



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE NUTRIÇÃO**

JOANA DE FÁTIMA FERREIRA BORGES DA COSTA

**ANÁLISE DOS NÍVEIS DE HOMOCISTEÍNA E ÁCIDO FÓLICO EM MODELO DE
CARCINOGENESE PARA VALIDAÇÃO COMO BIOMARCADORES
PARA RASTREIO DE CÂNCER GÁSTRICO**

BELÉM

2022

JOANADE FÁTIMA FERREIRA BORGES DA COSTA

**ANÁLISE DOS NÍVEIS DE HOMOCISTEÍNA E ÁCIDO FÓLICO EM MODELO DE
CARCINOGENESE PARA VALIDAÇÃO COMO BIOMARCADORES
PARA RASTREIO DE CÂNCER GÁSTRICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do Grau de Bacharel em
Nutrição, Faculdade de Nutrição, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal
do Pará.

ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª Luisa Margareth Carneiro da Silva

BELÉM

2022

JOANA DE FÁTIMA FERREIRA BORGES DA COSTA

**ANÁLISE DOS NÍVEIS DE HOMOCISTEÍNA E ÁCIDO FÓLICO EM MODELO DE
CARCINOGENESE PARA VALIDAÇÃO COMO BIOMARCADORES
PARA RASTREIO DE CÂNCER GÁSTRICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do Grau de Bacharel em
Nutrição, Faculdade de Nutrição, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal
do Pará.

APROVADA EM: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Dr^a Luísa Margareth Carneiro da Silva
Orientadora
FANUT/ICS/UFPA

Dr^a Vânia Maria Barboza da Silva
Docente
FANUT/ICS/UFPA

Prof^a Fabiana Costa Cardoso
Mestranda
FANUT/ICS/UFPA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a cada membro da minha família que nunca desistiu de mim, mesmo quando vinha contar, insistentemente, cada descoberta que fazia na Nutrição.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro e sempre, a Deus por me capacitar e me fazer forte para superar cada dificuldade vivida nesses sete anos que levei para concluir o curso de Nutrição. Aos meus pais Ananias e Madalena que sempre estiveram ao meu lado me dando apoio e confiando nas minhas escolhas. Aos meus irmãos que alegraram meus dias quando tudo parecia tão impossível. A Rafa (Rafaela) por cada dia que ficou com meu filho para que eu pudesse me concentrar para terminar algum trabalho durante o período de ensino remoto. A cada professor que, de alguma forma, me compreendeu e ajudou quando os compromissos de trabalho não me permitiam estar em dois lugares ao mesmo tempo. Aos professores Francisco, Orquídea, Liliane, Vanessa, Rejane, Faro, Auxiliadora, Naíza, pelas palavras de incentivo, que foram determinantes em tantos momentos que pensei em desistir e pelo exemplo de profissionais, que me servem de inspiração. A minha cunhada Rosileuda por confiar tanto em mim e me fazer sentir “Nutricionista” antes de realmente ser.

Ao David, meu companheiro de uma vida! Que sempre esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins. Que segura na minha mão quando estou desmotivada, dorme no sofá me esperando escrever, que ouve meus devaneios e meus estudos de caso com a mesma atenção e curiosidade, que cuidou da casa e do nosso filho por dias, para que eu me dedicasse aos estágios e finalização do trabalho de conclusão de curso, e ainda conciliando com o trabalho.

A professora Luísa Margareth, por ter me acolhido e me ajudado a finalizar essa etapa que foi muito difícil, cheia de surpresas, nem sempre boas, mas que manteve a serenidade, mesmo quando chamava a minha atenção, me transmitindo confiança e segurança.

Por fim, quero agradecer a UFPA, por mais um título a mim concedido, por me acolher há tantos anos, sendo responsável por todo caminho acadêmico que percorri.

E à Faculdade de Nutrição, por essa experiência maravilhosa que é a Nutrição, curso que escolhi por amor e que consegui, com muito esforço, concluir.

EPÍGRAFE

“Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade. Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível”.

Charles Chaplin

RESUMO

A evolução da carcinogênese gástrica ainda é pouco conhecida. Para este trabalho utilizamos o modelo de carcinogênese gástrica em *Cebus apella*, um primata não-humano do Novo Mundo. Tratamos seis animais com N-metil-nitrosourea (MNU). Durante os estudos foram feitas análises clínicas, hematológicas e bioquímicas, incluindo proteína C-reativa, ácido fólico e homocisteína. Todos os animais desenvolveram lesões pré-neoplásicas e cinco (05) deles morreram de intoxicação por drogas antes do desenvolvimento da neoplasia. O último animal sobrevivente do tratamento com MNU desenvolveu adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal, observado através de endoscopia no 940º dia. Os níveis de proteína C-reativa e a concentração de homocisteína aumentaram e o nível de ácido fólico diminuiu com a presença de tumores nos animais tratados com MNU. Os resultados hematológicos e bioquímicos corroboram com as observações encontradas em pacientes com câncer gástrico, provando que os *Cebus apella* são interessantes modelos *in vivo* para estudar esta neoplasia. Assim, concluímos que os níveis de homocisteína e ácido fólico são alterados de acordo com a etapa da carcinogênese, porém pudemos observar que a homocisteína aumenta a medida que o tumor é estabelecido, em contrapartida, os níveis de ácido fólico diminuem com a progressão do tumor. Corroborando com os estudos que mostram que os níveis de homocisteína e ácido fólico são inversamente proporcionais e que são parâmetros bioquímicos sensíveis ao desenvolvimento do câncer e que assim podem ser usados como marcadores bioquímicos para o rastreo do desenvolvimento carcinogênico.

Palavras-chave: Cancer Gástrico. Ácido fólico. Homocisteína. Biomarcadores. Primatas Não Humanos. MNU.

ABSTRACT

The evolution of gastric carcinogenesis is still poorly known. For this work we used the model of gastric carcinogenesis in *Cebus apella*, a non-human primate from the New World. We treated six animals with N-methyl-nitrosourea (MNU). During the studies, clinical, hematological and biochemical analyzes were performed, including C-reactive protein, folic acid and homocysteine. All animals developed pre-neoplastic lesions and five (05) of them died of drug intoxication before the development of neoplasia. The last surviving animal from MNU treatment developed intestinal-type gastric adenocarcinoma, seen through endoscopy on the 940th day. The levels of C-reactive protein and the concentration of homocysteine increased and the level of folic acid experienced with the presence of disturbances in the animals treated with MNU. The hematological and biochemical results corroborate the observations found in patients with gastric cancer, proving that *Cebus apella* are interesting in vivo models to study this neoplasm. Thus, we conclude that homocysteine and folic acid levels are altered according to the stage of carcinogenesis, but we could observe that homocysteine increases as the tumor is established, in evolution, folic acid levels decrease with tumor progression. Corroborating with studies that show that homocysteine and folic acid levels are inversely provided and that they are biochemical parameters sensitive to the development of cancer and that thus can be used as biochemical markers for tracking carcinogenic development.

Keywords: Gastric Cancer. Folic acid. Homocysteine. Biomarkers. Non-Human Primates. MNU.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspectos Microscópicos dos Tipos Histológicos de Laurén (HE).....	15
Figura 2 - Estrutura química do N-metil-nitrosourea	17
Figura 3 - Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos anormais nos animais tratados com MNU.....	27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	OBJETIVOS	13
1.1.1	Objetivo geral	13
1.1.2	Objetivo específico	13
1.2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
1.2.1	Câncer Gástrico	13
1.2.2	Modelo Animal	15
1.2.3	N-Metil-Nitrosouréia (MNU)	16
1.2.4	Homocisténa	19
1.2.5	Ácido Fólico	20
2	MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1	PRIMATAS NÃO HUMANOS	22
2.2	DESENHO EXPERIMENTAL	22
2.2.1	Tratamento com MNU	22
2.2.2	N-Metil-Nitrosouréia (MNU)	22
2.3	AVALIAÇÃO CLÍNICA	23
2.4	AMOSTRAS TECIDUAIS, ANÁLISE DA MUCOSA GÁSTRICA, MONITORAMENTO DO TAMANHO TUMORAL, ANATOMIA PATOLÓGICA, ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E PESQUISA DE H. PYLORI	23
2.5	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ÁCIDO FÓLICO E HEMOCISTEÍNA.....	24
3	RESULTADOS	25
3.1	MODELO ANIMAL: TRATAMENTO COM MNU	25
4	DISCUSSÃO	28
4.1	A CARCINOGENESE GÁSTRICA EM <i>CEBUS APELLA</i>	28
4.2	ANÁLISES BIOQUÍMICAS E HEMATOLÓGICAS NOS MODELOS DE CARCINOGENESE GÁSTRICA	29
5	CONCLUSÃO	31
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
7	ANEXOS	38
7.1	ANEXO 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	38
7.2	ANEXO 2: TABELA S1 – TABELA S1. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS ANORMAIS DE ANIMAIS TRATADOS COM MNU.....	39

1INTRODUÇÃO

O câncer gástrico é a segunda principal causa de mortes em todo mundo e a terceira mais comum em países industrializados (BRAY *et al.*, 2018; SUNG *et al.*, 2020). O tipo histológico mais freqüente é o adenocarcinoma, responsável por 95% dos tumores de estômago no Brasil (INCA, 2020). A carcinogênese gástrica é uma doença muito complexa com uma etiologia complicada envolvendo variáveis genéticas e ambientais complexas e específicas do hospedeiro (BASS *et al.*, 2014; YIN *et al.*, 2020) e, apesar da evolução no tratamento de pacientes com GC que apresentam metástases à distância, ainda persistem taxas de recorrência significativas e um prognóstico ruim, com escolhas limitadas de tratamento e sobrevida média em torno de um ano (LEE *et al.*, 2016; EUSEBI *et al.*, 2020).

