



ISIS ROSA MARTINS DA SILVA

AVALIAÇÃO DO USO DA BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA
ENDOLUMINAL ASSOCIADA A AGENTES DE CONTRASTE NO
DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO TERAPÊUTICO EM NEOPLASIA
DE CÓLON EXPERIMENTAL.

DUQUE DE CAXIAS

2017

ISIS ROSA MARTINS DA SILVA

AVALIAÇÃO DO USO DA BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA
ENDOLUMINAL ASSOCIADA A AGENTES DE CONTRASTE NO
DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO TERAPÊUTICO EM NEOPLASIA
DE CÓLON EXPERIMENTAL.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biomedicina Translacional
(BIOTRANS), como parte dos requisitos parciais para
a obtenção do Título de Mestre em Biomedicina
Translacional.

Orientadora: Dra. Rossana Soletti

DUQUE DE CAXIAS

2017

S586a Silva, Isis Rosa Martins da.
Avaliação do uso da biomicroscopia ultrassônica endoluminal associada a agentes de contraste no diagnóstico e acompanhamento terapêutico em neoplasia de cólon experimental / Isis Rosa Martins da Silva. – Duque de Caxias, 2017.
72 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado em Biomedicina Translacional) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, 2017.
“Orientadora: Profa. Dra. Rossana Soletti”.
Bibliografia: f. 63-69

1. Biomedicina Translacional. 2. Câncer corretal. 3. Colonoscopia.
4. Genes. 5. Sistema nervoso - Doenças. 6. Sistema nervoso - Degeneração.
I. Soletti, Rossana. II. Laks, Jerson. III. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”. III. Título.

CDD – 610

“Este trabalho reflete a opinião do autor, e não necessariamente a da Associação Fluminense de Educação – AFE. Autorizo a difusão deste trabalho.”

ISIS ROSA MARTINS DA SILVA

AVALIAÇÃO DO USO DA BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA ENDOLUMINAL ASSOCIADA A AGENTES DE CONTRASTE NO DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO TERAPÊUTICO NA NEOPLASIA DE CÓLON EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS), como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de Mestre em Biomedicina Translacional.

Aprovada em 24 de Maio de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Rossana Coila Soletti
UEZO
Orientadora



Prof.ª Dr.ª Cláudia Maria Pereira
UNIGRANRIO
Presidente



Prof.ª Dr.ª Carina Maciel da Silva Boghossian
UNIGRANRIO



Prof.ª Dr.ª Monica Soldan
UFRJ



Prof.ª Virginia Genelhu de Abreu
Coordenadora Geral do Programa
Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – BIOTRANS

Aos meus pais, pelo apoio a vida inteira, sempre me incentivando a crescer e não permitindo que eu desistisse durante as dificuldades, que não foram poucas; por apontarem meus erros, me ensinando a ser melhor como pessoa; por apostarem sempre em mim; por ser meu exemplo, meu orgulho, meu porto seguro; pelo suporte financeiro e emocional e pelo amor incondicional. Sem vocês eu não teria chegado nem na metade do caminho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me capacitar, me dar discernimento e forças para concluir mais essa etapa.

Aos meus queridos pais, José Inácio e Andréa Rosa, por todo apoio, toda dedicação, conselhos, compreensão, por ser meu porto seguro, pelo amor sem limites, por terem me dado força para superar todas as dificuldades, me ensinando a nunca desistir dos meus sonhos e a enfrentar meus problemas e por me conduzirem até aqui, me ensinando a ser a pessoa que me tornei.

Ao meu amado irmão, Daniel Martins, pela torcida, por todo amor, carinho e amizade.

Ao meu noivo, Ari, por toda compreensão, incentivo, paciência e por todo amor.

Aos meus queridos avós, pelo amor, carinho, colo e apoio.

À minha família e aos meus amigos, pelos momentos de descontração, ajudando no alívio da tensão.

À minha orientadora Rossana Soletti, pela orientação, paciência, por toda ajuda, por acreditar no meu potencial, por todo conhecimento transmitido, pelo respeito, pela inspiração e por todo incentivo que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

Ao Professor Vivaldo Moura Neto, por ter me acolhido em seu laboratório assim que concluí a graduação, por ter me apresentado o programa BIOTRANS e incentivado minha inscrição. Serei eternamente grata.

Ao Professor Dr. Daniel Machado, por ter me inserido na área de pesquisa ao me orientar na iniciação científica durante toda minha graduação e pela atual colaboração no desenvolvimento das análises histológicas.

Ao Dr. João Machado, por toda ajuda na parte experimental e nas análises de imagens, que foram fundamentais, e por me receber tão bem em seu laboratório.

Ao Msc. Rodrigo, por todo auxílio prestado durante as análises por BMUe, que foi

fundamental para conclusão deste trabalho, e pela disponibilidade em ajudar sempre.

À Dra Helena Borges, por ter cedido os animais utilizados no presente estudo e por me receber tão bem em seu laboratório, permitindo realizar grande parte experimental nele.

Ao Pós-Doc João Marcos, pela parceria, pelo aprendizado transmitido, por toda ajuda para realização de todo o protocolo de indução tumoral e posterior tratamento e acompanhamento dos animais, fundamental para execução do projeto.

Ao BIOTRANS, por ter possibilitado a realização do meu projeto, realizando assim um sonho, e a todo o corpo docente pelo enorme conhecimento transmitido.

À CAPES, pelo suporte financeiro que me possibilitou concluir o projeto.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas.”

Claude Lévi-Strauss

RESUMO

O câncer colorretal figura entre o segundo e o terceiro tipo de câncer mais comum no Brasil e no mundo. Apesar das elevadas taxas de incidência e mortalidade do câncer colorretal, a maioria das mortes poderia ser evitada com um diagnóstico precoce, refletindo a necessidade da busca constante por ferramentas de maior eficácia para a detecção precoce e para o acompanhamento das terapias clínicas, além de ferramentas que auxiliem a pesquisa experimental sobre os mecanismos de tumorigênese do cólon e sobre novas abordagens terapêuticas. Neste contexto a Biomicroscopia ultrassônica endoluminal (BMUe), instrumentação de ultrassom de alta frequência, se mostrou promissora na detecção de pequenas lesões do cólon, como neoplasias em estágio inicial. Ainda, o ultrassom de alta frequência pode ser aliado ao uso de agentes de contraste ultrassônicos (ACU), injetados por via intravenosa, com intuito de melhor delinear a morfologia e vasculatura do tecido analisado. Dado que o surgimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese) é necessário para o desenvolvimento do câncer de cólon, o uso de métodos de imagem capazes de avaliar a progressão da angiogênese colônica pode auxiliar no acompanhamento da tumorigênese e do efeito das terapias anti-tumorais. Sendo assim, neste estudo avaliou-se a capacidade da BMUe, na ausência e na presença de ACU, em acompanhar o desenvolvimento do câncer de cólon, bem como a resposta ao tratamento anti-tumoral (bevacizumabe, um anticorpo monoclonal anti-VEGF, e 5-fluorouracil, um quimioterápico de primeira linha) em modelo experimental de câncer de cólon associado à inflamação, em camundongos. Os resultados indicaram que o emprego dos ACU na BMUe auxilia na visualização da morfologia de lesões do cólon, melhorando a delimitação de infiltrados linfóides e de áreas tumorais planas. Através da quantificação da intensidade de pixels na imagem de ultrassom, observou-se que o uso de ACU induziu um aumento da ecogenicidade no grupo de animais que não sofreu tratamento anti-tumoral. Em animais tratados com bevacizumabe, a intensidade de sinal ultrassônico não foi aumentada após o uso do ACU, sugerindo efeito anti-angiogênico. Os resultados reforçam a capacidade da BMUe como uma importante ferramenta para auxiliar no diagnóstico e acompanhamento de lesões do cólon. Conclui-se que a BMUe pode atuar de maneira complementar à colonoscopia, auxiliando a detecção de lesões

tumorais planas e a visualização da integridade tecidual das camadas subjacentes à mucosa. Esse estudo ressalta que o uso de agentes de contraste ultrassônicos ajuda na melhor visualização da morfologia e vasculatura tumoral pela BMUe, evidenciando a aplicabilidade dessa técnica em análises experimentais e em possíveis estudos clínicos futuros.

Palavras-chave: Câncer de cólon; angiogênese; agentes de contraste ultrassônicos; ultrassom de alta frequência; bevacizumabe.

ABSTRACT

Colorectal cancer is among the second and third most common cancer worldwide and in Brazil. Despite the high rates of colorectal cancer incidence and mortality, most deaths could be avoided by early screening diagnosis, reflecting the need for more efficient tools for clinical early detection and follow-up, and also for experimental research on molecular mechanisms of colon tumorigenesis and new targets and therapeutic approaches. In this context, endoluminal Ultrasound Biomicroscopy (eUBM), a high frequency ultrasound instrumentation, has shown to be a promising tool for detection of small colonic lesions, such as early stage tumors. Furthermore, high frequency ultrasound can be combined with intravenous ultrasound contrast agents (UCA) in order to better delineate tissue's morphology and vasculature. Since the development of colon cancer depends on angiogenesis (formation of new blood vessels), the use of imaging methods capable of assessing the progression of colonic angiogenesis may help the analysis of tumorigenesis processes and the chemotherapy follow up. Thus, in this study we evaluated the ability of eUBM, with or without UCA, to monitor the development of colon cancer, as well as the response to anti-tumoral treatment (bevacizumab, an anti-VEGF monoclonal antibody, and 5- Fluorouracil, a first-line chemotherapy) in a mouse model of inflammation-associated colon cancer. The results indicated that UCA-associated eUBM improves visualization of colonic lesion's morphology, delimiting lymphoid infiltrates and *flat* tumoral areas. By quantifying pixel intensity in the ultrasound images, we observed that UCA injection induced an increase in tumoral echogenicity in animals not treated with anti-tumoral therapy. In animals treated with bevacizumab, ultrasound signal intensity was not increased after UCA injection, corroborating its anti-angiogenic effect. These results reinforce eUBM's ability as an important tool to help diagnosis and follow-up of colon lesions. We concluded that eUBM could be used as a colonoscopy-complementary tool, helping to detect *flat* tumoral lesions and to visualize tissue integrity underlying the mucosa layer. This study emphasizes that UCA improves the visualization of tumoral morphology and vasculature by eUBM, suggesting a possible application of this technique in experimental research and clinical studies.

Keywords: colorectal cancer; angiogenesis; ultrasound contrast agents; high

frequency ultrasound; bevacizumab.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1. Anatomia do intestino grosso. | 19 |
| Figura 2. Histologia do intestino grosso..... | 20 |
| Figura 3. Patogênese do câncer de cólon. | 23 |
| Figura 4. Esquema da indução e de tratamento de tumores de cólon em camundongos | 38 |
| Figura 5. Esquema de análises dos grupos GA1, GA2 e GA3.. | 39 |
| Figura 6. Esquema do sistema eletromecânico de varredura da BMUe..... | 41 |
| Figura 7. Análise das alterações na mucosa do cólon por colonoscopia. | 46 |
| Figura 8. Análise do cólon dos animais por BMUe ao fim do terceiro ciclo de DSS. | 47 |
| Figura 9. Acompanhamento da progressão tumoral de um mesmo animal (tratado com BVZ) por BMUe concomitante à colonoscopia.. | 49 |
| Figura 10. Análises por BMUe, concomitante à colonoscopia, com e sem ACU em um mesmo animal (tratado com 5-FU) | 50 |
| Figura 11. Análises do mesmo animal (tratado com bevacizumabe e 5-FU) por BMUe associada e não associada a ACU e concomitante à colonoscopia. | 51 |
| Figura 12. Análises por BMUe associada e não associada a ACU e concomitante à colonoscopia num mesmo animal (sem tratamento). | 52 |
| Figura 13. Análise do cólon por BMUe sem e com o uso de ACU | 53 |
| Figura 14. Análises do mesmo animal (tratado com BVZ) por BMUe associada e não associado a ACU e concomitante à colonoscopia. | 53 |
| Figura 15. Box plot com os achados referentes à diferença entre níveis de intensidade de pixel nas imagens de tumores entre os animais com e sem a presença de ACU e para os grupos CTE, BVZ (bevacizumabe) e BVZ+5-FU (bevacizumabe + 5- | |

| | |
|---|----|
| fluorouracila)..... | 55 |
| Figura 16. Análise imuno-histoquímica da angiogênese tumoral.. .. | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU – 5-Fluorouracila

ACU – Agente de Contraste Ultrassônico

ADR – *Adenoma Detection Rates*

APC – *Polipose Adenomatosa Coli*

BMUe – Biomicroscopia Ultrassônica Endoluminal

BVZ – Bevacizumabe

CD34 – *Cluster of Differentiation 34*

Cox-2 - *Ciclooxigenase-2*

DCC - *Deleted in Colon Cancer*

DPC4 - *Smad4*

EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor*

FDA – *Food and Drug Administration*

FLK-1 – *Receptor For Vascular Endothelial Growth Factor -1*

KRAS - *Kirsten Rat sarcoma virus homolog*

PA - Pólipos Adenomatosos

TP53 – *Tumor Protein P53*

VEGFR – *Vascular Endotelial Growth Factor Receptor*

SUMARIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 19 |
| 2.1. ANATOMIA E MORFOLOGIA DO CÓLON | 19 |
| 2.2. DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS CÔNICAS | 21 |
| 2.3. CÂNCER DE CÓLON | 22 |
| 2.3.1. <i>Etiologia</i> | 22 |
| 2.3.2. <i>Angiogênese</i> | 24 |
| 2.3.3. <i>Epidemiologia</i> | 26 |
| 2.3.4. <i>Aspectos clínicos</i> | 27 |
| 2.3.5. <i>Diagnóstico</i> | 28 |
| 2.3.6. <i>Tratamento</i> | 31 |
| 2.4. BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA ENDOLUMINAL (BMUE) | 33 |
| 2.5. AGENTES DE CONTRASTE ULTRASSÔNICOS (ACU) | 33 |
| 3. JUSTIFICATIVA | 35 |
| 4. OBJETIVO GERAL | 36 |
| 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 37 |
| 6. METODOLOGIA | 38 |
| 6.1. MODELO EXPERIMENTAL DO CÂNCER DE CÓLON: PROTOCOLO AOM/DSS | 38 |
| 6.2. BMUE | 40 |
| 6.3. ANÁLISES HISTOLÓGICAS | 42 |
| 6.4. ANÁLISES IMUNO-HISTOQUÍMICAS | 43 |
| 6.5. ANÁLISE DE IMAGENS | 44 |
| 6.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 44 |
| 7. RESULTADOS | 45 |
| 7.1. IMPLEMENTAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL | 45 |
| 7.2. AVALIAÇÃO DA TUMORIGÊNESE DO CÓLON, NOS DIFERENTES GRUPOS, ATRAVÉS DA BMUE ISOLADA E APÓS A ASSOCIAÇÃO À ACU | 48 |
| 7.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO ANTI-TUMORAL ATRAVÉS DA BMUE ASSOCIADA À ACU | 55 |
| 7.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO ANTI-TUMORAL ATRAVÉS DE BMUE COM E SEM ACU | 57 |
| 8. DISCUSSÃO | 58 |
| 9. CONCLUSÃO | 62 |
| REFERÊNCIAS | 63 |
| APÊNDICE A – ACOMPANHAMENTO PESO CORPORAL DOS ANIMAIS | 70 |
| APÊNDICE B – DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO DA PROGRESSÃO DE TUMORES POR BMUE E COLONOSCOPIA | 71 |
| ANEXO A – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO CEUA | 72 |

1. INTRODUÇÃO

O câncer de cólon (CC) apresenta elevadas taxas de incidência e mortalidade, acometendo tanto pessoas de países desenvolvidos, quanto pessoas de países em desenvolvimento (Torre et al, 2015; Ferlay et al, 2015). Seu desenvolvimento pode se dar de maneira esporádica ou pode estar associado com inflamação, sendo descrito por alguns autores o aumento do risco de desenvolvimento do CC em portadores de doenças intestinais crônicas como a Doença de Chron (DC) e Retocolite Ulcerativa (RCU) (Kraus & Arber, 2009; Terzic et al, 2010). Em ambas as formas de desenvolvimento, o tumor pode se originar a partir da malignização de Pólipos Adenomatosos (PA).

A progressão do tumor é dependente do aporte de nutrientes e oxigênio, sendo estes fornecidos pelo desenvolvimento de uma nova vasculatura (Forsythe et al., 1996). O desenvolvimento de novos vasos ocorre a partir de vasos pré-existentes locais, fenômeno denominado angiogênese. A angiogênese é estimulada por diversos fatores, sendo o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular – A (VEGF-A) o fator mais estudado com relação a angiogênese tumoral, e o Receptor tipo 2 de VEGF (VEGFR2) mais relacionado com os eventos mitogênico e vasculares do VEGF (Folkman, 1971; George et al., 2001; Jubb et al., 2006).

Estudos apontam para a diminuição das taxas de incidência e de mortalidade por CC, que pode ser atribuída ao aumento da remoção de pólipos pré-cancerígenos, salientando a importância da detecção precoce (Winawer et al., 1993; Hosokawa et al, 2003; Lansdorp-Vogelaar et al, 2009). Assim, diversos estudos vêm buscando novas ferramentas que auxiliem no rastreamento de lesões pré-tumorais e tumorais do câncer de cólon, visando obter uma melhor taxa de resposta ao tratamento do paciente. A necessidade da constante busca por ferramentas de maior eficácia para a detecção precoce do CC levou ao desenvolvimento de uma ferramenta auxiliar, que utiliza ultrassom de alta frequência, a Biomicroscopia Ultrassônica endoluminal (BMUe). Tal ferramenta tem se mostrado promissora no do diagnóstico de lesões inflamatórias e tumorais de cólon em modelos experimentais (Alves et al., 2011; Alves et al., 2012; Soletti et al., 2013).

No presente trabalho buscou-se avaliar a capacidade da BMUe isolada e

aliada ao uso de Agentes de Contraste Ultrassônicos (ACU) em acompanhar o desenvolvimento dos tumores, bem como a resposta ao tratamento anti-tumoral do CC.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Anatomia e morfologia do cólon

Cólon, reto e ânus constituem o intestino grosso, órgão cujas funções incluem absorção (água, íons e vitaminas), produção de determinadas vitaminas (por bactérias) e a formação e expulsão das fezes (Tortora & Derrickson, 2010). O cólon é dividido, segundo suas características, em ceco ou ascendente, transverso, descendente e sigmóide. Os segmentos ascendente e transverso são considerados cólon proximal, enquanto os segmentos descendente e sigmóide são considerados cólon distal (Figura 1). Cada segmento do cólon possui veias e artérias próprias que realizam o suprimento sanguíneo, sendo acompanhados por vasos linfáticos e linfonodos (Campos, 1994; Tortora & Derrickson, 2010).

