilizando esse produto como quimiopreventivo contra o câncer colorretal em ratos.

Entretando, como já bem demonstrado na literatura, o SFN contido nos vegetais frescos (Couve de Bruxelas, brócolis, ervilhas, agrião e outros) e o SFN obtido de laboratórios especializados na síntese química de substâncias para experimentação, são eficazes em promover efeitos protetivos em estudos pré-clínicos de carcinogênese experimental.

Não conseguimos afirmar com exatidão qual o motivo da ineficácia do SFN utilizado nesse trabalho, mas é possível que diversos fatores tenham interferido na entrega, metabolização, assimilação e utilização da substância, tais como biodisponibilidade, dose utilizada, quantidade de SFN contida em cada cápsula do suplemento, presença ou não da mirosinase na fórmula, etc.

Portanto, mais estudos são necessários para melhor elucidar os motivos da ineficácia dessa formulação em nosso estudo.

7. CONCLUSÃO

O DSS foi capaz de promover a colite nos ratos, paralelamente, o uso do DSS associado ao AOM foi eficaz em induzir lesões pré-neoplásicas nas células da mucosa colorretal.

O SFN suplemento não foi eficaz em bloquear ou reduzir a colite pelo DSS em ratos e também não foi efetivo em reduzir a incidência de lesões pré-neoplásicas associadas a colite em ratos.

As alterações macroscópicas encontradas nos animais (Tratados e não tratados com SFN) podem ser descritas como lesões discretamente elevadas na mucosa, geralmente arredondadas, com bordas bem definidas e de coloração um pouco mais pálida que a mucosa colorretal adjacente, e apenas um adenoma exofítico foi encontrado.

As alterações histopatológicas relacionadas com pré-malignidade/câncer encontradas demonstraram a efetividade da ação do DSS e Azoximetano em induzir lesões de cólon associado a colite.

As análises histopatológicas mostraram inflamação discreta na mucosa e submucosa, ulceração de mucosa, placas linfoides reacionais, atrofia de criptas e dilatação de vasos linfáticos nos cólons dos ratos.

O uso do Sulforafano levou a mais episódios de diarreia e diarreia com sangue quando comparado com os animais que receberam somente AD, com isso, influenciando negativamente nas complicações clínicas. Nenhum dos animais apresentou as outras alterações relativas a colite, descritas na literatura como piloereção, hiporreatividade, e alguns animais apresentaram perda de peso isoladamente.

8. REFERÊNCIAS

- ARES, A. M.; NOZAL, M. J.; BERNAL, J. Extraction, chemical characterization and biological activity determination of broccoli health promoting compounds. **Journal of Chromatography**, v. 1313, p. 78-95, Oct. 2013.
- ARNOLD, M.; SIERRA, M. S.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Frontline Gastroenterology - BMJ**, v. 66, n. 4, p. 683-691, Jan. 2016.
- CARVALHO, P. G. B., MACHADO, C. M. M., MORETTI, C. L., FONSECA, M. E. N., Hortaliças como alimentos funcionais. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 4, p.397-404, Oct. 2006.
- CHEN, M. F.; CHEN, L. T.; BOYCE, H. W. JR. Cruciferous vegetables and glutathione: their effects on colon mucosal glutathione level and colon tumor development in rats induced by DMH. **Nutrition and Cancer**, v.23, n. 1, p.77-83, 1995.
- CHUNG, F-L.; CONAWAY, C. C.; RAO, C. V.; REDDY, B. S. Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci in fischer rats by sulforaphane and phenethyl-isothiocyanate. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 12, p. 2287-2291, Dec. 2000.
- CLARKE, J. D.; DASHWOOD, R. H.; HO, E. Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. **Cancer Letters**, v. 269, n. 2, p. 291-304, Oct. 2008.
- DAMSCH, S.; EICHENBAUM, G.; TONELLI, A.; LAMMENS, L.; VAN DEN BULCK, K.; FEYEN, B.; VANDENBERGHE, J.; MEGENS, A.; KNIGHT, E.; KELLEY, M. Gavage-related reflux in rats: identification, pathogenesis, and toxicological implications (review). **Toxicological Pathology**, v. 39, n. 2, p. 348-360, Feb. 2011.
- DASHWOOD, R. H.; HOB, E. Dietary histone deacetylase inhibitors: from cells to mice to man. **Seminars in Cancer Biology**, v. 39, n. 2, p. 363-369, Oct. 2007.
- ENG, J. Sample size estimation: how many individuals should be studied? **Radiology**, v. 227, n. 2, p. 309-313, May 2003.
- FENOGLIO-PREISER, C. M.; NOFFSINGER, A. Aberrant crypt foci: a review. **Toxicologic Pathology**, v. 27, n. 6, p. 632-642, 1999.
- GRAY, S. G. Sulforaphane (4-methylsulfinylbutyl isothiocyanate) is a dietary isothiocyanate synthesized from a precursor found in cruciferous vegetables of the genus Brassica. **Epigenetics in Human Disease**, 2016.
- HASLER, C. M. A new look at an ancient concept, **Chemical & Industry**, v. 3, p. 84-89, Feb. 1998.
- HERR, I.; LOZANOVSKI, V.; HOUBEN, P.; SCHEMMER, P.; BÜCHLER, M. W. Sulforaphane and related mustard oils in focus of cancer prevention and therapy. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 163, n. 3-4, p. 80-88, Dec. 2012.