O câncer gástrico não apresenta sintomas específicos nos estágios iniciais (HUNT *et al.*, 2015). Sendo assim seu diagnóstico na maioria das vezes se dá em estágio avançado. O principal método de diagnóstico é a endoscopia e a biópsia, que são métodos invasivos e que trazem desconforto e ansiedade para o paciente. A ressecção cirúrgica é o procedimento terapêutico mais eficaz, os avanços na quimioterapia têm melhorado bastante a sobrevida livre de progressão do tumor e as taxas de sobrevida global. No entanto, um diagnóstico precoce é de grande importância para garantir um tratamento eficaz e num menor tempo possível, além de aumentar a taxa de sobrevida dos pacientes (LI Y *et al.*, 2011; EMOTO *et al.*, 2012). Porém essa detecção precoce continua sendo um desafio diagnóstico devido a falta de biomarcadores eficazes. A maioria deles não são recomendados devido ao limite de especificidade e sensibilidade nos estágios iniciais da doença gástrica (SHIMADA *et al.*, 2014). Assim, Novos biomarcadores para rastrear e prever a invasividade do câncer gástrico podem fornecer novas maneiras de resolver o dilema e, portanto, são necessários com urgência (GRAVALOS *et al.*, 2008; OH *et al.*, 2012).

A experimentação animal reveste-se de importância incomensurável nas pesquisas científicas, contribuindo sobremaneira para a ciência e a tecnologia. Sua vasta contribuição nos diferentes campos científicos tem promovido ao longo dos anos a descoberta de medidas profiláticas e de tratamentos de inúmeras enfermidades que acometem os seres vivos (TAKAYAMA, 2008). No entanto, a eficácia dos modelos animais é dificultada pelas diferenças intrínsecas de espécies entre modelos animais e humanos. Os primatas não humanos oferecem um modelo útil para estudos de carcinogênese, pois apresentam uma

estreita relação à anatomia, fisiologia, bioquímica e sistema de órgãos, em comparação à roedores. Permitindo um estudo mais fidedigno (TORRES, 2010; LEAL *et al.*; 2013).

Uma grande variedade de substâncias químicas é capaz de induzir o desenvolvimento de neoplasias, funcionando como agentes carcinogênicos. Tumores malignos surgem do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas causadas pela exposição a esses agentes num processo que envolve uma série de eventos que resultam na conversão de células normais em células neoplásicas (TAKAYAMA, 2008). Um desses carcinogênicos é a N-metil-nitrosouréia (MNU), que não necessita de ativação metabólica para exercer carcinogenicidade. MNU é um produto de nitrosação do metabolismo da creatinina que é formado na presença de nitritos no ambiente gástrico ácido. A sua produção está associada à ingestão de produtos cárneos, carnes curadas e frutos do mar (STATISTICS, 2016; CHARALAMPAKIS, 2017). Além disso, é possível que muitas espécies, incluindo humanos, sejam expostas ao MNU, gerado em seu trato gastrointestinal (UWAGAWA, 1991; DA COSTA *et al.*, 2011; TSUBURA, 2011; SINTARA, 2012;).

Pacientes com câncer têm altos níveis plasmáticos de homocisteína. Sendo a concentração de homocisteína inversamente proporcional à concentração de ácido fólico, nesses pacientes, espera-se que o nível plasmático de folato esteja baixo, uma vez que as células tumorais precisam extrair folato do sangue através da síntese de Purina. A toxicidade da homocisteína independe do tipo ou do órgão/tecido em que se encontra o câncer. As concentrações plasmáticas de homocisteína variam de acordo com o estágio da carcinogênese. Câncer em estado inicial não apresenta alterações significativas de homocisteína plasmática, porém em cânceres em estágio avançado, os níveis plasmáticos da homocisteína são bastante elevados (BRZEZINSKI, 2020). Evidências sugerem que baixos níveis de folato estão envolvidos no desenvolvimento do CG, pois observou-se que a concentração de folato é menor em tecido de câncer gástrico que em tecido de gastrite (MORGAGNI *et al.*, 2015).

A compreensão dos efeitos da homocisteína e do Folato no crescimento e proliferação de células cancerígenas renderiam novas e promissoras estratégias contra o câncer. Podendo ser usados como potenciais marcadores tumorais (ZHI LIU *et al.*, 2018).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Avaliar os padrões bioquímicos de Homocisteína e Ácido Fólico para a validação de possíveis biomarcadores relevantes para o rastreio do Câncer Gástrico utilizando o modelo experimental para Carcinogênese Gástrica de Primatas Não Humanos.

1.1.2 Específicos

- Identificar o comportamento da Homocisteína durante as fases de desenvolvimento e estabelecimento do câncer gástrico.
- Identificar o comportamento do Ácido Fólico durante as fases de desenvolvimento e estabelecimento do Câncer Gástrico.

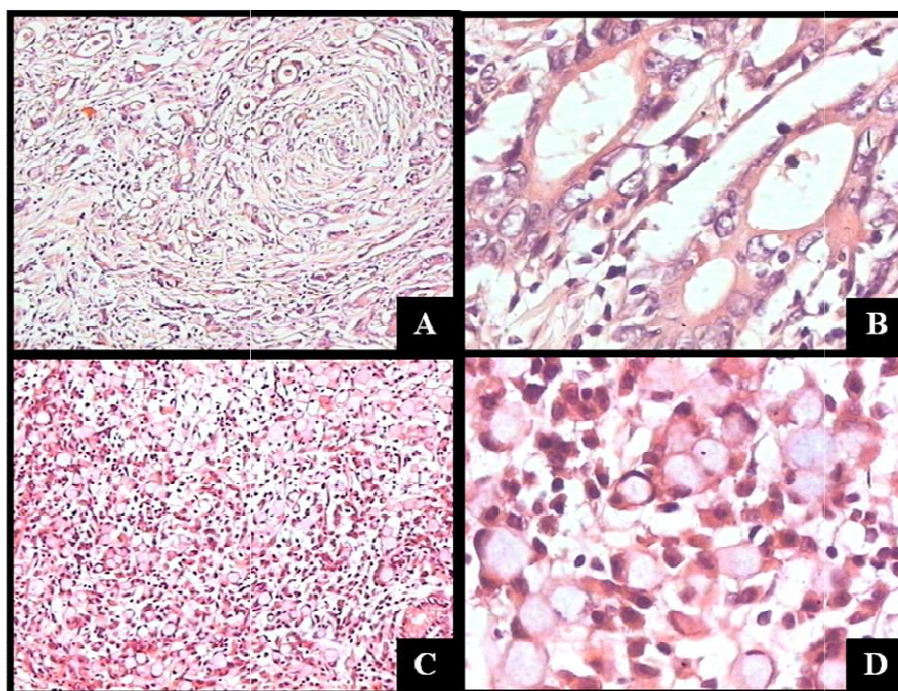
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 Câncer Gástrico

O câncer gástrico é a segunda principal causa de mortes em todo mundo e a terceira mais comum em países industrializados (BRAY *et al.*, 2018; UNG *et al.*, 2020). O tipo histológico mais freqüente é o adenocarcinoma, responsável por 95% dos tumores de estômago no Brasil (INCA, 2020). A carcinogênese gástrica é uma doença muito complexa com uma etiologia complicada envolvendo variáveis genéticas e ambientais complexas e específicas do hospedeiro (BASS *et al.*, 2014; YIN *et al.*, 2020) e, apesar da evolução no tratamento de pacientes com GC que apresentam metástases à distância, ainda persistem taxas de recorrência significativas e um prognóstico ruim, com escolhas limitadas de tratamento e sobrevida média em torno de um ano (LEE *et al.*, 2016; EUSEBI *et al.*, 2020). Os tumores gástricos são divididos em dois tipos histológicos principais segundo a classificação de Laurén (1965): Câncer Gástrico do tipo difuso e Câncer Gástrico do Tipo Intestinal. O tipo intestinal, também chamado de tipo “epidêmico”, depende de fatores ambientais e nutricionais e está associado à presença de lesões pré-cancerosas, como gastrite crônica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal, neoplasia intraepitelial e adenocarcinoma (SMITH *et al.*, 2006; LEE, *et al.*, 2016; SUKANYA *et al.*, 2021). O tipo difuso apresenta prognóstico ruim, não está

associado a lesões pré-cancerosas e apresenta um padrão de crescimento invasivo. Seu predomínio sofre influência de fatores geográficos, étnicos e culturais. (PARKIN, 2006; LEE, *et al.*, 2016).

Figura 1 - Aspecto microscópico dos tipos histológicos de Laurén (HE)



Fonte: Da Costa (2012)

Figura 1: Aspecto microscópico dos tipos histológicos de Laurén (HE). No tipo intestinal, neoplasia forma glândulas desorganizadas, 200x (A); e as células neoplásicas formam cordões sólidos, 400x (B). No tipo difuso o tumor infiltra difusamente todas as camadas do estômago, e o melhor lugar para identificar a infiltração é a camada muscular, onde as células neoplásicas contrastam com as fibras musculares lisas, 200x (C); o excesso de muco produzido pelas células neoplásicas pode ser observado no citoplasma na forma de um grande vacúolo, que desloca o núcleo para a periferia, originando as células em anel de sinete, 400x (D).

Os principais fatores de risco para o câncer gástrico são: infecção por *H. pylori*, idade avançada, baixo nível socioeconômico, tabagismo, consumo de álcool, predisposição familiar, cirurgia gástrica anterior, anemia perniciosa (MURPHY *et al.*, 2015; MORGAGNI *et al.*, 2015; YAGHOUBI *et al.*, 2017), uma dieta rica em alimentos salgados, baixa ingestão de frutas e verduras, Doença do Refluxo Gastroesofágico (TSUGANE E SASAZUKI, 2007; SMYTH, 2020). A infecção por *H. pylori* é o fator de risco mais bem descrito para o câncer gástrico. A infecção crônica da mucosa gástrica leva a progressão gradual das lesões gástricas

(WHO, 2019), no entanto, a maioria dos indivíduos infectados não desenvolve malignidade (CREW *et al.*, 2006; CARCAS *et al.*, 2014). São necessárias interações entre a infecção por *H. pylori*, e os fatores ambientais, alimentares e genéticos, para que ocorra o desenvolvimento da carcinogênese gástrica (MILNE *et al.*, 2009), assim, a adequação da dieta para uma alimentação com menor ingestão de sal e alimentos salgados é uma estratégia possível para prevenir o câncer gástrico. Uma vez que o risco de câncer gástrico pode ser reduzido por alta ingestão de frutas e vegetais (TSUGANE E SASAZUKI, 2007; ELIZABETH *et al.*, 2020).