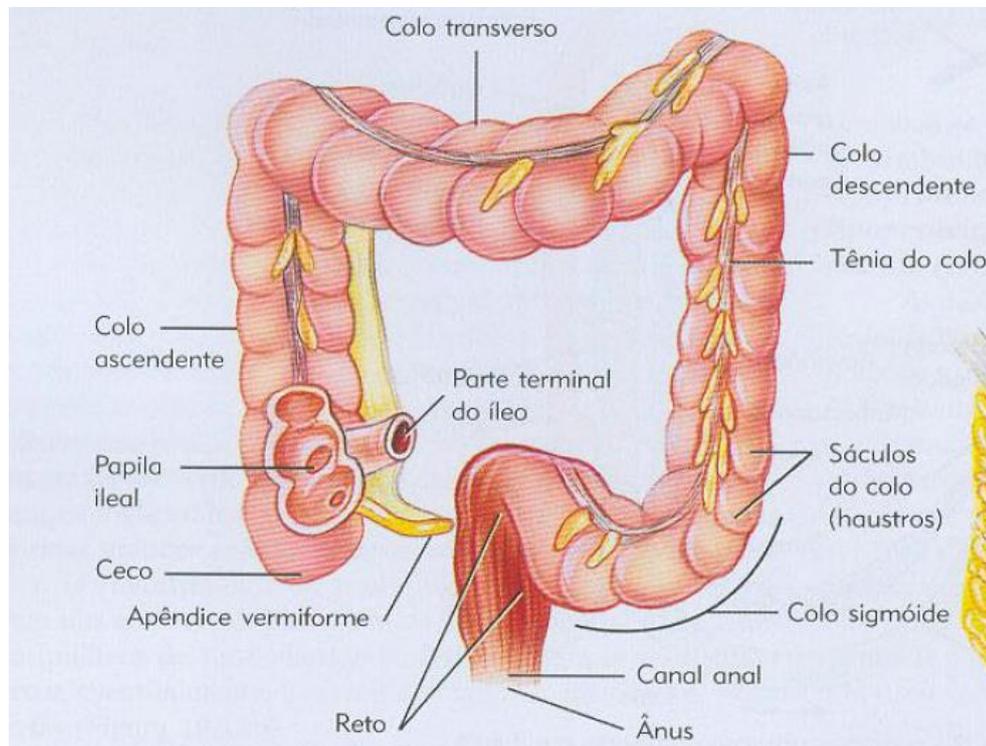
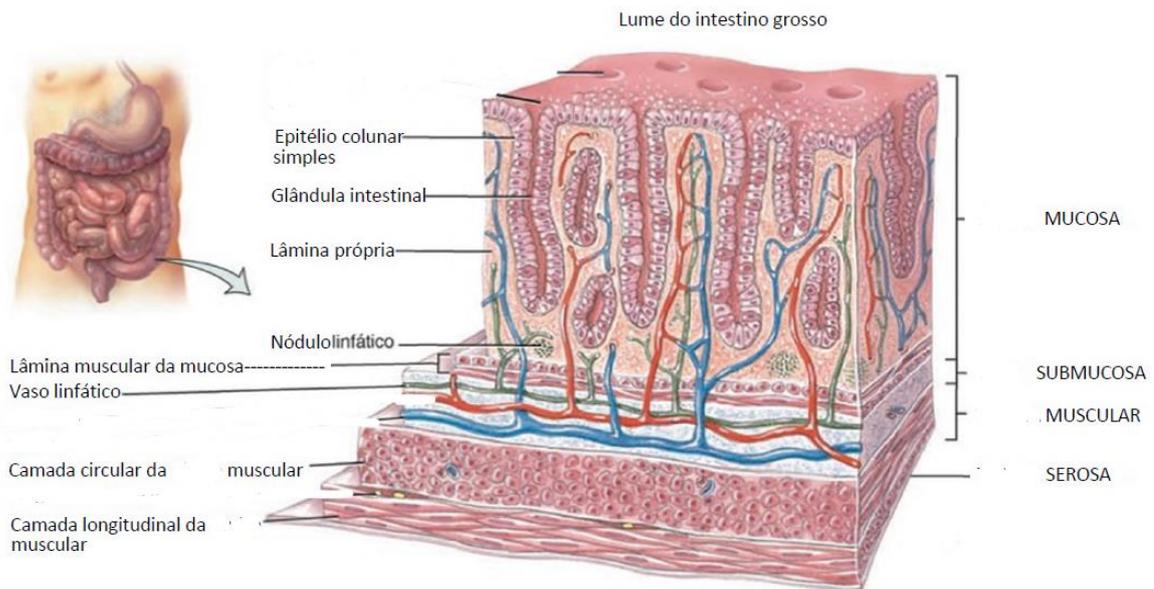


Figura 1. Anatomia do intestino grosso. TORTORA, Gerard J. Corpo Humano: Fundamentos de Anatomia e Fisiologia. 4ed. Artmed

O cólon é subdividido em quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (Figura 2). A camada mucosa é o revestimento interno, sendo composta de epitélio, tecido conjuntivo (lâmina própria) e músculo liso; a submucosa, constituída por tecido conjuntivo, atua unindo as camadas mucosa e muscular; a camada muscular é formada por músculo liso em duas camadas (camada interna de fibras circulares e uma camada externa de fibras longitudinais); e a camada serosa é a mais externa, voltada para a cavidade abdominopélvica, composta por tecido conjuntivo areolar e epitélio pavimentoso simples (mesotélio) (Tortora; Derrickson, 2010).

O epitélio da mucosa intestinal é colunar simples selado por junções oclusivas; e atua na absorção e na secreção (células exócrinas). A lâmina própria contém muitos vasos sanguíneos e linfáticos, importantes para o transporte dos nutrientes absorvidos no intestino até outros tecidos do corpo (Tortora & Derrickson, 2010).



(a) Vista tridimensional das camadas do intestino grosso

Figura 2. Histologia do intestino grosso. Tortora & Derrickson, 2010.

O intestino desempenha importantes funções, incluindo a capacidade do epitélio intestinal em atuar como uma barreira entre os ambientes interno e externo. Assim, um bom funcionamento do intestino é essencial para a saúde (Camilleri, et al. 2012). Alterações homeostáticas, infecções e inflamações afetam seu funcionamento podendo levar ao desenvolvimento de neoplasias, e até mesmo ao

desenvolvimento de tumores. Dentre essas alterações, as doenças inflamatórias intestinais crônicas – Retocolite ulcerativa e Doença de Crohn - têm sido apontadas, por dados da literatura, como fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de cólon (associado à inflamação) em pessoas portadoras das mesmas (Askling et al., 2001; Zisman & Rubin, 2008; Beaugerie & Itzkowitz, 2015).

2.2. Doenças inflamatórias intestinais crônicas

As doenças inflamatórias intestinais crônicas, Retocolite Ulcerativa (RCU) e a Doença de Crohn (DC), aumentam o risco do desenvolvimento do câncer de cólon em portadores das mesmas, conforme já citado. A RCU é uma inflamação intestinal que normalmente se inicia no ânus e reto, onde a maior atividade inflamatória é encontrada. Com a progressão da doença, todo o cólon pode ser afetado, de maneira contínua e simétrica (Guindi & Riddell, 2004; Rogler, 2014).

A DC afeta todas as camadas do cólon e pode ocorrer em qualquer região do trato gastrointestinal com áreas de mucosa normal intercaladas por áreas inflamadas. Ambas apresentam características clínicas, que se sobrepõem, o que dificulta a distinção entre elas, não havendo testes diagnósticos específicos (Silverberg et al, 2007).

Em estudo realizado por Dahlhamer e colaboradores, estimou-se que no ano de 2015, mais de três milhões de adultos tenham sido diagnosticados com doença inflamatória intestinal. Foi encontrada maior prevalência entre adultos dos seguintes grupos sócio-demográficos: hispânicos; brancos não-hispânicos; adultos com baixo nível escolar; desempregados; nascidos nos EUA; vivendo na pobreza ou em áreas suburbanas e em adultos a partir dos 45 anos (Dahlhamer et al., 2016).

O câncer de cólon associado à inflamação parece apresentar fisiopatologia diferente do câncer de cólon esporádico, não apresentando a sequência adenoma-carcinoma deste último. Com a inflamação crônica recrutando citocinas e quimiocinas, ocorrem alterações nos padrões de proliferação, sobrevivência e

migração das células epiteliais, contribuindo assim para o desenvolvimento de displasia multifocal de baixo e alto grau, podendo então culminar no desenvolvimento do câncer de cólon (Rogler, 2014; Dulai et al., 2016).

2.3. Câncer de cólon

O câncer de cólon (CC) pode afetar todas as regiões do intestino grosso. Tumores no cólon proximal acometem mais frequentemente mulheres e pacientes mais idosos, enquanto os no cólon distal são mais comuns em homens e pacientes de meia idade (Matanoski et al, 2006; Nawa et al, 2008).

O desenvolvimento do câncer de cólon pode ser esporádico, decorrente de instabilidades genéticas (por exemplo, devido à polipose adenomatosa familiar, na qual ocorre mutação do gene APC, *Polipose Adenomatosa Coli*), ou associado à inflamações crônicas intestinais, como já citado (Kraus & Arber, 2009; Terzic et al, 2010).

2.3.1. Etiologia

O câncer de cólon esporádico possui etiologia mal definida e representa 80% dos casos, podendo ser decorrente de alterações genéticas hereditárias ou por causas ambientais (exposição a agentes mutagênicos) (Kraus & Arber, 2009). O desenvolvimento associado à inflamação também apresenta alterações genéticas, compartilhando algumas mutações contidas no tipo esporádico, apresentando diferenças no tempo e na frequência de algumas alterações na sequência displasia-carcinoma. Beaugerie & Itzkowitz (2015) esquematizaram as mutações ocorridas em ambos os tipos de câncer de cólon ao longo de seu desenvolvimento (Figura 3) (Beaugerie & Itzkowitz, 2015).

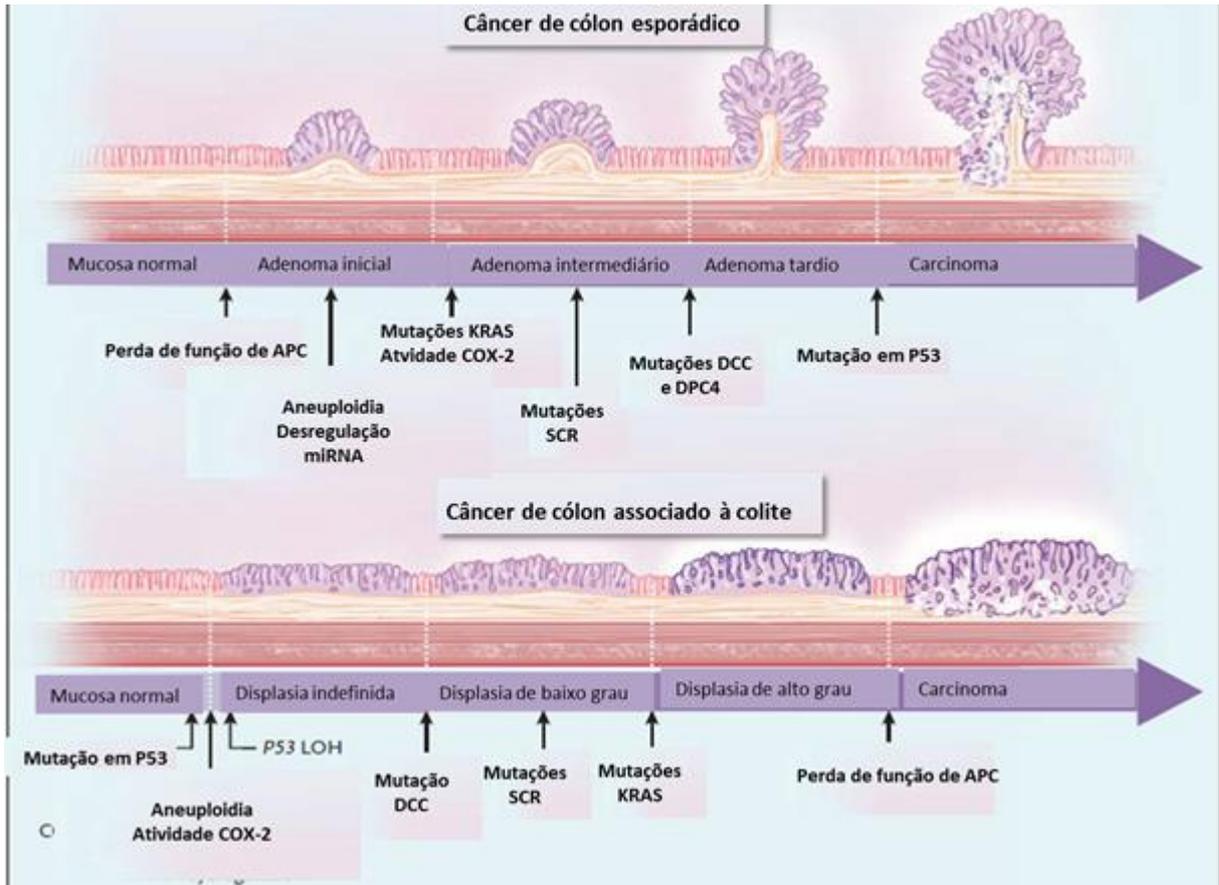


Figura 3. Patogênese do câncer de cólon. O câncer de cólon é causado pelo acúmulo de mutações em oncogenes e genes supressores tumorais. Algumas alterações moleculares são similares durante a sequência adenoma-carcinoma e no câncer de cólon associado à colite, porém ocorrem em ordem diferente. No câncer de cólon esporádico, inicialmente ocorre a perda de função do gene APC (*Polipose Adenomatosa Coli*), seguida por aneuploidia e desregulação de micro RNAs (miRNA) e por mutações nos oncogenes KRAS (Kirsten Rat sarcoma vírus homolog) e SRC; ativação de Cox-2 (Ciclooxigenase-2), e mutações nos genes supressores tumorais DCC (*Deleted in Colon Cancer*), DPC4 (*Smad4*) e TP53. Adaptado de Beaugerie & Itzkowitz, 2015.

Tanto o câncer de cólon esporádico, quanto o associado à inflamação podem se originar de pólipos adenomatosos (PA). Os pólipos intestinais resultam do crescimento anormal das células da mucosa intestinal, originando uma protuberância no lúmen intestinal, sendo considerados tumores benignos que ocasionalmente podem sofrer malignização (Adachim et al., 1991). Devido à distinção morfológica e aos padrões diferentes de crescimento e diferenciação celular, os pólipos foram divididos, num primeiro momento, em dois subtipos histológicos: pólipos hiperplásicos e adenomas (pólipos adenomatosos).

Os pólipos hiperplásicos são pequenas lesões mais frequentemente localizadas no cólon distal e no reto, que apresentam um padrão de células epiteliais serrilhadas, devido à inserção de células colunares absortivas, frequentemente hiperdistendidas. Pólipos adenomatosos são compostos por células absortivas colunares não diferenciadas, com hiper cromatismo nuclear e sem uma zona replicativa restrita, ocorrendo mitose em todo o comprimento da cripta (Longacre & Fenoglio-Preiser, 1990). Ocorre simultaneamente um aumento no número de mitoses e uma redução da morte celular (apoptose), levando a um desequilíbrio proliferativo na região da cripta. O pólipo é originado quando o crescimento anormal das células epiteliais, devido ao desequilíbrio proliferativo, progride ao ponto de atingir a superfície da mucosa (Pinho, 2006).

Outro subtipo de pólipo existente é o serrilhado, que compartilha características morfológicas dos epitélios adenomatoso e hiperplásico, possuindo hiperplasia mista/adenomatosa (Longacre & Fenoglio-Preiser, 1990). Inicialmente acreditava-se que os pólipos hiperplásicos e os serrilhados não tinham potencial para sofrer malignização, ao contrário dos pólipos adenomatosos, reconhecidos como precursores do câncer de cólon (Leonard et al., 2011). Porém, estudos recentes apontam que os pólipos serrilhados podem também ser precursores do câncer colorretal (Kapsoritakis, 2001; Leonard et al., 2011; Hazewinkel et al., 2013; Michalopoulos & Tzathas, 2013).

2.3.2. Angiogênese

Depois de estabelecido o tumor, é necessário que oxigênio e nutrientes cheguem até as células tumorais para que ocorra progressão do tumor inicial. Com a proliferação acentuada das células tumorais, o nível de oxigênio se torna insuficiente, principalmente no centro do tumor, resultando em apoptose e necrose dessas células. Um possível mecanismo utilizado pelas células tumorais como alternativa para sobrevivência no estado de hipóxia foi testado por Forsythe e colaboradores (1996), e os resultados obtidos reforçaram a hipótese de que o fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1) atua como mediador da ativação da transcrição do

Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) em células tumorais (Forsythe et al., 1996). Dados obtidos por Bottaro e Liotta (2003) sugerem que as próprias células, da área em hipóxia, atuam na secreção de fatores estimuladores angiogênicos (Bottaro & Liotta, 2003).

Segundo afirmado por Folkman, o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos na área tumoral ocorre a partir de vasos locais pré-existentes, fenômeno denominado angiogênese (Folkman, 1971). O principal mediador da angiogênese é o VEGF, responsável por iniciar o processo de neovascularização, tendo grande importância na sobrevivência dos tumores e subsequente metástase (Folkman, 1971; Warren et al., 1995).

Existem diferentes isoformas de VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E. Dentre essas isoformas, a mais estudada com relação à angiogênese é o VEGF-A, um potente e específico mitógeno que estimula a cascata de eventos necessários para que a angiogênese se desenvolva (George et al., 2001; Nishida et al., 2006; Jubb et al., 2006). O VEGF liga-se a três tipos de receptores transmembranares tirosina-quinase: Receptor de VEGF tipo 1 (VEGFR-1/Flt-1), receptor de VEGF tipo 2 (VEGFR-2/FLK-1/KDR) e VEGFR-3 (Flt-4) (Gerber & Ferrara, 2005). O VEGFR-2 é considerado o responsável por mediar a maior parte dos efeitos mitogênicos e vasculares do VEGF.

Estudos têm demonstrado o importante papel da angiogênese no estabelecimento e progressão do câncer de cólon, além do desenvolvimento de metástases, fator que pode ser relacionado com um mau prognóstico para os pacientes (Takahashi et al, 1995; Ellis et al., 2000; George et al., 2001; Nishida et al., 2006; Jubb et al., 2006). As metástases ocorrem quando células tumorais se desprendem do tumor sólido, entram na circulação sanguínea (podendo fazê-lo indiretamente por meio do sistema linfático) e dirigem-se à outros órgãos. Ao chegar em outro órgão, elas proliferam, tendo seu crescimento sustentado pelo desenvolvimento de novos vasos, e o processo tumoral ocorre novamente e

Resultados obtidos por Takahashi e colaboradores (1995) evidenciaram, por meio da análise da expressão de VEGF e seu receptor (FLK-1), que o aumento da densidade de vasos está correlacionado com o desenvolvimento de metástases em

tumores do cólon (Takahashi et al., 1995). Posteriormente, a relação entre a angiogênese tumoral e o desfecho do paciente com câncer de cólon foi novamente avaliada por Tanigawa e colaboradores (1997), cujos resultados demonstraram forte associação entre a sobrevida global e a vascularização tumoral (Tanigawa et al., 1997). Lee e colaboradores estudaram o papel do VEGF na transformação neoplásica do cólon de humanos, encontrando correlação positiva entre a carcinogênese no cólon com a proporção e a intensidade da expressão de VEGF nos tecidos tumorais (Lee et al., 2000).