HU, R.; KHOR, T. O.; SHEN, G.; JEONG, W. S.; HEBBAR, V.; CHEN, C.; XU, C.; REDDY, B.; CHADA, K.; KONG, A. N. Cancer chemoprevention of intestinal polyposis in Apc Min/+ mice by sulforaphane, a natural product derived from cruciferous vegetable. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 10, p. 2038–2046, May 2006.

JESS, T.; RUNGOE, C.; PEYRIN–BIROULET L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v.10, n. 6, p. 639–645, June 2012.

JOHNSON, G. S.; LI, J.; BEAVER, L. M.; DASHWOOD, W. M.; SUN, D.; RAJENDRAN, P.; WILLIAMS, D. E.; HO, E.; DASHWOOD, R. H. A functional pseudogene, NMRAL2P, is regulated by Nrf2 and serves as a coactivator of NQO1 in sulforaphane-treated colon cancer cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 61, n. 4, p. 1-18, Apr. 2017.

JUGE, N.; MITHEN, R. F.; TRAKA, M. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 9, p. 1105-1127, May 2007.

KIM, J. J.; SHAJIB, Md. S.; MANOCHA, M. M.; KHAN, W. I. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. **Journal of Visualized Experiments**, v. 1, n. 60, p. 1-6, Feb. 2012.

KLATT, E. C. The Internet pathology laboratory for medical education hosted by **The University of Utah Eccles Health Sciences Library - EUA**, 1994-2020.

LATTÉ, K. P.; APPEL, K-E.; LAMPEN, A. Health benefits and possible risks of broccoli – an overview. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 12, p. 3287-3309, Dec. 2011.

LEARY, L.; UNDERWOOD, W.; RAYMOND, A.; CARTNER, S.; COREY, D.; GRANDIN, T.; GREENACRE, C.; GWALTNEY-BRANT, S.; Mc-CRACKIN, M. A.; MEYER, R.; MILLER, D.; SHEARER, J.; YANONG, R. Guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition. **American Veterinary Medical Association**, 2013.

LI, Y.; ZHAN, T.; LI, X.; ZOU, P.; SCHWARTZ, S. J.; SUN, D. Kinetics of sulforaphane in mice after consumption of sulforaphane-enriched broccoli sprout preparation. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, n. 12, p. 1-19, Dec. 2013.

LIPPMANN, D.; LEHMANN, C.; FLORIAN, S.; BARKNOWITZ, G.; HAAK M.; MEWIS I.; WIESNER, M.; SCHREINER, M.; GLATT, H.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; KIPP, A. P. Glucosinolates from pakchoi and broccoli induce enzymes and inhibit inflammation and colon cancer differently. **Food & Function**, v. 5, n. 6, p. 1073–1081, June. 2014.

MENEZES, C. C. S.; FERREIRA D. B. B.; FARO F. B. A.; BOMFIM M. S.; TRINDADE, L. M. D. F. Câncer colorretal na população brasileira: taxa de mortalidade no período de 2005-2015. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 29, n. 2, p. 172-179, abr./jun. 2016.

MOKHTARI, R. B.; BALUCH, N.; HOMAYOUNI, T. S.; MORGATSKAYA, E.; KUMAR, S.; KAZEMI, P.; YEGER, H. The role of Sulforaphane in cancer chemoprevention and health benefits: a mini-review. **Journal of Cell Communication and Signalling**, v. 12, n. 1, p. 91-101, Mar. 2018.

NICOLUSSI, A.C.; SAWADA, N.O. Quality of life of patients with colorectal cancer who were receiving complementary therapy. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, n. 2, p. 155-161, May 2008.

PARANG, B.; BARRET, C. W.; WILLIAMS, C. S. AOM/DSS Model of colitis-associated cancer. **Methods in molecular biology**, v. 1422, p. 297-307, Jan. 2017.

RAJENDRAN, P.; DASHWOOD, W-M.; LI, L.; KANG, Y.; KIM, E.; JOHNSON, G.; FISCHER, K. A.; LÖHR, C. V.; WILLIAMS, D. E.; HO, E.; YAMAMOTO, M.; LIEBERMEN, D. A.; DASHWOOD, R. H. Nrf2 status affects tumor growth, HDAC3 gene promoter associations, and the response to sulforaphane in the colon. **Clinical Epigenetics**, v. 7, n. 102, p. 1-12, Sep. 2015.

RANDHAWA, P. K.; SINGH, K.; JAGGI, A. S. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 18, n. 4, p. 279-288, Aug. 2014.

RASKOV, H.; BURCHARTH, J.; POMMERGAARD, H-C. Linking gut microbiota to colorectal câncer. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 17, p. 3378–3395, Sep. 2017.

RÊGO, A. G. S.; BORGES, I. C. V.; VALENÇA, R. J. V.; TELES, J. B. M.; PINTO, L. S. S. Câncer colorretal em pacientes jovens. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 2, p. 173-180, mar 2012.

RIJKEN, P. J.; TIMMER, W. G.; VAN DE KOOIJ, A. J.; VAN BENSCHOP, I. M.; WISEMAN, S. A.; MEIJERS, H.; TIJBURG, L. B. Effect of vegetable and carotenoid consumption on aberrant crypt multiplicity a surrogate end-point marker for colorectal cancer in azoxymethane-induced rats. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 12, p. 2267-2272. Dec. 1999.

ROBERTIS, M.; MASSI, E.; FASIO, V. M. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. **Journal of Carcinogenesis**, v. 10, n. 9, Mar. 2011.

RONCUCCI, L.; STAMP, D.; MEDLINE, A.; CULLEN, J. B.; BRUCE, R. Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. **Human Pathology**, v.22, n. 3, p. 287-294, Mar. 1991.

SALES-CAMPOS, H.; BASSO, P. J.; ALVES, V. B. F.; FONSECA, M. T. C.; BONFÁ, G.; NARDINI, V.; CARDOSO, C. R. B. Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 2, p. 96-107, Nov. 2014.

SANTOS JR, J. C. M. Câncer Ano-reto-cólico: Aspectos atuais II – Câncer colorretal – Fatores de riscos e prevenção. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 27, n. 4, p. 459-473, Oct. 2007.

SEQUETTO, P. L. Efeitos dos flavonoides naringina, crisina e resperidina e do extrato hidroalcoólico do *Helianthus annuus* na carcinogênese experimental do cólon. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Viçosa – MG, 2012.

SHOTT, S. Statistics for health professionals. London: W.B. **Saunders Company**, 1990.

SMITH, T. K.; MITHEN, R.; JOHNSON, I. T. Effects of brassica vegetable juice on the induction of apoptosis and aberrant crypt foci in rat colonic mucosal crypts in vivo. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 3, p. 491–495, Mar. 2003.

STEINKELLNER, H.; RABOT, S.; FREYWALD, C.; NOBIS, E.; SCHARF, G.; CHABICOVSKY, M.; KNASMÜLLER, S.; KASSIE, F. Effects of cruciferous vegetables and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. **Mutation Research**, v. 480-481, p. 285–297, Feb. 2001.

TAKAYAMA, T.; KATSUKI, S.; TAKAHASHI, Y.; OHI, M.; NOJIRI, S.; SAKAMAKI, S.; KATO, J.; KOGAWA, K.; MIYAKE, H.; NIITSU, Y. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. **New English Journal Medicine**, v. 339, n. 18, p. 1277-1284, Oct. 1998.

TANAKA, T.; KOHNO, H.; SUZUKI, R.; YAMADA, Y.; SUGIE, S.; MORI, H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. **Cancer Science**, v. 94, n. 11, p. 965-973, Nov. 2003.

TOMASELLO, G.; TRALONGO, P.; DAMIANI, P.; SINAGRA, E.; DI TRAPANI, B.; ZEENNY, M. N.; HUSSEIN, I. H.; JURJUS A.; LEONE, A. Dismicrobism in inflammatory bowel disease and colorectal cancer: Changes in response of colocytes. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 48, p. 18.121-18.130, Dec. 2014.

ULLAH, M. F. Sulforaphane (SFN): an isothiocyanate in a cancer chemoprevention paradigm. **Medicines**, v. 2, n. 3, p. 141-156, Sep. 2015.

ULLMAN, T. A.; ITZKOWITZ, S. H. Intestinal Inflammation and Cancer. **Gastroenterology**, v. 140, n. 6, p. 1807–1816, May 2011.

VEERANKI, O. L.; BHATTACHARYA, A.; MARCHALL, J. R.; ZHANG, Y. Organ-specific exposure and response to sulforaphane, a key chemopreventive ingredient in broccoli: implications for cancer prevention. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 1, p. 25-32, Jan. 2013.

VERHOEVEN, D. T. H.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHN, R. A.; VAN DEN BRANDT, P. A.; VAN POPPEL, G. A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. **Chemico-Biological Interactions**, v. 103, n. 2, p. 79-129, Feb. 1997.

WAGNER, A. E.; WILL, O.; STURM, C.; LIPINSKI, S.; ROSENSTIEL, P.; RIMBACH, G. DSS-Induced acute colitis in C57BL/6 mice is mitigated by sulforaphane pre-treatment. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 12, p. 2085-2091, Dec. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - International Agency for Research on Cancer. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018, **Press Release**, n. 263, Sep. 2018.

WU, Q. J.; YANG, Y.; VOGTMANN, E.; WANG, J.; HAN, L. H.; LI, H. L.; XIANG, Y. B. Cruciferous vegetables intake and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis of observational studies. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 4, p. 1079–1087, Apr. 2013.

YANAKA, A.; HYODO, H.; YAMAMOTO, M. Daily intake of sulphoraphane-rich broccoli sprouts prevents colon tumor formation in mice treated with dextran sodium sulfate and azoxymethane via stimulating nrf2-dependent antioxidant enzymes. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 15, n. 12, Dec. 2006.

YANAKA, A.; SUZUKI, H.; MUTOH, M.; KAMOSHIDA, T.; KAKINOKI, N.; YOSHIDA, S.; HIROSE, Z.; EBIHARA, T.; HYODO, I. Chemoprevention against colon cancer by dietary intake of sulforaphane. **Functional Foods in Health & Disease**, v. 9, n. 6, p. 392-441, June 2019.

9. ANEXOS

Anexo 1. Certificado da Comissão de Ética no uso de Animais/CEUA da UFMS.



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “O efeito do sulforafano na incidência do câncer de cólon associado a colite em ratos”, registrada com o nº 989/2018, sob a responsabilidade de **Ricardo Dutra Aydos** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 9ª reunião ordinária do dia 25/10/2018.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	1º/02/2019 a 30/04/2020
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Nº de animais	74
Peso/Idade	200 - 280g / Aprox. 8 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério - UT/INBIO/UFMS

Joice Stein

Coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 29 de outubro de 2018.



Documento assinado eletronicamente por **Joice Stein, Professor do Magisterio Superior**, em 01/11/2018, às 07:45, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0848602** e o código CRC **EF29DEDF**.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº 23104.038566/2018-89

SEI nº 0848602

Anexo 2. Evolução do peso dos animais na fase de pré-indução do câncer colorretal associado a colite (Subgrupos 1-4).

SUBGRUPO	ANIMAL	CONTEÚDO DA GAVAGEM	PESO (15/04/19)	PESO (23/04/19)
1	1	SFN	323 g	348 g
	2		383 g	414 g
	3		279 g	292 g
	4		395 g	397 g
	5		360 g	358 g
	6		373 g	398 g
	7		376 g	412 g
	8		356 g	Óbito dia 17/04/19
	9		382 g	418 g
	10		360 g	395 g
2	1	AD	385 g	325 g
	2		397 g	309 g
	3		360 g	390 g
	4		380 g	310 g
	5		354 g	362 g
	6		364 g	336 g
	7		374 g	357 g
	8		308 g	391 g
	9		360 g	346 g
3	1	SFN	318 g	390 g
	2		302 g	423 g
	3		381 g	368 g
	4		300 g	396 g
	5		354 g	359 g
	6		329 g	367 g
	7		352 g	323 g
	8		385 g	308 g
	9		347 g	354 g
4	1	AD	287 g	321 g
	2		297 g	336 g
	3		287 g	313 g
	4		384 g	379 g
	5		391 g	363 g
	6		400 g	410 g
	7		317 g	317 g
	8		359 g	365 g
	9		301 g	303 g

Anexo3. Evolução do peso dos animais na fase de pré-indução apenas colite (Subgrupos 5-8).

SUBGRUPO	ANIMAL	CONTEÚDO DA GAVAGEM	PESO (15/04/19)	PESO (23/04/19)
5	1	SFN	381 g	392 g
	2		370 g	384 g
	3		382 g	393 g
	4		353 g	365 g
	5		374 g	394 g
	6		370 g	370 g
	7		374 g	406 g
	8		376 g	412 g
	9		355 g	389 g
	10		318 g	341 g
6	1	AD	350 g	387 g
	2		347 g	413 g
	3		375 g	396 g
	4		340 g	387 g
	5		326 g	400 g
	6		290 g	353 g
	7		345 g	402 g
	8		342 g	392 g
	9		333 g	387 g
7	1	SFN	374 g	381 g
	2		397 g	364 g
	3		393 g	390 g
	4		372 g	334 g
	5		381 g	330 g
	6		336 g	310 g
	7		402 g	349 g
	8		375 g	359 g
	9		389 g	325 g
8	1	AD	324 g	338 g
	2		369 g	397 g
	3		356 g	370 g
	4		386 g	395 g
	5		335 g	344 g
	6		382 g	408 g
	7		427 g	449 g
	8		383 g	395 g
	9		438 g	462 g

Anexo 4. Evolução do peso dos animais na fase de indução do câncer colorretal associado acolite (Subgrupo 1-4).

SUB GRUPO	ANIMAL	CONTEÚDO DA GAVAGEM	PESO (29/04/19)	PESO (04/05/19)	PESO (12/05/19)	PESO (17/05/19)	PESO (23/05/19)	PESO (28/05/19)
1	1	SFN	312 g	253 g	368 g	382 g	393 g	395 g
	2		405 g	434 g	450 g	463 g	471 g	478 g
	3		267 g	303 g	305 g	311 g	318 g	324 g
	4		373 g	398 g	418 g	424 g	436 g	448 g
	5		365 g	389 g	407 g	415 g	420 g	430 g
	6		387 g	408 g	417 g	421 g	433 g	434 g
	7		397 g	452 g	453 g	470 g	430 g	467 g
	8		Óbito	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito
	9		414 g	467 g	451 g	464 g	466 g	474 g
	10		375 g	422 g	413 g	425 g	480 g	432 g
2	1	AD	319 g	361 g	351 g	362 g	369 g	370 g
	2		302 g	322 g	330 g	341 g	358 g	360 g
	3		293 g	342 g	327 g	345 g	347 g	352 g
	4		294 g	359 g	443 g	356 g	365 g	374 g
	5		332 g	407 g	385 g	394 g	396 g	402 g
	6		314 g	381 g	357 g	368 g	373 g	380 g
	7		360 g	411 g	390 g	400 g	405 g	405 g
	8		376 g	446 g	413 g	428 g	437 g	442 g
	9		340 g	408 g	376 g	386 g	393 g	396 g
3	1	SFN	372 g	431 g	409 g	420 g	426 g	417 g
	2		410 g	478 g	457 g	464 g	475 g	438 g
	3		364 g	427 g	404 g	409 g	410 g	411 g
	4		387 g	461 g	438 g	448 g	456 g	466 g
	5		369 g	427 g	399 g	412 g	428 g	429 g
	6		378 g	440 g	413 g	418 g	428 g	431 g
	7		328 g	388 g	363 g	364 g	371 g	374 g
	8		292 g	349 g	327 g	336 g	335 g	339 g
	9		356 g	415 g	386 g	387 g	401 g	408 g
4	1	AD	324 g	378 g	352 g	365 g	375 g	381 g
	2		341 g	396 g	370 g	378 g	386 g	389 g
	3		311 g	372 g	342 g	349 g	361 g	361 g
	4		363 g	440 g	418 g	437 g	438 g	458 g
	5		383 g	447 g	428 g	435 g	444 g	451 g
	6		420 g	485 g	460 g	464 g	470 g	484 g
	7		304 g	382 g	354 g	356 g	363 g	374 g
	8		361 g	421 g	390 g	399 g	405 g	405 g
	9		300 g	366 g	341 g	344 g	344 g	361 g

Anexo 5. Evolução do peso dos animais na fase de indução apenas colite (Subgrupo 5-8).

SUB GRUPO	ANIMAL	CONTEÚDO DA GAVAGEM	PESO (29/04/19)	PESO (04/05/19)	PESO (12/05/19)	PESO (17/05/19)	PESO (23/05/19)	PESO (28/05/19)
5	1	SFN	405 g	435 g	415 g	423 g	473 g	435 g
	2		390 g	421 g	447 g	451 g	458 g	458 g
	3		403 g	420 g	424 g	434 g	454 g	459 g
	4		379 g	396 g	414 g	414 g	424 g	430 g
	5		408 g	426 g	429 g	432 g	446 g	452 g
	6		376 g	421 g	411 g	425 g	434 g	433 g
	7		416 g	436 g	440 g	432 g	445 g	443 g
	8		418 g	440 g	447 g	458 g	465 g	462 g
	9		404 g	424 g	448 g	452 g	470 g	457 g
	10		349 g	362 g	375 g	372 g	381 g	382 g
6	1	AD	393 g	408 g	409 g	424 g	438 g	440 g
	2		422 g	451 g	457 g	473 g	474 g	493 g
	3		410 g	439 g	438 g	460 g	462 g	465 g
	4		401 g	419 g	430 g	440 g	445 g	449 g
	5		404 g	423 g	423 g	422 g	436 g	440 g
	6		363 g	381 g	386 g	395 g	403 g	409 g
	7		422 g	446 g	454 g	464 g	474 g	481 g
	8		402 g	423 g	423 g	438 g	444 g	451 g
	9		400 g	413 g	427 g	437 g	440 g	454 g
7	1	SFN	391 g	404 g	421 g	422 g	437 g	448 g
	2		379 g	389 g	404 g	407 g	419 g	418 g
	3		393 g	403 g	431 g	439 g	445 g	450 g
	4		348 g	376 g	385 g	396 g	405 g	419 g
	5		339 g	356 g	372 g	371 g	381 g	387 g
	6		317 g	345 g	356 g	358 g	368 g	377 g
	7		364 g	385 g	398 g	400 g	412 g	424 g
	8		380 g	393 g	398 g	406 g	420 g	419 g
	9		340 g	359 g	358 g	361 g	368 g	372 g
8	1	AD	349 g	368 g	376 g	377 g	379 g	383 g
	2		405 g	429 g	434 g	438 g	449 g	459 g
	3		384 g	408 g	407 g	413 g	419 g	428 g
	4		411 g	433 g	432 g	442 g	445 g	450 g
	5		357 g	375 g	383 g	381 g	391 g	401 g
	6		415 g	444 g	451 g	468 g	465 g	473 g
	7		460 g	475 g	484 g	487 g	495 g	499 g
	8		405 g	424 g	432 g	441 g	439 g	449 g
	9		470 g	490 g	489 g	492 g	502 g	509 g

Anexo 6. Evolução do peso dos animais na fase de pós-indução do câncer colorretal associado a colite (Subgrupo 1-4).

SUB GRUPO	ANIMAL	CONTEÚDO DA GAVAGEM	PESO (03/06/19)	PESO (10/06/19)	PESO (17/06/19)	PESO (21/06/19)	PESO (26/06/19)
1	1	SFN	415 g	422 g	429 g	419 g	438 g
	2		490 g	507 g	510 g	497 g	529 g
	3		340 g	340 g	347 g	340 g	350 g
	4		450 g	464 g	468 g	452 g	472 g
	5		433 g	450 g	463 g	453 g	469 g
	6		440 g	457 g	449 g	450 g	455 g
	7		485 g	500 g	497 g	488 g	516 g
	8		Óbito	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito
	9		480 g	485 g	458 g	475 g	507 g
	10		450 g	455 g	487 g	450 g	465 g
2	1	AD	375 g	383 g	390 g	376 g	398 g
	2		375 g	376 g	360 g	347 g	358 g
	3		365 g	380 g	389 g	368 g	393 g
	4		380 g	399 g	401 g	408 g	407 g
	5		415 g	418 g	431 g	440 g	439 g
	6		380 g	393 g	392 g	407 g	397 g
	7		415 g	419 g	424 g	477 g	431 g
	8		450 g	455 g	460 g	469 g	479 g
	9		410 g	415 g	422 g	430 g	434 g
3	1	SFN	435 g	445 g	448 g	448 g	461 g
	2		490 g	495 g	502 g	496 g	514 g
	3		415 g	420 g	423 g	423 g	443 g
	4		480 g	490 g	496 g	490 g	516 g
	5		452 g	466 g	473 g	460 g	495 g
	6		450 g	449 g	459 g	444 g	465 g
	7		Óbito em 30/05/19	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito
	8		350 g	360 g	362 g	403 g	366 g
	9		410 g	420 g	409 g	424 g	422 g
4	1	AD	390 g	400 g	403 g	408 g	417 g
	2		400 g	405 g	409 g	412 g	413 g
	3		380 g	380 g	388 g	396 g	402 g
	4		470 g	476 g	489 g	486 g	496 g
	5		465 g	475 g	482 g	496 g	493 g
	6		485 g	490 g	494 g	484 g	495 g
	7		380 g	389 g	389 g	398 g	400 g
	8		420 g	430 g	423 g	440 g	436 g
	9		370 g	375 g	375 g	387 g	388 g

Anexo 7. Evolução do peso dos animais na fase de pós-indução apenas de colite (Subgrupo 5-8).