O câncer gástrico não apresenta sintomas específicos nos estágios iniciais (HUNT *et al.*, 2015). Sendo assim, seu diagnóstico na maioria das vezes se dá em estágio avançado levando a um prognóstico ruim e a uma taxa de sobrevida de até cinco (05) anos. O principal método de diagnóstico é a endoscopia e a biópsia, que trazem desconforto e ansiedade para o paciente. A ressecção cirúrgica é o procedimento terapêutico mais eficaz, os avanços na quimioterapia têm melhorado bastante a sobrevida livre de progressão do tumor e as taxas de sobrevida global. No entanto, um diagnóstico precoce é de grande importância para garantir um tratamento eficaz em um menor tempo possível, melhorando a taxa de sobrevida dos pacientes (LI Y *et al.*, 2011; EMOTO *et al.*, 2012). O desenvolvimento de moléculas biomarcadoras para a detecção precoce do CG teve alguns avanços, porém observa-se que biomarcadores diagnósticos úteis para o diagnóstico do câncer gástrico parecem limitados. A maioria deles não é recomendada devido ao limite de especificidade e sensibilidade nos estágios iniciais da doença gástrica (SHIMADA *et al.*, 2014). Assim, se faz muito importante a necessidade de identificar biomarcadores adicionais para o rastreio e diagnóstico precoce da carcinogênese gástrica.

1.2.2 Modelo Animal

A experimentação animal é muito importante para as pesquisas científicas, contribuindo de maneira marcante para a ciência e a tecnologia. Sua contribuição nos diferentes campos científicos tem promovido ao longo dos anos a descoberta de medidas profiláticas e de tratamentos de inúmeras enfermidades que acometem os seres vivos (TAKAYAMA, 2008).

Os primatas não humanos constituem excelentes modelos experimentais devido à grande proximidade evolutiva filogenética com o ser humano, possuindo maior similaridade anatômica, fisiológica e bioquímica que os roedores, gerando resultados que podem ser

interpretados de forma mais próxima e segura para o organismo humano. O tamanho dos órgãos torna possível a repetição de diagnósticos tais como exames endoscópicos, coleta de amostras de sangue e biopsia de um mesmo animal por um longo período; além disso, a maior longevidade dos macacos permite a exposição à carcinógenos por longos intervalos de tempo, assim como ocorre em humanos (TAKAYAMA *et al.*, 2008).

Muitos estudos relataram o desenvolvimento de neoplasias diversas em primatas não humanos. Terrell *et al.* (1980) foram dos primeiros grupos a diagnosticar linfomas malignos em primatas não humanos. Paoli e McClure (1982) reportam o desenvolvimento espontâneo de dois adenocarcinomas mucóides colônicos em Tamarins (*Saguinus oedipus*). Um macho adulto apresentou metástase para os linfonodos regionais e o pâncreas. Brack (1998) publicou também uma revisão de 26 tumores gastrointestinais diagnosticados em 23 primatas não humanos durante necropsias de rotina no “German Primate Center”. Destes, 15 casos foram de adenocarcinomas mucóides coloretais em Tamarins (*Saguinus oedipus*), dos quais dois animais apresentavam associação com adenocarcinomas gástricos.

O adenocarcinoma intestinal parece ser a neoplasia maligna mais freqüente em primatas não humanos, e uma substancial causa de morbidade e mortalidade é observada no seu envelhecimento. Uma revisão retrospectiva de 32 casos foi realizada por Valverde *et al.* (2000) no “California Regional Primate Research Center”, a avaliação clínica revelou perda severa de peso, anorexia e presença de massa tumoral palpável. Também foi observado o desenvolvimento de anemia microcítica e hipocrômica. Análises laboratoriais detectaram a presença de sangue intermitentes nas fezes, hipoproteinemia e hipoalbuminemia. Os locais mais freqüentes onde houve o desenvolvimento de adenocarcinomas intestinais foram a junção ileocecal, colo, íleo, jejuno e ceco. Metástases foram evidentes em 34% dos casos, com o desenvolvimento de nódulos periféricos no fígado, pulmões, pâncreas e glândulas adrenais. Adenocarcinomas espontâneos do colo também já foram descritos em dois macacos rhesus. Os tumores foram associados com metástases, o que é incomum nesses primatas (KERRICK E BROWNSTEIN, 2000).

1.2.3 N-metil-nitrosourea (MNU)

Uma grande variedade de substâncias químicas é capaz de induzir o desenvolvimento de neoplasias, funcionando como agentes carcinogênicos. Tumores malignos surgem do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas causadas pela exposição a esses agentes num

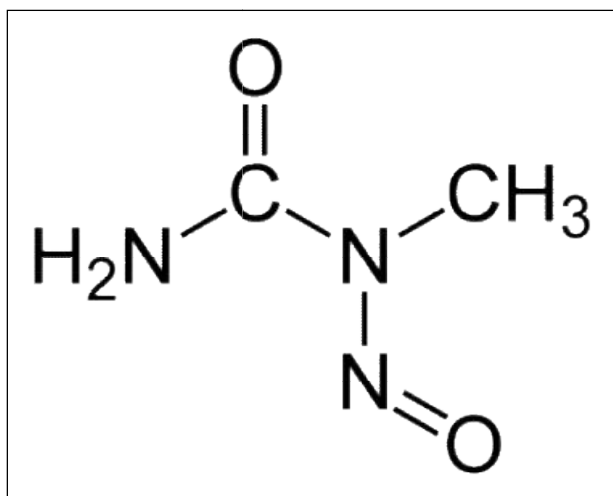
processo que envolve uma série de eventos que resultam na conversão de células normais em células neoplásicas (TAKAYAMA, 2008).

Os compostos N-nitrosos são compostos químicos produzidos pela reação de óxidos de nitrogênio com aminas ou amidas secundárias e terciárias (AUCHER *et al.*, 1999). Atuam como agentes carcinogênicos induzindo o desenvolvimento de tumores em diversos modelos animais experimentais, sendo também possível que estes agentes possam estar associados ao desenvolvimento de alguns tipos de tumores humanos.

Quando comparados com outros modelos animais, os tumores quimicamente induzidos apresentam vantagens como um curto período de latência e elevada reprodutibilidade. Além das semelhanças com o processo de carcinogênese humana onde o desenvolvimento de tumores ocorre através de uma série de etapas progressivas. Esse modelo *in vivo* fornece informações bastante relevantes sobre a progressão da carcinogênese em órgãos alvos, assim como a possibilidade de avaliar agentes preventivos e terapêuticos (FAUSTINO E ROCHA *et al.*, 2015; MATOS *et al.*, 2016). No entanto, estes modelos apresentam também algumas limitações, como os elevados custos de obtenção e manutenção dos animais, a necessidade de utilização de agentes cancerígenos em doses elevadas para induzir o desenvolvimento do processo carcinogênico, a exposição prolongada a agentes potencialmente cancerígenos, o que pode causar danos tanto às pessoas que o manuseiam quanto ao meio ambiente (FAUSTINO E ROCHA *et al.*, 2015).

O MNU metila o DNA em sítios nucleofílicos, gerando N7 e N3 alquilpurinas. Sugere-se que a lesão mutagênica primária é O6 metilguanina (FRIEDBERG *et al.*, 1995; FEIO *et al.*, 2014). O MNU exerce efeito carcinogênico direto sobre o organismo, sem requerer ativação enzimática. O MNU apresentou efeito carcinogênico em todas as espécies de animais testadas: camundongos, ratos, sírio dourado, hamster chinês e europeu, coelhos, roedores, suínos, cães e macacos (WHO-IARC, 1998).

Figura 2: Estrutura química do N-metil-nitrosourea (MNU)



Fonte: FAUSTINO E ROCHA (2015).

Em primatas não humanos, a administração oral deste composto induziu o surgimento de carcinoma de células escamosas na superfície gastrointestinal (cavidade oral, faringe, laringe e estômago), além de inflamações crônicas no esôfago, as quais causaram o aumento da proliferação celular, favorecendo assim o surgimento de tumores (Thorgeirsson *et al.*, 1994) e de endometriose e cisto ovariano em algumas fêmeas (Takayama *et al.*, 2008).

Os compostos N-nitrosos são compostos químicos produzidos pela reação de óxidos de nitrogênio com aminas ou amidas secundárias e terciárias (Matos *et al.*, 2016; Aucher *et al.*, 1999). Atuam como agentes carcinogênicos induzindo o desenvolvimento de tumores em diversos modelos animais experimentais, sendo também possível que estes agentes possam estar associados ao desenvolvimento de alguns tipos de tumores humanos.