Cao e colaboradores avaliaram o impacto de HIF-1a e VEGF no câncer colorretal, encontrando associação significativa destes com a fase do tumor, linfonodos e metástases hepáticas, assim como uma correlação positiva entre ambos os fatores (Cao et al., 2009).

2.3.3. Epidemiologia

A incidência mundial do câncer de cólon apresenta padrões semelhantes entre homens e mulheres, com aproximadamente 55% dos casos ocorrendo em regiões mais desenvolvidas (com alto índice de desenvolvimento econômico – IDH), como Austrália. Embora os países desenvolvidos tenham alta incidência de casos de câncer de cólon, estes apresentam menor taxa de mortalidade quando comparados aos países menos desenvolvidos, evidenciando que apesar da menor incidência de casos, há um pior prognóstico nestes (Torre et al, 2015; Ferlay et al, 2015).

A partir de meados da década de 1980, houve uma diminuição das taxas de incidência de câncer de cólon, e essa diminuição foi acentuada nos anos de 2008 a 2010, chegando a declinar 4% ao ano, em ambos os sexos. Essa diminuição é atribuída, em grande parte, ao aumento do rastreamento do câncer de cólon, com a detecção e remoção dos pólipos pré-cancerígenos (ACS, 2014).

Dados do *American Cancer Society* apontam para um aumento da incidência e da mortalidade do câncer de cólon com o aumento da idade, sendo a média do

diagnóstico de 69 anos e 73 anos, respectivamente em homens e mulheres, e 93% dos óbitos ocorrendo a partir dos 50 anos (ACS, 2014). Porém em estudo de coorte realizado por Siegel e colaboradores (2017), foi demonstrado um declínio da incidência em grupos de adultos com idade igual ou superior a 55 anos e um aumento da incidência do câncer de cólon em adultos com idade entre 20 a 39 anos, nos anos de 1980 até 2013, nos Estados Unidos (Siegel et al., 2017).

Segundo dados do *American Cancer Society*, o câncer de cólon será o terceiro mais comum entre homens e mulheres, com 95.520 novos casos estimados para o ano de 2017. Com um total de 50.260 mortes estimadas para 2017, o câncer colorretal (estimativa realizada em conjunto para o câncer de cólon e de reto) é a segunda causa de morte por câncer em homens e a terceira em mulheres (ACS, 2017). Devido à mudanças na aceitação do rastreamento e na prevalência dos fatores de risco, as taxas de incidência do câncer de cólon tem declinado nas últimas décadas (Siegel et al., 2017; ACS, 2017).

No Brasil, em 2016, foram estimados 34.280 novos casos de câncer de cólon, sendo 16.660 em homens e 17620 em mulheres. Entre os tumores mais frequentes para homens, no país, o câncer de cólon ocupa a segunda posição na região Sudeste, a terceira posição nas regiões Sul e Centro-Oeste e a quarta nas regiões Norte e Nordeste. Nas mulheres, o câncer de cólon é o segundo mais frequente nas regiões Sul e Sudeste, e o terceiro nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (INCA, 2015).

Devido às elevadas taxas de incidência e mortalidade e por afetar indivíduos tanto de países com elevado índice de desenvolvimento humano (IDH), quanto os de países com baixo IDH, o câncer de cólon é considerado um problema de saúde pública de escala mundial (ACS, 2014).

2.3.4. Aspectos clínicos

O câncer de cólon em estágio inicial muitas vezes não tem sintomas, porém

alguns casos podem apresentar uma sintomatologia que inclui: perda de peso involuntária; diminuição do apetite; fezes escuras; sangue nas fezes; constipação ou diarreia que dure mais do que alguns dias; desejo de evacuar mesmo quando o intestino se encontra vazio; mudança na forma das fezes; cólicas ou desconforto na parte inferior do abdômen; sangramento no reto e até mesmo anemia em consequência da perda de sangue, levando a quadros de fadiga excessiva e fraqueza (ACS, 2011).

Alguns hábitos são apontados pela literatura como fatores de risco, como o consumo excessivo de álcool; consumo de carne vermelha e carne processada; inatividade física; fumo e obesidade. A ingestão de fibras, o consumo de produtos lácteos, frutas e vegetais, assim como a prática de exercícios físicos, são fatores protetores para o desenvolvimento do câncer de cólon (ACS, 2014).

Apesar do alto índice de mortalidade, o câncer de cólon é tratável e a sobrevida dos portadores é alta dependendo do estágio em que a doença é detectada (Selby et al., 1992; Levin et al., 2008). Quanto mais cedo o câncer for diagnosticado e tratado, maior a sobrevida do indivíduo.

2.3.5. Diagnóstico

A *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) preconiza as seguintes metodologias para rastreio do câncer de cólon: sigmoidoscopia flexível, análise de sangue fecal, teste de DNA fecal, colonoscopia e a colonoscopia virtual por tomografia computadorizada. A sigmoidoscopia flexível é uma ferramenta de imagem utilizada para visualizar o reto e terço inferior do cólon (cólon sigmóide e porção distal do cólon descendente). A análise de sangue fecal e o teste de DNA fecal são realizados por meio da utilização de um kit para detectar sangue e alterações genéticas (mutações em APC, TP53 - *Tumor Protein P53*, KRAS) nas fezes, achados sugestivos de câncer de cólon, mas que necessitam de confirmação por colonoscopia (Ahlquist et al., 2000; Dong et al., 2001; Traverso et al., 2002).

Padrão-ouro para o diagnóstico do câncer de cólon, a colonoscopia é uma ferramenta de imagem que visualiza a mucosa de todo o cólon - o que a difere da sigmoidoscopia flexível, em que somente o cólon sigmoide é visualizado. Durante a colonoscopia são retiradas biópsias para posterior análise histopatológica. É considerada a ferramenta com maior precisão para detecção do câncer de cólon, podendo ser complementada por algumas técnicas de imagem, como a tomografia computadorizada. A colonoscopia, embora seja o padrão-ouro na detecção do câncer de cólon, tem a limitação de fornecer apenas imagens da superfície da mucosa intestinal, de modo que lesões planas e de cor não marcante podem não ser detectadas (Baxter et al., 2009; Hazewinkel et al., 2013). A taxa de falha na detecção pólipos, em estudo realizado por Guo-chun e colaboradores, chegou a 27,7% (11,5% para pólipos avançados). Os pólipos que apresentam maior taxa de falha na detecção foram os diminutos, menores de 5mm (55,2%), e os planos ou *flat* (75,9%). Quanto a localização, a maior parte dos pólipos perdidos se encontravam no reto (21,8%), cólon sigmoide (41,4%) e cólon transverso (17,2%) (Guo-chun et al., 2014).

Estudos têm documentado variações na taxa de detecção de adenomas (ADR, *adenoma detection rates*) entre os endoscopistas, o que pode estar associado às técnicas utilizadas na retirada do colonoscópio e ao tempo de retirada, sendo o tempo mínimo de seis minutos associado a uma maior detecção de neoplasias (Imperiale et al., 2009). Ainda, a colonoscopia pode não detectar lesões próximas das dobras haustrais e das válvulas retais (Leufkens et al., 2010). Essa variação na detecção de adenomas e as falhas na detecção de lesões durante a colonoscopia, evidenciam a necessidade de aprimoramento da técnica de colonoscopia, com a busca de técnicas que auxiliem no diagnóstico. Com este intuito, novas ferramentas têm sido investigadas mostrando-se promissoras. Dentre essas técnicas estão a Tomografia de Coerência Óptica (TCO) (Hariri et al., 2006), a Cromoendoscopia e a Ressonância Magnética por Imagem (RMI).

A TCO é uma ferramenta que permite a criação de imagens de cortes transversais do cólon, delineando as camadas mucosa e submucosa. Um estudo realizado em modelo animal por Hariri e colaboradores, demonstrou que as imagens obtidas por TCO, em um mesmo animal, apresentaram diferenças consideráveis entre as regiões do cólon com tumores e as regiões saudias (Hariri et al., 2006). A

técnica de cromoendoscopia consiste na instilação de um corante biocompatível na parede do cólon, que realça a superfície da mucosa, permitindo melhor avaliação durante a colonoscopia. Uma meta-análise realizada por Libânio e Azevedo (2016) mostrou que a cromoscopia aumenta potencialmente a detecção de pólipos neoplásicos, principalmente os diminutos. Apesar dos benefícios dessa técnica, a limitação é o aumento do custo e do tempo de duração do exame. (Araújo et al., 2002; Chiu et al., 2007; Libânio & Azevedo, 2016).

A colonografia por tomografia computadorizada (colonoscopia virtual) gera imagens tridimensionais e com ela é possível avaliar os órgãos no abdômen e pélvis, não sendo necessária a realização de ultrassonografia do fígado para avaliação de metástases. Apesar das vantagens, durante a colonoscopia virtual os pacientes são expostos a quantidades potenciais de radiação ionizante, sendo essa uma desvantagem da técnica (Munikrishnan et al., 2003; Wang et al., 2015). A colonografia por ressonância magnética (RM) é um método que analisa o cólon inteiro, de maneira não invasiva. Além de detectar câncer e lesões pré-cancerosas, também é útil para avaliação do estágio da doença e de metástases, assim como a tomografia computadorizada (*Health Quality Ontario*, 2009). A colonografia por RM tem a vantagem de não utilizar radiação ionizante, porém possui custo elevado (Wang et al., 2015). Ambas as técnicas possuem sensibilidade para detecção do câncer colorretal, tendo capacidade para detectar ainda pólipos de tamanho grande (≥ 10 mm) ou médio (6–9 mm), contudo cerca de 20% dos pólipos de tamanho médio podem não ser visualizados (*Health Quality Ontario*, 2009). Embora essas técnicas sejam eficientes ao mostrar mudanças na vascularização da região tumoral antes da alteração de tamanho, elas não são capazes de detectar confiavelmente os pólipos planos e os de tamanho pequeno, menores que 5mm (Munikrishnan et al., 2003; *Health Quality Ontario*, 2009; Wang et al., 2015).

Na técnica de cromoendoscopia, utiliza-se um corante biocompatível durante a colonoscopia, como o índigo carmim, que pode ressaltar a estrutura superficial das lesões epiteliais, facilitando sua visualização e, por conseguinte, auxiliando no rastreio do câncer de cólon. A endoscopia de magnificação também facilita a visualização das lesões, por possibilitar melhor observação das mudanças estruturais e de cor da mucosa. Gono e colaboradores (2004) desenvolveram a imagem de banda estreita (NBI), uma ferramenta capaz de detectar alterações

morfológicas na estrutura microvascular, por meio da utilização de luz de banda estreita, que realça a vasculatura ao ser absorvida e dispersada na mucosa. Estudos sugerem que a precisão diagnóstica de NBI é equivalente à precisão por cromoendoscopia na distinção de lesões neoplásicas das não neoplásicas, e que ambas são superiores à colonoscopia convencional (Machida et al., 2004; Chiu et al., 2007).

A sobrevida dos pacientes com câncer de cólon é dependente do estágio da doença e do diagnóstico precoce, o que possibilita melhores respostas ao tratamento e melhores prognósticos (Winawer et al., 1993; Hosokawa et al, 2003; Lansdorp-Vogelaar et al, 2009).

2.3.6. Tratamento

O tratamento de escolha dependerá do tamanho, extensão e localização do tumor, além do estado de saúde geral no qual se encontra o paciente. O tratamento primário é a retirada cirúrgica do tumor, sendo seguida por terapêutica sistêmica (quimioterapia) e/ou radioterapia. Porém há casos em que a quimioterapia ou a radioterapia podem ser realizadas antes da cirurgia, com intuito de reduzir a massa tumoral, facilitando assim a retirada cirúrgica da mesma (Nordlinger et al., 2008).

Inicialmente o tratamento do câncer de cólon era baseado no regime quimioterápico com fluoropirimidinas, associando 5-fluorouracil (5-FU), leucovorina e irinotecano (FOLFIRI) ou fluorouracil, leucovorina e oxaliplatina (FOLFOX) (Cutsem et al., 2012). Atualmente, esses esquemas continuam sendo a base das terapias combinadas.

As opções de terapêutica sistêmica têm progredido significativamente, e um importante avanço trazido por estudos tendo a angiogênese como alvo terapêutico, foi o desenvolvimento novas terapias anti-tumorais como o anticorpo monoclonal anti-VEGF, bevacizumabe, aprovado em 2004 e tendo sido o único agente antiangiogênico aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como primeira

linha do tratamento do câncer colorretal metastático, em associação com regimes de quimioterapia baseados em 5-fluorouracil (Krämer&Lipp, 2007).

Outros anticorpos desenvolvidos foram cetuximabe (2004) e panitumumabe (2006), tendo como alvo o Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR), que está superexpresso em mais de 75% dos pacientes com câncer de cólon (Zanibon, 2016). Cetuximabe é um anticorpo monoclonal que bloqueia especificamente o EGFR, tendo mostrado atividade clinicamente significativa em pacientes com câncer colorretal, quando administrado sozinho ou em combinação com irinotecano (Cunningham et al., 2004). Panitumumabe também é um anticorpo monoclonal que bloqueia com alta afinidade EGFR causando internalização do receptor; mostrando atividade contra o câncer colorretal metastático (Hecht et al., 2007).

Dentre os agentes identificados mais recentemente como eficazes para o tratamento do câncer de cólon, os mais promissores são: *Aflibercept*, proteína recombinante que atua como um receptor solúvel se ligando ao VEGF-A, VEGF-B e PlGF (Fator de crescimento placentário) (Cutsem et al., 2012; Tabernero et al., 2015); regorafenibe, que atua inibindo os receptores VEGFR-1/2/3 e outros fatores de crescimento (Grothey et al., 2013); Tas-102 (Yoshino et al., 2012), uma combinação de um análogo da timidina, a trifluridina, com um inibidor de timidina-fosforilase, o cloridrato tipiracil; e ramucirumabe, um anticorpo monoclonal que se liga ao VEGFR-2 (Tabernero et al., 2015) (Zaniboni, 2016).

Mesmo com toda a evolução dos esquemas terapêuticos do câncer de cólon nas últimas décadas, um diagnóstico precoce é extremamente necessário para que o paciente apresente uma melhor resposta ao tratamento (Sive Droste et al., 2010). Isso reflete a necessidade da constante busca por ferramentas de maior eficácia para a detecção precoce e para o acompanhamento das terapias anti-tumorais, além de novas abordagens terapêuticas.

Nesse contexto, uma ferramenta que utiliza ultrassom de alta frequência tem se mostrado promissora como auxiliar no diagnóstico de lesões inflamatórias e tumorais de cólon em modelos experimentais. A Biomicroscopia Ultrassônica Endoluminal (BMUe), como é denominada, pode ser utilizada combinada à

colonoscopia para uma melhor precisão diagnóstica (Alves et al., 2011; Alves et al., 2012; Soletti et al., 2013).

2.4. Biomicroscopia Ultrassônica Endoluminal (BMUe)

O sistema BMUe é uma ferramenta de ultrassom com resolução que se aproxima da obtida por microscopia óptica panorâmica. Esta resolução é obtida devido à utilização de elevadas frequências ultrassônicas, o que possibilita a identificação de alterações histológicas nos tecidos (Foster et al, 2000).

Resultados preliminares obtidos por nosso grupo têm estabelecido e utilizado a BMUe no diagnóstico de lesões inflamatórias e tumorais do cólon com bons resultados (Alves et al., 2011; Alves et al., 2012; De Britto et al., 2013; Soletti et al., 2013). Sendo assim, a BMUe tem se mostrado uma ferramenta com potencial para auxiliar a colonoscopia no diagnóstico do câncer de cólon.

Ainda, a BMUe pode ser aliada ao uso de agentes de contraste ultrassônicos (ACUs), isolados ou conjugados a moléculas de interesse, com intuito de identificar a expressão de proteínas-alvo no tecido analisado.

2.5. Agentes de Contraste Ultrassônicos (ACU)

Agentes de contraste ultrassônicos (ACU) são microbolhas de gás inerte, estabilizadas por membrana de polímeros ou lipídeos, com diâmetro variando de 0,5-5 μm . Estes agentes são injetados por via intravenosa, usualmente, por onde se dirigem até os tecidos e nestes atuam proporcionando um aumento da ecogenicidade, melhorando a visualização das imagens ultrassônicas (Postema & Gilja, 2011). As microbolhas respondem às alterações de pressão das ondas sonoras, vibrando fortemente em altas frequências, como nas utilizadas no

diagnóstico por ultrassom. É por esse mecanismo que elas tornam os tecidos, nos quais se encontrarem, mais reflexivos (hiperecóticos) que os demais, melhorando as imagens em escala de cinza obtidas pelo ultrassom. Para a realização de exames de imagem, as microbolhas de gás são injetadas via intravenosa, mas não apresentam risco devido ao pequeno volume necessário (Blomley et al, 2001).

Clinicamente, os ACU já são utilizados em cardiologia, para aumento da definição da borda endocárdica, para opacificação da cavidade ventricular, e para aumentar a intensidade dos sinais do fluxo sanguíneo, até um nível detectável em análises por Doppler (Ries et al., 1993; Mulvagh et al., 2000). Outra aplicação importante dos ACU é a detecção de lesões, tumores e até mesmo metástases no fígado (Kim et al., 2000; Blomley et al, 2001; Albrecht et al., 2003). Foi demonstrado em estudos mais recentes, que análises de ultrassom com a utilização dos ACUs permitiu avaliar a resposta precoce ao tratamento anti-angiogênico, nos modelos experimentais de câncer de mama, carcinoma epidermóide e câncer de cólon (Hoyt et al, 2010; Rix et al., 2011; Wang et al., 2015).

Os ACUs podem ainda ser conjugados a compostos biotinizados, dessa maneira ligando-se a um alvo molecular específico, como a proteínas específicas, e podem ser visualizados graças à conjugação com determinados repórteres, possibilitando o emprego do ultrassom para a imagem molecular (Rix et al, 2011).

3. JUSTIFICATIVA

Por ser considerado um problema de saúde pública em escala mundial, afetando a todas as camadas da sociedade, e devido à relação entre o diagnóstico precoce e um bom prognóstico, a busca constante por novas ferramentas de diagnóstico se faz necessária. Nesse contexto, estudos realizados por nosso grupo obtiveram bons resultados no emprego da BMUe no diagnóstico de lesões inflamatórias e tumorais do cólon.