SUB GRUPO	ANIMAL	CONTEÚDO DA GAVAGEM	PESO (03/06/19)	PESO (10/06/19)	PESO (17/06/19)	PESO (21/06/19)	PESO (26/06/19)
5	1	SFN	450 g	457 g	501 g	498 g	510 g
	2		480 g	463 g	464 g	452 g	478 g
	3		462 g	475 g	473 g	472 g	488 g
	4		440 g	447 g	456 g	467 g	476 g
	5		455 g	458 g	464 g	476 g	467 g
	6		460 g	462 g	470 g	481 g	472 g
	7		458 g	473 g	475 g	460 g	483 g
	8		468 g	484 g	492 g	468 g	497 g
	9		467 g	482 g	492 g	472 g	498 g
	10		385 g	410 g	417 g	387 g	415 g
6	1	AD	455 g	460 g	462 g	469 g	485 g
	2		502 g	520 g	516 g	512 g	528 g
	3		480 g	495 g	491 g	499 g	506 g
	4		448 g	470 g	462 g	470 g	476 g
	5		440 g	452 g	456 g	452 g	465 g
	6		419 g	429 g	432 g	434 g	448 g
	7		492 g	495 g	498 g	515 g	519 g
	8		460 g	460 g	473 g	470 g	482 g
	9		455 g	467 g	469 g	477 g	486 g
7	1	SFN	452 g	463 g	476 g	468 g	472 g
	2		435 g	440 g	459 g	457 g	458 g
	3		460 g	470 g	471 g	481 g	487 g
	4		415 g	423 g	431 g	432 g	434 g
	5		393 g	396 g	399 g	410 g	407 g
	6		384 g	395 g	395 g	401 g	404 g
	7		428 g	444 g	448 g	431 g	456 g
	8		424 g	439 g	447 g	440 g	459 g
	9		476 g	392 g	395 g	381 g	395 g
8	1	AD	395 g	405 g	401 g	391 g	417 g
	2		462 g	474 g	470 g	441 g	486 g
	3		429 g	440 g	440 g	423 g	456 g
	4		469 g	470 g	478 g	461 g	489 g
	5		405 g	408 g	409 g	410 g	422 g
	6		390 g	505 g	510 g	513 g	525 g
	7		505 g	520 g	517 g	513 g	538 g
	8		447 g	470 g	470 g	478 g	482 g
	9		522 g	518 g	535 g	537 g	538 g

Anexo 8. Foto e bula do sulforafano utilizado nessa pesquisa.



Size:
120c

Serving Size:
1 Capsule

Servings Per Container:
30 (small) or 120 (large)

Directions:
Take one capsule per day or as directed by your healthcare practitioner.

BrocColinate® Extra Strength, 120c

Powerful Detoxifier Featuring Patented Sulforaphane Glucosinolate*

BrocColinate® Extra Strength contains high amounts of the heavily studied and multi-patented ingredient Sulforaphane Glucosinolate, found in broccoli and broccoli sprouts. For the first time in the industry, NuMedica® is bringing you this science-based ingredient in the highest potency available. BrocColinate® Extra Strength contains Sulforaphane Glucosinolate 10%, which yields 60 mg of Sulforaphane Glucosinolate per capsule, double the potency of other available formulas.

Sulforaphane Glucosinolate has been identified by many scientists as the strongest known inducer of Phase II enzymes.* These Phase II enzymes have the ability to neutralize the chemical toxins, electrophiles and free radicals.* Sulforaphane Glucosinolate activates the body's natural enzymes for detoxification and those with antioxidant properties, protecting cells from harmful free radical damage.*

One Capsule Contains:

Broccoli (Brassica oleracea L. italica) (seed) extract	600 mg
Providing:	
Sulforaphane Glucosinolate†	60 mg

Other Ingredients: Hydroxypropyl methylcellulose (vegetable capsule).

Does Not Contain: Milk, eggs, fish, shellfish, tree nuts, peanuts, wheat, soy.

†Sulforaphane Glucosinolate is produced under U.S. patents: 5,725,895; 5,968,567; 6,177,122; 6,242,018; 7,303,770 and patents pending.