Os seres humanos são frequentemente expostos aos compostos nitrosos através da dieta devido ao consumo de carnes curadas, bacon, peixe defumado e frito, cerveja, manteiga, salsichas, queijo, presunto, leite em pó e pickles, ou através do uso de serviços de cabeleireiros, utilização de produtos como borrachas, metal e couro industrializado, além dos agrotóxicos (FAUSTINO E ROCHA *et al.*, 2015). O acúmulo desses compostos nos alimentos está associado às condições de processamento, como alimentos em conserva, armazenados em condições de umidade, defumados ao ar saturado com nitrogênio, secos em altas temperaturas e curados com nitrato ou nitrito (FAUSTINO E ROCHA *et al.*, 2015)

1.2.4. Homocisteína

Os níveis de homocisteína podem ser aumentados por diferentes condições, incluindo fatores genéticos, dieta, estilo de vida, vários medicamentos, epilepsia e outros. Os mecanismos subjacentes à neurotoxicidade da homocisteína incluem estresse oxidativo, dano ao DNA, tiolação de proteínas ou homocisteinilação de proteínas, desencadeando apoptose e excitotoxicidade. Dados recentes indicam que a inflamação durante a hiper-homocisteinemia (hHcy) acompanha o aumento dos níveis de várias citocinas e alterações na metilação do DNA (HASAN *et al.*, 2019). A homocisteína é um composto intermediário necessário na via de síntese de transsulfuração da cisteína a partir da metionina. A metionina sintase catalisa a remetilação da homocisteína em metionina para manter níveis adequados de folato intercelular, necessários para a síntese de DNA, metilação e homeostase (LISSOWSKA *et al.*, 2007; ZHI LIU *et al.*, 2018). Quando há excesso de metionina celular, a via de transsulfuração desempenha um papel crucial no metabolismo da homocisteína, convertendo homocisteína em cistationina utilizando o fosfato como cofator (HASAN *et al.*, 2019). Quando o nível celular de metionina é baixo, a homocisteína é remetilada de volta à metionina em uma reação dependente de betaina ou folato.

A homocisteína foi escolhida para este estudo com base nas descobertas de estudos anteriores que mostraram que os níveis aumentados de homocisteína no plasma estavam associados a taxas de proliferação celular *in vitro* em uma variedade de tipos de tumor (TAWFIK *et al.*, 2020; ELSHERBINY *et al.*, 2020), bem como a danos oxidativos às células (SIBAROV *et al.*, 2020). A hiper-homocisteinemia pode aumentar a superprodução de radicais livres de oxigênio através da oxidação da homocisteína e pode inibir a metilação do DNA nos tecidos (HERMANN; SITDIKAVA; 2021; IVANOVA *et al.*, 2021)

Pacientes com câncer têm altos níveis plasmáticos de homocisteína, como já foi citado anteriormente, existindo uma relação inversa entre a concentração de homocisteína plasmática e folato. Em pacientes com câncer, espera-se que o nível plasmático de folato esteja baixo, uma vez que as células tumorais precisam extrair folato do sangue através da síntese de Purina. A toxicidade da homocisteína independe do tipo ou do órgão/tecido em que se encontra o câncer. As concentrações plasmáticas de homocisteína variam de acordo com o estágio da carcinogênese. Câncer em estado inicial não apresenta alterações significativas de homocisteína plasmática, porém em cânceres em estágio avançado, os níveis plasmáticos da

homocisteína são bastante elevados (BRZEZINSKI, 2020). Assim como em pacientes que são submetidos à cirurgia ou quimioterapia também ocorre um aumento acentuado dos níveis de homocisteína. Elevando a frequência de eventos tromboembólicos, complicação mais frequente e a segunda causa mais comum de morte entre os pacientes com câncer, e diminuindo a concentração plasmática de ácido fólico (HASAN *et al.*, 2019).

Claramente existem fatores genéticos, epigenéticos e ambientais que estabelecem uma associação próxima entre distúrbios do metabolismo de homocisteína e o câncer. Onde níveis aumentados de homocisteína representam um papel importante na detecção de diversos tipos de câncer, incluindo, Câncer Colorretal, de Estômago, de Pulmão e outros (ZHI LIU *et al.*, 2018). A compreensão dos efeitos da homocisteína no crescimento e proliferação de células cancerígenas renderiam novas e promissoras estratégias contra o câncer. Sendo assim, a homocisteína pode ser usada como um potencial biomarcador tumoral para uma variedade de cânceres, uma vez que reflete a taxa de proliferação de células tumorais (ZHI LIU *et al.*, 2018).

1.2.5 Ácido Fólico

O Folato (vitamina B9) desempenha um papel fundamental no metabolismo celular fornecendo metabólitos necessários para a síntese e reparo do DNA, proteínas e lipídios, bem como está envolvido em reações biológicas de metilação e biossíntese de nucleotídeos que são desregulados durante a carcinogênese. Sua depleção pode resultar em hipometilação global do DNA, dano a sua estrutura, reparo prejudicado do DNA e expressão alterada de proto-oncogenes/genes supressores de tumor (KIM, 2000; CHOI E MASON, 2000; WOORI *et al.*, 2016). Várias enzimas envolvidas no metabolismo do folato requerem outros cofatores do grupo das vitaminas do complexo B, como a vitamina B12. Além disso, o 5-metil-tetraidrofolato (5-metil-THF) atua como doador do grupo metil que atua na remetilação da homocisteína em metionina, representando um intermediário necessário para os processos de metilação.

Relatos de um estudo feito com modelo animal de Camundongo infectado por *Helicobacter pylori* mostrou que a suplementação com folato aumentou significativamente a metilação global do DNA e reduziu a inflamação da mucosa e a displasia celular, enfatizando a hipótese de que alta ingestão de folato poderia prevenir o câncer gástrico (GAO *et al.*, 2013). O resultado de outro estudo mostrou o risco de desenvolvimento de câncer gástrico associado

a baixos níveis de folato (RADY *et al.*, 2002; WOORI *et al.*, 2016;). Além de relatar que as concentrações de folato são significativamente menores em tecidos de câncer gástrico que em tecidos de gastrite, e que a hipometilação ou a superexpressão de genes envolvidos com a carcinogênese gástrica também foram correlacionadas com menores concentrações de folato nos tecidos (GOS *et al.*, 2002; STANISŁAWSKA-SACHADYN *et al.*, 2019;).

Existem cada vez mais evidências que sugerem que baixos níveis de folato estão envolvidos no desenvolvimento do CG, porém, embora os níveis de folato no sangue possam refletir seu grau de depleção, ainda não foi estabelecida uma relação entre o nível de folato no sangue e o CG. Em um estudo de câncer em estágio avançado foi possível observar que a concentração plasmática de ácido fólico foi menor em pacientes com hipometilação total do DNA genômico do que em pacientes com metilação normal. (MOYERS *et al.*, 2001; TENG-YOU *et al.*, 2014),

Apesar dos efeitos benéficos da suplementação de ácido fólico em algumas malignidades, existem algumas preocupações relacionadas ao impacto potencial dessas intervenções, ou mesmo do status de folato, na progressão do câncer. Altos níveis de folato podem permitir a progressão de células neoplásicas para câncer através da estimulação da síntese de DNA e proliferação celular (SACHADYN *et al.*, 2019; Kim, 2006). Todavia, níveis inadequados de folato em células neoplásicas podem estar associados à inibição da síntese de DNA e, portanto, podem levar à interrupção do crescimento celular (KIM, 2006; SACHADYN *et al.*, 2019). No entanto, níveis subótimos de folato também estão associados a uma maior taxa de quebras de DNA, mutações e alterações nos padrões de metilação do DNA; potencialmente desencadeando a transformação de células normais em células neoplásicas (TENG E YOU *et al.*, 2014).

O baixo nível de folato está relacionado ao desenvolvimento do câncer gástrico, mas o papel do folato na capacidade invasiva do câncer gástrico permanece ainda pouco estudado. Um estudo de caso-controle mostrou que o folato sérico mais baixo estava significativamente associado ao desenvolvimento de câncer gástrico. Além disso, na coorte de pacientes com câncer gástrico, folato sérico baixo foi significativamente associado a fenótipos invasivos, como invasão da serosa, invasão linfática e metástase hepática (TENG E YOU *et al.*, 2014). Estes achados justificam a continuidade de estudos para decifrar como as flutuações dos níveis de folato, bem como sua atuação na metilação e síntese do DNA podem está associadas ao desenvolvimento tumoral.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PRIMATAS NÃO HUMANOS

Para o desenvolvimento da pesquisa foi necessário fazer a manipulação de primatas não humanos da espécie *Cebus apella*, machos, provenientes do Centro Nacional de Primatas (CENP). Os animais foram identificados com microchips e foram mantidos sob as condições padrões do CENP, onde receberam dieta balanceada, não enriquecida com cloreto de sódio. Este projeto recebeu a aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal do Pará (PARECER MED002-10). De acordo com a avaliação veterinária, clínica e comportamental, todos os animais foram considerados saudáveis no momento da endoscopia, do ultrassom e da primeira coleta de sangue periférico. O bom estado de saúde foi confirmado pelo comportamento do animal. Foi utilizada a veia femoral direita dos animais para receber os tratamentos administrados por injeção.

2.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Com o objetivo de estudar a tumorigênese de estômago e a existência de potenciais biomarcadores bioquímicos e hematológicos utilizando modelo animal, foram selecionados 06 primatas não humanos da espécie *Cebus apella*, adultos (6 - 7 anos) e machos (2,7 - 3,6 kg).

2.2.1 Tratamento com MNU

Seis *Cebus apella* foram tratados com MNU (Grupo MNU) até o início da tumorigênese.

2.2.2 MNU

O MNU (MNU - N1517 ISOPAC® da Sigma-Aldrich) foi administrado de forma diluída em água, diariamente, por via oral (16 mg/kg) e ofertada *ad libitum* seguindo os protocolos descritos por Thorgeirsson *et al.* (1994) e Takayama *et al.* (2008).

2.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS

No dia zero (0), amostras de sangue de todos os animais foram coletadas para a determinação dos parâmetros hematimétricos e leucocitários, como também para a avaliação das funções hepáticas e renais e dosagens de proteína C-reativa (PC-R), ácido fólico e homocisteína. Essas amostras também foram utilizadas como controles negativos do estudo. Durante o período de tratamento, os animais foram inspecionados diariamente e os sintomas clínicos registrados. Foi determinado o peso corporal e sangue periférico da veia femoral esquerda foi coletado para todas as análises sorológicas.

As análises bioquímicas incluíram glicose, uréia nitrogenada, creatina, proteína total, albumina, globulina, bilirrubina total, colesterol, triglicerídeos, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, γ -glutamyl transferase, lactato desidrogenase, creatina quinase, amilase, cálcio, fósforo inorgânico, sódio, potássio e cloreto. As análises clínicas hematológicas incluíram a contagem de células vermelhas, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio e da hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, contagem de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos) e contagem de reticulócitos e plaquetas.

A metodologia e os valores de referência para um animal macho adulto foram previamente relatados por Riviello e Wirz (2001). A PC-R foi dosada pelo teste turbidimétrico fotométrico, segundo protocolo descrito por Price *et al.* (1987).

Os animais foram monitorados de forma a evitar qualquer sinal de dor, desconforto, estresse ou infecção antes, durante e depois da injeção do tratamento com MNU. Também foram avaliadas ocorrências de reações alérgicas ou de toxicidade.

No modelo de carcinogênese por tratamento com MNU, nossos resultados focalizaram principalmente as análises sanguíneas dos dias 0, 90, 120, 300, 940 e 960.

2.4 AMOSTRAS TECIDUAIS, ANÁLISE DA MUCOSA GÁSTRICA, MONITORAMENTO DO TAMANHO TUMORAL, ANATOMIA PATOLÓGICA, ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E PESQUISA DE *HELICOBACTER PYLORI*.

Os animais foram examinados mensalmente, até os 900 dias de tratamento com MNU, após este período as análises supracitadas foram semanais. Essa mesma abordagem foi utilizada para identificação de possíveis recidivas.

Através de endoscopia foram coletadas amostras de tecido gástrico normal e neoplásico dos animais. O crescimento tumoral também foi acompanhado por endoscopia e ultrassom. A análise histopatológica das biopsias do estômago e de linfonodos inguinais e axilares, dos *Cebus apella* foram incluídos em blocos de parafina, com cortes histológicos de 5 µm e corados pela hematoxilina-eosina.

Biopsias de tecido gástrico normal e lesões da mucosa estomacal (gastrites atróficas e não atróficas, metaplasias e adenocarcinomas) foram retiradas por endoscopia. Linfadenectomia foi realizada para a coleta de amostras linfonodais inguinais e axilares. Após a ressecção cirúrgica, a medida tumoral foi obtida pelo exame anátomo-patológico, no qual o tamanho clínico do tumor foi obtido medindo-se os seus dois maiores diâmetros, em milímetros, com o auxílio de um paquímetro.

Na análise histopatológica, os tumores foram classificados segundo o tipo histológico de Laurén (intestinal ou difuso). Na mucosa adjacente ao tumor, foi verificada a presença ou a ausência de metaplasia intestinal, de displasia epitelial, e a pesquisa da bactéria *Helicobacter pylori* foi realizada pela coloração *Giemsa* modificada.

2.5 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ÁCIDO FÓLICO E HOMOCISTEÍNA

Os níveis plasmáticos de ácido fólico foram dosados utilizando o Imunoensaio Automatizado de Micropartículas Quimioluminescentes (CMIA) (Abbott System, USA) em quanto que os níveis de homocisteína foram revelados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (Betamed, Agilent 1100 series, Chromosystems Reagent Kit) com padrões Sigma.

3 RESULTADOS

3.1 MODELO ANIMAL: TRATAMENTO COM MNU

Seis *Cebus apella* foram tratados com MNU por aproximadamente 2,5 anos. Todos os animais desenvolveram lesões pré-neoplásicas e 5 morreram por intoxicação de drogas antes do desenvolvimento do câncer gástrico. Todos os animais apresentaram gastrite não atrófica no 90º dia. No 110º dia, 1 animal morreu de intoxicação por drogas, os outros 5 animais apresentaram gastrite atrófica no 120º dia. No 134º, 140º e 290º dias, mais 3 animais morreram em decorrência de intoxicação. No 300º dia, os 2 *Cebus apella* sobreviventes apresentaram metaplasia intestinal na mucosa gástrica. Um animal morreu com sintomas de intoxicação por drogas no 520º dia e o último animal sobrevivente desenvolveu adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal na região antral do estômago. Este tumor foi observado por ultrassonografia e endoscopia no 940º dia e estes dados foram confirmados por análise histopatológica. Nenhum dos animais desenvolveu qualquer outro tipo de tumor.

Os animais que morreram apresentaram os sintomas típicos de intoxicação: midríase, confusão, sonolência, vertigem, perda de equilíbrio, tremor, hipertermia, baixo consumo de alimento, sintomas gastrointestinais não específicos (diarréia e vômito), retenção urinária, erupções cutâneas e lesões orais cáusticas e ulcerativas. Eles também apresentaram insuficiências renais, hepáticas e respiratórias, hipocalemia, colecistite crônica e esteatose.

No modelo de carcinogênese, observamos que o tratamento com MNU levou a significantes modificações nos níveis de triglicerídeos ($X^2=7,6$, $df=2$, $p=0,0224$, pelo teste de Friedman), uréia ($X^2=10$, $df=2$, $p=0,0067$), fósforo ($X^2=10$, $df=2$, $p=0,0067$), alanina aminotransferase ($X^2=10$, $df=2$, $p=0,0067$), bilirrubina total ($X^2=8,4$, $df=2$, $p=0,015$), creatinina ($X^2=8,4$, $df=2$, $p=0,015$) e PC-R ($X^2=8,4$, $df=2$, $p=0,015$) (Figura 3A-G). As análises *post-hoc* de Dunns revelaram um aumento significativo no 120º dia de todos esses parâmetros bioquímicos em relação aos valores iniciais ($p<0,05$). O MNU alterou outros parâmetros bioquímicos, o maior aumento foi observado nos níveis da PC-R. Depois de 90 dias de tratamento com MNU, os níveis da PCR aumentaram 5,3-13 vezes comparados aos valores iniciais.

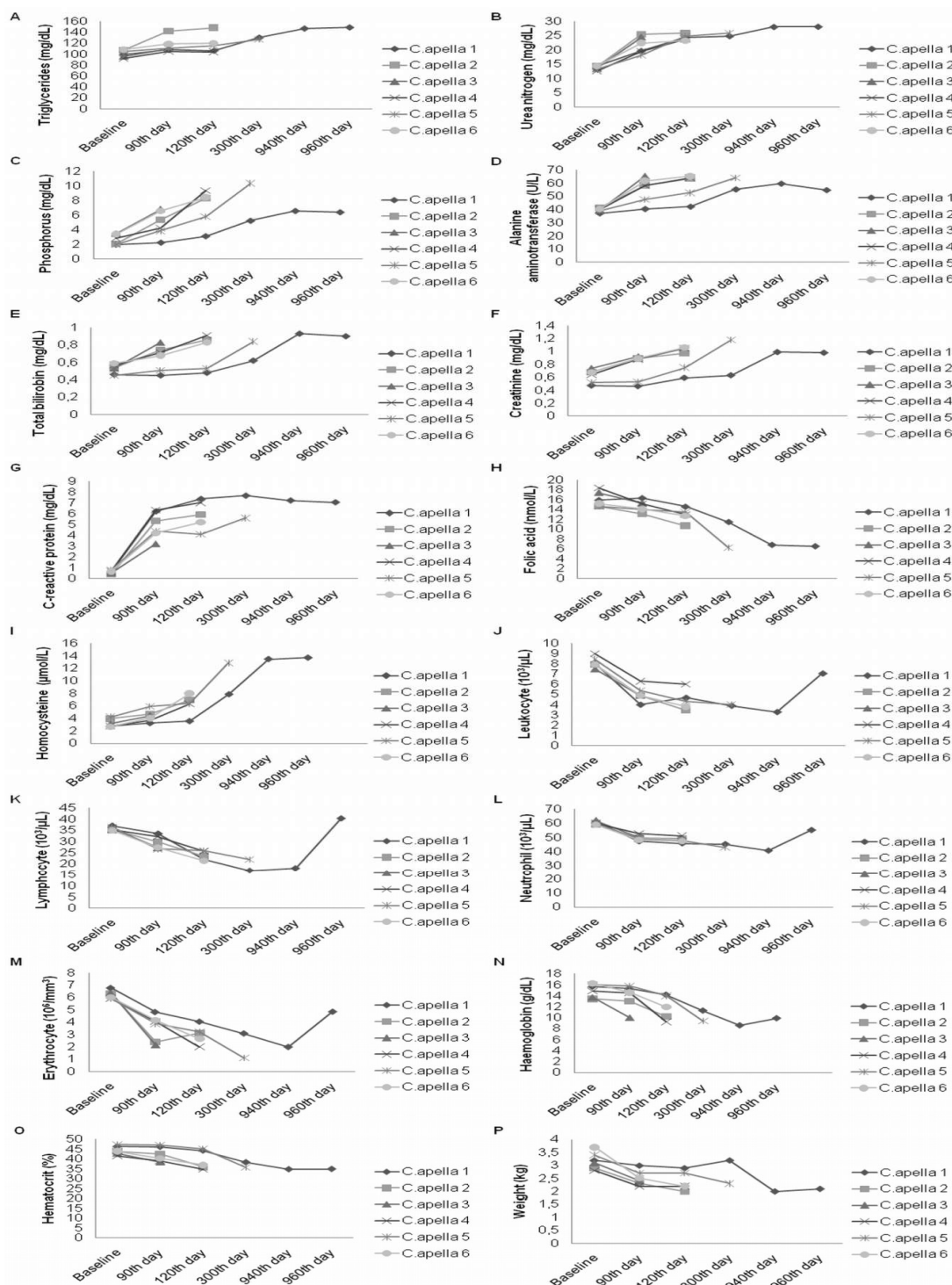
Também observamos que as concentrações de ácido fólico ($X^2=8,4$, $df=2$, $p=0,015$) e de homocisteína ($X^2=10$, $df=2$, $p=0,0067$) foram alteradas com o tratamento com MNU (Figura 3H-L). A concentração de ácido fólico foi significativamente reduzida (mais que 2 vezes) e a concentração de homocisteína aumentou quase 5 vezes no 120º dia quando comparadas aos níveis iniciais ($p<0,05$) (Figura 3).