Devido ao potencial demonstrado pela BMUe em auxiliar no diagnóstico do câncer de cólon, a proposta deste trabalho é a avaliação da capacidade desta ferramenta em acompanhar o desenvolvimento e crescimento do câncer de cólon, bem como a resposta ao tratamento anti-tumoral, em modelo experimental. Considerando estudos anteriores que demonstraram a capacidade dos ACUs em visualizar o aumento na intensidade dos sinais de fluxo de sangue, propõe-se avaliar neste estudo a possibilidade de associação de ACUs à BMUe, com a finalidade de obter mais informações acerca da vascularização e morfologia das lesões em desenvolvimento e da resposta ao tratamento anti-tumoral, comparando as imagens obtidas por BMUe isolada e associada a ACUs.

Busca-se assim padronizar essa ferramenta (BMUe associada à ACUs e colonoscopia) para utilização em estudos experimentais que avaliam o desenvolvimento do câncer de cólon e para avaliação precoce das respostas às novas terapias. Além disso, este estudo fornece mais dados sobre a possibilidade de emprego clínico dessa ferramenta no rastreamento de lesões tumorais e pré-tumorais, vislumbrando o possível emprego da BMUe como auxiliar no diagnóstico e acompanhamento clínico do câncer de cólon.

4. OBJETIVO GERAL

Estudar a capacidade da BMUe, com ou sem a presença de agentes de contraste ultrassônicos, em avaliar a tumorigênese e a resposta ao tratamento anti-tumoral no câncer de cólon, em modelo experimental.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar o modelo experimental do câncer de cólon;
- Avaliar o desenvolvimento dos tumores através da BMUe com e sem a presença de agentes de contraste ultrassônicos (ACUs);
- Avaliar as alterações na morfologia e vasculatura dos tumores ao longo do tratamento anti-tumoral, através da BMUe com e sem a presença de ACUs;
- Comparar os resultados obtidos pela BMUe com e sem a presença dos ACUs com as imagens obtidas na colonoscopia, histologia e imuno-histoquímica.

6. METODOLOGIA

6.1. Modelo experimental do câncer de cólon: protocolo AOM/DSS.

No presente estudo, quarenta camundongos machos das cepas suíço (32) e híbridos 129xC57BL6/J (33), com 7 a 8 semanas de idade, foram mantidos em salas de manutenção com ciclo claro e escuro de 12 horas (ciclo claro das 7:00 às 19:00 h) e temperatura climatizada entre 22-24°C. As gaiolas foram abastecidas com água e ração sólida própria. A indução tumoral foi realizada com base no protocolo AOM-DSS (Figura 4) e ocorreu da seguinte maneira: os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p) de azoximetano (AOM, Sigma Aldrich; 12,5 mg/kg); após cinco dias da administração de AOM, os animais passaram por ciclos de alimentação com água contendo o sal Dextran Sulfato de Sódio (DSS), um agente irritante de mucosa que mimetiza o processo de carcinogênese do cólon associada à inflamação. A exposição ao DSS ocorreu em três ciclos, com concentrações decrescentes do sal: no primeiro a concentração foi de 2%, no segundo de 1,5% e no terceiro de 1%. Cada ciclo durou 5 dias, havendo um intervalo de 17 dias entre os mesmos.

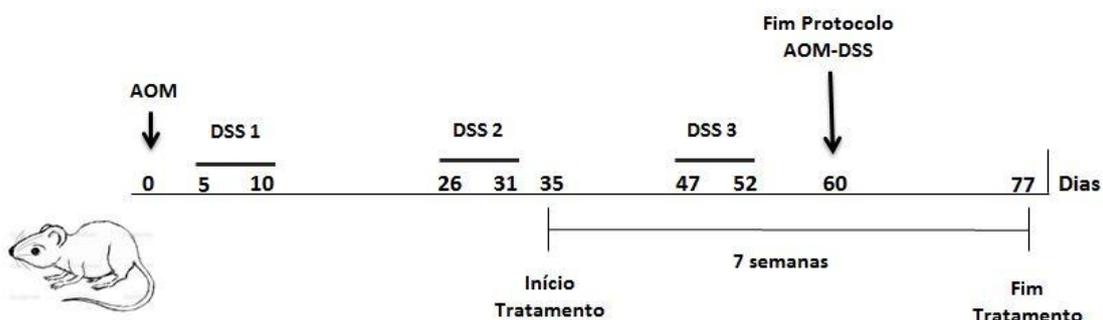


Figura 4. Esquema da indução e de tratamento de tumores de cólon em camundongos. Os animais com 7 a 8 semanas de vida receberam injeção intraperitoneal de AOM (azoximetano) no dia 0; cinco dias após a injeção de AOM os animais receberam o primeiro ciclo de DSS (dextran sulfato de sódio), que durou cinco dias. Após o intervalo de quinze dias teve início o segundo ciclo de DSS, durante do dia 26 até o dia 31, e após novo intervalo de quinze dias o terceiro ciclo teve início, desde o dia 47 até

o dia 52. O protocolo teve a duração de sessenta dias. O tratamento anti-tumoral foi iniciado após o segundo ciclo de DSS, dia 35, e finalizado sete semanas depois, dia 77.

Após o fim do segundo ciclo de DSS (trinta e cinco dias após a injeção de AOM), os animais foram separados em quatro grupos de tratamento: grupo 1 (BVZ, Avastin®, 25 mg/mL, Roche, Basel, *Switzerland*); grupo 2 (5-FU, Aducril®, 50 mg/mL, *Pfizer*); grupo 3 (BVZ+5FU) e grupo 4 (controle). A partir disso, o tratamento anti-tumoral foi iniciado, utilizando-se: BVZ administrado intraperitonealmente nos animais do grupo 1 na dose de 5 mg/kg, seguindo o protocolo já estabelecido (Basbug et al, 2011), durante 7 semanas, com intervalo de 15 dias entre as administrações; 5-FU a 25 mg/kg intraperitoneal, semanalmente, nos animais do grupo 2 durante 7 semanas; injeções intraperitoneais semanais de 5FU (25mg/kg) e quinzenais de BVZ (5mg/kg) nos animais do grupo 3; e injeções intraperitoneais de salina estéril O grupo 4, semanalmente. Durante todo o tratamento anti-tumoral, os animais foram submetidos a análises por BMUe e colonoscopia, semanalmente. Após as 7 semanas de tratamento os animais foram submetidos a óbito para realização das análises histológicas.

Para realizar as análises por colonoscopia concomitantes à BMUe, uma nova divisão foi realizada, de maneira que animais dos quatro grupos de tratamento (BVZ, 5-FU, BVZ + 5FU e controle) fossem avaliados semanalmente durante nove semanas, criando assim três novos grupos de análise: GA1, GA2 e GA3 (Figura 5).

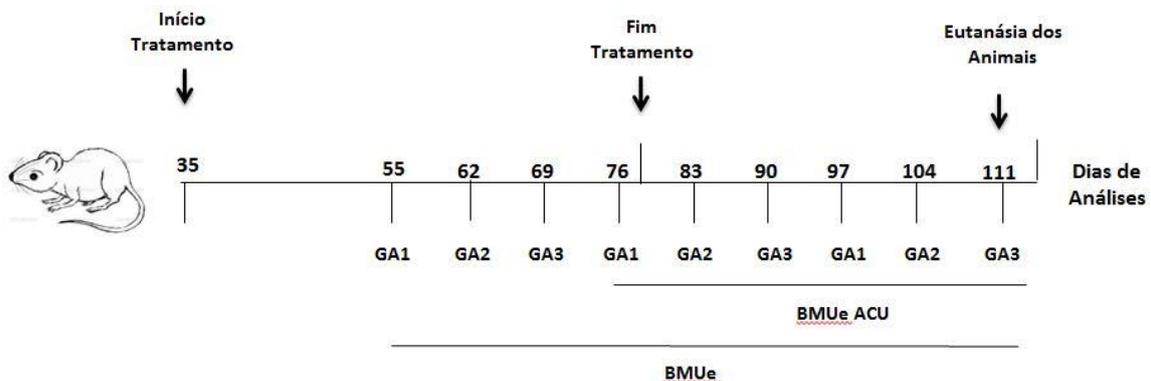


Figura 5. Esquema de análises dos grupos GA1, GA2 e GA3. As análises por colonoscopia concomitantes à BMUe foram realizadas semanalmente. A primeira análise ocorreu vinte dias após o

início do tratamento anti-tumoral, após o fim dos ciclos de DSS; os grupos foram analisados primeiramente apenas com a BMUe isolada e a partir da segunda análise o ACU foi associado à BMUe, sempre concomitante com a colonoscopia. Cada grupo passou por três análises, que foram realizadas com intervalos de uma semana entre os grupos e vinte e um dias de intervalo para o mesmo grupo.

Todos os animais no protocolo de indução tumoral por AOM-DSS tiveram o peso acompanhado ao longo dos ciclos. As pesagens foram realizadas entre o primeiro dia do ciclo até o 13º dia, em cada ciclo (Apêndice A). Animais cuja perda de peso foi igual ou superior a 5% em 24 horas, ou de 15% em 48 horas, foram submetidos a óbito, de acordo com o pré-estabelecido no protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais sob o protocolo DAHEICB 029/17 (Anexo 1).

6.2. BMUe

A obtenção das imagens de ultrassom (US) pelo sistema de BMUe ocorre através da movimentação rotacional do transdutor de US, girando 360 graus em torno do eixo do cateter onde está inserido. Um sistema eletromecânico de varredura acoplado a um codificador óptico emite os sinais de pulso responsáveis por excitar o transdutor (Figura 6). O transdutor proporciona imagens de ultrassom a partir de uma região plana, perpendicular ao eixo do cateter. Faz ainda parte do sistema um microcomputador com placa de aquisição e fontes de alimentação. O sistema de BMUe utilizado neste projeto foi desenvolvido pelo Laboratório de Ultrassom (LUS) do Programa de Engenharia Biomédica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, operando na frequência de 40MHz.

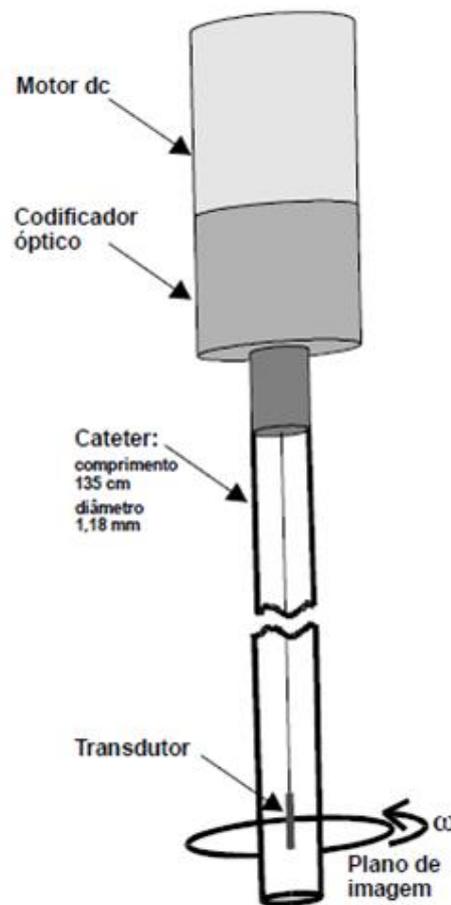


Figura 6. Esquema do sistema eletromecânico de varredura da BMUe. Imagem ilustrando um motor com o eixo acoplado a um codificador óptico e o transdutor de ultrassom, que se movimenta na forma de rotação (360°) em torno do eixo do cateter, gerando imagens planas da parede do cólon. (Alves et al., 2011).

Para os procedimentos de colonoscopia e de BMUe, os animais foram anestesiados com isoflurano a 5% para indução e 1,5% para manutenção da anestesia em um sistema de anestesia inalatória comercial (*EZ-7000, EZ Systems*). Durante todo o procedimento, os animais foram mantidos em cama cirúrgica com controle de temperatura (*T/Pump, Gaymar*). Os animais foram mantidos em decúbito dorsal e o lúmen do cólon foi preenchido com solução salina. O transdutor ultrassônico miniaturizado (*Boston Scientific Corporation*), operando em 40MHz, foi introduzido em um endoscópio flexível (*Richard Wolf*) cujo diâmetro externo é de 2,5mm, através do canal de trabalho. O endoscópio foi introduzido via intra-retal e as imagens simultâneas de BMUe e colonoscopia foram coletadas. As imagens de ultrassom foram adquiridas simultaneamente à colonoscopia, em uma taxa de 3.8

frames por segundo. Durante o procedimento, o cólon foi irrigado com solução fisiológica, injetado através de uma via do cateter, para agir como meio de acoplamento acústico entre o transdutor e a parede do cólon. Em cada procedimento de BMUe associada à colonoscopia, os achados referentes às lesões e ao aspecto da mucosa foram registrados em fichas identificadas com o número de cada animal.

Para conduzir as análises de BMUe associada à agentes de contraste, o ACU comercial Vevo Micro Marker (*Visual Sonics*) foi primeiramente preparado segundo as instruções do fabricante. A administração do ACU foi realizada através de injeção intravenosa (70uL por animal), por meio de um cateter na veia da cauda. Antes das análises utilizando os ACUs, cada animal foi previamente analisado por colonoscopia concomitante à BMUe sem o uso de ACU, e as imagens resultantes foram comparadas entre si. Após as análises do último curso temporal de BMUe, as imagens obtidas com e sem o uso de ACUs foram comparadas com a histologia *post mortem* dos mesmos segmentos do cólon, para determinar se o uso de ACUs foi realmente capaz de fornecer mais informações sobre a morfologia e a vascularização dos tumores.

Assim, sete semanas após o início do tratamento anti-tumoral, os animais passaram pela última análise por BMUe e, ainda sob o efeito da anestesia inalatória, foram submetidos a óbito por deslocamento cervical. Os cólons foram dissecados, limpos, fixados com formaldeído 4% durante 24 horas e processados para análises histológicas e imuno-histoquímicas.

6.3. Análises histológicas

Após a fixação durante 24 horas em formaldeído 4%, os cólons foram fragmentados e emblocados na posição vertical, em parafina, de maneira a se obter cortes no plano transversal. O seccionamento dos blocos foi realizado selecionando apenas uma fatia de 5 µm a cada 200 µm seccionados, que eram desprezados, de

maneira a obter diferentes segmentos do cólon para análise. Em seguida, os cortes foram colocados em lâminas e estas foram coradas por Hematoxilina e Eosina (HE). Os parâmetros histológicos dos cólons (tamanho e número de tumores) de cada animal foram avaliados de modo cego, sem identificar o número e grupo de cada animal para o pesquisador avaliador.

6.4. Análises Imuno-histoquímicas

As análises imuno-histoquímicas foram realizadas utilizando os anticorpos para as proteínas: VEGF, FLK-1 e CD34.

As lâminas contendo biópsias do cólon foram identificadas e submetidas ao processo de desparafinização, constituído por 3 banhos de 15 minutos cada, em concentrações crescentes de etanol (80%, 90% e 100%), seguidos por 3 banhos de xilol (100%), por 15 minutos cada, e um banho de água destilada, por 5 minutos. Após a desparafinização, realizou-se a recuperação antigênica por meio da imersão das lâminas durante 10 minutos em panela de pressão contendo o tampão citrato de sódio (pH 6,0) aquecido. Em seguida as lâminas, já em temperatura ambiente, foram imersas durante 15 minutos em solução de peróxido de hidrogênio, e passaram por dois banhos, de 5 minutos cada, em tampão PBS. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado por meio da incubação das lâminas com albumina bovina sérica (BSA) diluída a 5% em PBS durante 30 minutos, sendo mantidas na câmara úmida durante esse processo. Após, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários VEGF (JH121) na diluição 1:100 (*Santa Cruz Biotechnology*, sc-57496), FLK-1 (A-3) na diluição 1:50 (*Santa Cruz Biotechnology*, sc-6251), e CD34 (ICO115) na diluição 1:50 (*Santa Cruz Biotechnology*, sc-7324), previamente diluídos em PBS/BSA 1%, *overnight* em câmara úmida a 4°C. A etapa seguinte foi a incubação com o anticorpo secundário biotina (LASB2) (*Dako*, K0609), por 30 minutos, e com estreptavidina (LASB2) (*Dako*, K0609) por 30 minutos, ambos em câmara úmida. As lâminas foram coradas com diaminobenzeno (DAB), contra-coradas com hematoxilina e sofreram processo de clarificação com banhos de etanol (90% e 100%) e xilol (100%), por 5 minutos cada. Após, as lâminas foram montadas com

Entelan (*Merck*, HX54866861) para posterior observação em microscópio óptico.

6.5. Análise de imagens

As imagens de BMUe com e sem a presença de ACUs foram analisadas qualitativamente e comparadas com a histologia *post mortem*. Para análise quantitativa da intensidade de pixels, foi utilizado o software *ImageJ* (*National Institutes of Health*). Para isso, foram analisados cinco animais de cada grupo: AOM-DSS + bevacizumabe, AOM-DSS + 5FU, AOM-DSS + bevacizumabe + 5-FU e AOM-DSS. Em cada animal, foram analisadas três imagens representativas obtidas sem a presença de ACUs e três imagens representativas obtidas com a presença de ACUs. As imagens obtidas com e sem a presença de ACUs foram pareadas para que representassem a mesma lesão do cólon. Uma mesma região de interesse (ROI) foi delimitada em uma lesão em cada imagem obtida com e sem a presença de ACU, e a intensidade de pixels foi avaliada como a média da área.

6.6. Análises estatísticas

A análise estatística para avaliar as diferenças entre as médias das intensidades de pixel (com/ACU-sem/ACU) entre os diferentes grupos de animais foi realizada através do uso do teste ANOVA *one-way*, seguida por múltiplas comparações baseadas no teste t (*welch*) com a correção de Bonferroni. O nível de significância estatística considerado foi para $p < 0,05$. O programa estatístico R (versão 2.15.0; *The R Foundation for Statistical Computing*, Viena, Áustria) foi usado na realização dos cálculos.

7. RESULTADOS

7.1. Implementação do modelo experimental

Após o terceiro ciclo de DSS, as análises semanais por colonoscopia concomitante à BMUe foram iniciadas. As imagens obtidas na análise por colonoscopia concomitante com a BMUe após o fim do terceiro ciclo demonstraram alterações na mucosa intestinal. Na colonoscopia foi possível observar aumento da vascularização (Figura 7B) e ulcerações na mucosa do cólon (Figura 7D).