Em relação às análises hematológicas, durante o tratamento com MNU, observamos uma significativa alteração do número de leucócitos ($X^2=8,4$, $df=2$, $p=0,0067$), linfócitos ($X^2=10$, $df=2$, $p=0,0067$), neutrófilos ($X^2=10$, $df=2$, $p=0,0067$) e eritrócitos ($X^2=8,4$, $df=2$, $p=0,015$), assim como dos valores da hemoglobina ($X^2=10$, $df=2$, $p=0,0067$) e do hematócrito ($X^2=10$, $df=2$, $p=0,0067$) (Figura 3J-O). As análises *post-hoc* de Dunns indicaram uma significativa redução de todos esses parâmetros hematológicos no 120º dia quando comparado aos valores iniciais ($p<0,05$) (Figura 3).

Todos os animais apresentaram níveis anormais dos parâmetros hematológicos supracitados imediatamente após o tratamento com MNU. A ingestão de MNU também induziu uma significativa perda de peso nos animais ($X^2=8,4$, $df=2$, $p=0,015$) (Figura 3P). Os *Cebus apella* apresentaram menor peso corporal no 120º dia do que no início do tratamento. ($p<0,05$).

No 960º dia, o *Cebus apella* sobrevivente foi submetido à remoção cirúrgica do tumor. Este animal foi monitorado clinicamente durante um ano depois do fim do experimento e não mostrou qualquer complicação resultante do tratamento.

Figura 3: Parâmetros bioquímicos e hematológicos anormais nos animais tratados com MNU. A) Triglicerídeos; B) Uréia Nitrogenada; C) Fósforo; D) Alanina aminotransferase; E) Bilirrubina total; F) Creatinina; G) proteína C-reativa; H) Leucócitos; I) Linfócitos; J) Neutrófilos; K) Eritrócitos; L) Hemoglobina; M) Hematócrito; N) Ácido fólico; O) Homocisteína; P) Peso. N=6 nos dias 0-90 (gastrite não atrofica); N=5 no 120º dia (gastrite atrofica); N=2 no 300º dia (metaplasia intestinal); N=1 no 940º dia (desenvolvimento de câncer gástrico) e 960º dia (Efeito do tratamento com o *Canova*).



Fonte: Da Costa (2012)

4 DISCUSSÃO

4.1 A CARCINOGENESE GÁSTRICA EM *CEBUS APELLA*

Diversos estudos descreveram o desenvolvimento de neoplasias em primatas não humanos, porém a incidência é baixa quando comparada à dos roedores. Todos os relatos referem-se ao desenvolvimento da carcinogênese espontânea, principalmente relacionada ao processo de envelhecimento (TAKAYAMA *et al.*, 2008).

A proximidade filogenética com o ser humano faz com que os primatas não humanos ofereçam um modelo útil para a pesquisa básica em mecanismos de carcinogênese, bem como para o desenvolvimento e validação de novas terapias para várias doenças. O *Cebus apella*, um primata do Novo Mundo, é um interessante modelo para estudos biomédicos, uma vez que esse animal tem fácil adaptabilidade ao cativeiro e seu tamanho é reduzido. De acordo com nossos conhecimentos, este é o primeiro estudo que estabeleceu um modelo de carcinogênese gástrica em *Cebus apella*.

O tipo histológico mais frequente de câncer gástrico é o adenocarcinoma, responsável por 95% dos tumores de estômago no Brasil (INCA, 2020). A classificação histopatológica mais utilizada de adenocarcinoma gástrico é a de Lauren (1965), que divide os adenocarcinomas gástricos em dois tipos principais: difuso e intestinal. O tipo intestinal de câncer gástrico, também chamado de tipo “epidêmico”, depende de fatores ambientais e está associado à presença de lesões pré-cancerosas, como gastrite crônica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal, neoplasia intraepitelial e adenocarcinoma (SMITH *et al.*, 2006; LEE, *et al.*, 2016; SUKANYA *et al.*, 2021). O tipo difuso apresenta prognóstico ruim, não está associado a lesões pré-cancerosas e apresenta um padrão de crescimento invasivo (HUNTSMAN *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2016;). Neste trabalho induzimos o adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal em *Cebus apella*, através do tratamento com o carcinogênico MNU (LEAL *et al.*, 2010).

Para o estudo, induzimos a carcinogênese gástrica através do tratamento com MNU. O acúmulo deste carcinogênico conduz ao desenvolvimento de vários tipos de tumor no trato digestivo (cavidade oral, faringe, laringe e principalmente esôfago e estômago) de primatas

não humanos (ADAMSON *et al.* 1977; THORGEIRSSON *et al.*, 1994; TAKAYAMA *et al.* 2008; FAUSTINO E ROCHA *et al.*, 2015). O MNU induz lesões pré-neoplásicas antes do desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal (TSUKAMOTO *et al.*, 2007), usualmente na região antral do estômago dos animais tratados (KODAMA *et al.* 2005).

No presente estudo, todos os animais tratados com MNU apresentaram lesões pré-neoplásicas: gastrite não atrófica (06 animais), gastrite atrófica (05 animais) e metaplasia intestinal (02 animais). Detectamos o desenvolvimento do adenocarcinoma do tipo intestinal na região antral de um único animal. Em *Cebus apella*, o MNU induziu carcinogênese gástrica do tipo intestinal apresentando sequências de etapas similares às descritas para humanos (Correa, 1992). Assim este modelo pode permitir o estudo da evolução do câncer gástrico do tipo intestinal, identificando possíveis biomarcadores envolvidos do desenvolvimento e na evolução das etapas iniciais do processo carcinogênico, além dos alvos específicos para a transformação neoplásica gástrica.

Takayama *et al.* (2008) reportaram o desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico em 2 primatas do velho mundo (*Macaca fascicularis*), após 10 anos de tratamento contínuo com MNU (10 mg/kg). O pequeno tamanho do *Cebus apella*, pode ter contribuído com o rápido desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico, quando comparado com esses primatas do velho mundo tratados com MNU.

4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E HEMATOLÓGICAS NOS MODELOS DE CARCINOGENESE GÁSTRICA

Em muitas neoplasias, a inflamação crônica está relacionada com o desenvolvimento da malignidade e, a presença de elevados níveis da Proteína C-Reativa é um indicativo de risco para o desenvolvimento do câncer. A inflamação crônica esta envolvida com a malignidade em várias neoplasias. Nesse modelo de estudo, através do tratamento com MNU, foi detectada uma elevação significativa dos níveis da PC-R. A PC-R é um marcador representativo das condições inflamatórias e quando seus níveis estão elevados há uma associação com o aumento do risco de câncer no pré-diagnóstico do paciente (CASTELL *et al.*, 1990; MATOS *et al.*, 2016). Níveis elevados desse biomarcador também tem associação

com a progressão do tumor ou com o estágio avançado da malignidade, além de ser um marcador desfavorável para taxa de sobrevida de pacientes com câncer gástrico (KIM *et al.*, 2009; MATOS *et al.*, 2016). Chang et al. (2010) sugerem que, embora a PC-R sérica não seja um biomarcador específico para câncer gástrico, esta proteína pode ser um potencial biomarcador de prognóstico e um promissor alvo terapêutico em pacientes com câncer gástrico.

Após 90 dias de tratamento com MNU foi observado que os níveis séricos da PC-R aumentaram de 5,3-13 vezes em comparação ao início do tratamento (dia 0). O processo inflamatório crônico foi confirmado pela presença de gastrite não atrófica em todos os *Cebus apella* tratados com o MNU. Com o decorrer do tratamento os níveis séricos aumentaram, reforçando a hipótese de que embora a PC-R não seja um biomarcador específico para o câncer gástrico, pode ser um possível biomarcador de prognóstico para essa patologia (KIM *et al.*, 2009; CHANG *et al.*, 2010; MATOS *et al.*, 2016).

Foi possível detectar a redução do ácido fólico associado à carcinogênese gástrica. O ácido fólico tem recebido atenção especial, pela sua participação em processos essenciais, como na síntese, reparo e metilação do DNA. A deficiência do ácido fólico acelera o processo de carcinogênese visto que induz a incorporação de uracila no DNA e erros na replicação e reparo dessa molécula, o que causa instabilidade cromossômica e genômica (FENECH, 2007; DUTHIE, 2011). Nossos resultados, no modelo experimental de carcinogênese gástrica, apresentam uma correlação inversa entre a concentração do ácido fólico e o risco de desenvolver câncer gástrico, semelhante a outros estudos experimentais e epidemiológicos em leucemias, neuroblastomas, câncer colorretal e em tumores do esôfago, estômago, pâncreas, pulmão, cérvix e ovário (KIM, 2007; TENG-YOU *et al.*, 2014).

A concentração plasmática da homocisteína teve um aumento concomitante à presença das lesões associadas à tumorigênese gástrica. Foi observado um crescimento contínuo da concentração deste aminoácido conforme a carcinogênese se desenvolvia. Devido à proliferação das células cancerosas, pacientes com câncer apresentam quantidades elevadas de homocisteína total circulante. Estudos da literatura sugerem que a concentração total de homocisteína poderia ser usada como marcador de biomonitoramento tumoral, durante o tratamento de pacientes com câncer, visto que o declínio da concentração desse aminoácido é observado em paralelo com a morte das células neoplásicas. A hiperhomocisteinemia pode

induzir o estresse oxidativo celular e a hipometilação do DNA, aumentando o risco de câncer, incluindo o câncer gástrico (WU E WU, 2002; ZACHO *et al.*, 2010; HERMANN E SITDIKAVA; 2021; IVANOVA *et al*, 2021). Já o seu descréscimo está relacionado com a regressão tumoral. Essas observações corroboram com nossos achados no modelo de carcinogênese deste trabalho e permite inferir que a concentração de homocisteína pode ser utilizada para aferir a eficiência da terapia anticâncer.

Nesse modelo de carcinogênese, foi possível analisar que os níveis de uréia nitrogenada, fósforo, alanina aminotransferase, bilirrubina total e creatina aumentaram com o tratamento com MNU, essas alterações podem ser associadas com os sintomas típicos da intoxicação por drogas que foi constatada nos cinco (05) *Cebus apella* antes da morte dos mesmos. Também detectamos que os leucócitos, linfócitos, neutrófilos, a hemoglobina e o hematócrito foram significativamente reduzidos pelo tratamento com MNU, o que esta de acordo com os efeitos que esse carcinogênico causa no sistema linfo-hematopoiético (UWAGAWA *et al.*, 1991; FAUSTINO E ROCHA *et al*, 2015;). E que mostra que os animais apresentaram anemia. Anemia é uma complicação comum em pacientes com doenças inflamatórias de vários tipos, incluindo o câncer. Os mecanismos incluem mudanças mediadas por citocinas e alterações no metabolismo do ferro (ADAMSON, 2008).

5 CONCLUSÃO

Embora não tenhamos encontrado nenhum resultado diferente do que achamos na literatura para as diferentes concentrações de Ácido Fólico e de Homocisteína na Carcinogênese Gástrica, esse estudo foi importante para afirmar o papel que esses biomarcadores têm para o rastreio do CG. Uma vez que foi possível justificar as concentrações inversamente proporcionais entre o Folato e a Homocisteína, demonstrando que o aumento de um, influencia na diminuição do outro e, isso tem uma importante interpretação no desenvolvimento e no prognóstico do câncer.

Flutuações na concentração de homocisteína estão relacionadas ao desenvolvimento tumoral, visto que a concentração de homocisteína aumenta à medida que a carcinogênese evolui e diminui com a morte das células neoplásicas. Sendo assim um importante marcador

tanto para desenvolvimento da carcinogênese como para avaliar a eficácia da terapia antitumoral.

Em relação ao Ácido Fólico, sua concentração plasmática está intimamente ligada ao desenvolvimento neoplásico, pois a medida que o tumor se desenvolve, suas concentrações diminuem, caracterizando uma deficiência de folato sérico desde as primeiras lesões pré neoplásicas.

. Acredito que este estudo gerou informações biológicas importantes e relevantes que justificam a continuidade das pesquisas por novos biomarcadores para a carcinogênese gástrica que sejam mais específicos e que seja possível, através deles, fazer um melhor rastreio do desenvolvimento da neoplasia.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSON JW (2008) The anemia of inflammation/malignancy: mechanisms and anagement. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**: 159-165.
- BASS, A.J.; Thorsson, V.; Shmulevich, I.; Reynolds, S.M.; Miller, M.; Bernard, B.; Hinoue, T.; Laird, P.W.; Curtis, C.; Shen, H.; et al. Comprehensive Molecular Characterization of Gastric Adenocarcinoma. **Nature** 2014, 513, 202–209.
- BRAVATÀ, V. Controversial roles of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and folate in breast cancer disease. **Int. J. Food Sci. Nutr.** 66, 43–49 (2015).
- BRAY, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J. Clin.** 2018, 68, 394–424.
- BRZEZINSKI, K. S-adenosyl-L-homocysteine Hydrolase: A Structural Perspective on the Enzyme with Two Rossmann-Fold Domains. **Biomolecules** 2020, 10, 1682.
- CARCAS, L. P., Gastric cancer review. **J. Carcinog.** 2014, 13, 14
- CHANG CC, Sun CF, Pai HJ, Wang WK, Hsieh CC, et al. Preoperative serum C-reactive protein and gastric cancer; clinical-pathological correlation and prognostic significance. **Chang Gung Med J** 33: 301-312.
- CHARALAMPAKIS N, Economopoulou P, Kotsantis I, Tolia M, Schizas D, Liakakos T, et al. Medical management of gastric câncer: a 2017 update. **Cancer Med.** 2018 jan;7(1):123-133.
- CHOI, S. W., Mason, J. B., Folate and carcinogenesis: an integrated scheme 1–3. **J. Nutr.** 2000, 130, 129–132.
- CREW, K. D., Neugut, A. I., Epidemiology of gastric cancer. **World J. Gastroenterol.** 2006, 12, 354–362.
- DA Costa Jde F, Leal MF, Silva TC, Andrade Junior EF, Rezende AP, Muniz JÁ. Experimental Gastric Carcinogenesis in Cebus apella Nonhuman Primates. **PLos One.** 2011;6 (7): e21988.
- DE Jong, M. M. et al. Low-penetrance genes and their involvement in colorectal cancer susceptibility. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.** 11, 1332–1352 (2002).
- DUTHIE SJ Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. **J Inherit Metab Dis.** 2011.
- ELIZABETH C Smyth, Magnus Nilsson, Heike I Grabsch, Nicole CT van Grieken, Florian Lordick. Gastric câncer. **Lancet** 2020; 396: 635–48

ELSHERBINY, N.M.; Sharma, I.; Kira, D.; Alhusban, S.; Samra, Y.A.; Jadeja, R.; Martin, P.; Al-Shabrawey, M.; Tawfik, A. Homocysteine Induces Inflammation in Retina and Brain. **Biomolecules** 2020, 10, 393.

EMOTO S, Ishigami H, Yamashita H, Yamaguchi H, Kaisaki S, Kitayama J. Clinical significance of CA125 and CA72-4 in gastric cancer with peritoneal dissemination. **Gastric Cancer**. 2012;15:154-161.

EUSEBI, L.H.; Telese, A.; Marasco, G.; Bazzoli, F.; Zagari, R.M. Gastric Cancer Prevention Strategies: A Global Perspective. **J. Gastroenterol. Hepatol**. 2020, 35, 1495–1502.

FEIO DC, Muniz JA, Montenegro RC, Burbano RR, De Brito Junior LC, De Lima PD. Evaluation of the Immunological Cellular Response of Cebus apella Exposed to the Carcinogen N-MethylN-nitrosourea and Treated with CANOVA®. **In Vivo**. 2014 sep-oct;28(5):837-841.

FENECH M . Nutrition and genome health. **Forum Nutr** 2007 60: 49-65.

GAO, S., Ding, L. H., Wang, J. W., Li, C. B. et al., Diet folate, DNA methylation and polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase in association with the susceptibility to gastric cancer. **Asian Pac. J. Cancer Prev**. 2013, 14, 299–302.

GIOVANNUCCI, E. et al. Alcohol, low-methionine--low-folate diets, and risk of colon cancer in men. **J. Natl. Cancer Inst**. 87, 265–273 (1995).

GOS, M., Szpecht-Potocka, A., Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. **J. Appl. Genet**. 2002, 43, 511–524.

GRAVALOS C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. **Ann Oncol** 2008; 19: 1523-1529.

HERMANN, A.; Sitdikova, G. Homocysteine: Biochemistry, Molecular Biology and Role in Disease. **Biomolecules** 2021, 11, 737.

HUNT RH, Camilleri M, Crowe SE, et al. The stomach in health and disease. **Gut**. 2015;64:1650-1668. in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. **Am. J. Med. Genet**. 2002, 107, 162–168.

INCA, Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil.

IVANOVA, M.A.; Kokorina, A.D.; Timofeeva, P.D.; Karelina, T.V.; Abushik, P.A.; Stepanenko, J.D.; Sibarov, D.A.; Antonov, S.M. Calcium Export from Neurons and Multi-Kinase Signaling Cascades Contribute to Ouabain Neuroprotection in Hyperhomocysteinemia. **Biomolecules** 2020, 10, 1104.

KATO, I. et al. Serum folate, homocysteine and colorectal cancer risk in women: a nested case–control study. **Br. J. Cancer** 79, 1917–1921 (1999).

KIM DK, Oh SY, Kwon HC, Lee S, Kwon KA, et al. (2009) Clinical significances of preoperative serum interleukin-6 and C-reactive protein level in operable gastric cancer. **BMC Cancer** 9: 155.

KIM YI. Does a high folate intake increase the risk of breast cancer? **Nutr Rev.** 2006; 64(10 Pt 1):468– 75. Epub 2006/10/27.

KIM, Y. I., Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: a paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. **Nutr. Rev.** 2000, 58, 205–209.

LEAL MF, Calcagno DQ, Khayat AS, Silva TC, Muniz JA, Assumpção PP, et al. hTERT and TP53 deregulation in intestinal-type gastric carcinogenesis in non-human primates. **Clin Exp Med.** 2013 aug;13(3):221-224.

LEE, J.; Bass, A.J.; Ajani, J.A. Gastric Adenocarcinoma: An Update on Genomics, Immune System Modulations, and Targeted Therapy. **Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. book. Am. Soc. Clin. Oncol. Annu. Meet.** 2016, 35, 104–111.

LI Y, Yang Y, Lu M, Shen L. Predictive value of serum CEA, CA19-9 and CA724 in early diagnosis of recurrence after radical resection of gastric cancer. **Hepatogastroenterology.** 2011;58:2166-2170.

LISSOWSKA J, Gaudet MM, Brinton LA et al: Genetic polymorphisms in the one-carbon metabolism pathway and breast cancer risk: A population-based case-control study and meta-analyses. **Int J Cancer**, 2007; 120: 2696–703.

MA, J. *et al.* A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.** 8, 825–829 (1999).

MATOS LA, Alcântara DFA, Sousa JM, Ribeiro EF, Leal MF, Muniz JAPC, Imbeloni MA, Smith MAC, Burbano RR, Bahia MO. Evaluation of the Biochemical, Hematological and Genotoxic Parameters of Cebus Apella Treated with N-MethylNitrosurea (NMU) Followed by Treatment with a Complex Homeopathic Compound (Canova). **J Biother.** 2016, 2(1):1-7.

MILNE, A. N., Carneiro, F., O’Morain, C., Offerhaus, G. J. A., Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer. **Hum. Genet.** 2009, 126, 615–628.

MOYERS, S., Bailey, L. B., Fetal malformations and folate metabolism: review of recent evidence. **Nutr. Rev.** 2001, 59, 215–224. [19] Heil, S. G., V.

OH SY, Kwon HC, Kim SH, Lee S, Lee JH, Graves CA, Camphausen K, Kim HJ. Prognostic significance of serum levels of vascular endothelial growth factor and insulin-like growth factor-1 in advanced gastric cancer patients treated with FOLFOX chemotherapy. **Chemotherapy** 2012; 58: 426-434.

RADY, P. L., Szucs, S., Grady, J., Hudnall, S. D. et al., Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) SHIMADA H, Noie T, Ohashi M, Oba K, Takahashi Y. Clinical significance of serum tumor markers for gastric cancer: a systematic review of literature by the Task Force of the Japanese Gastric Cancer Association. **Gastric Cancer**. 2014;17:26-33.

SIBAROV, D.A.; Boikov, S.I.; Karelina, T.V.; Antonov, S.M. GluN2 Subunit-Dependent Redox Modulation of NMDA Receptor Activation by Homocysteine. **Biomolecules** 2020, 10, 1441.

SINTARA K, Thong-Ngam D, Patumraj S, Klaikeaw N. Curcumin attenuates gastric cancer induced by N-methyl-N-nitrosourea and saturated sodium chloride in rats. **J Biomed Biotechnol**. 2012;2012: 915380.

STANISŁAWSKA-SACHADYN A, Borzyszkowska J, Krzemiński M, Janowicz A, Dziadziuszko R, Jassem J, et al. Folate/ homocysteine metabolism and lung cancer risk among smokers. **PLoS ONE** 14(4): e0214462. 2019.

STATISTICS, S. C. SEER Cancer Stat Fact Sheets: Stomach Cancer: 2016 [Internet] (cited 2018 Aug 30). Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/stomach.html>

SUKANYA, J.S.; Pavithra, V.R.; Thanka, J.: Role of HER2neu expression in gastric cancer. **Indian Journal of Pathology and Microbiology (IJPM)** 2021, 64, 58-64.

SUNG, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J. Clin.** 2021, 71, 209–249.

TAUHEED Hasan , Reetika Arora , Aniket Kumar Bansal , Reshmee Bhattacharya , Gurumayum Suraj Sharma and Laishram Rajendrakumar Singh. Disturbed homocysteine metabolism is associated with cancer. **Experimental & Molecular Medicine** (2019) 51:21

TAWFIK, A.; Samra, Y.A.; Elsherbiny, N.M.; Al-Shabrawey, M. Implication of Hyperhomocysteinemia in Blood Retinal Barrier (BRB) Dysfunction. **Biomolecules** 2020, 10, 1119.

TENG-Yu Lee, En-Pei Chiang, Yin-Ting Shih, Hsien-Yuan Lane, Jaw-Town Lin, Chun-Ying Wu. Lower serum folate is associated with development and invasiveness of gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2014 August 28; 20(32): 11313-11320.

TORRES LB, Silva Araujo BH, Gomes de Castro PH, Romero Cabral F, Sarges Marruaz K, Silva Araujo M, et al. The use of new world primates for biomedical research: an overview of the last four decades. **Am J Primatol**. 2010 dec;72(12): 1055-1061.

TSUBURA A, Lai YC, Miki H, Sasaki T, Uehara N, Yuri T, et al. Review: Animal models of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary cancer and retinal degeneration with special emphasis on therapeutic trials. **In Vivo**. 2011 jan-feb; 25(1): 11-22.

TSUGANE S, Sasazuki S. Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence. **Gastric Cancer** 2007; 10: 75–83.

UWAGAWA S, Tsuda H, Inoue T, Tagawa Y, Aoki T, et al. (1991) Enhancing potential of 6 different carcinogens on multi-organ tumorigenesis after initial treatment with N-methyl-N-nitrosourea in rats. **Jpn J Cancer Res** 82: 1397-1405.

WEISBERG, I., Tran, P., Christensen, B., Sibani, S. et al., A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. **Mol. Genet. Metab.** 1998, 64, 169–172.

WHO - World Health Organization - The International Agency for Research on Cancer (IARC). Available from: [URL:http://www.iarc.fr/](http://www.iarc.fr/). Accessed Fevereiro, 2021.

WOORI Kim, Hae Dong Woo, Jeonghee Lee, Il Ju Choi, Young Woo Kim, Joohon Sung and Jeongseon Kim. Dietary folate, one-carbon metabolism-related genes, and gastric cancer risk in Korea. **Mol. Nutr. Food Res.** 2016, 60, 337–345

WORLD Health Organization (WHO). Available from: [URL:http://www.who.int/en](http://www.who.int/en). Accessed November, 2019.

WU LL, Wu JT (2002) Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cancer and a new potential tumor marker. **Clin Chim Acta** 322: 21-28.

YIN, J.; Wu, X.; Li, S.; Li, C.; Guo, Z. Impact of Environmental Factors on Gastric Cancer: A Review of the Scientific Evidence, Human Prevention and Adaptation. **J. Environ. Sci.** 2020, 89, 65–79.

ZACHO J, Yazdanyar S, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG
Hyperhomocysteinemia, methylenetetrahydrofolate reductase c.677C>T polymorphism and risk of cancer: cross-sectional and prospective studies and meta-analyses of 75,000 cases and 93,000 controls. **Int J Cancer** 128: 644-652.

ZHI Liu; Chunhui Cui; Xiaoyang Wang; Alejandro Fernandez-Escobar; Qunzheng Wu; Kai Xu; Jiajia Mao; Minxin Jin; Kexin Wang. Plasma Levels of Homocysteine and the Occurrence and Progression of Rectal Cancer. **Med Sci Monit**, 2018; 24: 1776-1783

7 ANEXOS

7.1 ANEXO 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER MED002/2007

Projeto: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO BIOPRODUTO *MÉTODO CANOVA* EM MODELO EXPERIMENTAL DE CÂNCER GÁSTRICO EM PRIMATAS NÃO HUMANOS.

Coordenador: Rommel Mario Rodríguez Burbano

Área Temática: Medicina

Vigência: 01-01-2008 a 31-12-2009

O Projeto intitulado “AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO BIOPRODUTO *MÉTODO CANOVA* EM MODELO EXPERIMENTAL DE CÂNCER GÁSTRICO EM PRIMATAS NÃO HUMANOS” foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE) e os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para manipulação e uso de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das suas atribuições, resolve APROVAR a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora deste período devem receber nova autorização deste comitê.



Prof. Dr. Antônio Pereira

Presidente do CEPAE/UFPA

7.2 ANEXO 2: TABELA S1. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS ANORMAIS DE ANIMAIS TRATADOS COM MNU.

Table S1. Abnormal biochemical and hematologic measurements in MNU-treated animals.

Measurement	Days (median $\pm$ interquartile range)					
	Baseline	90 th day	120 th day ^a	300 th day ^b	940 th day ^c	960 th day ^c
C-reactive protein (mg/dL)	0.66 $\pm$ 0.11	4.87 $\pm$ 1.74	5.89 $\pm$ 1.79	6.62 $\pm$ 1.03	7.21	7.04
Triglycerides (mg/dL)	102.05 $\pm$ 9.66	110.41 $\pm$ 8.38	115.08 $\pm$ 13.43	128.89 $\pm$ 1.57	147.14	149.21
Urea nitrogen (mg/dL)	13.9 $\pm$ 1.07	20.98 $\pm$ 4.38	24.2 $\pm$ 0.91	25.29 $\pm$ 0.51	28.00	28.08
Phosphorus (mg/dL)	2.46 $\pm$ 1.25	4.8 $\pm$ 2.32	8.35 $\pm$ 2.63	7.8 $\pm$ 2.55	6.60	6.43
Alanine aminotransferase (U/L)	39.81 $\pm$ 1.2	58.115 $\pm$ 10.65	63.39 $\pm$ 11.48	59.69 $\pm$ 4.31	59.74	54.78
Total bilirubin (mg/dL)	0.54 $\pm$ 0.09	0.7 $\pm$ 0.18	0.83 $\pm$ 0.33	0.73 $\pm$ 0.11	0.93	0.90
Creatinine (mg/dL)	0.66 $\pm$ 0.13	0.885 $\pm$ 0.27	0.97 $\pm$ 0.3	0.91 $\pm$ 0.28	0.99	0.98
Folic acid (nmol/L)	15.66 $\pm$ 2.27	14.58 $\pm$ 1.25	12.98 $\pm$ 0.74	8.85 $\pm$ 2.61	6.78	6.49
Homocysteine (μ mol/L)	2.95 $\pm$ 0.96	4.23 $\pm$ 0.86	6.37 $\pm$ 0.58	10.36 $\pm$ 2.51	13.46	13.68

Leukocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	7.97 ± 0.41	4.89 ± 0.36	4.34 ± 0.87	3.95 ± 0.05	3.29	7.03
Lymphocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	35.53 ± 0.99	28.64 ± 4.29	23.57 ± 3.78	19.45 ± 2.55	18.00	40.39
Neutrophil ($10^3/\mu\text{L}$)	60.12 ± 1.56	49.36 ± 1.59	48 ± 1.87	44.16 ± 1.05	40.68	55.21
Erythrocytes ($10^6/\text{mm}^3$)	6.17 ± 0.39	3.96 ± 1.36	3.1 ± 0.56	2.1 ± 0.98	1.98	4.85
Haemoglobin (g/dL)	15.28 ± 1.9	14.56 ± 1.74	11.97 ± 3.76	10.35 ± 0.94	8.57	9.88
Haematocrit (%)	43.84 ± 2.61	41.41 ± 5.92	36.89 ± 8.3	37.03 ± 1.23	34.75	34.89

^aFive animals; ^bTwo animals; ^cOne animal.