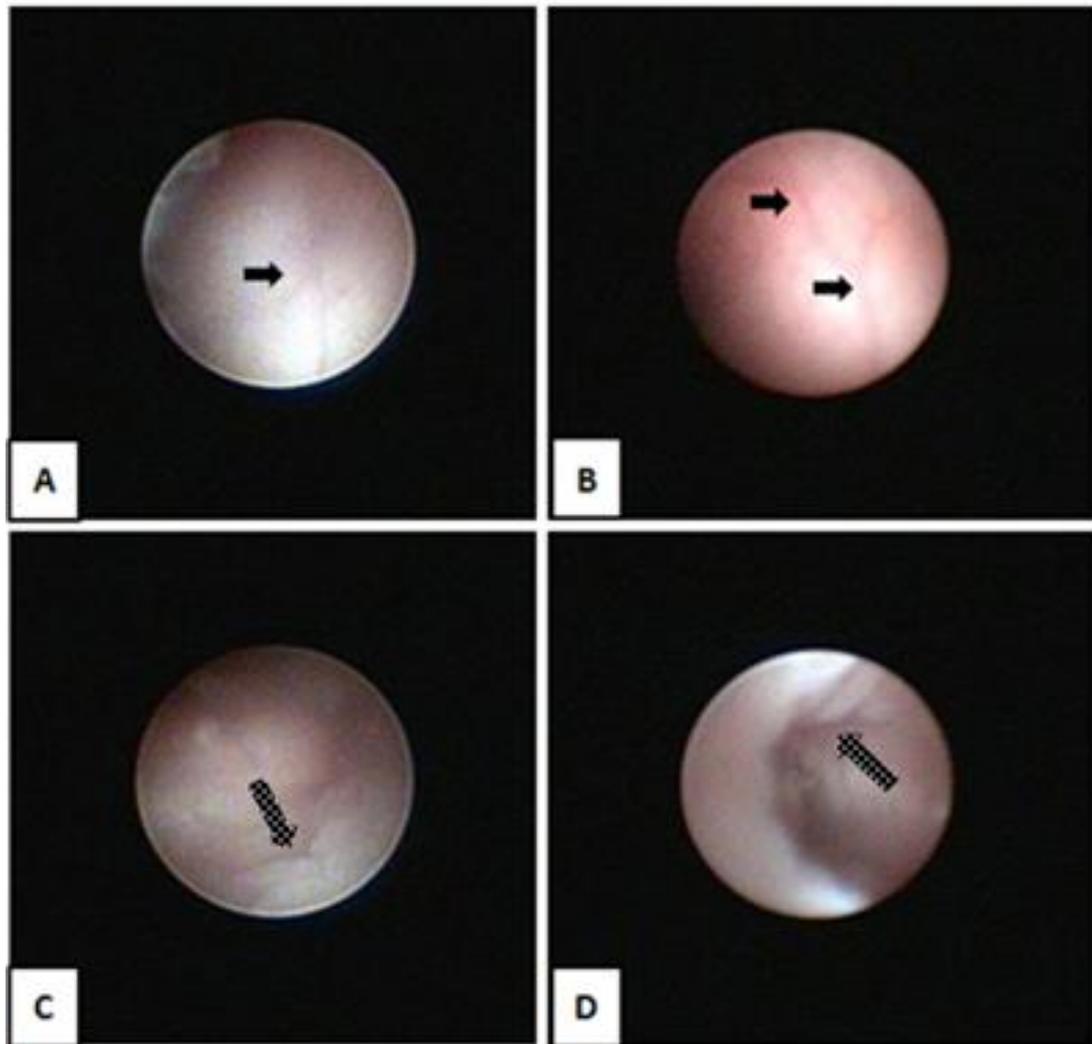


Figura 7. Análise das alterações na mucosa do cólon por colonoscopia. Imagens obtidas por colonoscopia (simultânea à BMUe) do cólon de camundongo sadio (A) e ao fim do terceiro ciclo de DSS (B-D). (A) Imagem representando a mucosa do cólon sem alterações, em um animal sadio não submetido ao protocolo de indução tumoral. (B) Imagens representativas do aumento da vascularização da mucosa ao fim do terceiro ciclo de DSS. As setas pretas indicam os vasos sanguíneos. (C e D) Imagens representativas de ulcerações na mucosa do cólon (setas pontilhadas) ao fim do terceiro ciclo de DSS.

Imagens obtidas pela BMUe revelaram aumento da espessura da mucosa intestinal (Figura 8A), escavações na parede representando as ulcerações visualizadas pela colonoscopia (Figura 8B), correspondente à um infiltrado linfóide (Figura 8C) e uma elevação na camada mucosa, sugerindo a presença de um tumor em estágio inicial (Figura 8D).

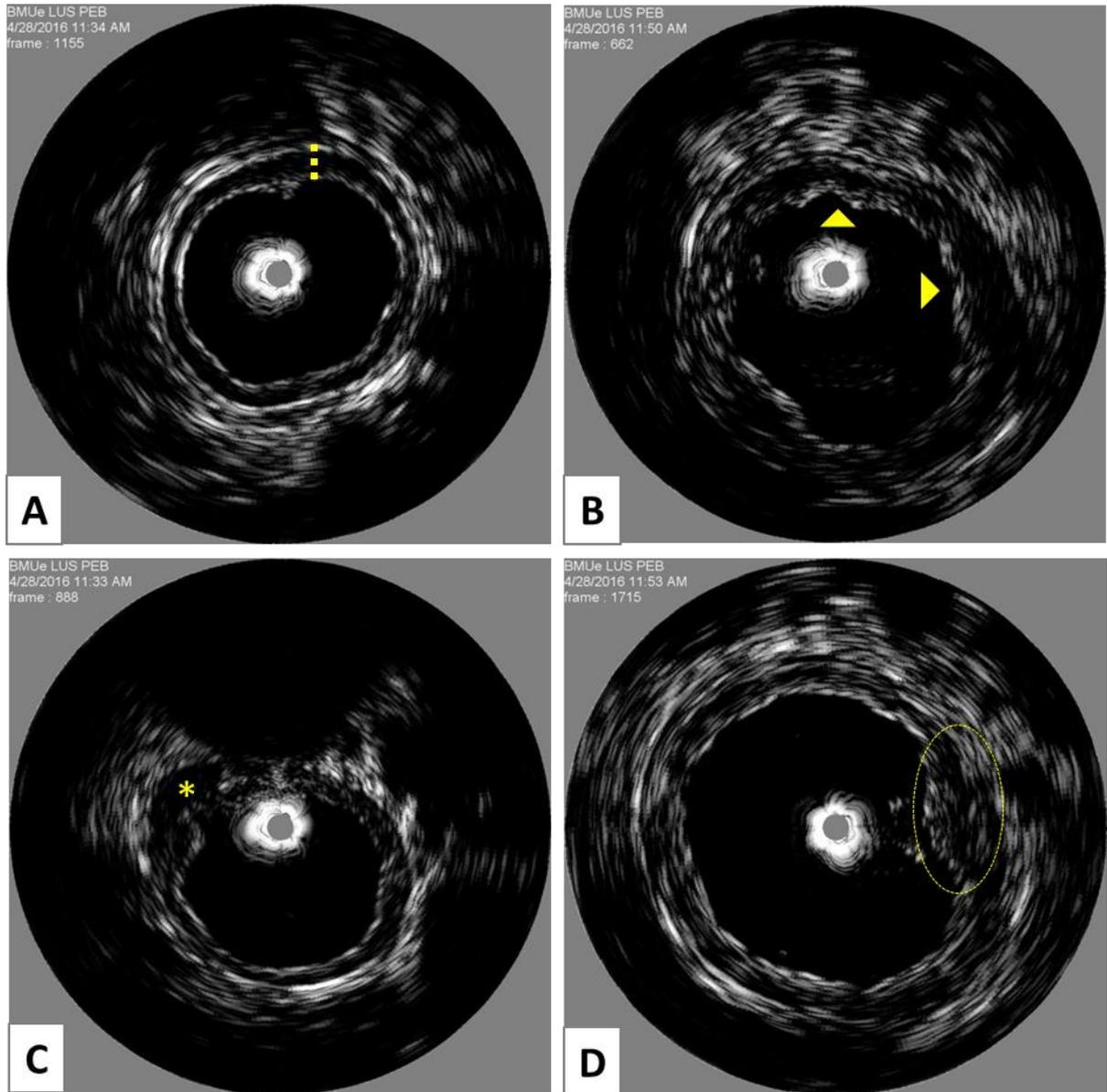


Figura 8. Análise do cólon dos animais por BMUe ao fim do terceiro ciclo de DSS. (A) Imagem representativa de um animal, evidenciando espessamento da camada muscular da mucosa (linha pontilhada). (B) Escavações na parede do cólon foram observadas em alguns animais (cabeças de seta), representando as ulcerações visualizadas pela colonoscopia. (C) Região sugestiva de infiltrado linfóide, área hipoeecóica abaixo da camada mucosa, apontada pelo asterisco (*) e (D) uma elevação na camada mucosa, sugerindo a presença de um tumor.

7.2. Avaliação da tumorigênese do cólon, nos diferentes grupos, através da BMUe isolada e após a associação à ACU

Nas imagens obtidas por colonoscopia foi possível observar a superfície da mucosa com ulcerações e elevações que indicaram a presença de tumor. Um exemplo da análise curso-temporal realizada no presente estudo através de colonoscopia e BMUe em um mesmo animal (tratado com BVZ) está representado na Figura 9. Na primeira avaliação, após o terceiro ciclo de DSS, observaram-se ulcerações e elevações na mucosa (Figura 9A); na segunda análise foi possível visualizar acentuação das ulcerações ao longo da mucosa e a presença de tumor (Figura 9B), que aumentou de tamanho ao longo das análises (Figura 9C). Observou-se um padrão semelhante quando analisadas as imagens obtidas através da BMUe; na primeira análise visualizou-se a presença de ulceração na mucosa e um espessamento da mesma (Figura 9D), na segunda análise foi detectado um tumor bilateral (Figura 9E), e na última análise verificou-se uma grande extensão tumoral, porém de forma não polipóide (Figura 9F), uma informação adicional à registrada pela colonoscopia concomitante do mesmo segmento (Figura 9C).

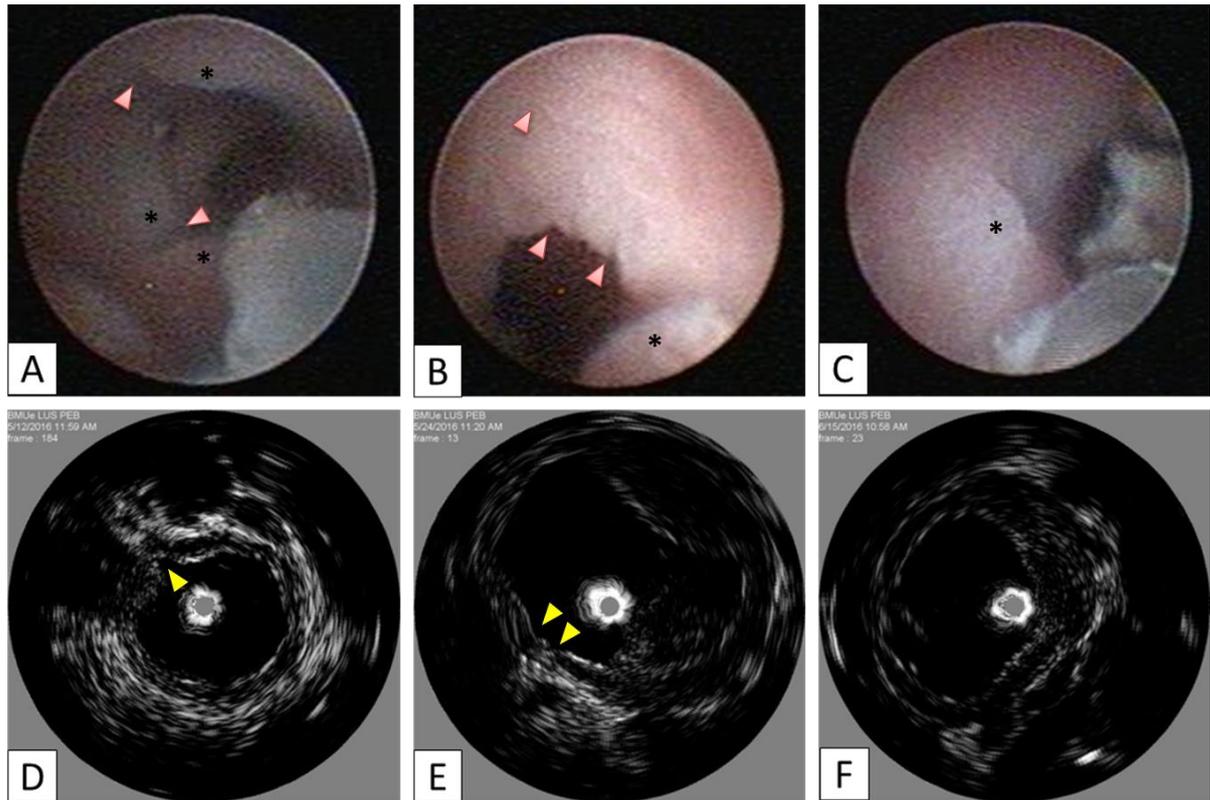


Figura 9. Acompanhamento da progressão tumoral de um mesmo animal (tratado com BVZ) por BMUe concomitante à colonoscopia. (A) Primeira análise colonoscópica exibindo ulcerações (setas) e elevações (*) na mucosa. (B) Imagem da colonoscopia realizada 21 dias após a primeira análise, mostrando aumento das ulcerações e da elevação (*), sugerindo tumor. (C) Na última análise, a imagem mostra um tumor. (D-F) Imagens obtidas por BMUe concomitante às análises colonoscópicas exibidas em A-C. (D) As setas mostram ulcerações. O tracejado em amarelo delimita a área de elevações na mucosa, coincidindo com o que foi observado na colonoscopia em A.; (E) As setas indicam ulcerações. Uma área tumoral bilateral está delimitada pelo tracejado e coincide com a elevação na mucosa observada em B. (F) A última análise temporal revela a presença de um tumor não polipóide, englobando quase metade do diâmetro do cólon.

Com a avaliação por BMUe, foi possível detectar alterações na camada mucosa intestinal, inclusive a visualização de pequenas elevações, indicativas de tumores em estágio inicial. A BMUe também se mostrou útil na detecção de tumores não polipóides (Figura 9F).

Em seguida, foi avaliado o efeito da associação da BMUe com ACUs para detecção e acompanhamento do tumor (Figuras 10, 11, 12 e 13). As imagens de BMUe obtidas após a injeção de ACU sugerem que o emprego desses agentes pode

acrescentar informações que auxiliem na análise da morfologia, em comparação às imagens obtidas antes do ACU.

A Figura 10 mostra um exemplo de avaliação da evolução dos tumores ao longo do tratamento com 5-FU. Nesse caso, foi observado desenvolvimento da elevação detectada desde a primeira análise (Figuras 10 D e E). Observou-se um ligeiro aumento de ecogenicidade na área indicativa de tumor após adição de ACU no animal avaliado (Figura 10C). Foi encontrada uma região era sugestiva de infiltrado linfóide (Figura 10E), que teve correspondência com a histologia. Após o emprego de ACU a área sugestiva de tumor se tornou mais hiperecoica (Figura 10C), delimitando melhor esta área.

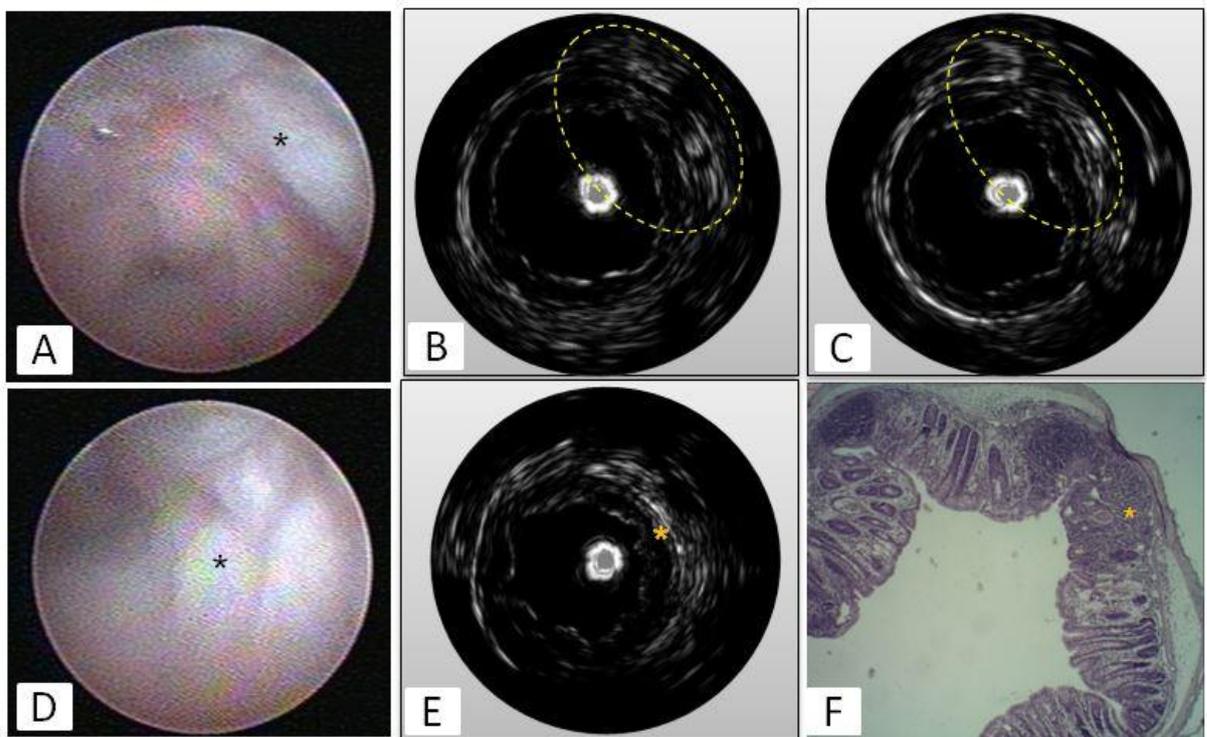


Figura 10. Análises por BMUe, concomitante à colonoscopia, com e sem ACU em um mesmo animal (tratado com 5-FU) (A) Análise colonoscópica mostrando elevação na mucosa (*), indicativa de tumor. (B e C) Imagens obtidas por BMUe concomitante à análise colonoscópica, isolada (B) e aliada ao ACU (C), sendo observado uma área espessada da mucosa, sugerindo o início de um tumor com um discreto aumento de ecogenicidade e uma melhor delimitação da área em destaque (tracejado). (D-E) Última análise de BMUe com ACU concomitante à colonoscopia, exibindo área tumoral (*). (F) Histologia do cólon, confirmando a existência do tumor (*). Aumento de 4x.

Ao analisar o grupo tratado com BVZ e 5-FU, observou-se que grande parte dos tumores não teve crescimento detectado ao longo da segunda e terceira análise por BMUe. A Figura 11 mostra um animal tratado com BVZ+5-FU. As imagens de BMUe e colonoscopia permitiram a visualização de um tumor na primeira análise colonoscópica (Figura 11A-B). Ao longo das semanas seguintes, não foi observado crescimento dessa área tumoral. (Figuras 11D-E). A análise das imagens de BMUe após a injeção de ACU sugere uma ligeira diminuição da ecogenicidade ao longo da área tumoral (Figuras 11C).

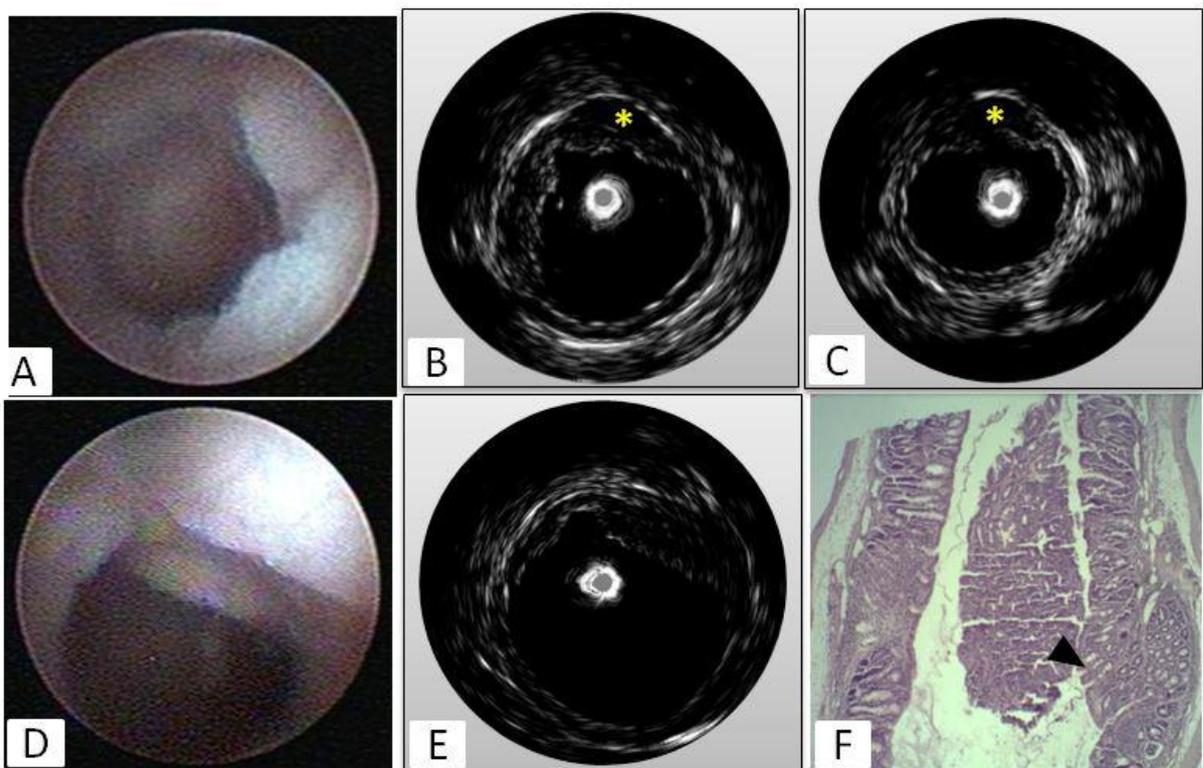


Figura 11. Análises do mesmo animal (tratado com bevacizumabe e 5-FU) por BMUe associada e não associada a ACU e concomitante à colonoscopia. (A) Primeira análise colonoscópica e elevações na mucosa, indicativa de tumor. (B) Imagem de BMUe correspondente à imagem de colonoscopia anterior, mostrando elevação na camada mucosa, indicando a presença de um tumor (*). (C) Imagem de BMUe, exibindo uma diminuição da ecogenicidade na área tumoral após a injeção do ACU (*). (D) Última análise por colonoscopia exibindo ainda uma elevação, sugestiva de tumor, e imagem de BMUe (E) concomitante à colonoscopia, mostrando também região tumoral. (F) Análise histológica exibindo área tumoral indicada por seta. Aumento 4x.

Análises do grupo controle (sem tratamento anti-tumoral) mostraram que o uso do ACU resultou em aumento da ecogenicidade na área sugestiva de tumor,

delimitando melhor essa área, facilitando a visualização do seu contorno (Figura 12C). Esses dados sugerem que a administração do ACU pode resultar em aumento de ecogenicidade da área tumoral, melhorando sua visualização e, conseqüentemente, auxiliando no diagnóstico tumoral. Essa suposição é reforçada pela Figura 13, na qual imagens de BMUe obtidas de um animal sem tratamento anti-tumoral demonstram uma ligeira elevação na camada mucosa em um padrão “espalhado” sugerindo o desenvolvimento de tumor *flat* (Figura 13A). Após a utilização do ACU, esta região fica melhor delimitada e com melhor distinção das camadas (Figura 13B).

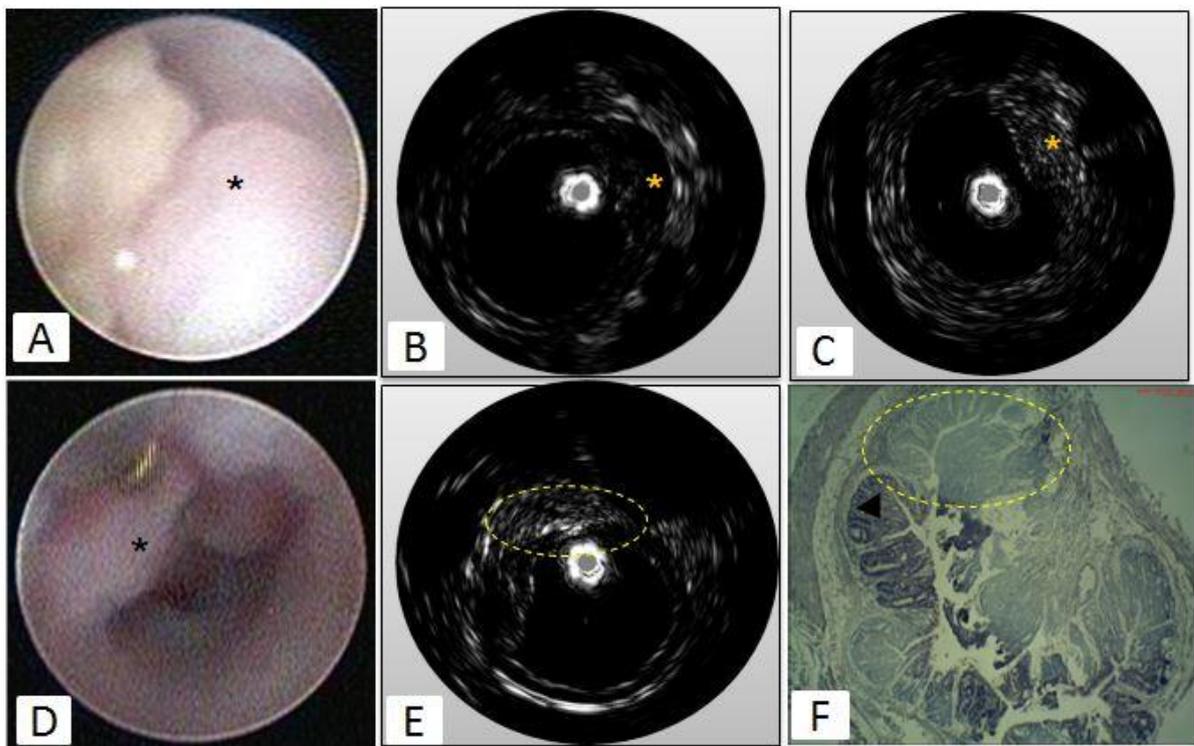


Figura 12. Análises por BMUe associada e não associada a ACU e concomitante à colonoscopia num mesmo animal (sem tratamento). (A) Análise colonoscópica mostra uma elevação na mucosa, indicativa de tumor (*). (B) Imagem de BMUe correspondente à imagem de colonoscopia anterior, mostrando elevação na camada mucosa, indicando a presença de um tumor. (C) Imagem obtida por BMUe após injeção do ACU exibindo a área indicativa de tumor com aumento de ecogenicidade(*) e melhor delimitação do contorno do tumor (seta). (D-E) Última análise BMUe concomitante à colonoscopia, exibindo a mucosa com elevação, sugerindo ainda a presença de tumor (tracejado). (F) Histologia do cólon do animal analisado por BMUe e colonoscopia, confirmando a existência do tumor (tracejado). É possível visualizar área indicativa de infiltrado linfóide na imagem de BMUe (E) e na histologia (F).

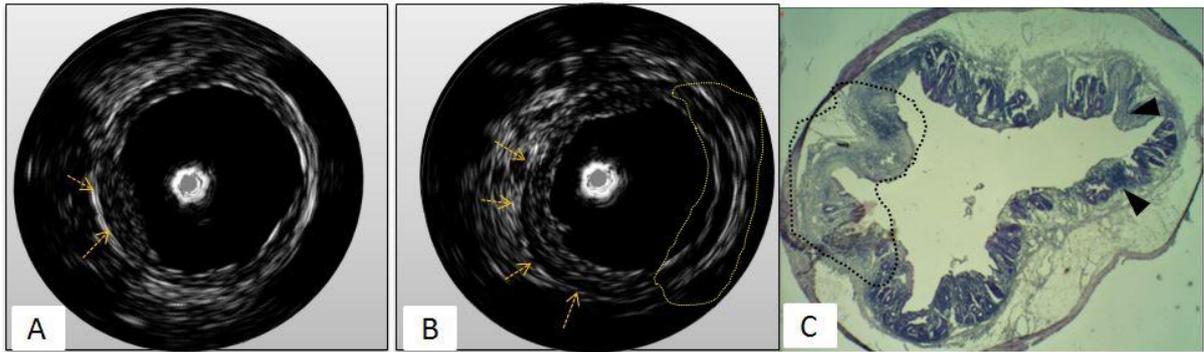


Figura 13. Análise do cólon por BMUe sem (A) e com o uso de ACU (B), exibindo a mucosa levemente elevada num padrão “espalhado” sugerindo o desenvolvimento de tumor *flat*. A imagem pós-ACU (B) apresenta uma melhor delimitação da lesão e melhor distinção das camadas (setas pontilhadas). (C) Histologia do cólon do mesmo animal analisado, exibindo uma alteração morfológica indicativa de um tumor não polipóide, (cabeças de seta). A área destacada nas imagens B e C (tracejado) são sugestivas de infiltrado linfóide. Aumento 4x.

A Figura 14 exibe uma análise de um animal do grupo tratado com BVZ. A imagem obtida após a administração ACU mostra discreta diferença de ecogenicidade em parte da área indicativa de tumor (Figura 14C).

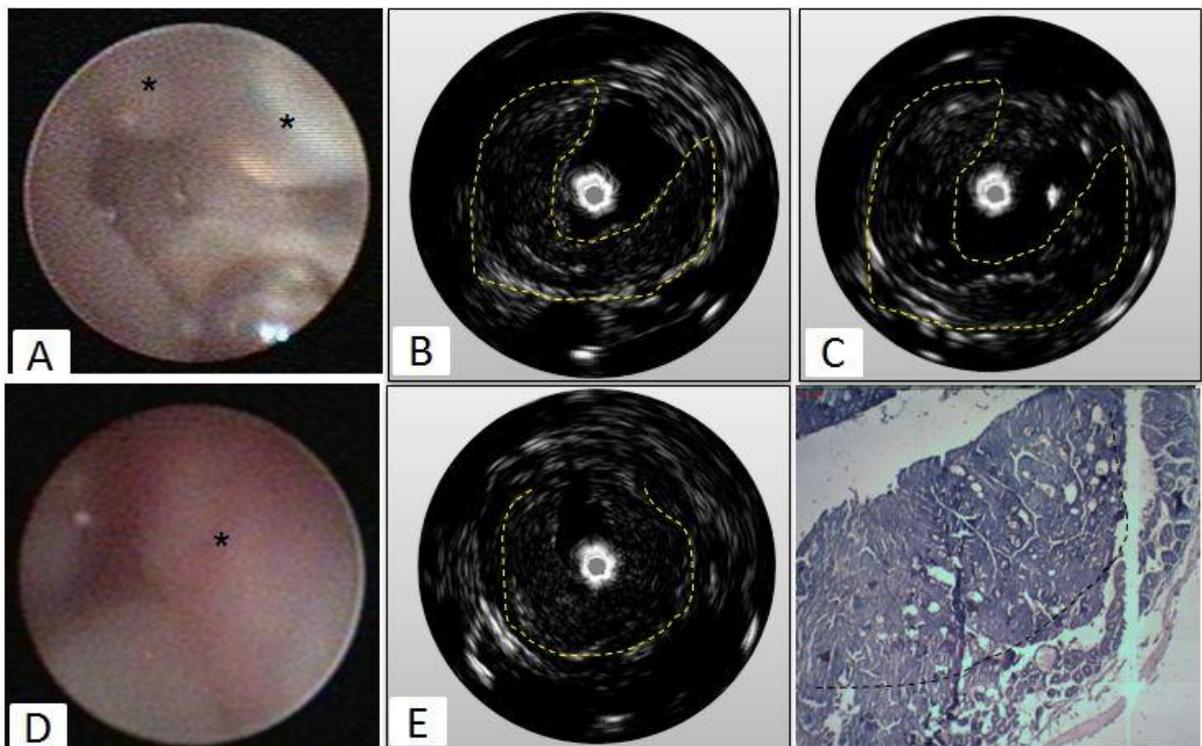


Figura 14. Análises do mesmo animal (tratado com BVZ) por BMUe associada e não associada a ACU e concomitante à colonoscopia. (A) Análise colonoscópica mostra uma elevação na mucosa, *

indicativa de tumor (*). (B) Imagem de BMUe correspondente à imagem de colonoscopia anterior, mostrando elevação ao longo camada mucosa, indicando a presença de um tumor (tracejado). (C) Imagem obtida por BMUe após administração do ACU, mostrando discreta diferença de ecogenicidade em parte da área indicativa de tumor. Histologia do cólon do animal analisado por BMUe e colonoscopia. (D) Última análise por colonoscopia exibindo ainda elevação na mucosa, sugerindo ainda a presença de tumor, (*) (E) BMUe com ACU concomitante à colonoscopia, mostrando a luz intestinal quase totalmente ocluída pelo tumor, o que pôde ser confirmado pela análise histológica (F). Aumento 4x.

Através dos resultados exibidos acima, sugere-se que nos animais não submetidos ao tratamento anti-tumoral ocorre um aumento da ecogenicidade das regiões tumorais, após o uso de ACU. Visualmente, esse aumento de ecogenicidade não foi observado em animais tratados com 5-FU e/ou BVZ. Para confirmação desses dados qualitativos, foi realizada a quantificação da intensidade de pixels nas imagens de BMUe obtidas na presença e na ausência de ACU, nos grupos controle e tratados com BVZ e/ou 5-FU (Figura 15).

O valor médio (DP), da diferença entre as intensidades de pixel dos animais foi de 6321,2 - com ACU, e 4477,6 - sem ACU, no grupo controle (CTE); de 1898,0 - com ACU, e 1323,7 - sem ACU, no grupo tratado com BVZ; e de -4473,6 - com ACU, e 5160,2 - sem ACU, no grupo tratado com BVZ + 5-FU (Figura 15). A diferença entre os grupos de animais foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) somente para CTE x BVZ + 5-FU. Estes resultados reforçam a suposição de que a diferença de ecogenicidade entre as imagens sem e com ACU está relacionada com a menor vascularização do tumor, ocasionada pela inibição da angiogênese nos grupos que receberam tratamento anti-angiogênico (BVZ), principalmente quando combinado ao quimioterápico 5-FU.

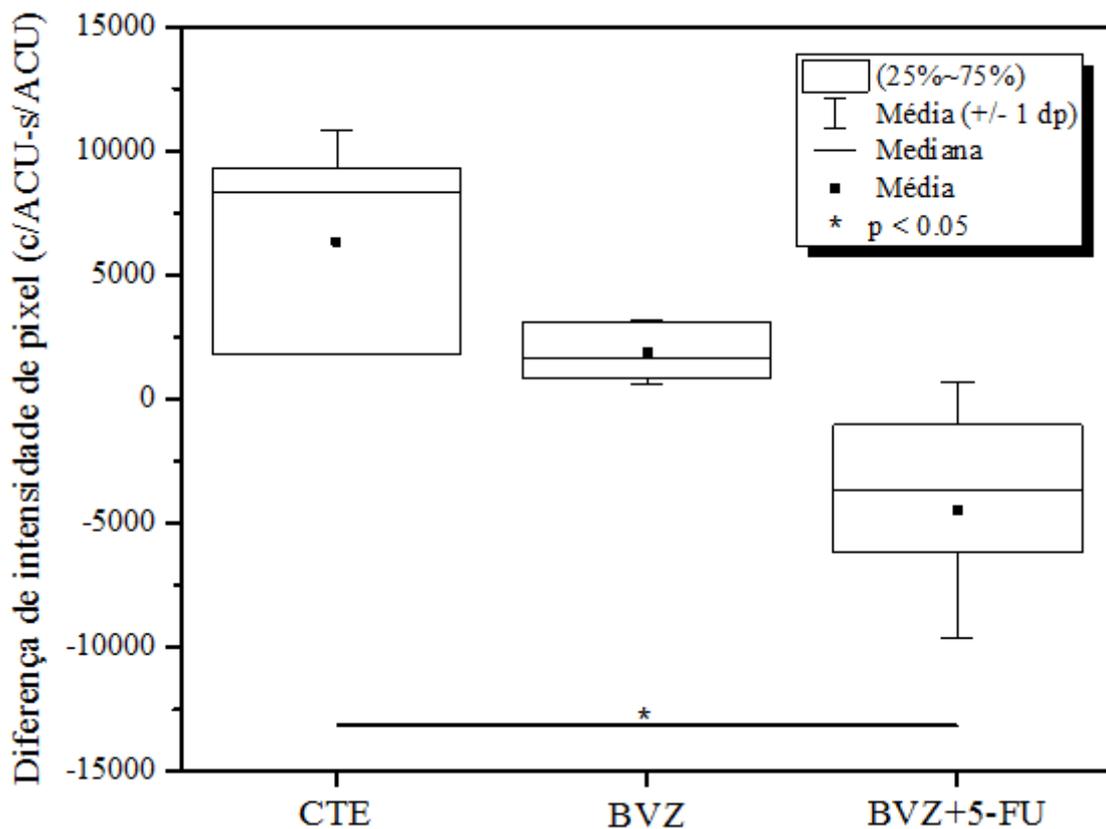


Figura 15. Box plot com os achados referentes à diferença entre níveis de intensidade de pixel nas imagens de tumores entre os animais com e sem a presença de ACU e para os grupos CTE, BVZ (bevacizumabe) e BVZ+5-FU (bevacizumabe + 5-fluorouracila).

7.3. Avaliação do efeito do tratamento anti-tumoral através da BMUe associada à ACU

Com a finalidade de investigar a resposta ao tratamento anti-tumoral e confirmar os dados anteriores, a angiogênese foi avaliada por análise imunohistoquímica com os marcadores CD34 (marcador de células endoteliais), VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular), e seu receptor FLK-1.

Os resultados mostraram uma marcação mais intensa para FLK-1 nos grupos controle (Figura 16E) e 5-FU (Figura 16F), em comparação com a marcação no grupo tratado com BVZ + 5-FU (BVZ+5FU) (Figura 16D). A marcação para CD34 e

VEGF foi similar nos três grupos, apresentando baixa marcação em ambos (Figuras 16 A-D, G-I). Tal análise demonstrou que, qualitativamente, os grupos controle e 5-FU tiveram um padrão semelhante de distribuição de CD34 e FLK-1, enquanto no grupo BVZ+5FU foi observada uma menor marcação de CD34 e FLK-1. Observou-se um padrão semelhante de distribuição para VEGF nos grupos analisados, sendo observada baixa marcação neles (Figura 16).

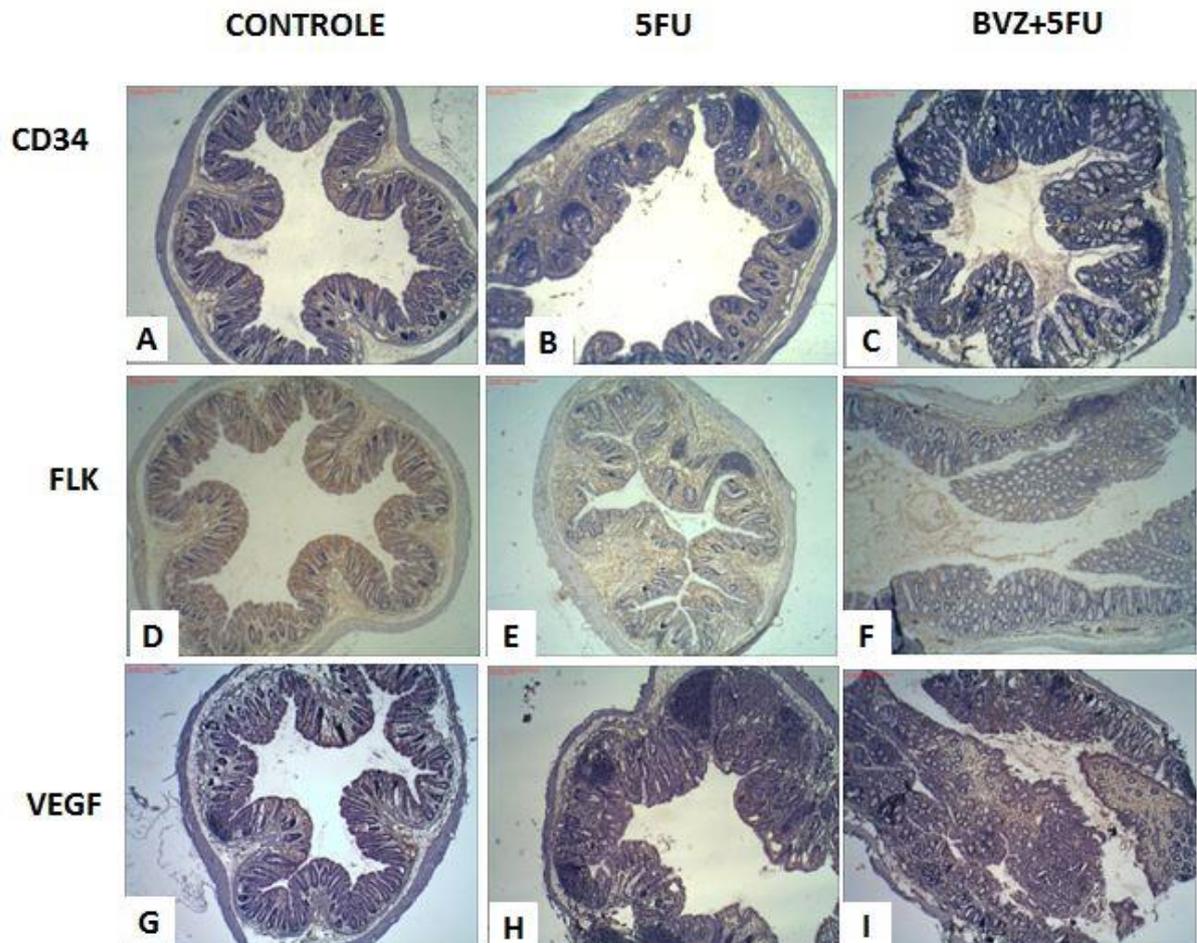


Figura 16. Análise imuno-histoquímica da angiogênese tumoral. (A-C) Imunomarcagem com CD34, nos grupos sem tratamento (A), tratado com 5-FU (B) e tratado com bevacizumabe (BVZ) e 5-FU (C). (D-F) imunomarcagem com FLK-1 nos grupos sem tratamento (D), tratado com 5-FU (E) e tratado com bevacizumabe e 5-FU (F). (G-I) imunomarcagem com VEGF nos grupos sem tratamento (G), tratado com 5-FU (H) e tratado com bevacizumabe e 5-FU (I). Aumento de 4X.

7.4. Avaliação do efeito do tratamento anti-tumoral através de BMUe com e sem ACU.

Para avaliar o potencial da BMUe em acompanhar a tumorigênese e o efeito do tratamento anti-tumoral nas lesões do cólon, o crescimento ou regressão dos tumores foi qualitativamente mensurado ao longo das semanas de experimentação. Dentre os animais avaliados por BMUe concomitante a colonoscopia, quatro não apresentaram tumores detectados pela colonoscopia, mas estes foram detectados pela BMUe; e um animal não desenvolveu tumor. Seis animais apresentaram regressão do tamanho do tumor e dois animais tiveram tumores sem alteração no tamanho. Dezesete animais desenvolveram tumores *flat*, dentre eles estão os quatro que não foram detectados pela colonoscopia (Anexo B).

Em todos os grupos analisados, observou-se que o uso de ACU não alterou a detecção de lesões tumorais polipóides pela BMUe. Ou seja, após a injeção de ACU não foram diagnosticadas novas lesões tumorais polipóides nas áreas já analisadas pela BMUe sem uso de agente de contraste. Porém, o emprego do ACU foi capaz de melhor delimitar regiões de tumores planos, além de também ressaltar a morfologia de lesões polipóides e a visualização das camadas subjacentes ao tumor, principalmente nos animais que não receberam tratamento anti-angiogênico. Assim, sugere-se que o uso de ACU pode auxiliar na visualização da morfologia dos tumores do cólon, e poderia contribuir para um melhor diagnóstico do subtipo tumoral, bem como avaliar a profundidade e as bordas da lesão.

8. DISCUSSÃO

A detecção e a retirada de pólipos pré-malignos, assim como o diagnóstico dos tumores de cólon em fase inicial, são essenciais para reduzir a incidência e a mortalidade do câncer colorretal. Dessa forma, novas ferramentas de diagnóstico têm sido desenvolvidas com o propósito de detectar precocemente o câncer de cólon e assim possibilitar ao paciente um melhor prognóstico. Nesse sentido, o potencial da BMUe em auxiliar no rastreamento de tumores do cólon já foi demonstrado por estudos do nosso grupo (Alves et al., 2011; Soletti et al., 2013; de Britto et al., 2013). No presente trabalho, buscou-se empregar os ACU associados à BMUe, na tentativa de obter mais informações acerca da vascularização e morfologia das lesões em desenvolvimento e da resposta ao tratamento anti-tumoral, comparando as imagens obtidas por BMUe sem e com a presença de ACUs.

Inicialmente verificamos a capacidade da BMUe em analisar a resposta dos tumores de cólon frente ao tratamento anti-tumoral, e observamos que foi possível acompanhar o desenvolvimento dos tumores, bem como observar a regressão destes em alguns animais. Dentre os achados nesse trabalho, verificou-se que os ACUs atuaram melhorando a distinção das camadas do cólon e delimitando melhor as regiões com infiltrados linfóides e tumores nos animais não tratados com inibidor de angiogênese. Nossas análises também demonstraram o potencial da BMUe para detecção de tumores planos (*flat*), o que atualmente ainda é uma das limitações encontradas na colonoscopia.

Este trabalho foi iniciado com sessenta e cinco animais, contudo houve grande perda de camundongos (36 animais), a maioria ainda na etapa de indução tumoral. De acordo com resultados pilotos (dados não mostrados), esse fato provavelmente deve-se à diferenças nos lotes do sal DSS, que apresenta uma faixa de peso molecular entre 36.000 e 50.000 Da. Uma possibilidade é que lotes diferentes contenham uma proporção diferente de cada peso molecular, podendo oferecer maior atividade inflamatória na mucosa intestinal e causando assim, maior

perda de animais.

A diferença significativa de ecogenicidade nas imagens com e sem agentes de contraste nas áreas tumorais, principalmente nos animais do grupo controle (e não nos animais tratados com BVZ), sugere que o efeito anti-angiogênico do BVZ estaria levando a uma diminuição da angiogênese tumoral. Essa diminuição na rede de vasos do tumor estaria relacionada com uma menor chegada do ACU na região tumoral, uma vez que os agentes de contraste são distribuídos pela circulação sanguínea e tendem a estar mais presentes nas regiões mais vascularizadas. A fim de confirmar a relação entre a vascularização e o aumento de ecogenicidade, foi realizada a imunomarcagem para vasos com CD34, e para angiogênese com VEGF e seu receptor FLK-1. Os resultados da imunomarcagem mostraram uma diminuição na distribuição do marcador CD34, reforçando a suposição anterior: com uma redução na rede vascular nos tumores dos animais do grupo BVZ+5FU pouca diferença de ecogenicidade é observada após a injeção do ACU. Com relação à angiogênese, o marcador FLK-1 também apresentou menor distribuição no grupo BVZ+5FU, indicando uma diminuição na angiogênese. Contudo, o marcador VEGF não apresentou diferença de distribuição entre os grupos. Esses resultados podem estar relacionados com dificuldades operacionais, como a qualidade do próprio anticorpo, e novas análises serão realizadas para a confirmação dos resultados.

Durante as análises por BMUe, a injeção intravascular do contraste foi realizada manualmente e isso pode ter levado a variações na quantidade de ACU chegando à circulação dos animais. Uma perspectiva para a resolução desse problema é a utilização de uma bomba de injeção controlada, como feito por Hoyt e colaboradores (2010), o que possibilitaria uma injeção constante e contínua de microbolhas e essa padronização da injeção nos animais poderia contribuir para obtenção de resultados mais satisfatórios.

Hoyt e colaboradores (2010) demonstraram que a utilização de ACUs em análises de ultrassom de alta frequência permitiu uma melhor avaliação da resposta ao tratamento anti-angiogênico com BVZ em um modelo animal de câncer de mama. Para isso, após a injeção das microbolhas e coleta das imagens, foram utilizados pulsos ultrassônicos de alto índice mecânico, capazes de destruir as microbolhas e então possibilitar a análise da perfusão tumoral em tempo real. As imagens obtidas

foram processadas em redes neurais artificiais. Através dessa metodologia, foi possível avaliar a resposta dos tumores de mama ao tratamento anti-angiogênico três dias após a injeção de BVZ, ao contrário da análise física do tamanho dos tumores, que não foi capaz de avaliar a resposta terapêutica precocemente. Dado que no presente trabalho não foram encontradas diferenças de ecogenicidade nas imagens de BMUe com e sem contraste após o tratamento dos animais com BVZ, acredita-se que o uso dessas técnicas de destruição das microbolhas e visualização da perfusão tumoral poderia agregar mais informações à respeito da vascularização dos tumores.

De forma similar à Hoyt e colaboradores (2010), Wang e colaboradores (2015) utilizaram ACUs e pulsos ultrassônicos para destruição das microbolhas durante as análises por ultrassonografia tridimensional dinâmica para avaliar precocemente o tratamento anti-angiogênico (dose única de BVZ) em modelo experimental de câncer de cólon. Diferentemente do nosso estudo, as imagens do cólon foram avaliadas com o uso de um transdutor extra-corpóreo (e não endoluminal), e as microbolhas foram injetadas através de uma bomba de injeção, capaz de controlar a entrada do ACU na circulação de forma mais precisa. Os dados deste estudo sugerem que é possível analisar a perfusão do tumor através dessa metodologia, avaliando assim os efeitos precoces do tratamento anti-angiogênico.

De forma semelhante aos estudos de Hoyt et al. e Wang et al., citados anteriormente, nossos resultados mostraram que o uso de ACU pode agregar mais informações durante as análises ultrassônicas do cólon. No presente estudo demonstramos melhora na distinção das camadas do cólon, melhor delimitação das regiões com infiltrados linfóides e a melhor visualização da área tumoral em animais não tratados com inibidores de angiogênese. Foi demonstrado ainda que a BMUe possui a capacidade de acompanhar o desenvolvimento do tumor, bem como a resposta ao tratamento anti-tumoral ao detectar o aumento ou a diminuição dos tumores frente ao tratamento. Considerando os resultados obtidos por nosso grupo e pelos grupos citados, e devido à empregabilidade clínica desses agentes em cardiologia, melhorando os sinais de fluxo no Doppler e a delimitação da borda endocárdica, os ACU podem ser considerados alvos promissores para futuros estudos clínicos no diagnóstico de tumores de cólon.

Os ACU podem ainda ser conjugados a compostos biotinizados, direcionando a ligação deles à um alvo molecular específico, contribuindo para aumento de especificidade no diagnóstico, e sendo assim um campo bastante atrativo a ser explorado. No modelo experimental de câncer de cólon, uma promissora área de atuação é a utilização de ACU direcionados à VEGFR2 (receptor de VEGF tipo 2). (Rix et al, 2011). Resultados preliminares do nosso grupo (dados não mostrados) mostraram que a utilização de ACU conjugados à VEGFR2 possibilita a visualização pela BMUe de áreas do cólon com maior angiogênese, auxiliando assim a detecção de um alvo molecular através de um exame de imagem, de forma minimamente invasiva.

Dentre outras possibilidades abertas pelo presente estudo, está o desenvolvimento de um sistema de BMUe 3D para geração de imagens tridimensionais dos tumores de cólon. O objetivo é o de melhor avaliar a área tumoral ao longo do processo de tumorigênese e da terapia anti-tumoral. Esse sistema de BMU 3D, cuja construção já foi finalizada no Laboratório de Ultrassom da COPPE, ajudará a diminuir uma limitação do presente trabalho, que é a interferência manual durante a movimentação de avanço e recuo do transdutor de ultrassom. Com a construção do novo sistema, a movimentação do transdutor dentro de regiões milimétricas do cólon do animal pode ser automatizada, o que facilita a comparação das imagens obtidas antes e após o uso dos ACU.

No presente trabalho foi proposto aliar a BMUe ao uso de ACU com dois intuitos: um imediato e uma possibilidade futura. Inicialmente, a utilização em estudos experimentais que avaliem tanto o desenvolvimento do câncer de cólon em animais com mutações em diversas proteínas relacionadas ao ciclo celular, quanto estudos sobre novas terapias antitumorais. Dentro dessa perspectiva, um grupo de pesquisa colaborador já está utilizando essa ferramenta para monitorar a resposta de um tratamento anti-tumoral a base de flavonóides. Como perspectiva futura, é proposta a possibilidade de emprego clínico dessa ferramenta no rastreamento de lesões tumorais e pré-tumorais, juntamente com a colonoscopia, assim como no acompanhamento clínico dos tratamentos de câncer de cólon.

9. CONCLUSÃO

O presente trabalho reforçou a capacidade da BMUe como uma importante ferramenta para auxiliar no diagnóstico e acompanhamento de lesões do cólon. Conclui-se que a BMUe pode atuar de maneira complementar à colonoscopia, auxiliando a suplementar o diagnóstico desta, como na detecção de lesões tumorais planas. Esse estudo ressalta que o uso de agentes de contraste ultrassônicos ajuda na melhor visualização da morfologia tumoral pela BMUe, principalmente em animais não submetidos a tratamentos anti-angiogênicos, evidenciando a aplicabilidade dessa técnica em análises experimentais e em possíveis estudos clínicos visando o melhor diagnóstico de tumores do cólon.

REFERÊNCIAS

- ADACHI, M. et al. Adenoma-carcinoma sequence of the large bowel. *Australian and New Zealand Journal of Surgery*, v.61, p. 409-414, 1991.
- AHLQUIST, D. A. et al. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology*, v.119, n.5, p. 1219-1227, 2000.
- ALBRECHT, T. et al. Improved detection of hepatic metastases with pulse-inversion US during the liver-specific phase of SHU 508A: multicenter study. *Radiology*, v. 227, n.2, p. 361-370, 2003.
- ARAUJO, S. E. A.; DE PARIS, P. P. Eficácia da cromoendoscopia de contraste do cólon com emprego do índigo-carmim administrado por via oral. *Arquivos de Gastroenterologia*, v.39, n.3, p.153-157, 2002.
- ALVES, K. Z. et al. Features of in vitro ultrasound biomicroscopic imaging and colonoscopy for detection of colon tumor in mice. *Ultrasound in Medicine & Biology*, v.37, n.12, p. 2086-2095, 2011.
- ALVES, K. Z. et al. In vivo endoluminal ultrasound biomicroscopic imaging in a mouse model of colorectal cancer. *Academic Radiology*, v.20, n.1, p. 90-98, 2012.
- ASKLING, J. et al. Family history as a risk factor for colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, v.120, n.6, p. 1356-1362, 2001.
- BASBUG, M. et al. The effect of antivascular endothelial growth factor on the development of adhesion formation in laparotomized rats: experimental study. *Gastroenterology Research and Practice*, 2011.
- BAXTER, N. N., et al. Association of colonoscopy and death from colorectal cancer. *Annals of Internal Medicine*, v. 150, n.1, p. 1-8, 2009
- BEAUGERIE, L.; ITZKOWITZ, S. H. Cancers complicating inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine*, v.372, n.15, p. 1441-1452, 2015.
- BLOMLEY, M. J. K, et al. Microbubble contrast agents: a new era in ultrasound. *British Medical Journal*, v. 322, p. 1222-1225, 2001.
- BOTTARO, D. P.; LIOTTA, L. A. Cancer: out of air is not out of action. *Nature*, v. 423, p. 593-595, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Falando sobre câncer do intestino / Instituto Nacional de Câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2003.
- CAMILLERI, M. et al. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterology & Motility*, v.24, n.6, p. 503-512, 2012.

CAMPOS FGCM, HABR-GAMA A. Embriologia e anatomia cirúrgica do cólon. In: Pinotti HW (Org). **Tratado de Clínica Cirúrgica do Aparelho Digestivo**. São Paulo: Atheneu, 1994. p. 1059-1063.

CAO, D. et al. Expression of HIF-1 α and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications. *BMC Cancer*, v.9, n.1, p. 1-9, 2009.

CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Metastasis: dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*, v.2 n.8, p. 563-572, 2002.

CHIU, H. M. et al. A prospective comparative study of narrow-band imaging, chromoendoscopy, and conventional colonoscopy in the diagnosis of colorectal neoplasia. *Gut*, v.56, n.3, p. 373-379, 2007.

CUNNINGHAM, D. et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, v.352, n.4, p. 337-345, 2004.

DAHLHAMER, J. M. Prevalence of Inflammatory Bowel Disease Among Adults Aged \geq 18 Years—United States, 2015. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v.65, n.42, p. 1166–1169, 2016.

DE BRITTO, M. A. P. et al. Endoluminal ultrasound biomicroscopy as a reliable tool for in vivo assessment of colonic inflammation in rats. *International journal of colorectal disease*, v. 28, n.12, p. 1613-1620, 2013.

DONG, S. M. et al. Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets. *Journal of the National Cancer Institute*, v.93, n.11, p. 858-865, 2001.

DULAI, P. S.; SANDBORN, W. J.; GUPTA, S. Colorectal cancer and dysplasia in inflammatory bowel disease: a review of disease epidemiology, pathophysiology, and management. *Cancer Prevention Research*, v.9, n.12, p. 887-894, 2016.

ELLIS, L. M. Mechanisms of action of bevacizumab as a component of therapy for metastatic colorectal cancer. *Seminars in oncology*. v.33, n.6, p. S1-S7, 2006.

ENGSTROM, P. F. et al. Colon cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, v.7, n.8, p. 778-831, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2015.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, v.136, n.5, p. 359-386, 2015.

FOLKMAN, J. et al. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *The Journal of experimental medicine*, v. 133, n. 2, p. 275-288, 1971.

FORSYTHE, J. A., et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and cellular biology*, v. 16, n.9, p. 4604-4613, 1996.

FOSTER, F. S. et al. Advances in ultrasound biomicroscopy. *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 26, n. 1, p. 1-27, 2000.

GEORGE, M. L., et al. VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression. *Neoplasia*, v.3, n.5, p. 5, p.420-427, 2001.

GERBER, H. P.; FERRARA, N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer research*, v.65, n.3, p. 671-680, 2005.

GROTHEY, A. et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*, v.381, p. 303-312, 2013.

GUINDI, M.; RIDDELL, R. H. Indeterminate colitis. *Journal of clinical pathology*, v.57, n.12, p. 1233-1244, 2004.

HARIRI, L. P., et al. Endoscopic optical coherence tomography and laser-induced fluorescence spectroscopy in a murine colon cancer model. *Lasers in Surgery and Medicine*, v.38, n.4, p. 305-33, 2006.

HAZEWINDEL, Y. et al. Endoscopic features of sessile serrated adenomas: validation by international experts using high-resolution white-light endoscopy and narrow-band imaging. *Gastrointestinal Endoscopy*, v.77, n.6, p.916-924, 2013.

HAZEWINDEL, Y. et al. Prevalence of serrated polyps and association with synchronous advanced neoplasia in screening colonoscopy. *Endoscopy*, v.46, n.3, p. 219-224, 2014

HECHT, J. R. et al. Panitumumab monotherapy in patients with previously treated metastatic colorectal cancer. *Cancer*, v.110, n.5, p. 980-988, 2007.

HOSOKAWA, O. et al. Invasive colorectal cancer detected up to 3 years after a colonoscopy negative for cancer. *Endoscopy*, v.35, n.6, p. 506-510, 2003.

HOYT, K. et al. Determination of Breast Cancer Response to Bevacizumab Therapy Using Contrast-Enhanced Ultrasound and Artificial Neural Networks. *Journal of Ultrasound in Medicine*, v.29, n.4, p. 577-585, 2010.

IMPERIALE, T. F., et al. Variation in polyp detection rates at screening colonoscopy. *Gastrointestinal endoscopy*, v.69, n.7, p. 1288-1295, 2009.

JUBB, A. M., et al. Impact of vascular endothelial growth factor-A expression, thrombospondin-2 expression, and microvessel density on the treatment effect of bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v.24, n.2, p. 217-227, 2006.

KAPSORITAKIS, A., et al. Mixed hyperplastic-adenomatous polyps (serrated

adenomas). An intermediate step in colorectal carcinogenesis? *Annals of Gastroenterology*, v.14. n.2, p. 118-121, 2001.

KIM, T. K. et al. Hepatic Tumors: Contrast Agent-Enhancement Patterns with Pulse-Inversion Harmonic US 1 . *Radiology*, v.216, n.2, p. 411-417, 2000.

KRÄMER, I.; LIPP, H. P. Bevacizumab, a humanized anti-angiogenic monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, v. 32, n. 1, p. 1-14, 2007.

KRAUS, S.; ARBER, N. Inflammation and colorectal cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, v.9, n.4, p. 405-410, 2009.

LANSDORP-VOGELAAR, I. et al. Effect of rising chemotherapy costs on the cost savings of colorectal cancer screening. *Journal of the National Cancer Institute*, v.101, n.20, p. 1412-1422, 2009.

LEE, J. C. et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients. *European Journal of Cancer*, v.36, n.6, p 748-753, 2000.

LEONARD, D. F., et al. Endoscopic and surgical management of serrated colonic polyps. *British Journal of Surgery*, v.98, n.12, p. 1685-1694, 2011.

LEUFKENS, A. M. et al. Effect of a retrograde-viewing device on adenoma detection rate during colonoscopy: the TERRACE study. *Gastrointestinal Endoscopy*, v.73 , n.3, p. 480-489, 2011.

LEVIN, B. et al. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v.58, n.3, p. 130-160, 2008.

LIBÂNIO, D.; AZEVEDO, L. F. Análise da Revisão Cochrane: Cromoscopia Versus Colonoscopia Convencional na Detecção de Pólipos Colorretais. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016; 4: CD006439. *Acta Medica Portuguesa*, v.29, n.10, p. p583-586, 2016.

LONGACRE, T. A.; FENOGLIO-PREISER, C. M. Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas: a distinct form of colorectal neoplasia. *The American Journal of Surgical Pathology*, v.14, n.6, p. 524-537, 1990.

LOU, G. C., et al. A retrospective study on endoscopic missing diagnosis of colorectal polyp and its related factors. *The Turkish journal of gastroenterology: the official journal of Turkish Society of Gastroenterology*, v. 25, p. 182-186, 2014.

MACHIDA, H. et al. Narrow-band imaging in the diagnosis of colorectal mucosal lesions: a pilot study. *Endoscopy*, v. 36, n.12, p. 1094-1098, 2004.

MATANOSKI, G. et al. Demographics and tumor characteristics of colorectal

cancers in the United States, 1998–2001. *Cancer*, v.107, n. 5, p. 1112-1120, 2006.

HEALTH QUALITY ONTARIO. Magnetic resonance (MR) colonography for colorectal cancer screening: an evidence-based analysis. *Ontario Health Technology Assessment Series*, v.9, n.8, 2009.

MICHALOPOULOS, G.; TZATHAS, C. Serrated polyps of right colon: guilty or innocent?. *Annals of Gastroenterology*, v.26, n.3, p. 212–219, 2013.

MULVAGH, S. L., et al. Contrast echocardiography: current and future applications. *Journal of the American Society of Echocardiography*, v.13, n.4, p. 331-342, 2000.

MUNIKRISHNAN, V. et al. Prospective study comparing multislice CT colonography with colonoscopy in the detection of colorectal cancer and polyps. *Diseases of the Colon & Rectum*, v.46, n.10, p. 1384-1390, 2003.

NAWA, T. et al. Differences between right-and left-sided colon cancer in patient characteristics, cancer morphology and histology. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 23, n. 3, p. 418-423, 2008.

NISHIDA, N. et al. Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management*, v.2, n.3, p. 213-219, 2006.

PINHO, M. S. L. A estória biomolecular do pólipo adenomatoso. *Revista Brasileira de Coloproctologia*, v.26, n.2, p. 197-203, 2006.

POSTEMA, M.; GILJA, O. H. Contrast-enhanced and targeted ultrasound. *World Journal of Gastroenterology*, v.17, n.1, p. 28-41, 2011.

RIES, F. et al. A transpulmonary contrast medium enhances the transcranial Doppler signal in humans. *Stroke*, v.24, n.12, p. 1903-1909, 1993.

RIX, A. et al. Evaluation of high frequency ultrasound methods and contrast agents for characterising tumor response to anti-angiogenic treatment. *European Journal of Radiology*, v.81, n.10, p. 2710-2716, 2012.

ROGLER, G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer Letters*, v.345, n.2, p. 235-241, 2014.

SELBY, J. V. et al. A case–control study of screening sigmoidoscopy and mortality from colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 326, n.10, p. 653-657, 1992.

SIEGEL, R. L. et al. Colorectal cancer incidence patterns in the United States, 1974–2013. *Journal of the National Cancer Institute*, v.109, n.8, p. 1-6, 2017.

SILVERBERG, M. S., et al. Refined genomic localization and ethnic differences observed for the IBD5 association with Crohn's disease. *European Journal of Human Genetics*, v.15, n.3, p. 328-335, 2007.

- SIVE DROSTE, J. S. T. et al. Does delay in diagnosing colorectal cancer in symptomatic patients affect tumor stage and survival? A population-based observational study. *BMC Cancer*, v.10, n.332, p. 1-11, 2010.
- SOCIETY, A. C. Cancer Facts & Figures 2017. (Atlanta, 2017)
- SOCIETY, A. C. Cancer Facts and Figures 2016. (Atlanta, 2016).
- SOCIETY, A. C. Colorectal Cancer Facts & Figures 2014-2016. (Atlanta, 2014)
- SOCIETY. A. C. Cancer Facts & Figures 2011. (Atlanta, 2011)
- SOLETTI, R. C. et al. Simultaneous follow-up of mouse colon lesions by colonoscopy and endoluminal ultrasound biomicroscopy. *World Journal of Gastroenterology*, v. 19, n. 44, p. 8056-8064, 2013.
- TABERNERO, J. et al. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study. *The Lancet Oncology*, v.16, n.5, p. 499-508, 2015.
- TAKAHASHI, Y. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Research*, v.55, n.18, p. 3964-3968, 1995.
- TANIGAWA, N. et al. Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. *Cancer Research*, v.57, n.6, p. 1043-1046, 1997.
- TERZIĆ, J. et al. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, v.138, n.6, p. 2101-2114, 2010.
- TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v.65, n.2, p 87-108, 2015.
- TORTORA, G. J. **Corpo Humano fundamentos de Anatomia e Fisiologia**. 4ª edição. São Paulo: Artmed, 2004.
- TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. 12ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- TOURNIGAND, C. et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *Journal of Clinical Oncology*, v. 22, n. 2, p. 229-237, 2004.
- TRAVERSO, G. et al. Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors. *New England Journal of Medicine*, v.346, n.5, p. 311-320, 2002.
- U.S. PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE. Screening for Colorectal Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann Intern Med*. V.149, n.9, p. 627-637, 2008.

VAN CUTSEM, E. et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *Journal of Clinical Oncology*, v.30, n.28, p; 3499-3506, 2012.

WANG, H. et al. Three-dimensional dynamic contrast-enhanced US imaging for early antiangiogenic treatment assessment in a mouse colon cancer model. *Radiology*, v.277, n.2, p. 424-434, 2015.

WARREN, R. S. et al. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *Journal of Clinical Investigation*, v. 95, n. 4, p. 1789-1797, 1995.

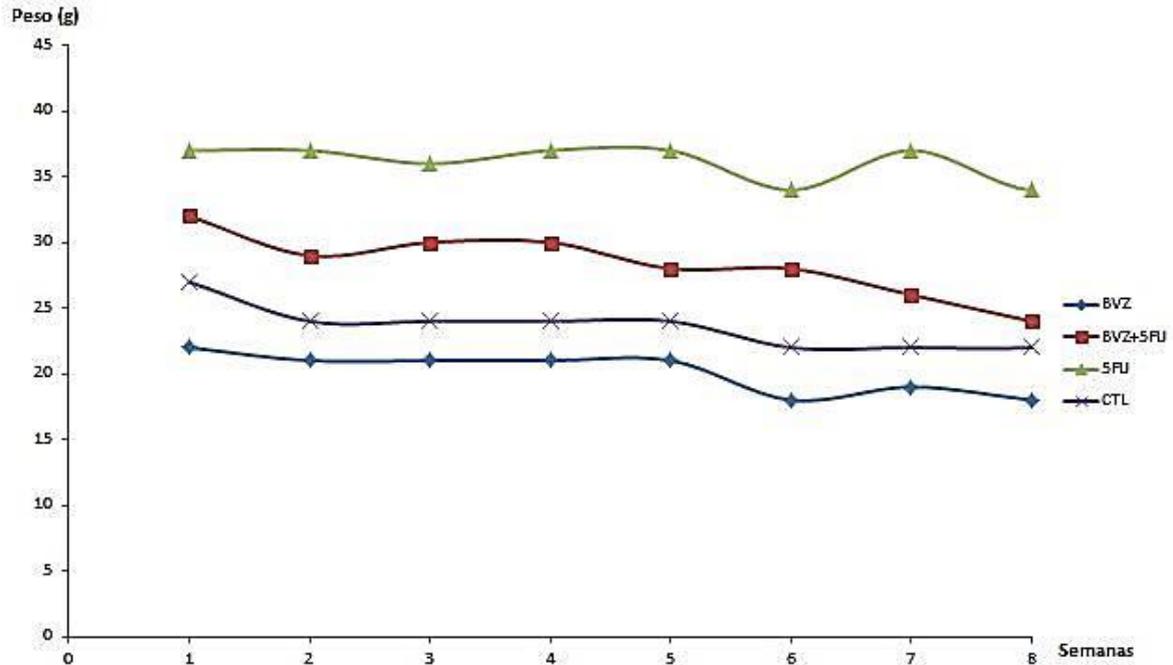
WINAWER, S. J. et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. *New England Journal of Medicine*, v.329, n.27, p. 1977-1981, 1993.

WINAWER, S. J. Natural History of Colorectal Cancer. *American Journal of Medicine*. V.106, n.1, p. 3-6, 1999.

YOSHINO, T. et al. TAS-102 monotherapy for pretreated metastatic colorectal cancer: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, v.13, n.10, p. 993-1001, 2012.

ZISMAN, T. L.; RUBIN, D. T. Colorectal cancer and dysplasia in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, v. 14, n. 17, p. 2662-2669, 2008.

APÊNDICE A – ACOMPANHAMENTO PESO CORPORAL DOS ANIMAIS



Registro semanal do peso corporal dos animais ao longo do protocolo AOM-DSS. As médias semanais de peso corporal dos animais estão representadas por grupos, sendo o grupo BVZ representado por “triângulos”, o grupo BVZ+5FU por “quadrados”, o grupo 5FU por “X” e o grupo CTL por “losângulos”. Os camundongos submetidos ao protocolo de indução tumoral AOM-DSS tiveram o peso monitorado durante a exposição aos ciclos de DSS e durante os intervalos dos ciclos. Quatro dos 65 camundongos incluídos no protocolo precisaram ser submetidos ao óbito, e 32 deles tiveram óbito espontâneo. A perda total de animais foi de 36 camundongos.

APÊNDICE B – DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO DA PROGRESSÃO DE TUMORES POR BMUe E COLONOSCOPIA

| Animal | GRUPO | Detecção do tumor | | | | Progressão | | |
|--------|---------|-------------------|-----|--------|-----|------------|---|---|
| | | BMUe | | Colono | | Tamanho | | |
| | | Sim | Não | Sim | Não | > | < | = |
| 32 | BVZ | ✓ | | ✓ | | ✓ | | |
| 33 | BVZ | ✓ | | ✓ | | | | |
| 34 | BVZ | ✓ | | ✓ | | ✓ | | |
| 35 | BVZ | ✓ | | ✓ | | ✓ | | |
| 36 | BVZ | ✓ | | ✓ | | ✓ | | |
| 37 | BVZ | | ✓ | | ✓ | | | |
| 4 | 5FU | ✓ | | | ✓ | | ✓ | |
| 6 | 5FU | ✓ | | ✓ | | ✓ | | |
| 7 | 5FU | ✓ | | ✓ | | ✓ | | |
| 14 | 5FU | ✓ | | ✓ | | ✓ | | |
| 17 | 5FU | ✓ | | ✓ | | ✓ | | |
| 18 | 5FU | ✓ | | ✓ | | | ✓ | |
| 20 | 5FU | ✓ | | ✓ | | ✓ | | |
| 26 | 5FU | ✓ | | | ✓ | | ✓ | |
| 29 | 5FU | ✓ | | | ✓ | ✓ | | |
| 3 | BVZ+5FU | ✓ | | ✓ | | | ✓ | |
| 9 | BVZ+5FU | ✓ | | ✓ | | ✓ | | |
| 15 | BVZ+5FU | ✓ | | ✓ | | ✓ | | |
| 27 | BVZ+5FU | ✓ | | ✓ | | | | |
| 28 | BVZ+5FU | ✓ | | ✓ | | | ✓ | |
| 30 | BVZ+5FU | ✓ | | ✓ | | ✓ | | |
| 5 | CTL | ✓ | | ✓ | | ✓ | | |
| 8 | CTL | ✓ | | | ✓ | ✓ | | |
| 13 | CTL | ✓ | | ✓ | | ✓ | | |
| 21 | CTL | ✓ | | ✓ | | ✓ | | |
| 23 | CTL | ✓ | | ✓ | | ✓ | | |
| 24 | CTL | ✓ | | ✓ | | | | ✓ |
| 31 | CTL | ✓ | | ✓ | | ✓ | | |
| 38 | CTL | ✓ | | ✓ | | ✓ | | |
| 39 | CTL | ✓ | | ✓ | | ✓ | | |
| 40 | CTL | ✓ | | ✓ | | ✓ | | |

ANEXO A – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 08 de maio de 2017

Prezado Professor João Carlos Machado

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: "Utilização da Biomicroscopia Ultrassônica Endoluminal, aliada ao uso de agentes de contraste, na avaliação da eficácia de tratamentos de lesões tumorais do cólon.", protocolo nº 029/17, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 8.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia 25/04/2017.

| | |
|---------------------|--|
| Finalidade | () Ensino (X) Pesquisa Científica |
| Vigência do Projeto | Até 08/05/2019 |
| Espécie/inhagem | <i>Mus musculus</i> /C57BL/6J |
| Nº de animais | 51 animais |
| Pesolidade | 20-25g / 6-8 semanas |
| Sexo | Machos e fêmeas |
| Origem | Biotério de Camundongos e Ratos do Programa de Anatomia do ICB/ UFRJ - CCS - bloco k térreo. |

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS