



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Guilherme Ribeiro Romualdo

**Efeitos da Deficiência ou Suplementação de Zinco sobre a
Hepatocarcinogênese química em camundongos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan

Botucatu

2016

Guilherme Ribeiro Romualdo

Efeitos da Deficiência e Suplementação de Zinco sobre
a Hepatocarcinogênese química em camundongos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de mestre em Patologia.

Orientador: Prof.Dr. Luís Fernando Barbisan

Botucatu

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Romualdo, Guilherme Ribeiro.

Efeitos da deficiência e suplementação de zinco sobre a hepatocarcinogênese química em camundongos / Guilherme Ribeiro Romualdo. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Luís Fernando Barbisan

Capes: 40105008

1. Zinco no organismo. 2. Deficiência de Zinco. 3. Fígado - Doenças. 4. Carcinogênese. 5. Alimentos - Aditivos.

Palavras-chave: Deficiência; Hepatocarcinogênese; Suplementação; Zinco.

Resumo

O Zinco é um elemento essencial para uma grande diversidade de enzimas e fatores de transcrição envolvidos no reparo ao DNA, defesa antioxidante e proliferação celular. O consumo inadequado desse metal pode prejudicar tais funções e predispor ao desenvolvimento de doenças. Assim, o estudo avaliou se a deficiência ou suplementação de zinco alteram os estágios iniciais da hepatocarcinogênese. Para tanto, camundongos Balb/C receberam dose única intraperitoneal do carcinógeno dietilnitrosamina (50 mg/Kg) no 15º dia pós-natal (DPN), para iniciação da hepatocarcinogênese. Ao 28º DPN, os animais foram randomicamente alocados em três grupos experimentais (n=13/grupo) recebendo dieta AIN-93G contendo níveis adequados (35 mg/Kg), deficiência (3 mg/Kg) ou suplementação (180 mg/Kg) de zinco, além do agente promotor acetilaminofluoreno (0.02% em todas as dietas). Os animais foram eutanasiados após 12 e 24 semanas após a introdução das dietas. Amostras de sangue periférico foram coletadas antes da eutanásia para a avaliação de genotoxicidade pelo Teste do Cometa. Na necropsia, amostras de fígado foram retiradas para o Teste do Cometa, avaliação histopatológica e morfométrica análise imunistoquímica, determinação do perfil antioxidante e western blot. Na 12ª semana, a deficiência de zinco reduziu a expressão de Nrf2 e os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e aumentou a expressão de NFκB e p53 e número de lesões pré-neoplásicas por cm². Já na 24ª semana, a deficiência reduziu os níveis de GSH e aumentou a genotoxicidade induzida por 2-AAF (sangue e fígado), o tamanho e a proliferação celular das lesões pré-neoplásicas. Por outro lado, a suplementação aumentou os níveis de GSH e a atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) e reduziu a expressão de β-catenina e genotoxicidade induzida por 2-AAF (sangue). Ademais, na 24ª semana, a suplementação aumentou os níveis de GSH e a atividade das enzimas GPx, superóxido dismutase e catalase. Os resultados indicam que a deficiência de zinco promove a hepatocarcinogênese em seus estágios iniciais, enquanto a suplementação aumenta a defesa antioxidante hepática.

Abstract

Zinc is required for a wide range of enzymes and transcription factors involved in DNA repair, antioxidant defense and cell proliferation. Inadequate zinc intake could impair these functions, predisposing to the development of human diseases. This study evaluated whether dietary zinc deficiency or supplementation alter early chemically-induced mouse hepatocarcinogenesis. Male Balb/C mice received a single dose of diethylnitrosamine (DEN, 50 mg/Kg) at postnatal day (PND) 15 as an initiating agent for hepatocarcinogenesis. At PND 28, animals were allocated into three groups (n=13/group) and were fed AIN-93G diet containing different concentrations of zinc: adequate zinc (35 mg/Kg diet), zinc deficiency (3 mg/Kg diet) or zinc supplementation (180 mg/Kg diet). Also, 2-acetylaminofluorene (2-AAF, 0.02%) was incorporated in all experimental diets as a promoting agent for hepatocarcinogenesis. Mice were euthanized at 12 or 24 weeks after introducing the experimental diets. Blood and liver samples were collected to perform Comet Assay. Other liver fragments were sampled for histopathological, morphometrical and immunohistochemical analyses, western blotting and antioxidant profiling. Zinc deficiency decreased Nrf2 expression and reduced glutathione (GSH) levels and increased NF κ B, p53 expression and the number of preneoplastic altered hepatocyte foci (AHF) per cm² at week 12. In addition, zinc deficiency decreased GSH levels and increased 2-AAF-induced genotoxicity (peripheral blood and liver), cell proliferation into AHF and AHF size at week 24. In contrast, zinc supplementation increased GSH levels and Glutathione Peroxidase (GPx) activity and decreased 2-AAF-induced genotoxicity (blood) and β -catenin expression at week 12. Besides, zinc supplementation increased GSH levels and GPx, superoxide dismutase, and catalase activity at week 24. The findings indicate that zinc deficiency promotes early chemically-induced mouse hepatocarcinogenesis while zinc supplementation enhances hepatic antioxidant defense.

Sumário

Capítulo I - Revisão de Literatura	2
1. O Carcinoma Hepatoceleular	2
1.1 <i>Epidemiologia e Aspectos Demográficos</i>	2
1.2 <i>Fatores de Risco</i>	4
1.3 <i>Hepatocarcinogênese Humana</i>	7
1.4 <i>Diagnóstico, tratamento e prevenção</i>	17
1.5 <i>Modelos Experimentais de Hepatocarcinogênese</i>	18
2. O Zinco	22
2.1 <i>Inorgânico ao Orgânico</i>	22
2.2 <i>Consumo e fontes alimentares</i>	23
2.3 <i>Homeostase</i>	26
2.4 <i>Principais funções</i>	30
2.5 <i>Deficiência, Suplementação e Câncer</i>	34
3. Referências	41
Capítulo II – Artigo Científico	67
Abstract	68
1. Introduction	69
2. Materials and Methods	71
2.1 <i>Experimental Design</i>	71
2.2 <i>Histopathological and Morphometrical Evaluations</i>	73
2.3 <i>Immunohistochemistry and Semi-quantitative Analysis</i>	74
2.4 <i>Single Cell Gel Electrophoresis</i>	74
2.5 <i>Hepatic Antioxidant Profiling and Serum ALT</i>	75
2.6 <i>Zinc determination</i>	76
2.7 <i>Western Blot</i>	77
2.8 <i>Statistical Analysis</i>	78
3. Results	78
3.1 <i>General Findings and Hepatic zinc levels</i>	78
3.2 <i>Western Blot</i>	79
3.3 <i>Antioxidant Profiling and SCGE</i>	80
3.4 <i>Histopathological and Morphometrical analyses</i>	83
3.5 <i>Immunoistochemistry</i>	85
4. Discussion	87
5. References	93

Zn

Zn

Zn

Capítulo I – Revisão de Literatura



Capítulo I - Revisão de Literatura

1. O Carcinoma Hepatocelular

1.1 Epidemiologia e Aspectos Demográficos

Nas últimas décadas, as neoplasias malignas, antes consideradas doenças características de países desenvolvidos, têm acometido um grande contingente de pessoas também em países em desenvolvimento, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial (Ferlay *et al.*, 2010; GLOBOCAN, 2012). A Organização Mundial da Saúde (OMS), em seu último cálculo a nível global, estimou para o ano de 2012 cerca de 14,1 milhões de novos casos (incidentes) e 8,2 milhões de mortes por neoplasias malignas (GLOBOCAN, 2012).

Entre todos os novos casos, 5,6% correspondem às neoplasias malignas primárias do fígado, atrás daquelas que acometem o pulmão (13%), mama (11,9%), colo e reto (9,7%), próstata (7,8%) e estômago (6,8%). Enquanto, em relação às mortes, 9,1% são causadas por neoplasias malignas primárias do fígado, somente atrás das neoplasias malignas de pulmão (19,4%) (GLOBOCAN, 2012). Além disso, de 2008 a 2012, foram observados crescimentos de aproximadamente 5% e 7% nos números estimados de casos incidentes e mortes relacionadas às neoplasias malignas do fígado, respectivamente (Ferlay *et al.*, 2010; GLOBOCAN, 2012). Se comparadas as estimativas atuais com os dados de uma década atrás, os aumentos de casos incidentes e mortes relacionadas às neoplasias malignas de fígado atingem 20% em ambos (Parkin *et al.*, 2005).

Além disso, as taxas de sobrevivência dos indivíduos que possuem neoplasias malignas hepáticas são pequenas. Estudos indicam que após o diagnóstico, em média, os pacientes sobrevivam de 11 a 18 meses (Greten *et al.*, 2005; op den Winkel *et al.*, 2012). Em um período de três anos após o diagnóstico, somente 19% a 29% sobrevivem (op den Winkel *et al.*, 2012; Greten *et al.*, 2005). Esses dados epidemiológicos mundiais justificam a relevância das neoplasias malignas hepáticas e suscitam a necessidade de pesquisas nas áreas de prevenção e tratamento dessas doenças.

Entre os tipos de neoplasias malignas primárias que acometem o fígado, o carcinoma hepatocelular (CHC) é considerado o mais importante, visto que é responsável por cerca de 75% a 80% de todos os casos incidentes e das mortes mundialmente (Sanyal *et al.*, 2010; GLOBOCAN, 2012) (Figura 1). O CHC é seguido pelo colangiocarcinoma e pelo hepatoblastoma, principalmente (Sanyal *et al.*, 2010; GLOBOCAN, 2012) (Figura 1). Quanto às características da população acometida pelos cânceres primários de fígado e,

evidentemente, pelo CHC, destacam-se a distribuição geográfica e a disparidade em relação ao gênero (GLOBOCAN, 2012). Tanto incidência quanto mortalidade são aproximadamente 2,5 vezes maiores no sexo masculino em comparação com o feminino (Figura 1).

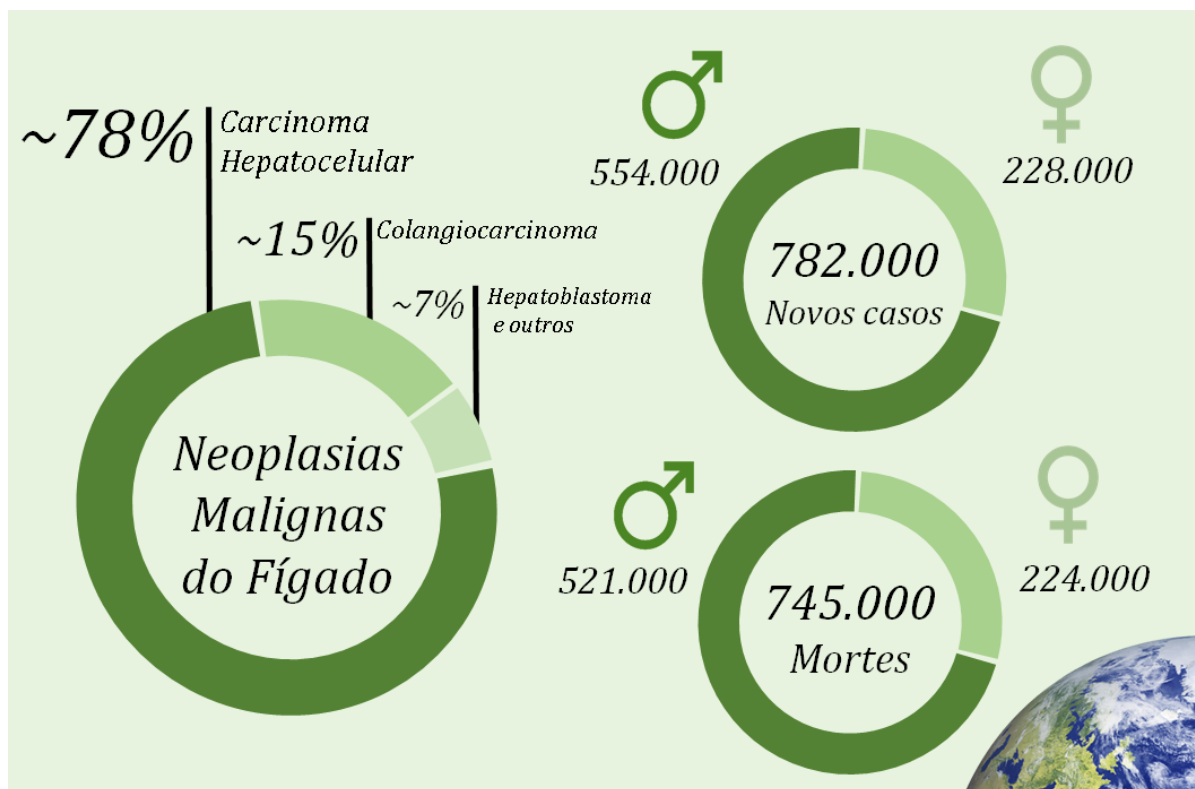


Figura 1. As principais neoplasias malignas primárias do fígado e a distribuição mundial dos novos casos e mortes quanto ao gênero. Referências: Sanyal *et al.*, 2010; GLOBOCAN, 2012.

Geograficamente, cerca de 83% dos casos incidentes e mortes por neoplasias malignas hepáticas ocorrem em países da Ásia (particularmente nas regiões Leste e Sudeste, sendo que 50% correspondem somente à China) e da África (regiões Central e Oeste), considerados “países em desenvolvimento” (GLOBOCAN, 2012) (Figura 2). Enquanto 12% dos novos casos e mortes ocorrem em países da Europa e América do Norte, considerados “países desenvolvidos” (GLOBOCAN, 2012) (Figura 2). Na Ásia, tais neoplasias ocupam a quinta e segunda colocações entre as neoplasias malignas de maior incidência e mortalidade, respectivamente, e na África, quarta e segunda colocações (GLOBOCAN, 2012). Enquanto, na Europa e na América do Norte, o CHC não está entre as dez neoplasias malignas mais incidentes e de maior mortalidade

(GLOBOCAN, 2012). No entanto, nos Estados Unidos as taxas de incidência e mortalidade crescem 3,4% e 2,5% por ano, respectivamente (American Cancer Society, 2015). Tais diferenças na distribuição dos dados epidemiológicos estão diretamente relacionadas à ocorrência dos fatores de risco da doença, que serão discutidos a seguir (Sanyal *et al.*, 2010).

No Brasil, o CHC também não está entre as dez neoplasias malignas mais incidentes e de maior mortalidade (INCA, 2014). Os últimos dados expressivos fornecidos pelo Instituto do Câncer (INCA) datam de 1999, quando as neoplasias malignas hepáticas ocupavam a sétima posição entre as neoplasias de maior mortalidade, sendo responsável por 4.682 óbitos (INCA, 1999).



Figura 2. Distribuição continental dos dados de incidência e mortalidade das neoplasias malignas primárias do fígado. Referências: GLOBOCAN, 2012.

Outra característica populacional importante está associada com a idade (American Cancer Society, 2015). Mortalidade e incidência tendem a aumentar de acordo com a idade do indivíduo, atingindo a sua maior prevalência em pessoas com idade próxima aos 65 anos (American Cancer Society, 2015). Embora sejam neoplasias raras antes dos 50 anos de idade, um aumento na incidência em pessoas mais jovens vem sendo observada nos EUA nas duas últimas décadas (American Cancer Society, 2015).

1.2 Fatores de Risco

O CHC é considerado uma doença multifatorial, complexa e de múltiplas etapas (Sanyal *et al.*, 2010). A maioria dos pacientes desenvolve o CHC em um contexto de

cirrose hepática causado por hepatite crônica (Yang *et al.*, 2011) (Figura 3). Assim, a cirrose é considerada o fator de risco mais importante e, conseqüentemente, as causas comuns de cirrose também são fatores de risco para o desenvolvimento desta neoplasia maligna (Yang *et al.*, 2011). Dentre estes fatores, destacam-se as hepatites crônicas causadas pelos vírus das hepatites B (VHB) e C (VHC), o consumo de alimentos contaminados com micotoxinas (aflatoxinas) produzidas pelos fungos do gênero *Aspergillus*, o consumo maciço e crônico de etanol, doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA), hemocromatose, doença de Wilson, deficiência de α -1-antitripsina, hepatite autoimune, entre outros (Figura 3) (Sanyal *et al.*, 2010). Além disso, outros fatores como idade, gênero, pesticidas, cigarro e hormônios podem também contribuir para o desenvolvimento da doença (Sanyal *et al.*, 2010).

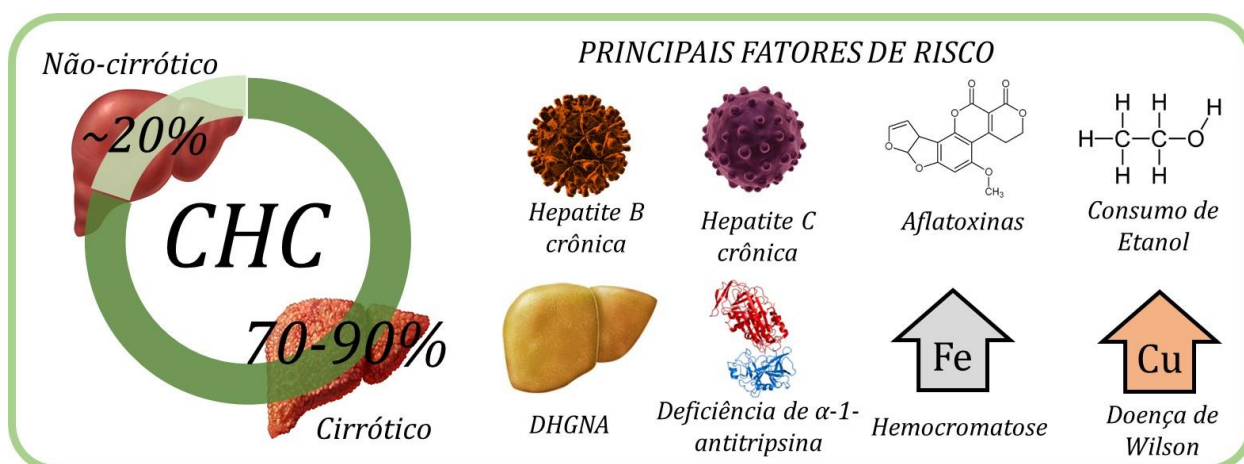


Figura 3. Proporção de casos de CHC relacionados à presença ou ausência de cirrose hepática, além dos principais fatores de risco associados ao CHC. Referências: Trevisani *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011.

Mundialmente, as infecções virais crônicas têm particular importância na ocorrência do CHC (Yang *et al.*, 2011; El-Serag, 2012). Estima-se que a infecção crônica pelo VHB esteja relacionada a 55% dos casos de CHC, enquanto a infecção crônica pelo VHC, de 10 a 25% (Yang *et al.*, 2011; El-Serag, 2012). Coinfecções com VHB e VHC também são comuns em pacientes com o CHC (Cho *et al.*, 2011). O consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas está relacionado a 5% a 28% dos casos de CHC no mundo, podendo também estar associado à infecção crônica pelo VHB (Liu & Wu, 2010). Tais fatores de risco são prevalentes nos países da Ásia e da África (Figura 4), contribuindo

para cerca de 80% a 90% do total de novos casos e mortes estimadas (El-Serag, 2012). Por outro lado, são menos frequentes na Europa e na América do Norte, sendo responsáveis por menos de um terço dos casos nos EUA, por exemplo (American Cancer Society, 2015).

O consumo excessivo de álcool, por sua vez, pode ser considerado fator principal ou cofator de risco, dependendo da quantidade e frequência de consumo (Mohamed *et al.*, 1992; Donato *et al.*, 2002). Casos de CHC associados ao consumo de etanol são comuns nos EUA e na Europa, e podem estar associados à infecção crônica por VHB e VHC (Morgan *et al.*, 2004; Donato *et al.*, 2002). Por fim, os distúrbios metabólicos, principalmente a DHGNA, apesar de contribuírem com peso menor para o desenvolvimento do CHC mundialmente, são consideradas ameaças emergentes na Europa e na América do Norte (Figura 4), sendo atribuídas a um terço dos casos de CHC nos EUA (Baffy *et al.*, 2012; American Cancer Society, 2015).

Por outro lado, uma minoria dos pacientes não desenvolve o CHC em um contexto de cirrose hepática (Figura 3) (Trevisani *et al.*, 2010). Como principais fatores de risco relacionados ao surgimento do CHC em fígado não-cirrótico, também estão as infecções crônicas pelo VHB e VHC, a ingestão de álcool e aflatoxinas (Figura 3). No entanto, tais fatores parecem contribuir mais para o desenvolvimento do CHC em fígado cirrótico (Trevisani *et al.*, 2010). Distúrbios metabólicos e congênitos, como a hemocromatose e deficiência de α -1-antitripsina, além dos hormônios sexuais e outras substâncias parecem ter papel importante no CHC em fígado não-cirrótico (Trevisani *et al.*, 2010) (Figura 3). A contribuição e importância dos principais fatores de risco no surgimento do CHC serão discutidas a seguir.

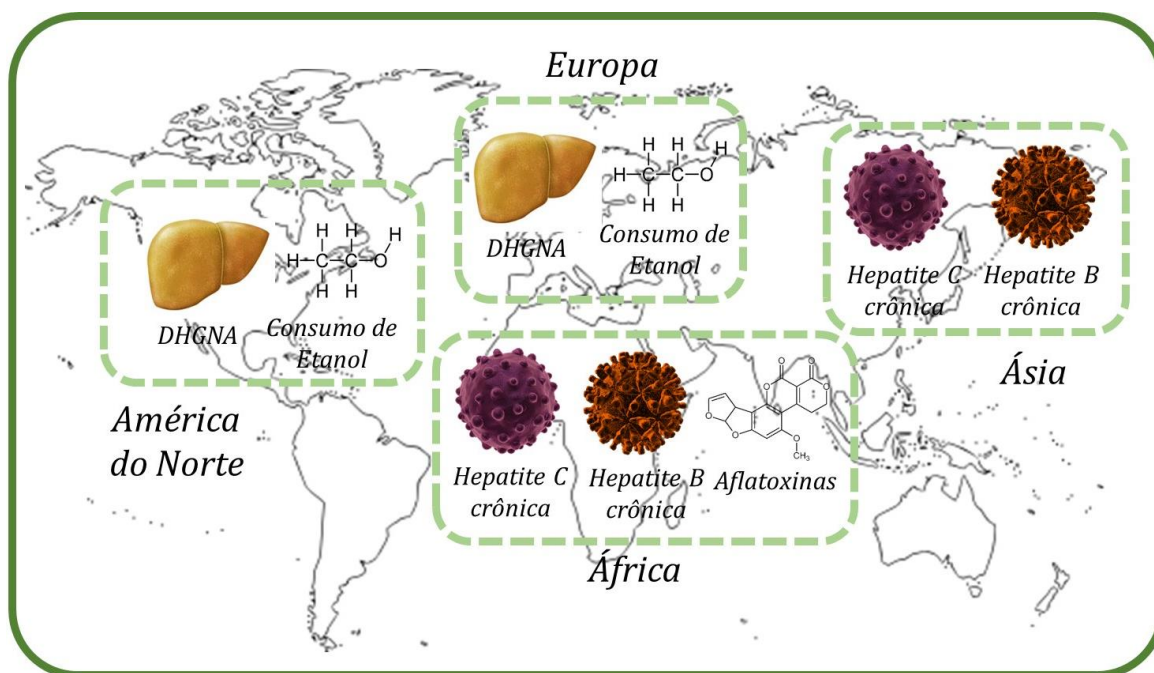


Figura 4. Distribuição continental dos principais fatores de risco associados ao desenvolvimento do CHC. Referências: Sanyal *et al.*, 2010; GLOBOCAN, 2012; American Cancer Society, 2015.

1.3 Hepatocarcinogênese Humana

O surgimento de cirrose causada por doença hepática crônica pode ser considerado fundamental para o desenvolvimento do CHC, visto que contribui com cerca de 70% a 90% dos casos (Figura 3) (Yang *et al.*, 2011). É nesse contexto em que há alterações drásticas e progressivas do microambiente hepático normal, envolvendo os hepatócitos, as células estreladas (ou de Ito), as células do sistema imunológico, além da produção de várias citocinas e fatores de crescimento (Zhou *et al.*, 2014). Sucintamente, a agressão crônica do fígado, causada pelos fatores de risco (citados no item 1.2), leva a um processo inflamatório contínuo, seguido de morte maciça de hepatócitos (por necrose, principalmente), estimulando a regeneração hepática pelo processo de hiperplasia compensatória (Figura 5) (Zhou *et al.*, 2014).

Além disso, há a ativação das células estreladas, que produzem e causam deposição de proteínas da matriz extracelular (MEC) (Figura 5) (Zhou *et al.*, 2014). Assim, há alteração a arquitetura hepática pela substituição gradativa do parênquima normal pelo tecido fibroso, que forma septos conjuntivos entre os hepatócitos, caracterizando a fibrose (Friedman, 2010; Zhou *et al.*, 2014). A cirrose, por sua vez, é o resultado final da fibrose,

caracterizada por uma diminuição progressiva da proliferação dos hepatócitos, indicando uma exaustão da capacidade regenerativa do fígado, além de comprometimento da função do órgão (Zhou *et al.*, 2014) (Figura 5). O parênquima hepático, na cirrose, se restringe a nódulos de hepatócitos cercados por septos fibrosos (Zhou *et al.*, 2014). De maneira geral, é nesse contexto hepático alterado em que há maior susceptibilidade ao desenvolvimento do CHC (Yang *et al.*, 2011).

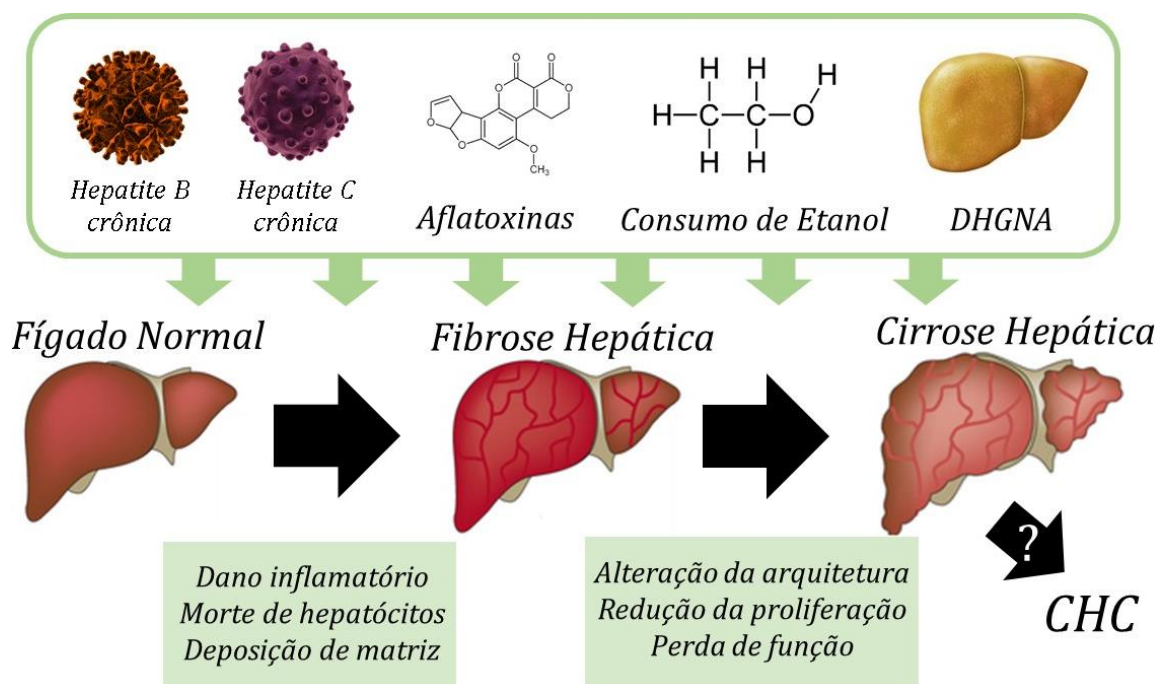


Figura 5. Principais alterações relacionadas ao processos de fibrose e cirrose hepática mediante a exposição aos principais fatores de risco. Referências: Friedman, 2010; Zhou *et al.*, 2014.

Já o processo de desenvolvimento, ou patogênese, da principal neoplasia maligna hepática é denominado de hepatocarcinogênese (Coleman, 2003) (Figura 6). Este é considerado um processo complexo e longo (40 a 50 anos) no qual os hepatócitos, mediante a exposição prolongada aos fatores e cofatores de risco, adquirem e acumulam diversas alterações genéticas, epigenéticas e moleculares, modificando vias relacionadas a oncogenes e genes supressores de tumor (Liu *et al.*, 2014; Shibata & Aburatani, 2014) (Figura 6). Tais alterações contribuem para que os hepatócitos adquiram características fenotípicas incomuns a uma célula normal, como proliferação celular contínua, evasão a fatores supressores de crescimento, imortalização, invasão e metástase, entre outros,

denominados de “*hallmarks*” do câncer (Hanahan & Weinberg, 2011) (Figura 6). Por sua vez, essas características colaboram para a transformação maligna da célula, seguida do surgimento de lesão pré-neoplásica, AHC, do estabelecimento do CHC e, por fim, do possível desenvolvimento de um tumor secundário por metástase (Katyal *et al.*, 2000; Libbretcht *et al.*, 2005; Natsuizaka *et al.*, 2005) (Figura 6). Portanto, o esclarecimento dos principais mecanismos pelos quais os fatores de risco atuam, causando diversas alterações genéticas, epigenéticas e moleculares é essencial para o entendimento dos processos de fibrose/cirrose e, sobretudo, da hepatocarcinogênese humana.

O VHB (vírus de DNA) e o VHC (vírus de RNA) são vírus hepatotróficos que promovem a cirrose e o CHC por diversos mecanismos (Tarocchi *et al.*, 2014; McGivern & Lemon, 2011) (Figura 6). O ciclo viral de ambos, culminando na expressão de proteínas virais, estimula o processo inflamatório pela ativação e interação de diferentes fatores de transcrição (Neuveut *et al.*, 2010). As proteínas virais, como a preS/S e HBx (VHB) e NS3, NS5A e C (VHC), podem, no citoplasma, alterar a sinalização celular e, no núcleo, interagir com vários fatores de transcrição, modulando a expressão gênica (Kremsdorf *et al.*, 2006; Arzumanyan *et al.*, 2013). Além disso, o DNA viral do VHB pode integrar-se a diferentes regiões do genoma do hospedeiro e, conseqüentemente, alterar a expressão gênica e contribuir para a instabilidade genômica (Kremsdorf *et al.*, 2006). Diferentemente do VHB, o VHC não se integra ao genoma do hospedeiro (Selimovic *et al.*, 2012). Genótipos específicos do VHC estão associados a alterações na expressão de genes relacionados com o metabolismo de lipídios, podendo resultar em acúmulo de triglicerídeos no fígado (esteatose hepática) (Selimovic *et al.*, 2012). Ademais, como outros possíveis mecanismos oncogênicos, tanto VHC quanto VHB parecem induzir de estresse oxidativo e também alterar a expressão de micro RNAs (miRNA) específicos (Arzumanyan *et al.*, 2013, Rongrui *et al.*, 2014).

Estima-se que 4,5 bilhões de pessoas estejam sobre risco de ingestão de alimentos, como arroz, milho, amendoim, frutas secas, além de ovos, carnes e leite, contaminados com micotoxinas produzidas pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (van Egmond, 1999). O armazenamento de alimentos em locais inadequados favorece o crescimento dos fungos e subsequente produção aflatoxinas, principalmente o tipo B1 (AFB1) (Williams *et al.*, 2004). O principal mecanismo de ação das aflatoxinas associado à cirrose e à hepatocarcinogênese está na sua genotoxicidade e mutagenicidade (Aguilar *et al.*, 1993; Gursoy-Yuzugullu *et al.*, 2011) (Figura 6). Quando metabolizada pelo

citocromo P450 no fígado, a AFB1 dá origem a compostos ativos nucleofílicos, como o 8, 9-óxido de aflatoxina B1 (AFBO), capazes de formar adutos no DNA e dar origem a mutações genéticas específicas (Forrester *et al.*, 1990; Aguilar *et al.*, 1993).

O etanol, como comentado anteriormente, pode ser considerado um fator ou cofator de risco para desenvolvimento do CHC, dependendo da frequência e quantidade de consumo (Donato *et al.*, 2002). De fato, estudos epidemiológicos indicam que o consumo de 80 g de etanol por dia, durante 10 anos, seja considerado um fator de risco independente (Mohamed *et al.*, 1992; Donato *et al.*, 2002). Esse valor corresponderia a aproximadamente, 0,6 L de vinho ou 1,6 L de cerveja por dia (Morgan *et al.*, 2004). Nos hepatócitos, o etanol é metabolizado a acetaldeído pelo citocromo P450 (CYP2E1) e pela enzima álcool desidrogenase (ADH), principalmente (Seitz & Stickel, 2007). O acetaldeído, por sua vez, já demonstrou ter efeitos genotóxicos e mutagênicos comprovados por estudos *in vitro*, podendo contribuir para a hepatocarcinogênese (Singh & Khan, 1995; Kayani & Parry, 2010) (Figura 6). Além disso, o consumo de etanol leva ao aumento da atividade da CYP2E1, enzima envolvida na ativação de vários pró-carcinógenos, como as aflatoxinas, as nitrosaminas e os hidrorcarbonetos policíclicos aromáticos (Dilger *et al.*, 1997). Essa maior atividade do CYP2E1 também resulta na produção de radicais hidroxietil (RHE), que podem causar peroxidação lipídica (Dupont *et al.*, 1998).

Ademais, o consumo de etanol já demonstrou reduzir atividade e/ou quantidade de diversos agentes antioxidantes endógenos, como o α -tocoferol e a glutatona e as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (Kawase *et al.*, 1989; Rouach *et al.*, 1997) (Figura 6). Destaca-se também o papel do etanol na inibição síntese da enzima S-adenosil-1-metionina (SAMe), responsável por reações de transferência de grupamentos metil (CH_3 -), e, portanto, sendo responsável pela hipometilação de vários genes (Lu *et al.*, 2000) (Figura 6).

Os mecanismos exatos que levam ao desenvolvimento de CHC em meio ao contexto de DHGNA ainda não estão totalmente esclarecidos, mas é possível estabelecer relação com o desenvolvimento de obesidade e diabetes (Loomba *et al.*, 2012). Brevemente, ambas podem causar acúmulo de triglicerídeos no tecido hepático (esteatose) (Youssef & McCullough, 2002). Esse acúmulo leva a produção de diversas citocinas e lipocinas, ativando vias de sinalização relacionadas à inflamação, o que pode levar a esteatoepatite não-álcoolica (ENA), seguida de fibrose e cirrose hepática (Purushotham *et al.*, 2009) .

Além disso, esse processo resulta em maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que também ativam vias de sinalização relacionadas com inflamação, além de causarem dano às macromoléculas, como proteínas e o DNA (Kojima *et al.*, 2007) (Figura 6).

A α -1-antitripsina é uma proteína relacionada com a inibição de diversas proteases (Lindblad *et al.*, 2007). Brevemente, na deficiência de α -1-antitripsina, causada por distúrbio genético hereditário (autossômico recessivo), os principais mecanismos de hepatocarcinogênese estão associados ao acúmulo da glicoproteína mutante Z seguida de morte de hepatócitos (Lindblad *et al.*, 2007). Por fim, a hemocromatose e a doença de Wilson também se caracterizam por serem distúrbios genéticos hereditários (autossômicos dominante e recessivo, respectivamente), nos quais há o acúmulo de ferro (Fe) e cobre (Cu), respectivamente, em diversos órgãos do corpo, incluindo o fígado (Pietrangelo, 2010; Rosencrantz & Schilsky, 2011). Os acúmulos de Fe e Cu podem causar, diretamente e indiretamente (pela produção de EROs), dano ao DNA (Carmichael *et al.*, 1995; Houglum *et al.*, 1997; Cooksey *et al.*, 2004). Além disso, o Fe pode estimular ativação das células estreladas e o Cu pode ligar-se a grupos sulfidrílicos de diversas proteínas hepáticas (Ramm *et al.*, 1997; Mufti *et al.*, 2006).

Por fim, quanto ao papel do gênero no desenvolvimento do CHC, estudos *in vivo* em roedores têm apontado o papel inibitório do estrogênio sobre o desenvolvimento do CHC, podendo justificar maior incidência e mortalidade dessa malignidade em homens (Naugler *et al.*, 2007; Bakiri & Wagner, 2013). Naugler e colaboradores (2007) demonstraram que o estrogênio possui papel inibitório na produção da interleucina-6 (IL-6) pelas células de Kupffer. A grande produção de IL-6 no CHC é observada tanto em roedores quanto em seres humanos (Hsia *et al.*, 2007; Naugler *et al.*, 2007). Inclusive, a IL-6 é considerada um bom marcador tumoral em humanos, participando da patogênese dessa doença (Hsia *et al.*, 2007).

Nesse contexto, os perfis das alterações genéticas, epigenéticas e moleculares relacionadas à hepatocarcinogênese refletem a grande heterogeneidade e complexidade dos mecanismos de ação dos fatores de risco (Liu *et al.*, 2014). O estudo e caracterização dessas alterações e suas consequências nas principais vias celulares podem auxiliar na identificação de potenciais estratégias para prevenção e tratamento do CHC (Liu *et al.*, 2014).

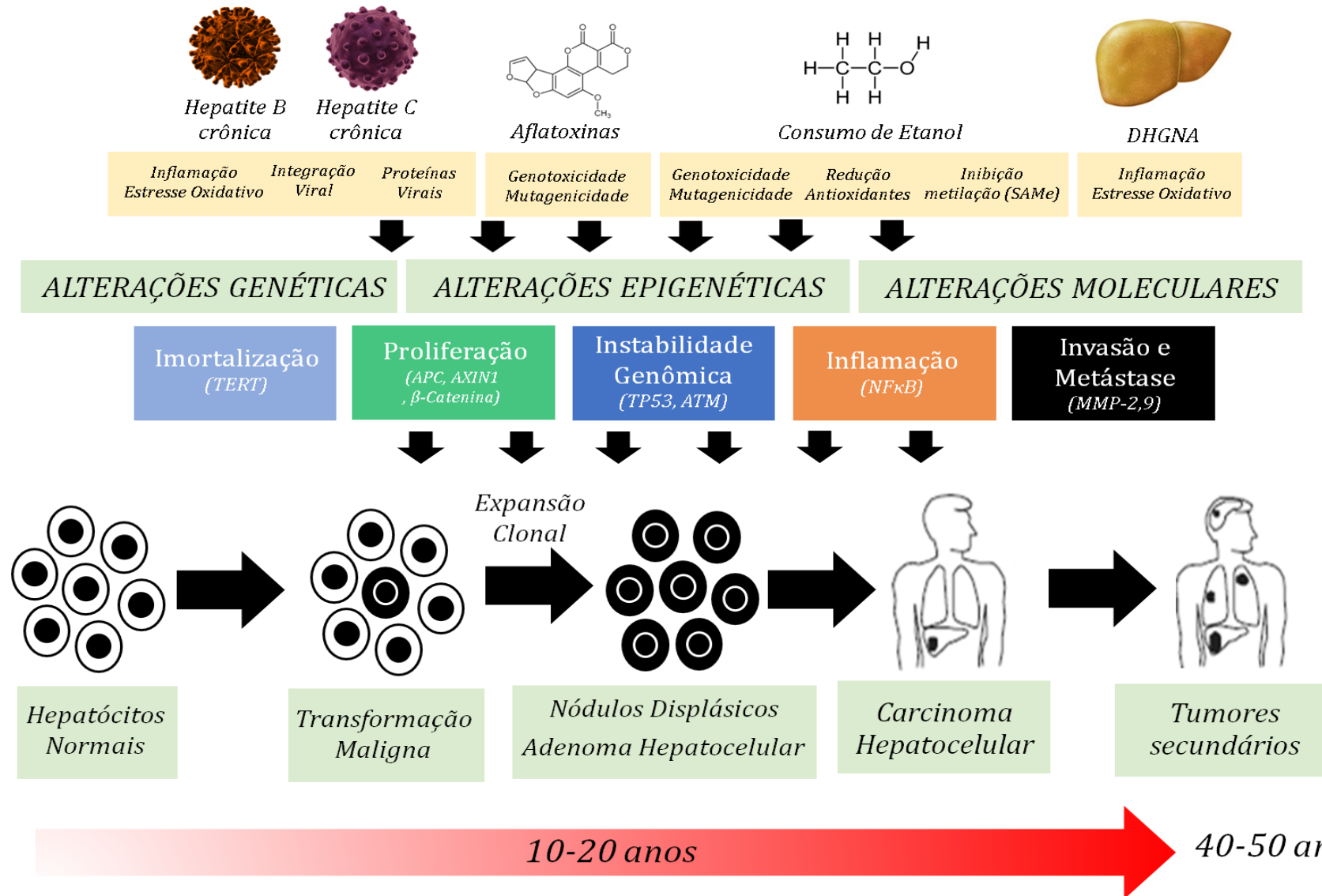


Figura 6. Hepatocarcinogênese humana. Processo longo (40 a 50 anos) no qual os fatores de risco, por diferentes mecanismos, causam alterações genéticas, epigenéticas e moleculares, conferindo características fenotípicas (imortalização, proliferação, instabilidade genômica, invasão e metástase, entre outras) que contribuem para a transformação maligna da célula, surgimento de lesão pré-neoplásica, AHC, estabelecimento do CHC e desenvolvimento de tumores secundários por metástase. Referências: Coleman, 2003; Libbrecht *et al.*, 2005; Hanahan & Weinberg, 2011; Natsuizaka *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2014; Shibata & Aburatani, 2014.

A via mais frequentemente alterada no processo de hepatocarcinogênese é a via do gene supressor de tumor *TP53* (Figura 7) (Liu *et al.*, 2014; Shibata & Aburatani, 2014). Em células saudáveis, a proteína p53 (codificada pelo gene *TP53*) associa-se com uma enzima denominada MDM2, que ubiquitina p53 e faz com que a proteína seja degradada no proteossoma (Prives & Hall, 1999. Riley *et al.*, 2008). Como resultado, as concentrações de p53 são virtualmente indetectáveis em células normais (Prives & Hall, 1999. Riley *et al.*, 2008). Por outro lado, a ativação de p53 acontece por dois mecanismos: (1) em células submetidas às condições de dano ao DNA e hipóxia, duas proteínas quinases, ATM e ATR, estimulam a fosforilação de p53 e MDM2, impedindo a degradação de p53 e permitindo seu acúmulo na célula; (2) a ativação de proteínas como a RAS acarreta à ativação “suprafisiológica” de vias relacionadas ao crescimento celular, como MAPK e PI3K/AKT (Prives & Hall, 1999. Riley *et al.*, 2008). Essa ativação de p53 leva a maior expressão da proteína p14/ARF (codificada pelo gene *CDKN2A*), que se liga a MDM2, permitindo o acúmulo de p53 na célula (Prives & Hall, 1999. Riley *et al.*, 2008).

O aumento de p53 ativa a transcrição de genes que codificam proteínas relacionadas ao reparo ao DNA (*GADD45*), parada no ciclo celular (*p21*, codificada pelo gene *CDKN1A*) e apoptose (*BAX* e *PUMA*) (Prives & Hall, 1999. Riley *et al.*, 2008). Por esses mecanismos de ação, a proteína p53 é denominada de “guardião do genoma”, impedindo que ocorram alterações que possam contribuir para transformação maligna das células do organismo (Prives & Hall, 1999. Riley *et al.*, 2008). Em média, 26% dos casos de CHC possuem mutações inativadoras no gene *TP53* (Hussain *et al.*, 2007). Tais mutações variam, refletindo diferenças nos agentes etiológicos e fatores de suscetibilidade do hospedeiro (Hussain *et al.*, 2007). No CHC decorrente de infecções por HBV e exposição à AFB1 na África e na Ásia, existe uma elevada proporção de casos relacionados à mutação na terceira posição do códon 249 do gene *TP53* (Bressac *et al.*, 1991; Scorsone *et al.*, 1992). Na exposição à aflatoxina, especula-se que a mutação em *TP53* seja um evento precoce na hepatocarcinogênese (Aguilar *et al.*, 1994). Em outros estudos, no entanto, as mutações parecem ser um evento tardio, relacionado com a progressão tumoral (Tanaka *et al.*, 1993).

Alterações em outros genes da via do *TP53* são comuns no CHC, por exemplo, mutações em *ATM* (6,9%), *CDKN2A* (11,7%) e *CDKN1A*, além da amplificação e hiperexpressão de *MDM2* (Jablkowski *et al.*, 2005; Shibata & Aburatani, 2014). Como resultado dessas alterações, pode haver inibição ou redução da atividade da via da proteína p53, contribuindo para instabilidade genômica e evasão dos sinais supressores

do crescimento, características fenotípicas associadas a hepatocarcinogênese (Figura 6) (Liu *et al.*, 2014; Shibata & Aburatani, 2014).

Outra via importante alterada na hepatocarcinogênese é a via de sinalização Wnt/ β -catenina (Figura 7) (Monga, 2011; Liu *et al.*, 2014; Shibata & Aburatani, 2014). Nessa via, a ausência da ligação da glicoproteína Wnt nos receptores Fz de membrana (*Frizzled*) impede o acúmulo citoplasmático e a translocação nuclear da proteína β -catenina, que é degradada por um complexo de proteínas (AXIN1, APC, PP2A, GSK3 e CK1 α) (Clevers, 2006). Quando há ligação, o complexo de degradação da β -catenina é inibido e a proteína acumula-se no citoplasma, sendo translocada para o núcleo (Clevers, 2006). No interior do núcleo, a β -catenina se liga a proteína TCF (*T Cell Factor*) e leva à transcrição de diversos genes envolvidos na proliferação celular (por exemplo, *MYC*, *MYB*, *CJUN* e *CYDI*), angiogênese, antiapoptose e formação de MEC (Clevers, 2006). No fígado normal, a via Wnt/ β -catenina está associada aos processos de crescimento e proliferação hepática pré e pós-natal, além contribuir para a regeneração hepática na vida adulta (Micsenyi *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2006; Apte *et al.* 2007). A ativação anormal da via, sem mutações, parece estar relacionada com o surgimento de nódulos displásicos (pré-neoplásicos) no fígado (Park *et al.*, 2005; Rebouissou *et al.*, 2008).

No AHC, 15-46% apresentam mutações ativadoras no protooncogene *CTNNB1* (β -catenina), relacionadas com maior potencial para desenvolvimento do CHC (Torbenson *et al.*, 2002; Zucman-Rossi *et al.*, 2006). Já no CHC, 26% dos casos de CHC possuem mutações ativadoras no gene *CTNNB1* (β -catenina), enquanto que 9,6% e ~2% possuem mutações inativadoras nos genes supressores de tumor *AXIN1* e *APC*, respectivamente (de La Coste *et al.*, 1998; Taniguchi *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2005). Além disso, o promotor do gene APC demonstrou estar hipermetilado em 53% dos casos de CHC (Yang *et al.*, 2003). Já o miRNA 214, que está relacionado com a inibição da via Wnt/ β -catenina em condições normais, tem sua expressão diminuída em pacientes com CHC (Xia *et al.*, 2012). Essas alterações podem levar ao acúmulo de β -catenina e subsequente ativação da via, conferindo estímulo proliferativo contínuo aos hepatócitos e contribuindo para as diferentes fases da hepatocarcinogênese (Figura 6) (Monga, 2011; Liu *et al.*, 2014; Shibata & Aburatani, 2014).

A via do fator de transcrição NF κ B (Figura 7), um importante regulador da resposta inflamatória no tecido hepático, é ativada por uma diversidade de agentes, como moléculas derivadas de patógenos, como bactérias e vírus, incluindo o HBV, além de citocinas e estresse oxidativo (Pahl, 1999; Morgan & Liu, 2011). O fator de transcrição é

formado por cinco subunidades que podem ligar-se ao DNA: p50, p52, p65, crel e relB. Na ausência de estímulo, o NFκB está ligado a um grupo de proteínas denominado de IκB (como IκBα e IκBβ), que impedem sua translocação nuclear, mantendo-o no citoplasma da célula (Pahl, 1999; Morgan & Liu, 2011). Quando a via é ativada, o IκB é fosforilado pelo complexo IκB quinase (IKK), a subunidade IκBα é degradada e o NFκB é translocado para o núcleo, ligando-se ao DNA e levando à transcrição de diversos genes relacionados à resposta pró-inflamatória (citocinas e quimiocinas, moléculas de adesão, etc.), antiapoptose e proliferação celular (Pahl, 1999). A ativação anormal da via é frequentemente relacionada ao processo inflamatório que pode promover doença hepática crônica, fibrose e cirrose (Morgan & Liu, 2011).

No CHC, a atividade do fator de transcrição NFκB demonstrou estar aumentada em 87% e 80% no tecido peritumoral e tumoral, respectivamente, quando comparada ao tecido hepático normal (Liu *et al.*, 2002). A inflamação mediada pela ativação desse fator de transcrição pode alterar o microambiente hepático, contribuindo para o surgimento do CHC (Figura 6) (Liu *et al.*, 2002; Luedde & Schwabe, 2011). Além disso, o aumento de NFκB parece mediar a expressão das metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9), responsáveis pela degradação de várias moléculas da MEC e por facilitarem a invasão e metástase tumoral (Figura 6) (Li *et al.*, 2011a; 2012).

Já a telomerase é um complexo ribonucleoprotéico responsável por atuar no alongamento das extremidades cromossômicas, os telômeros, garantindo a manutenção da integridade cromossômica, portanto, a estabilidade genômica (Callén & Surrallés, 2004). Esse complexo é formado por uma unidade catalítica, a telomerase transcriptase reversa (TERT), e um *template* de RNA (TERC) (Cohen *et al.*, 2007). A TERT alonga os telômeros por sintetizar uma molécula de DNA a partir do *template* de RNA (Cohen *et al.*, 2007). Esse complexo está ativo nas células germinativas e nas células-tronco e a sua atividade é silenciada na maioria das células somáticas durante a gestação (Hiyama & Hiyama, 2007). Assim, o progressivo encurtamento dos telômeros está relacionado à senescência e apoptose (Rodier *et al.*, 2005).

Um estudo recente revelou que o CHC (59%), o AHC (44%) e os nódulos displásicos (25%) possuem mutações na região promotora do gene *TERT*, que codifica a telomerase transcriptase reversa (Nault *et al.*, 2013). Além disso, as mutações em *TERT* estão associadas à presença de mutações no gene *CTNNB1* (Nault *et al.*, 2013). As mutações em *TERT* podem levar ao aumento de sua expressão, inibindo o processo de senescência e apoptose e conferindo a capacidade de “imortalização” às células pré-neoplásicas e

neoplásicas, contribuindo para a hepatocarcinogênese (Figura 6) (Nault *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Shibata & Aburatani, 2014).

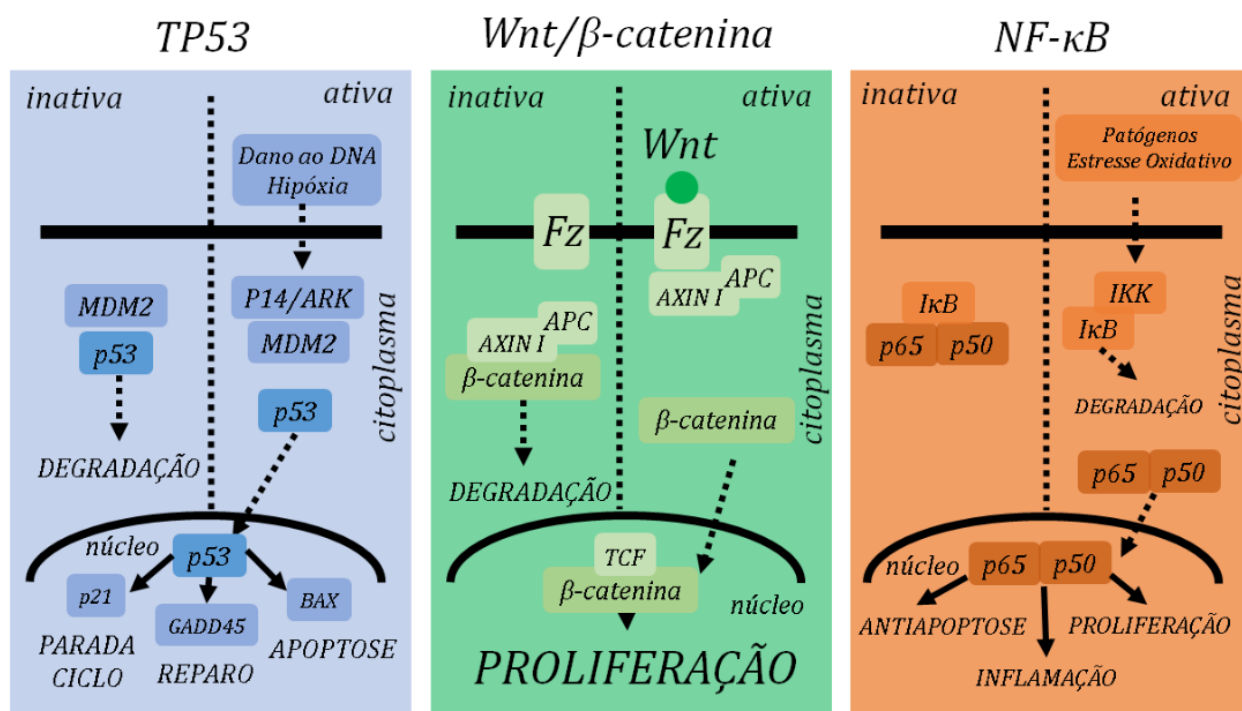


Figura 7. Caracterização das vias TP53, Wnt/β-catenina, e NF-κB, algumas das vias mais frequentemente alteradas na hepatocarcinogênese. Referências: Pahl, 1999; Prives & Hall, 1999; Clevers, 2006; Morgan & Liu, 2011.

Essas e outras alterações contribuem para que os hepatócitos sofram o processo de transformação maligna, seguido da formação de uma lesão hepática pré-neoplásica (Libbrecht *et al.*, 2005). Entre as lesões pré-neoplásicas, aquelas que apresentam alto grau de displasia e proliferação celular, como nódulos e alguns tipos de focos de hepatócitos alterados, frequentemente observados em fígados cirróticos, têm maior potencial para o desenvolvimento do CHC (Su & Bannasch, 2003; Libbrecht *et al.*, 2005). Além dos nódulos, os focos de pequenas e grandes células, além do AHC (principalmente os que possuem mutações em *CTNBI*) também podem dar origem a essa neoplasia maligna (Torbenon *et al.*, 2002; Zucman-Rossi *et al.*, 2006). Por fim, quando o CHC se estabelece, tumores secundários podem se desenvolver nos pulmões (55%), nos ossos (28% a 38%) e nos linfonodos abdominais (34% a 41%) (Katyal *et al.*, 2000; Natsuzaka *et al.*, 2005).

1.4 Diagnóstico, tratamento e prevenção

Os principais sintomas clínicos relacionados à presença do CHC são: dor abdominal, hepatomegalia, indisposição, ascite e icterícia (Trevisani *et al.*, 1995; Lam *et al.*, 2004). Além disso, grande parte dos pacientes (50-56%) com CHC possuem níveis séricos aumentados de α -fetoproteína, proteína expressa no fígado durante a embriogênese (Trevisani *et al.*, 1995; Lam *et al.*, 2004). No entanto, as melhores ferramentas para diagnóstico do CHC são os exames de imagem, como a ultrassonografia, tomografia e a ressonância magnética (Befeler & Bisceglie, 2002). Outro elemento importante para o diagnóstico é a biópsia hepática para caracterização histológica, seguida do estadiamento da neoplasia (Befeler & Bisceglie, 2002). Como já comentado, após o diagnóstico do CHC, a taxa de sobrevivência é pequena, e a morte normalmente ocorre por caquexia, sangramento visceral, falência hepática e ruptura do tumor com hemorragia fatal (Greten *et al.*, 2005; op den Winkel *et al.*, 2012).

Assim, transplante de fígado, ressecção cirúrgica, ablação (física ou química), quimioembolização e quimioterapia são consideradas as principais estratégias de tratamento do CHC, aplicadas na dependência do tamanho e número de tumores, além da presença de tumores extrahepáticos (metástases) (Befeler & Bisceglie, 2002). Após o transplante de fígado, uma das estratégias de tratamento mais aplicadas, cerca de 69,1% e 40,5% dos pacientes sobrevivem cinco e dez anos, respectivamente (Doyle *et al.*, 2012). É nesse contexto que suscita-se a necessidade de estratégias preventivas para o CHC.

A implementação da vacinação para o VHB (adotada em ~175 países), reduziu o número de pessoas infectadas nos últimos anos, consequentemente reduzindo o número de casos de CHC (Chang *et al.*, 2009; Luo & Ruan, 2012). Em relação às aflatoxinas, melhores condições de armazenamento dos alimentos reduzem o consumo de aflatoxinas, diminuindo o número de casos de CHC (Turner *et al.*, 2005). As terapias antivirais com interferon (IFN) em pacientes infectados por VHB e VHC demonstraram reduzir o risco de desenvolvimento de CHC (Lin *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011). Além disso, componentes da alimentação diária podem atuar na prevenção do CHC. Bravi e colegas (2013) observaram redução de 40% no risco de desenvolvimento do CHC em indivíduos que tomam café com frequência. O consumo de ácidos graxos poliinsaturados n-3, presentes no peixe, ou vitamina E também demonstraram reduzir o risco de CHC (Sawada *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

1.5 Modelos Experimentais de Hepatocarcinogênese

Modelos animais distintos têm sido aplicados ao estudo do diagnóstico, patogênese, tratamento e prevenção do CHC, principalmente utilizando-se de roedores, ratos (*Rattus norvegicus*) e camundongos (*Mus musculus*) (Heindryckx *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011b; Bakiri & Wagner, 2013). O estabelecimento dessas ferramentas de estudo é pertinente, visto que o padrão de desenvolvimento morfológico, molecular, epigenético e genético das neoplasias malignas no fígado de roedores é semelhante ao que pode ser observado em seres humanos (Heindryckx *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011b; Bakiri & Wagner, 2013). Os modelos em roedores também refletem a disparidade do gênero em relação ao desenvolvimento do CHC (Naugler *et al.*, 2007).

Li e colaboradores (2011b) apontaram alguns critérios essenciais para a seleção de um modelo animal de hepatocarcinogênese, considerando a analogia com o desenvolvimento do CHC em humanos: (1) permitir a avaliação dos eventos moleculares e celulares das diferentes fases a hepatocarcinogênese, (2) mimetizar o microambiente tumoral do CHC em humanos e (3) ser acessível financeiramente e ser de fácil manipulação. Entre os modelos, sobretudo aqueles que utilizam murinos, destacam-se os modelos geneticamente modificados, de xenoenxerto e de indução química (Heindryckx *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012; Bakiri & Wagner, 2013).

Os modelos murinos geneticamente modificados são amplamente aplicados à pesquisa dos mecanismos virais de hepatocarcinogênese (VHB e VHC) (Heindryckx *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012; Bakiri & Wagner, 2013). Os modelos de VHB inicialmente foram produzidos em 1985, e a maioria está relacionada à introdução do gene que codifica a proteína viral HBx (citada no item 1.3) no genoma murino (Babinet *et al.*, 1985). Os modelos de VHC foram desenvolvidos para expressar diferentes proteínas virais, como as estruturais e/ou não estruturais (citadas no item 1.3), apesar de o vírus de RNA não integrar-se ao genoma humano (Pasquinelli *et al.*, 1997; Lerat *et al.*, 2002). Outros modelos geneticamente modificados muito utilizados são aqueles que possuem alterações genéticas em vias oncogênicas específicas, como H-ras, Wnt/ β -catenina e p53 (Ghebraniou & Sell, 1998; Harada *et al.*, 2004). A aplicação principal desses modelos está relacionada ao estudo de vias específicas e seu papel na hepatocarcinogênese (Heindryckx *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012; Bakiri & Wagner, 2013).

Os modelos de xenoenxerto baseiam-se na inserção de células de CHC provenientes de material de biópsia ou de cultura celular de origem humana em camundongos atímicos (*nude*), ou na inserção de células tumorais murinas em animais compatíveis (Li *et al.*, 2001;

2004). Podem ser ectópicos, quando as células são enxertadas por via subcutânea, ou ortotópicos, quando são injetadas diretamente no fígado (Li *et al.*, 2001; 2004). Esses modelos são utilizados para avaliar a capacidade e mecanismos de metástase, principalmente (Li *et al.*, 2001; 2004).

Já na hepatocarcinogênese química, basicamente, há dois tipos de compostos hepatocarcinogênicos: (1) iniciadores, que são genotóxicos, ou seja, capazes de induzir mudanças estruturais na molécula de DNA e (2) compostos promotores (genotóxicos e/ou não-genotóxicos), que são capazes de promover a formação de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas após a iniciação, por facilitarem a expansão clonal das células iniciadas (Pitot & Dragan, 1991). Morfologicamente, o CHC induzido quimicamente em roedores ocorre através do desenvolvimento de alterações sequenciais, de maneira semelhante ao que ocorre no CHC humano (Figura 8) (Pitot, 1990; Pitot & Dragan, 1991; Ogawa, 2008). Após o início do tratamento com o hepatocarcinógeno, surgem os focos de hepatócitos alterados fenotipicamente (FHA), que são lesões compostas de hepatócitos de citoplasma claro, basofílico ou eosinofílico (Ogawa *et al.*, 1980; Pitot, 1990). Os FHA decorrem da expansão clonal de hepatócitos iniciados e são considerados lesões pré-neoplásicas (Pitot, 1990; Pitot & Dragan, 1991; Ogawa, 2009).

Sob estímulos químicos contínuos, essas lesões podem acumular alterações moleculares, genéticas e epigenéticas e adquirir novas características fenotípicas, tais como maior capacidade de sobrevivência e um potencial proliferativo elevado, podendo dar origem à lesões neoplásicas, tal como o CHC (Pitot, 1990; Pitot & Dragan, 1991; Ogawa, 2009). Os FHA podem ser facilmente identificados e quantificados em bioensaios de curto prazo e médio prazo, permitindo a investigação de potenciais fatores modificadores das etapas iniciais da hepatocarcinogênese química (Pitot, 1990; Pitot & Dragan, 1991; Ogawa, 2008).

A dietilnitrosamina (DEN) ou N-nitrosodietilamina (Figura 8) é um dos agentes químicos mais utilizados para a indução de hepatocarcinogênese desde os anos 60 da década passada (Rajewsky *et al.*, 1966). A DEN pode ser encontrada em uma variedade de produtos, como a fumaça de cigarro, na carne e no uísque (Hedler & Marquardt, 1968). Esse carcinógeno é metabolizado pelo citocromo P450 no fígado (CYP2E1), sendo inicialmente hidroxilado a α -hidroxilnitrosamina e posteriormente bioativado em uma reação dependente de oxigênio e NADPH, resultando na formação de íons etildiazônio (Verna *et al.*, 1996a; Jin *et al.*, 2007). Esses íons ligam-se e causam dano ao DNA (Santos *et al.*, 2014). O metabolismo dessa substância pelo citocromo P450 pode também causar

estresse oxidativo, produzindo peróxido de hidrogênio e ânions superóxido (Qi *et al.*, 2008). O estresse oxidativo, por sua vez, também pode causar dano a diferentes macromoléculas, como o DNA, proteínas e lipídios (Verna *et al.*, 1996a; Jin *et al.*, 2007). Em relação ao perfil genético, os tumores induzidos pela DEN possuem mutações e/ou hiperexpressão do protooncogene *H-ras* (Figura 8) (Stahl *et al.*, 2005). Tumores induzidos pelo mesmo modelo também possuem mutações no gene *Catnb* (análogo ao gene *CTNNB1* em humanos), levando à ativação da via Wnt/ β -catenina (Figura 8) (Stahl *et al.*, 2005). Além disso, uma análise genômica comparativa revelou o perfil genético do CHC induzido pela DEN assemelha-se ao CHC humano de mau prognóstico (Lee *et al.*, 2004)

A indução da hepatocarcinogênese pela DEN depende, sobretudo, da linhagem e idade do murino, da dose utilizada e do tempo de experimentação (Pitot & Dragan, 1991). Portanto, há grande variabilidade na aplicação do modelo em estudos experimentais. Especialmente, um dos modelos utilizados é o modelo do neonato, no qual os murinos são iniciados para a hepatocarcinogênese no décimo quinto dia pós-natal (DPN) (Goldfarb *et al.*, 1984). Nesse período, o fígado dos animais ainda está em desenvolvimento, sendo intrinsecamente mais susceptível à ação dos cancerígenos, como a DEN (Vesselinovitch & Mihailovitch, 1983; Vesselinovitch *et al.*, 1984; Vesselinovitch, 1987). As taxas proliferativas dos hepatócitos do murino neonato são altas, facilitando a expansão clonal de hepatócitos iniciados e resultando no aparecimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas em um menor período de tempo, quando comparado a um murino submetido ao modelo na idade adulta (Vesselinovitch & Mihailovitch, 1983; Vesselinovitch *et al.*, 1984; Vesselinovitch, 1987). Além dessas duas vantagens, o modelo ainda permite a introdução de um carcinógeno promotor em um período de 2 a 3 semanas após a iniciação (protocolo de iniciação/promoção), também facilitando o desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas em menor período de tempo (Vesselinovitch & Mihailovitch, 1983; Vesselinovitch *et al.*, 1984; Vesselinovitch, 1987).

O 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) (Figura 8), por sua vez, é um carcinógeno derivado do fluoreno que tem papel iniciador/promotor da hepatocarcinogênese (Lee *et al.*, 2013). O 2-AAF é uma substância sintética derivada do 2-aminofluoreno (2-AF), inicialmente desenvolvido como um inseticida (Wilson *et al.*, 1941). Esse composto, como a DEN, é substrato para o citocromo P450 (CYP1A2), sofrendo N-hidroxilação seguida de deacetilação e originando íons nitrênio (Holme *et al.*, 1986; Verna *et al.*, 1996b). Esses íons, por sua vez, podem formar adutos e causar dano ao DNA (Jenkins & Parry, 2000; Murata *et al.*, 2002). Além das propriedades genotóxicas, o 2-AAF parece promover a

hepatocarcinogênese por mecanismos não-genotóxicos, como afetar a respiração celular (Neumann *et al.*, 1997). Tais mecanismos são responsáveis por causar alterações genéticas e epigenéticas no fígado dos animais, contribuindo para a hepatocarcinogênese (Jenkins & Parry, 2000; Bagnyukova *et al.*, 2008; Pogribny *et al.*, 2011). Por exemplo, destacam-se as mutações no gene *Tp53* e a hipermetilação do gene *p16* do fígado dos roedores, semelhante ao que ocorre na hepatocarcinogênese humana (Figura 8) (Jenkins & Parry, 2000; Narimastu *et al.*, 2004; Bagnyukova *et al.*, 2008; Pogribny *et al.*, 2011).

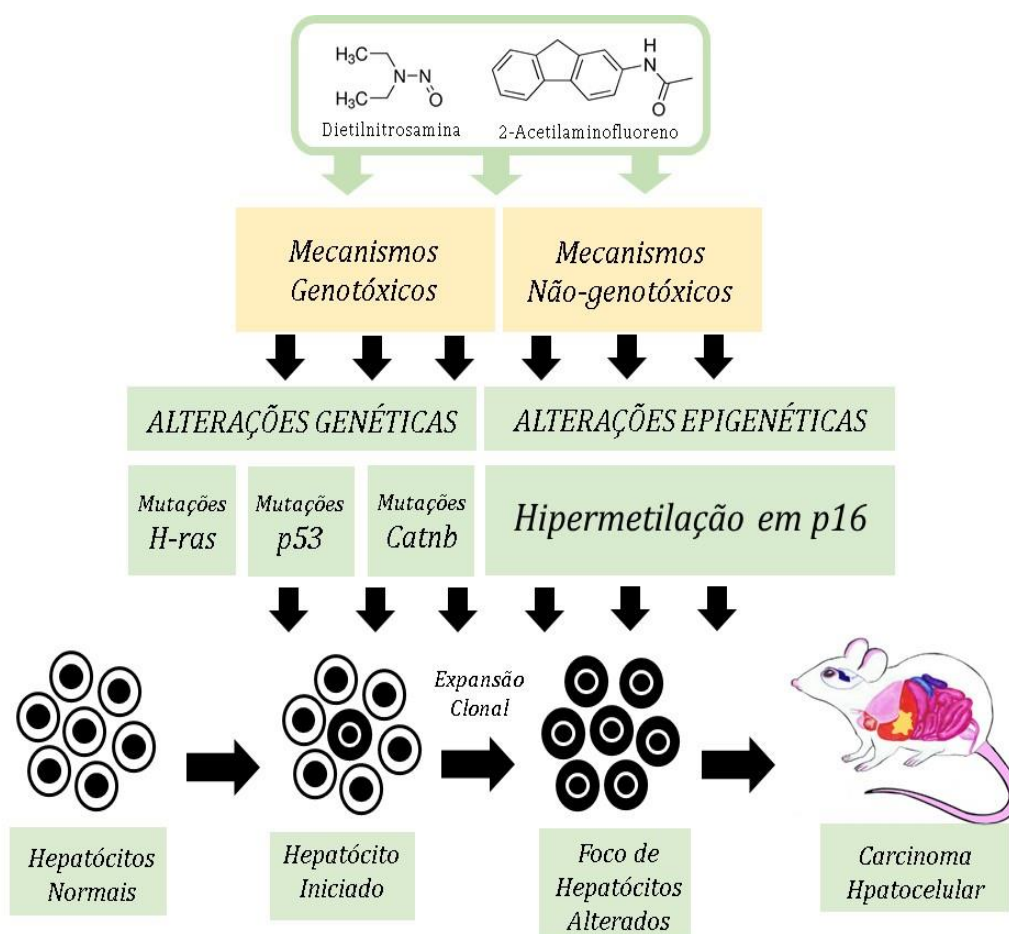


Figura 8. Hepatocarcinogênese química experimental induzida pelo DEN e o 2-AAF, a partir de mecanismos genotóxicos e/ou não-genotóxicos, causam alterações genéticas e epigenéticas que contribuem para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas no fígado dos roedores. Referências: Jenkins & Parry, 2000; Anna *et al.*, 2003; Stahl *et al.*, 2005; Bagnyukova *et al.*, 2008; Pogribny *et al.*, 2011.

2. O Zinco

2.1 Inorgânico ao Orgânico

O zinco (Zn) é um metal de transição pertencente à família IIB da Tabela Periódica, possuindo número atômico 30 (30 prótons e 30 elétrons) com massa atômica 65,38 (Figura 9) (IUPAC, 2013). É considerado o 23º elemento químico mais abundante da litosfera (10 mg a 300 mg/Kg de solo), também presente na atmosfera (~300 ng/m³) e na hidrosfera (0,1 µg a 50 µg/L) (*Environmental Health Criteria*, 2001). No ambiente, o metal ocorre em dois estados de oxidação, Zn (0) e Zn (+2), formando 55 compostos estáveis, entre sais de zinco e ligas metálicas, de larga aplicação industrial (*Environmental Health Criteria*, 2001). Normalmente, o zinco não é encontrado na sua forma metálica (*Environmental Health Criteria*, 2001).

Entre os sais, destacam-se o óxido (ZnO, zincita), o fosfato (Zn₃(PO₄)₂·4H₂O, hopeíta), o silicato (Zn₂SiO₄, willeíta), o sulfeto (ZnS, esfalerita ou blenda) e o carbonato de zinco (ZnCO₃, smithsonita), muito abundantes na litosfera e que possuem grande quantidade de zinco (*Environmental Health Criteria*, 2001). Já entre as ligas, o latão e o bronze (*Environmental Health Criteria*, 2001). Pelo fato de ser um elemento, o zinco não pode ser destruído e nem degrada-se (*Environmental Health Criteria*, 2001). A sua importância estende-se para outras partes do universo, visto que o metal e seus derivados já foram detectados na composição de estrelas e na atmosfera de exoplanetas (Takeda *et al.*, 2002; Knutson *et al.*, 2014; Kreidberg *et al.*, 2014).

Apesar de a sua importância para os seres vivos ter sido descoberta somente no século passado, o zinco desempenha papéis essenciais na composição da vida no planeta desde o seu surgimento (Sommer & Lipman, 1926; Rolinson, 1951; Prasad *et al.*, 1961; Williams, 2012). O zinco é o segundo metal mais abundante nos seres vivos, só atrás do ferro (*Environmental Health Criteria*, 2001). Acredita-se que em algum momento do processo evolutivo, o zinco presente no ambiente foi adquirido pela célula primitiva para desempenhar processos biológicos simples e, ao longo da evolução, foi incorporado aos processos mais complexos dos organismos de todos os reinos (Figura 9) (Williams, 2012). Evidências da importância evolutiva do zinco nos processos biológicos estão relacionadas à quantidade de metaloproteínas, ou seja, proteínas estruturalmente associadas ao zinco, nos seres vivos: (1) nos procariotos, 5% a 6% de todas as proteínas do genoma têm relação estrutural com o zinco, já nos eucariotos, aproximadamente 10%; (2) em relação aos “dedos de zinco” (*zinc fingers*), importantes domínios proteicos que necessitam de átomos de zinco para sua estabilização, as bactérias do gênero *Eubacterium* possuem

somente 5 dedos de zinco, enquanto o *Homo sapiens*, ~3000 (Andreini *et al.*, 2006; Emerson & Thomas, 2009; Williams, 2012).

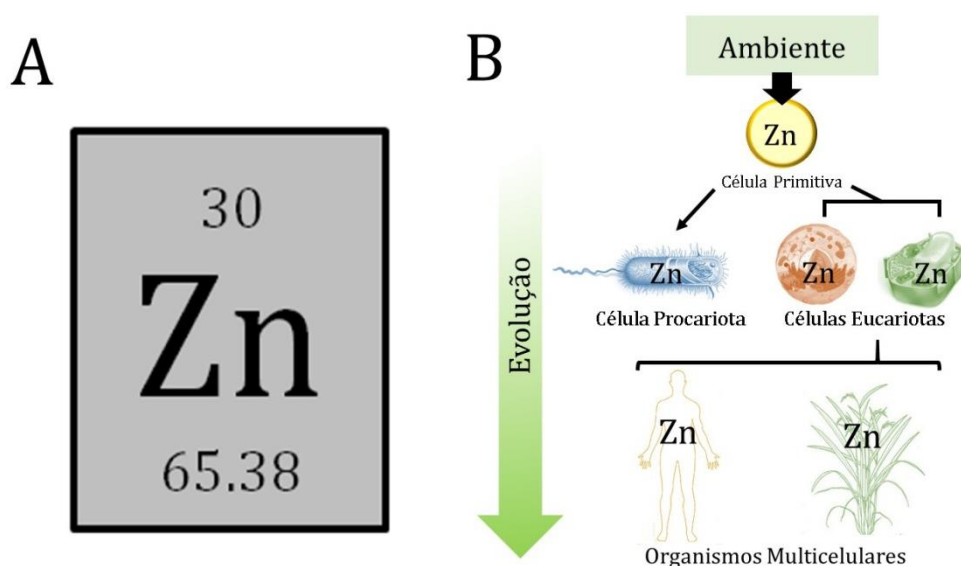


Figura 9. (A) Representação do elemento químico zinco de acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC, 2013). Arquivo Pessoal. (B) Incorporação do zinco presente no ambiente pelas as diferentes formas de vida ao longo da evolução. Referências: Andreini *et al.*, 2006; Williams, 2012.

2.2. Consumo e fontes alimentares

Quando considerado no contexto de outros metais, o zinco é único na sua diversidade funcional nos seres humanos (Stefanidou *et al.*, 2006). Sabe-se que o zinco é parte estrutural essencial de diversas proteínas no ser humano, incluindo diversos fatores de crescimento, citocinas, receptores, enzimas (>300) e fatores de transcrição (>2000) associados a muitas vias celulares relacionadas, sobretudo, à apoptose, proliferação, crescimento celular, reparo ao DNA, defesa antioxidante e resposta inflamatória (Stefanidou *et al.*, 2006). A estabilidade e, conseqüentemente, a funcionalidade dessas proteínas está diretamente relacionada com a concentração de zinco no organismo (Stefanidou *et al.*, 2006).

Mediante a diversidade funcional do zinco no corpo humano, além da homeostase diária desse metal, o organismo humano exige consumo diário de doses adequadas de zinco, visto que não há acúmulo de grandes quantidades do mesmo no corpo, como o cálcio e o ferro, por exemplo (*Food and Nutrition Board*, 2001). De acordo com a OMS,

há dificuldades inerentes à estimativa das necessidades de zinco para os seres humanos, visto que fatores fisiológicos, ambientais e dietéticos variam de acordo com as populações (*Environmental Health Criteria*, 2001).

Assim, as estimativas para o consumo diário de zinco foram feitas para contemplar de 97% a 98% das necessidades nutricionais da população, por meio de estudos equilíbrio metabólico, levando-se em consideração a sua ingestão, excreção, quantidades necessárias para o crescimento e desenvolvimento, eventuais perdas e biodisponibilidade (*Environmental Health Criteria*, 2001). A Sociedade Alemã de Nutrição (2015) estabelece como recomendação diária de ingestão (RDI) para indivíduos adultos saudáveis 10 mg e 7 mg/dia para homens e mulheres adultos, respectivamente. Já a *Food and Nutrition Board* (2001), dos EUA, recomenda 11 mg e 8 mg/dia. Durante a infância, devido ao importante papel do zinco no crescimento, a mesma entidade recomenda quantidades crescentes da ingestão do metal: 3 mg (1 a 3 anos), 5 mg (4 a 8 anos) e 8 mg/dia (9 a 13 anos). Durante a gravidez e lactação, também se levando em consideração a importância do zinco no desenvolvimento e crescimento do organismo, recomenda-se de 11 a 13 mg/dia (*Food & Nutrition Board*, 2001). No Brasil, especificamente, as recomendações de ingestão diária de zinco não foram divulgadas pelo Ministério da Saúde no “Guia Alimentar da População Brasileira” (2014).

A obtenção de zinco por meio da ingestão de alimentos é considerada o principal meio de suprir as recomendações diárias, enquanto a ingestão de água possui contribuição menor, em média <0.2 mg/dia (*Environmental Health Criteria*, 2001). No Brasil, empresas como a Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (Sabesp) não realizam análises rotineiras sobre as concentrações de zinco na água fornecida à população, portanto, é difícil saber a contribuição da água nas recomendações diárias de ingestão de zinco.

As principais fontes alimentares de zinco prontamente biodisponível são provenientes de produtos animais como as carnes bovinas e suínas, frutos do mar, aves, ovos, leite e derivados (Figura 10) (TACO, 2011). Por outro lado, os produtos vegetais não são considerados boas fontes de zinco (Figura 10) (TACO, 2011). Como exceção, os cereais, seus derivados (normalmente fortificados industrialmente) e o feijão possuem grandes quantidades do metal (Figura 10) (TACO, 2011). No entanto, a presença dos fitatos nos vegetais atrapalha a absorção intestinal e biodisponibilidade do zinco em seres humanos (Turnlund *et al.*, 1984; Lönnnerdal, 2000). O fitato, ou inositol hexafosfato, é um composto que pode fortemente se ligar a cátions, como o zinco, formando compostos

insolúveis e estáveis (van Steveninck *et al.*, 1994; Lönnerdal, 2000). Portanto, populações em que a dieta é baseada no consumo de grãos, como em países considerados “em desenvolvimento”, há maior risco de menor consumo de zinco e portanto, de deficiência desse metal (Wessells & Brown, 2012). Além disso, um estudo de meta-análise recente revelou que dietas vegetarianas reduzem de maneira significativa a quantidade de zinco consumida e sérica em relação a indivíduos não vegetarianos (Foster *et al.*, 2013). Em relação ao consumo do fitato, a OMS estabeleceu a razão molar desse composto em relação ao zinco como um indicador válido para estimar a biodisponibilidade do metal nas dietas (Morris & Ellis, 1989). Por exemplo, se o valor dessa razão é >15 mol fitato/mol zinco (F/Zn) (dieta rica em fitato), há redução de 50% da absorção intestinal do zinco ingerido (Morris & Ellis, 1989). Valores 5 até 15 correspondem a uma biodisponibilidade moderada de zinco, enquanto que <5 , alta biodisponibilidade desse metal (Morris & Ellis, 1989).

Apesar das diversas determinações de zinco nos alimentos, devem ser consideradas as condições de semente das plantas e criação de animais (Hacisalihoglu *et al.*, 2004; Alloway, 2009). A deficiência de zinco na agricultura ou na pecuária pode influenciar a característica e qualidade nutricional do alimento oferecido às populações, visto que esse metal é essencial para os processos biológicos dos vegetais e animais (Hacisalihoglu *et al.*, 2004; Alloway, 2009). As condições de preparo dos alimentos também podem influenciar na quantidade do zinco nos alimentos e, portanto, na sua biodisponibilidade (TACO, 2011).

Os roedores, como as diversas linhagens de ratos e camundongos utilizados em estudos de experimentação, também possuem necessidades diárias da ingestão de zinco. A *National Academy of Sciences* (2001) dos EUA indica dietas com valores de 30 mg a 35 mg de zinco elementar por quilograma de ração.

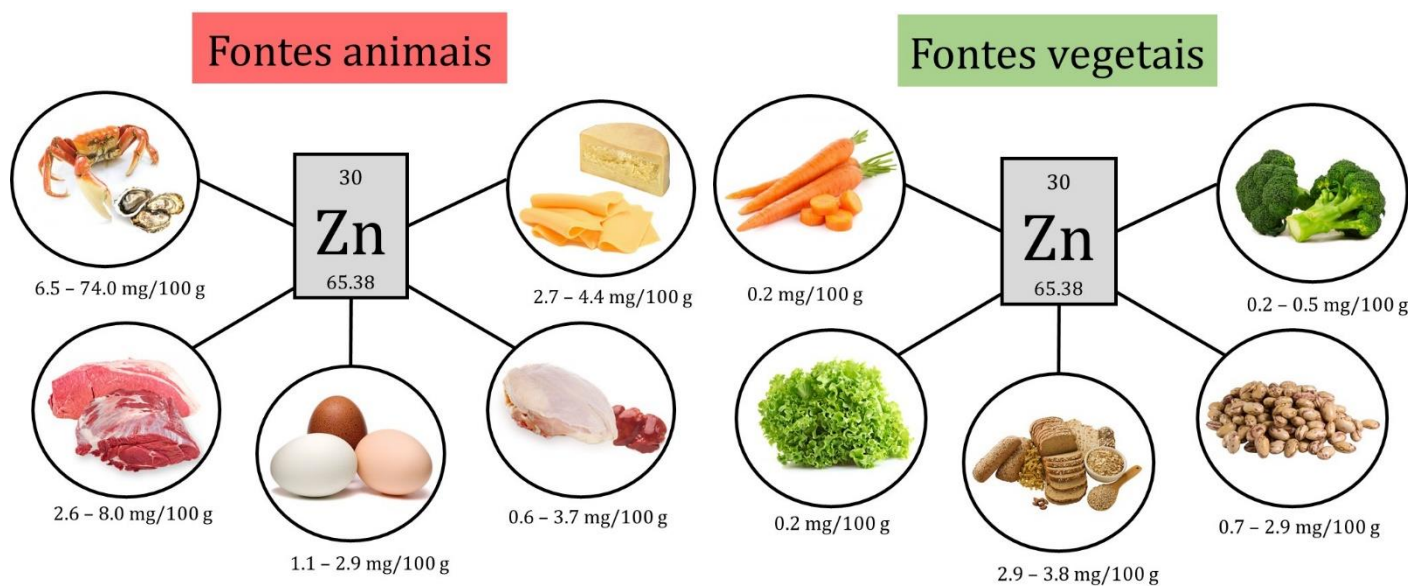


Figura 10. Fontes alimentares de Zinco (quantidades estimadas de zinco elementar a cada 100 g.). Observa-se que os produtos derivados de fontes animais (frutos do mar, carne bovina, ovos, carne de aves e queijos) possuem maior quantidade de zinco em comparação com os produtos vegetais (cenoura, alface crespa, cereais, feijão carioca, brócolis). As variações na quantidade do metal nos alimentos estão relacionadas com as condições de cultivo das plantas, criação dos animais e preparo dos alimentos. Referência: TACO, 2011.

2.3 Homeostase

O controle homeostático do zinco nas células dos mamíferos é um processo essencial e complexo, sendo realizado por vários transportadores transmembrana importadores (família ZIP/SLC39) e exportadores (família ZnT/SLC30) (Huang & Tepasorndech, 2013; Jeong & Eide, 2013). A entrada de zinco na célula pela membrana plasmática é regulada positivamente pelos ZIPs e negativamente pelos ZnTs, enquanto a entrada de zinco nas organelas é regulada positivamente pelos ZnTs e negativamente pelos ZIPs (Huang and Tepasorndech, 2013; Jeong and Eide, 2013). Ademais, as metalotioneínas (MT) e fatores responsivos à presença de metal, como o fator de transcrição MTF-1 (*metal transcription factor-1*), também contribuem para a homeostase do metal (Thirumoorthy *et al.*, 2011; Kloubert & Rink, 2015).

Esses componentes controlam, de maneira organismo/célula-dependente, eventos principais na manutenção da homeostase do zinco no organismo: (1) absorção, (2) distribuição, (3) armazenamento e (4) excreção (Figura 11) (Kambe *et al.*, 2014). O entendimento da homeostase em indivíduos saudáveis é importante pois as variações na quantidade de zinco na dieta, assim como a manifestação de condições patológicas, como

o câncer, podem influenciar o processo em si, refletindo em alterações funcionais no organismo (Kambe *et al.*, 2014).

Em condições de ingestão adequada, cerca de 30% a 40% do zinco presente nos alimentos é absorvido pelos enterócitos do intestino delgado, principalmente (Gallaher *et al.*, 1988). O transportador/importador ZIP4, presente tanto em murinos quanto em seres humanos, é o principal responsável por transportar o zinco da membrana apical para o citoplasma dos enterócitos (Figura 11) (Wang *et al.*, 2002; Dufner-Beattie *et al.*, 2004). A presença desse transportador nas células intestinais e a expressão do gene do transportador (*Zip4*) são sensíveis à quantidade de zinco no organismo: (a) quando há excesso, os transportadores ZIP4 sofrem endocitose, ubiquitinação e degradação, e há inibição da expressão de *Zip4*; resultando em menor quantidade do receptor na membrana das células; (b) quanto há falta, a degradação de ZIP4 é inibida e há maior expressão de *Zip4*, levando ao acúmulo de ZIP4 na membrana apical (Dufner-Beattie *et al.*, 2003; Dufner-Beattie *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2006).

Fatores como doenças intestinais absorptivas, como a acrodermatite enteropática, além do consumo de fitato (como citado em 2.2) são considerados os fatores principais que influenciam a absorção do zinco pelo intestino (Lönnerdal, 2000; Duffner-Beattie *et al.*, 2003). Após sua entrada pela membrana plasmática, parte do zinco permanece no citoplasma das células intestinais, sendo redistribuído pelos compartimentos celulares por diferentes transportadores, para que desempenhe funções celulares típicas desse metal (como comentado em 2.2) (Wang & Zhou, 2010).

Para que o zinco absorvido pelos enterócitos alcance a circulação e seja distribuído aos demais órgãos do corpo, há a saída do metal pela membrana basolateral dos enterócitos (Yu *et al.*, 2007). O transportador/exportador ZnT1 é o principal responsável pelo processo (Figura 11) (Liuzzi *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2007). Altos níveis de zinco aumentam expressão proteica do receptor, enquanto a deficiência parece não alterá-la (Liuzzi *et al.*, 2000). No sangue, a maioria dos átomos de zinco liga-se à albumina (77%) por ligações fracas, facilitando a passagem do metal para diferentes órgãos. Outra parte liga-se à α 2-macroglobulina (~20%) por ligações fortes, fazendo parte de um *pool* de zinco que não é transportado para os tecidos (Foote & Delves, 1984). Ademais, uma pequena parte do zinco permanece livre no sangue (Foote & Delves, 1984).

Assim, a dosagem de zinco no soro sanguíneo humano é considerada um indicador do *status* geral do zinco no corpo, sendo rotineiramente aplicado ao diagnóstico de deficiência e excesso do metal no organismo (Rükgauer & Klein, 1997). Os valores de

zinco séricos considerados normais em humanos variam na faixa de 70 µg a 150 µg/dL (Rükgauer & Klein, 1997).

Após alcançar a circulação sistêmica, o zinco é distribuído entre os diferentes órgãos (Wastney *et al.*, 1986; Aggett, 1994). Esse metal é considerado um oligoelemento, pois se apresenta em quantidades diminutas no organismo, representando apenas 0,003% (de 1,4 g a 2,3 g) de todo o corpo humano (70 Kg) (Wastney *et al.*, 1986; Aggett, 1994). A maior parte do zinco corpóreo é encontrada principalmente nos músculos esqueléticos (60%), ossos (30%), fígado (~5%) e pele (~5%) (Figura 11) (Wastney *et al.*, 1986; Aggett, 1994). Como já citado, os diferentes órgãos possuem variações na quantidade e no tipo de transportadores importadores e exportadores de zinco, refletindo na quantidade desse metal dentro das células (Kambe *et al.*, 2014).

No fígado, especificamente, os transportadores/importadores ZIP5 e ZIP14 têm papel relevante na importação do zinco do meio extracelular para o citoplasma dos hepatócitos (Figura 11) (Liuzzi *et al.*, 2005; Aydemir *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2014). Após o influxo do zinco para o meio intracelular, o metal distribui-se entre citoplasma (50%), núcleo (30% a 40%) e membrana plasmática (10%) para que desempenhe suas principais funções (Thiers & Valle, 1957; Kambe *et al.*, 2014). Sobretudo, os transportadores ZIP7 e ZnT7 estão presentes nas organelas do hepatócito, como o retículo endoplasmático (RE), e participam desse processo (Figura 11) (Sun *et al.*, 2014).

Parte do zinco citoplasmático liga-se às MT (Figura 11), proteínas de baixo peso molecular e ricas em resíduos sulfidril cisteína que possuem alta afinidade por diversos íons metálicos (Thirumorthy *et al.*, 2011; Kloubert & Rink, 2015). Tais proteínas têm papel fundamental na homeostase dos metais na célula e também desempenham função antioxidante (Thirumorthy *et al.*, 2011; Kloubert & Rink, 2015). Especificamente, as MT parecem ser “reservatórios” de zinco, pois a expressão de tais proteínas é diretamente associada às alterações na concentração do zinco intracelular (Thirumorthy *et al.*, 2011; Kloubert & Rink, 2015). Mediante ao aumento do zinco intracelular, há ativação do fator de transcrição MTF-1, que estimula a expressão de MT (Szcurek *et al.*, 2001; Saydam *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004). Por sua vez, as MT ligam-se ao zinco e reduzem a quantidade desse metal no citoplasma. Em condições de redução de zinco intracelular, inibe-se a ativação e expressão de MTF-1 e MT, respectivamente, e as MTs liberam o zinco para o citoplasma (Szcurek *et al.*, 2001; Saydam *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004).

Os transportadores/exportadores ZnT1 e ZnT2 têm papel importante na redução da concentração desse metal no fígado, visto que o aumento na quantidade de zinco

umenta a expressão de tais transportadores, podendo resultar no efluxo do zinco dos hepatócitos para a corrente sanguínea (Figura 11) (McMahon & Cousins, 1998; Liuzzi *et al.*, 2000).

Por fim, a excreção do zinco também é mediada pela ação dos transportadores e ocorre principalmente pelas fezes via enterócitos/hepatócitos e pequena parte pela urina via células epiteliais tubulares renais (Krebs, 2000). O transportador/importador ZIP5, presente na membrana basolateral dos enterócitos, media a reentrada do zinco circulante para citoplasma (Figura 11), já o transportador/exportador ZnT6, presente na membrana apical dos enterócitos, pode ser responsável pela excreção do metal do citoplasma para o lúmen intestinal (Figura 11) (Yu *et al.*, 2007; Geiser *et al.*, 2013). Já nos rins, os transportadores ZnT1 e ZnT2 são importantes para o efluxo do zinco das células epiteliais tubulares renais (Liuzzi *et al.*, 2000).

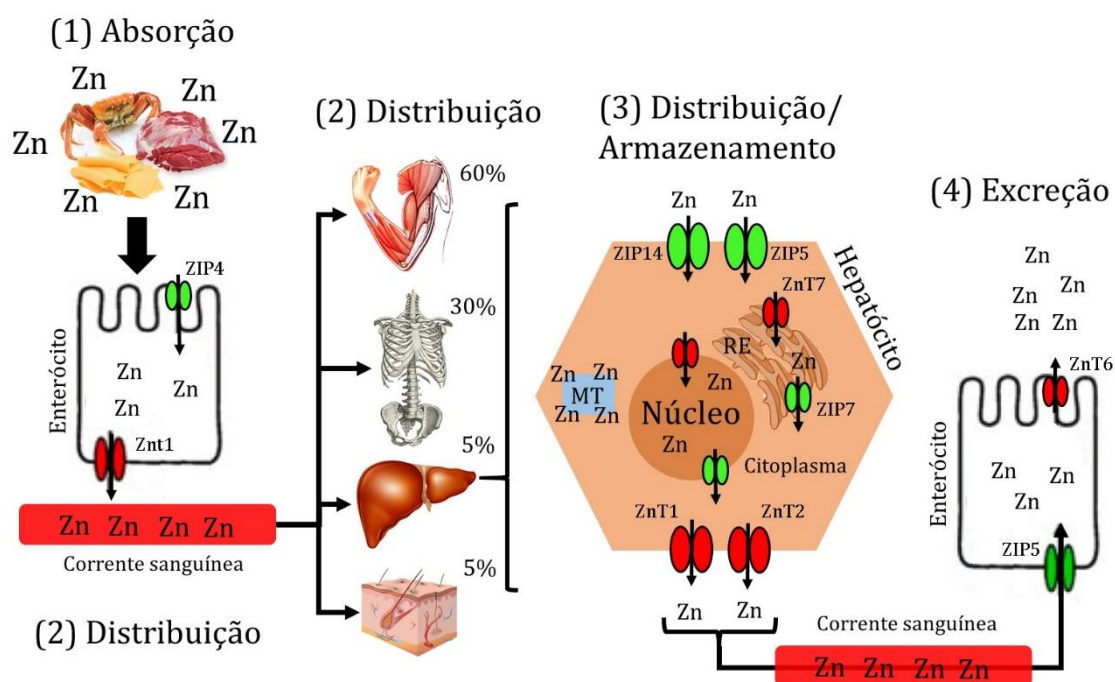


Figura 11. Homeostase do zinco. A manutenção de concentrações adequadas de zinco na célula envolve os processos de (1) absorção pelos enterócitos, (2,3) distribuição do metal pelo organismo e pelos distintos compartimentos celulares hepatócito, (3) armazenamento pelas metalotioneínas (MT) e (4) excreção pelos enterócitos. Referências: Aggett, 1994; Liuzzi *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004; Liuzzi *et al.*, 2005; Mao *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007.

2.4 Principais funções

Grande parte do conhecimento das múltiplas funções do zinco, sobretudo nos seres humanos e roedores, está diretamente relacionado à descoberta dos efeitos da deficiência desse metal nos organismos (Todd *et al.*, 1934; Prasad *et al.*, 1961). De fato, o zinco desempenha funções atreladas a diversas vias celulares importantes. Destaca-se o papel do zinco, sobretudo, como parte estrutural e funcional de enzimas e fatores de transcrição, principalmente como parte de dedos de zinco (Stefanidou *et al.*, 2006). Os dedos de zinco (Figura 12) são domínios proteicos descobertos por Hanas e colaboradores (1983) na espécie de sapo *Xenopus laevis*. São estruturas presentes na metade dos fatores de transcrição dos seres eucariotos, sobretudo humanos e murinos (Messina *et al.*, 2004). Observou-se que os dedos de zinco são estruturas relativamente pequenas que necessitam de átomos de zinco para a manutenção da sua estrutura tridimensional e função (Figura 12) (Hanas *et al.*, 1983).

Essas estruturas possuem protusões que se assemelham a “dedos”, interagindo com a molécula de DNA e permitindo a transcrição gênica (Figura 12) (Hanas *et al.*, 1983). Os dedos de zinco mais comuns no genoma eucariótico são aqueles formados por resíduos de cisteína e histidina (Cys2-His2) (Figura 12) (Razin *et al.*, 2012). O átomo de zinco coordena a ligação entre esses resíduos, mantendo as estruturas de α -hélice e β -antiparalela funcionais (Figura 12) (Razin *et al.*, 2012). Estruturalmente, o zinco também está presente em diversas enzimas. Por exemplo, o zinco faz parte de sítios estruturais e catalíticos da enzima ADH dos mamíferos (Brandt *et al.*, 2009). Nessa enzima, o zinco está ligado a diferentes resíduos de cisteína por meio de ligações iônicas e covalentes, contribuindo para a sua manutenção estrutural (Brandt *et al.*, 2009).

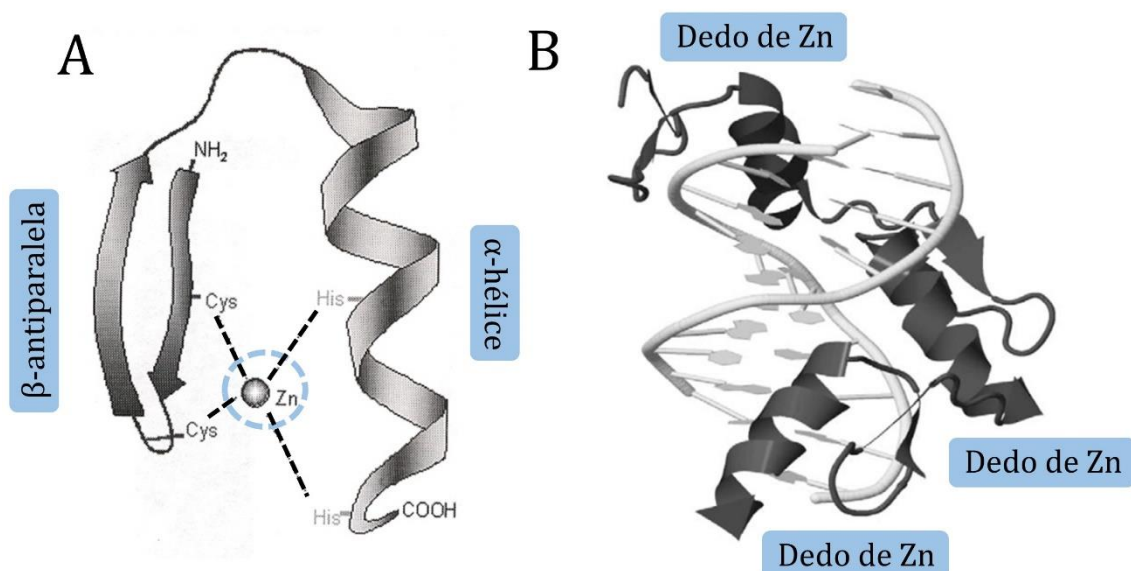


Figura 12. Dedo de zinco Cys2-His2. **(A)** Estrutura básica, formada por resíduos de cisteína e histidina ligados por um átomo de zinco, mantendo a forma de “dedo” característica da estrutura. **(B)** Interação de três dedos de zinco com uma molécula de DNA. Referência: Razin *et al.*, 2012.

Dentre as funções desempenhadas pelo zinco, destaca-se seu papel como agente antioxidante (Figura 13). O zinco, como metal, não parece desempenhar essa função *per se* e suas propriedades antioxidantes resultam de diversos mecanismos indiretos, quando associado a diferentes proteínas (Kloubert & Rink, 2015). Como resultado do metabolismo normal do oxigênio nas células, há a formação dos íons superóxido (O_2^-), que pode ligar-se a diversas biomoléculas e causar danos a célula. Assim, as metaloenzimas superóxido dismutase (SOD) catalisam a reação que transforma esse íon em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), reduzindo a sua ação oxidante (Tainer *et al.*, 1983).

O zinco é parte estrutural fundamental da SOD1 ou CuZnSOD, enzima abundante no citoplasma das células, por ligar-se a um anel eletrostático formado por resíduos histidil e aspartil, mantendo a estabilização estrutural do homodímero que forma a SOD (Tainer *et al.*, 1983). O zinco também é componente estrutural do fator de transcrição Sp1, mantendo a estabilização de três dedos de zinco formados por resíduos de cisteína e histidina (Cys2-His2) (Narayan *et al.*, 1997). Por sua vez, esse fator de transcrição pode induzir a expressão do gene da enzima antioxidante catalase, que decompõe o H_2O_2 em O_2 e H_2O (Tate *et al.*, 1997). Como já comentado em 2.3, a ativação do fator de transcrição MTF-1 é dependente da concentração de zinco intracelular (Saydam *et al.*, 2002). O zinco liga-se de maneira direta e reversível aos dedos de zinco presentes em MTF-1, ativando-

o e induzindo a transcrição do gene das MTs (Saydam *et al.*, 2002). As MTs, além do seu papel na homeostase de metais, tem ação antioxidante por possuir vários resíduos de cisteína que atuam na eliminação de radicais hidroxila (OH^\cdot) (Kang, 2006; Ruttkay-Nedecky *et al.*, 2013).

O zinco também parece ter importância na indução da via Keap1/Nrf2/ARE (Wang *et al.*, 2015). Nessa via, o aumento do zinco celular inibe a degradação de Nrf2 pela metaloproteína Keap1, que também possui um dedo de zinco em sua estrutura, promovendo acúmulo de Nrf2 (McMahon *et al.*, 2010; Ogura *et al.*, 2010). Esse fator de transcrição liga-se ao elemento de resposta antioxidante (ARE) e leva ao aumento da expressão de genes relacionados à enzimas de defesa antioxidante (glutathione [GSH] e glutathione peroxidase [GSPx] e a própria SOD) e detoxificação de carcinógenos (glutathione-S-transferase-1 [GSTA1] e hemeoxigenase-1 [HO-1]) (Stefanson & Bakovic, 2014; Wang *et al.*, 2015).

Outra função de destaque do zinco está relacionada à proteína p53 (Figura 13) (Méplan *et al.*, 2000; Loh, 2010). Como já comentado em 1.3, a p53 é um fator de transcrição que interage com DNA das células por um domínio proteico complexo que contém um átomo de zinco (Méplan *et al.*, 2000; Loh, 2010). Sabe-se que presença zinco mantém a estabilização estrutural e, conseqüentemente, funcional da proteína p53 (Méplan *et al.*, 2000; Loh, 2010). Portanto, as quantidades de zinco na célula estão diretamente atreladas à expressão de diversos genes controlados por p53, relacionados ao reparo do DNA (*GADD45*), parada no ciclo celular (*CDKN1A*) e apoptose (*BAX* e *PUMA*) (Méplan *et al.*, 2000; Loh, 2010). Ainda em relação ao reparo, a Poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) é uma enzima envolvida no reparo por excisão de bases (BER), ligando-se ao DNA por meio de dois dedos de zinco (F1 e F2) (Petrucco & Percudani, 2008). Também foi identificado um dedo de zinco Cys2Hys2 na enzima DNA Y-polymerase η , responsável por sintetizar DNA em locais logo após a lesão ao DNA (denominada de síntese translesão), mantendo a estabilidade genômica (Bomar *et al.*, 2007).

Em relação ao sistema imunológico (Figura 13), o zinco também desempenha uma grande diversidade de funções, contribuindo tanto para a resposta imune inata quanto para a adaptativa (Rink & Haase, 2007). Um átomo de zinco é necessário para a manutenção da conformação estrutural da timulina, um hormônio produzido pelas células epiteliais tímicas e envolvido com a maturação, diferenciação e função dos Linfócitos T (Dardenne *et al.*, 1985; Saha *et al.*, 1995). Além disso, apesar de as proteínas envolvidas na via do

fator de transcrição NFκB (comentada em 1.3) não possuem dedos de zinco na sua sequência de aminoácidos, a ativação dessa via nas células da resposta imunológica (como macrófagos e monócitos) demonstrou-se ser dependente da sinalização mediada pelo metal (Bao *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2013). O processo infeccioso leva à redistribuição corpórea e à redução do zinco plasmático (Gaetke *et al.*, 1997). A redução do zinco atenua os mecanismos de defesa antioxidante, aumentando o estresse oxidativo (Song *et al.*, 2009a,b). O NFκB, por sua vez, é ativado pelo estresse oxidativo, permitindo a expressão de diversos genes relacionados a resposta pró-inflamatória, como os genes da citocinas IL-2 e IL-2Rα (Prasad *et al.*, 2002; Bao *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2013). Ademais, foi observado que a ativação de macrófagos pelas citocinas TNF-α e IFN-γ leva ao aumento da concentração de zinco nos fagolisossomos, que por sua vez, pode contribuir para a resposta microbicida direta (Wagner *et al.*, 2005).

O zinco está envolvido em processos de proliferação e crescimento celular tanto como elemento estrutural quanto como elemento regulatório de diversas vias (Figura 13) (Macdonald, 2000). Como componente estrutural, o zinco parece estabilizar a estrutura dos ribossomos e fazer parte de diversas metalenzimas, incluindo a RNA polimerase (Macdonald, 2000). Mais recentemente, o dedo de zinco ZNF191 demonstrou-se um potencial regulador da via Wnt/β-catenina (citada em 1.3), ligando-se ao promotor do gene *CTNNB1* e ativando a expressão de β-catenina e de seus genes-alvo relacionados com a proliferação celular, como gene da proteína ciclina D1 (Liu *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2015). No fígado, especificamente, os processos de crescimento e proliferação, essenciais para a regeneração hepática, parecem estar relacionados com o maior influxo de zinco citoplasmático, mediado pelo transportador/importador ZIP14 (Aydemir *et al.*, 2012). A maior quantidade de zinco na célula aumenta a fosforilação de c-Met por ligar-se e inibir a atividade da enzima fosfatase PTP1B (Aydemir *et al.*, 2012). A proteína c-Met está relacionada com diversas vias de proliferação e crescimento celular, incluindo a ativação da via Wnt/β-catenina (Aydemir *et al.*, 2012).

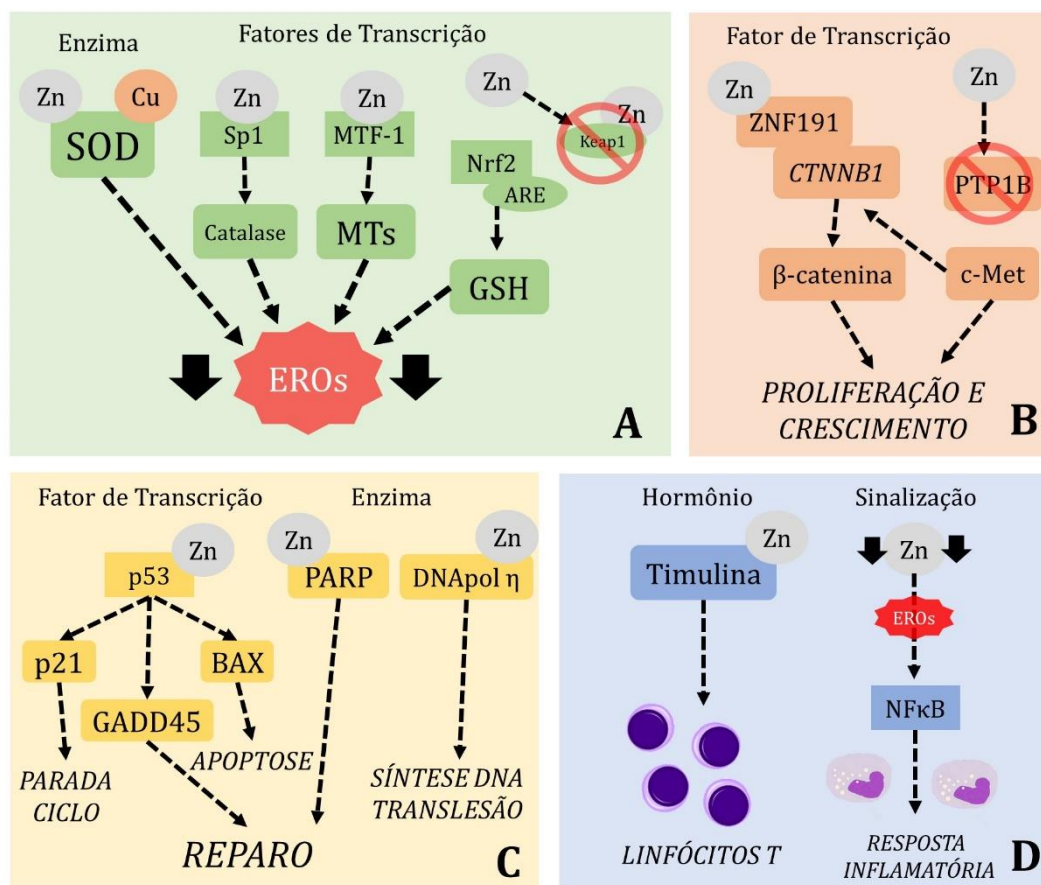


Figura 13. Algumas das principais funções do zinco na (A) defesa antioxidante, (B) proliferação e crescimento, (C) p53 e reparo ao DNA e (D) sistema imunológico. Referências: Tainer *et al.*, 1983; Narayan *et al.*, 1997; Saha *et al.* 1995; Méplan *et al.*, 2000; Saydam *et al.*, 2002; Bomar *et al.*, 2007; Petrucco & Percudani., 2008; McMahon *et al.*, 2010; Aydemir *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012.

2.5 Deficiência, Suplementação e Câncer

Apesar de a média global estimada para o consumo do zinco atingir valores próximos ao sugeridos (11,4 mg/dia), estima-se que 17,3% da população mundial esteja sobre risco de consumo inadequado de zinco e, conseqüentemente, sob risco de deficiência desse metal (Figura 14) (Wessels & Brown, 2012). Esse valor corresponde a 1 bilhão e 211 milhões de pessoas, se considerarmos a população mundial em torno de 7 bilhões de pessoas. Além disso, mundialmente, estima-se que o valor da razão molar fitato/zinco seja ~ 16 F/Zn, considerado alto pela OMS e podendo influenciar na redução da absorção do zinco (Wessels & Brown, 2012). Isso pode ser explicado pela estimativa de que somente 35% do zinco ingerido mundialmente seja de origem animal (Figura 14) (Wessels & Brown, 2012).

Os países da Ásia (Sul e Sudeste) (~30% e 22%, respectivamente) e África Subsaariana (26%) possuem grande parte da população sobre risco de consumo inadequado de zinco (Figura 14) (Wessells & Brown, 2012). Nessas regiões, o consumo médio de zinco está abaixo do estimado: 8,4 mg a 9,8 mg/dia na Ásia e 8,9 mg/dia na África (Wessells & Brown, 2012). Outro agravante está no fato de que a obtenção do zinco nessas regiões é baseada no consumo de produtos vegetais, como os cereais (Figura 14) (Wessells & Brown, 2012). Estima-se que na Ásia, somente 11% do zinco é obtido por produtos animais, enquanto na África, ~20% (Wessells & Brown, 2012). Assim, o valor da razão molar fitato/zinco dessas regiões é alto: 16,5 F/Zn a 23 F/Zn na Ásia e 21 F/Zn na África (Wessells & Brown, 2012). Além disso, síndromes de má absorção causadas por doenças diarreicas endêmicas são comuns nessas regiões, também influenciando na absorção e levando à deficiência desse micronutriente (Wapnir, 2000).

Por outro lado, estima-se que na América do Sul e na Europa, somente 6,4% e ~10% da população, respectivamente, esteja sob risco de consumo inadequado desse micronutriente (Figura 14) (Wessells & Brown, 2012). Nessas regiões, o consumo médio de zinco supera os níveis recomendados, ~12 mg/dia em ambas (Wessells & Brown, 2012). Essa estimativa pode ser justificada pelo alto consumo de produtos animais nessas regiões (Figura 14), que contribui com 60% e 52% de todo o consumo de zinco na América do Sul e na Europa, respectivamente (Wessells & Brown, 2012).

Além do consumo inadequado, deficiência desse micronutriente possui outras etiologias importantes, tanto herdadas quanto adquiridas. A forma herdada mais comum é a acrodermatite enteropática, uma condição que resulta de uma mutação no gene do transportador/importador ZIP4 (Wang *et al.*, 2002; Dufner-Beattie *et al.*, 2003). Enquanto o consumo inadequado é relacionado à maioria dos casos e dá origem a uma deficiência de zinco moderada, a acrodermatite enteropática contribui com a menor parte dos casos e está relacionada à deficiência severa do micronutriente (Wang *et al.*, 2002; Dufner-Beattie *et al.*, 2003, Wessells & Brown, 2012).

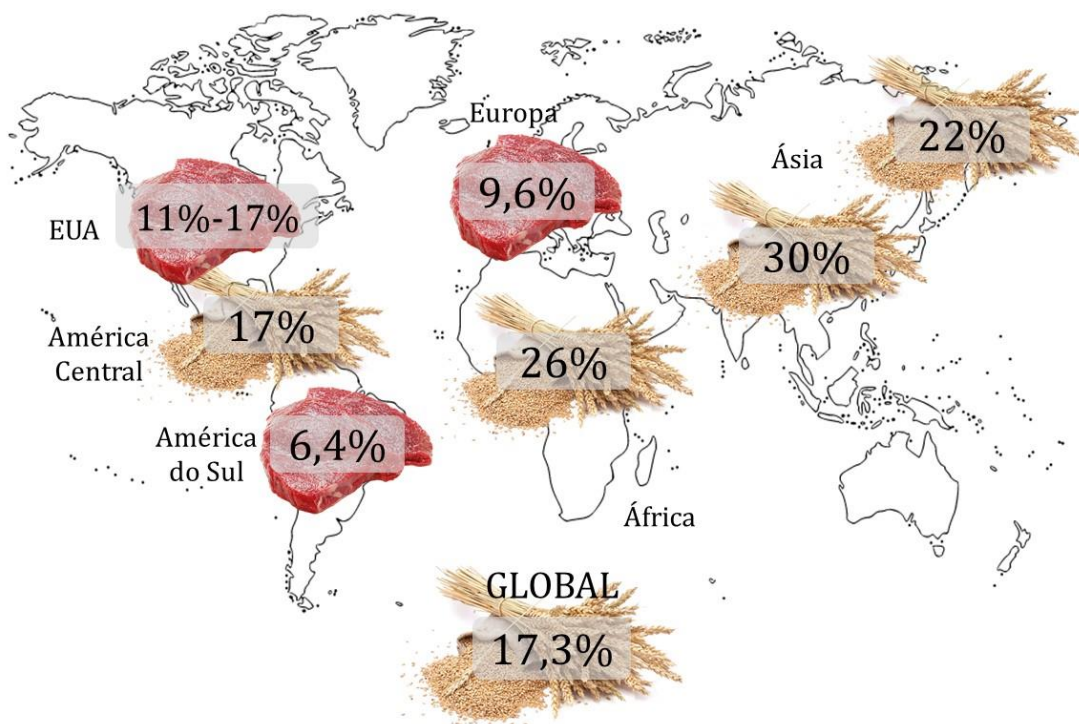


Figura 14. Porcentagem da população de cada país/continente sob risco de consumo inadequado de zinco e suas respectivas principais fontes de ingestão do micronutriente (produtos de origem animal ou vegetal, principalmente cereais). Referências: Wessells & Brown, 2012; *US Department of Agriculture*, 2010.

Os efeitos da deficiência de zinco nos seres humanos foram inicialmente registrados por Halsted e Prasad (1961), quando homens iranianos foram diagnosticados com alterações do crescimento, hipogonadismo, supressão da resposta imunológica, disfunções cognitivas e anormalidades cutâneas (acrodermatite), como consequências de alterações nas principais funções do zinco no organismo (citadas em 2.3). Estudos posteriores do mesmo grupo de pesquisa em pacientes egípcios também corroboraram com os achados (Prasad *et al.*, 1963). Ao longo dos anos, tais sintomas tornaram-se clássicos para o diagnóstico da deficiência de zinco em seres humanos (Prasad, 1991). Apesar desses achados, ainda nos anos 90 do século passado, a deficiência de zinco ainda era considerada por alguns autores um problema negligenciado pelas principais agências de saúde mundiais (Prasad, 1998). No entanto, em 2002, a OMS estimou que, mundialmente, a deficiência de zinco estaria relacionada com 16% das infecções do trato respiratório inferior (como a pneumonia), 18% dos casos de malária e 10% das doenças diarreicas, principalmente nos países considerados “em desenvolvimento” na África e na Ásia. Assim, aproximadamente 1,4% (0,8 milhões) do total de mortes no mundo poderiam ser atribuídos à deficiência de zinco e suas consequências (OMS, 2002). O

aumento da susceptibilidade às infecções está diretamente relacionado aos efeitos da deficiência de zinco na supressão do sistema imunológico (Ibs & Rink, 2003).

Dentro desse contexto, diversos modelos experimentais em roedores começaram a ser aplicados para o estudo dos efeitos da deficiência de zinco, visto que as características fisiopatológicas da deficiência nos roedores são semelhantes ao observado no ser humano (Todd *et al.*, 1934; Silvestre *et al.*, 2007). Especialmente em roedores, o modelo de deficiência de zinco em camundongos Balb/C é amplamente aplicado em comparação com outras linhagens, como a CD-1, pela sua semelhança única com a deficiência de zinco humana (Silvestre *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2013). E a partir desses modelos em roedores, sabe-se que a deficiência de zinco causa no fígado, especialmente, alterações na expressão gênica e proteica de componentes de vias de controle do crescimento celular, metabolismo de lipídios e xenobióticos, resposta ao estresse e sinalização celular, principalmente (Dieck *et al.*, 2003).

Já no contexto de doença hepática é importante ressaltar que as regiões endêmicas para as infecções com o VHC e VHB sobrepõem-se àquelas de consumo inadequado de zinco e maior risco de deficiência desse micronutriente (Franco *et al.*, 2012; Wessells & Brown, 2012; Messina *et al.*, 2015). Sabe-se que a imunocompetência do hospedeiro é fundamental para determinar o resultado das infecções agudas por VHC e VHB (McMahon, 2009; Westbrook & Dusheiko, 2014). Em indivíduos imunocompetentes, a resolução da infecção aguda com *clearance* viral pode chegar a 34% e 90% dos pacientes infectados pelo VHC e VHB, respectivamente (McMahon, 2009; Westbrook & Dusheiko, 2014). Assim, levando-se em consideração os efeitos da deficiência de zinco na supressão do sistema imunológico, especula-se uma importância subjacente da deficiência desse metal nas consequências dessas infecções agudas, incluindo o desenvolvimento de doença hepática crônica e o CHC (Grüngeriff & Reinhold, 2010). Além disso, um estudo experimental recente em camundongos Balb/C demonstrou que a deficiência de zinco gestacional parece suprimir o sistema imunológico humoral e celular da prole, resultando em menor eficácia da vacinação contra o VHB (Zhao *et al.*, 2013)

Já nos últimos anos, a redução dos níveis de zinco tem sido atrelada ao maior risco de desenvolvimento de doenças crônicas, como o câncer (Gumulec *et al.*, 2014). Em estudos tanto em humanos quanto em roedores, a deficiência de zinco aumenta o estresse oxidativo seguido de aumento de dano no DNA (Song *et al.*, 2009a,b). *In vitro*, a deficiência também demonstrou aumentar o dano ao DNA em células epiteliais prostáticas e fibroblastos normais, por alterar diversos mecanismos de defesa antioxidante

e reparo citados em 2.3, incluindo a redução da atividade de ligação do fator de transcrição p53 e redução na expressão de seus genes-alvo (Ho *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2008). A alteração da integridade genômica é considerada um fator de risco para o processo de transformação maligna e surgimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas malignas (Hanahan & Weinberg, 2011).

Um estudo de meta-análise recente avaliou a concentração de zinco no soro e no tecido tumoral de pacientes com diversos tipos de neoplasias malignas (Gumulec *et al.*, 2014). Observou-se que em neoplasias malignas dos pulmões, estômago e próstata há redução dos níveis séricos de zinco em comparação com pacientes saudáveis (Gumulec *et al.*, 2014). Ademais, os níveis de zinco estão reduzidos no tecido tumoral de neoplasias malignas da próstata e da tireoide (Gumulec *et al.*, 2014). Em relação às neoplasias malignas do esôfago, especificamente, já é antiga a relação epidemiológica entre a deficiência de zinco e maior risco de desenvolvimento dessas neoplasias (van Rensburg, 1981).

Estudos recentes *in vivo* em modelos de carcinogênese química de esôfago em roedores, induzida pela droga N-nitrosometilbenzilamina (NMBA), demonstraram que a deficiência parece promover o surgimento dessas neoplasias malignas pela indução exacerbada da resposta inflamatória, mediada por alteração na expressão dos miRNA-31 e miRNA-21 (Alder *et al.*, 2012; Taccioli *et al.*, 2012). Além disso, ainda em modelos experimentais *in vivo*, a deficiência parece induzir e/ou promover a carcinogênese oral e de colo (Fong *et al.*, 2006; Christudoss *et al.*, 2008;2012). Já em estudos *in vitro*, a deficiência de zinco parece aumentar a expressão, mas reduzir a atividade de p53 em células de glioma, reduzindo a expressão de genes-alvo (Ho & Ames, 2002). Em células de adenocarcinoma colorretal (Caco-2), a deficiência de zinco demonstrou causar ruptura de complexos juncionais intercelulares e causar desorganização do citoesqueleto, por alterações em ZO-1, ocludina, β -catenina, E-caderina e β -tubulina (Finamore *et al.*, 2008).

Assim como nas doenças hepáticas crônicas, há justaposição das regiões de maior incidência e mortalidade pelo CHC sobre aquelas de consumo inadequado de zinco e maior risco de deficiência desse micronutriente (GLOBOCAN, 2012; Wessels & Brown, 2012). Além disso, também é observada redução nos níveis de zinco séricos e teciduais em pacientes acometidos pelo CHC quando comparados a pacientes saudáveis (Gumulec *et al.*, 2014). Experimentalmente, estudos *in vitro* com células de CHC (HepG2) demonstraram que a deficiência de zinco reduz a atividade de p53, reduzindo a expressão

do gene da proteína p21 (Reaves *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2007). *In vivo*, apesar de observar que a deficiência promove lesão hepática induzida pelo álcool, um fator de risco importante para o desenvolvimento de doença hepática crônica e CHC, não há estudos que avaliem os efeitos da deficiência de zinco na hepatocarcinogênese (Zhong *et al.*, 2013). Portanto, a relação do CHC e da deficiência de zinco, apesar de clinicamente estabelecida, ainda segue negligenciada (Costello & Franklin, 2014).

No contexto do câncer, de uma maneira geral, pela diversidade funcional do zinco, a deficiência desse micronutriente pode afetar diversas vias celulares, que podem contribuir para que as células adquiram características como instabilidade genômica e mutação, proliferação celular contínua, evasão a sinais supressores do crescimento, resistência a apoptose e inflamação, consideradas “*hallmarks*” do câncer (Figura 15) (Hanahan & Weinberg, 2011). Tais características podem contribuir para o processo de patogênese de diferentes tipos de neoplasias malignas, incluindo o CHC.

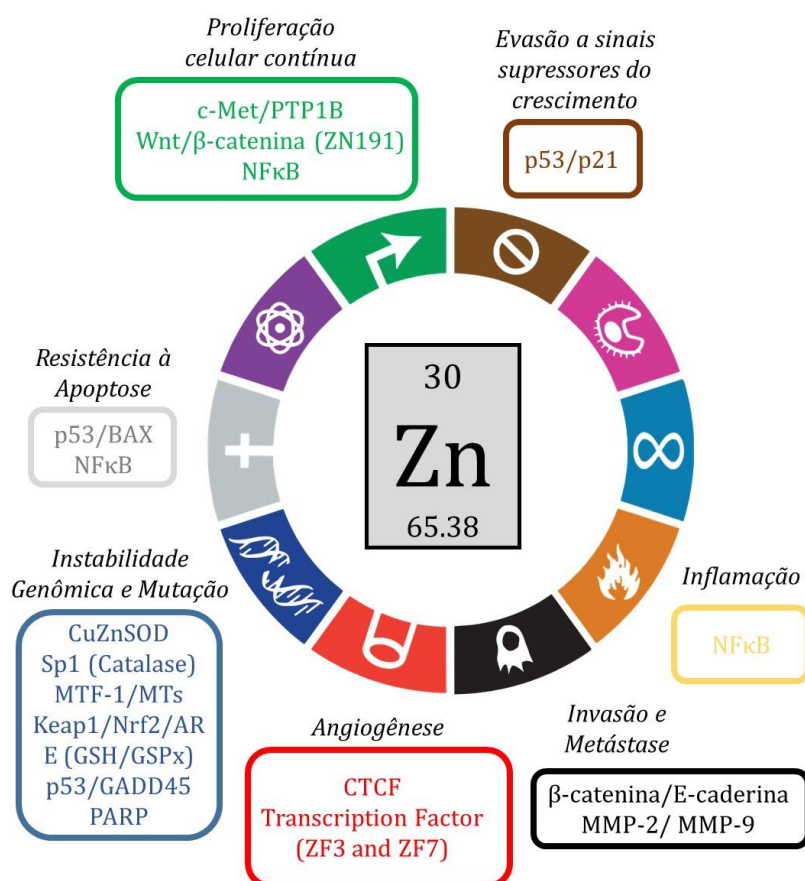


Figura 15. O zinco, suas múltiplas funções e o possível papel nos “*hallmarks*” do câncer. Referência: Reaves *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2007; Fong *et al.*, 2006; Alder *et al.*, 2012; Taccioli *et al.*, 2012; Hanahan & Weinberg, 2011.

A partir de 2002, como resultado da estimativa da OMS quanto à importância da deficiência de zinco a nível mundial, regimes de readequação de consumo, suplementação e de fortificação de alimentos foram amplamente aplicados para reduzir os efeitos da deficiência, principalmente sobre o desenvolvimento de doenças infecciosas (Yakoob *et al.*, 2011). Os regimes de suplementação de zinco utilizam diversos sais de zinco e variam globalmente em relação a dosagem e frequência (Brown *et al.*, 2004). No entanto, a escolha do regime em si deve levar em consideração fatores como a solubilidade do sal na água, solubilidade intragástrica, sabor, custo, efeitos colaterais e segurança (Brown *et al.*, 2004). Dentre os sais, os mais comumente aplicados são o acetato, aminoato, ascorbato, citrato, gluconato, histidinato, óxido, o picolinato e o sulfato de zinco (Brown *et al.*, 2004). O acetato, o gluconato e o sulfato de zinco merecem destaque pois são compostos hidrossolúveis e facilitam a absorção intestinal (Brown *et al.*, 2004). De fato, um estudo de meta-análise recente revelou que diferentes regimes de suplementação de zinco, quando aplicados em um período mínimo de três meses em países considerados “em desenvolvimento”, reduziram 15% da mortalidade causada pela pneumonia e 13% da mortalidade causada por doenças diarreicas (Yakoob *et al.*, 2011).

No contexto de doença hepática, diferentes regimes de suplementação já foram aplicados. A suplementação com gluconato de zinco (50 mg/dia, 5 vezes por semana por 24 semanas) demonstrou aumentar a eficácia de terapias antivirais contra a infecção crônica com o VHC (Ko *et al.*, 2005). Além disso, a suplementação com histidinato de zinco (33 mg/dia, 7 vezes por semana por ~8 anos) parece atenuar o quadro clínico e reduzir o risco de desenvolvimento de CHC em pacientes com infecção crônica pelo VHC (Matsumura *et al.*, 2012). Assim, a suplementação vem sendo considerada como terapia adjunta para o tratamento/prevenção de doenças hepáticas crônicas (Grüingreiff & Reinhold, 2010).

Já em relação ao câncer, estudos *in vitro* demonstraram que a suplementação protege células CHC (HepG2) do dano oxidativo causado por um agente genotóxico, por aumentar a expressão das MT 1 e 2 (Zheng *et al.*, 2013). Além disso, a suplementação demonstrou aumentar a ação apoptótica da droga quimioterápica adriamicina em células de câncer de mama (MCF7) por restaurar a função de p53 (Puca *et al.*, 2009). Em células de adenocarcinoma colorretal (Caco-2), opostamente à deficiência, a suplementação parece alterar a composição e aumentar a seletividade das junções oclusivas (Wang *et al.*, 2013). *In vivo*, estudos em roedores demonstraram que a suplementação atenua o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas malignas em modelos

quimicamente induzidos de carcinogênese de estômago, de próstata, de colo e oral (Dani *et al.*, 2007; Banudevi *et al.*, 2011a,b; Fong *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011). Além disso, a suplementação de zinco, quando aliada à adriamicina, também atenua o desenvolvimento de tumores mamários em um modelo murino transgênico de hiperexpressão de *HER2/neu* (Magalit *et al.*, 2012). O principal mecanismo de ação do zinco também está relacionado ao aumento da apoptose por restauração da atividade de p53, corroborando com os achados *in vitro* de Puca e colaboradores (2009) (Magalit *et al.*, 2012).

Devido aos achados recentes e pela diversidade de funções desempenhada por esse metal, autores têm considerado a aplicação da suplementação de zinco para a prevenção ou tratamento adjunto de diversas neoplasias em seres humanos (Dhawan & Chadha, 2010). No entanto, os mecanismos moleculares, genéticos e epigenéticos relacionados à suplementação desse metal ainda devem ser elucidados (Dhawan & Chadha, 2010). Em relação ao CHC, apesar de observar que a suplementação atenua o desenvolvimento de lesão hepática induzida pelo álcool em murinos, por aumentar a atividade das enzimas ADH e glutatona redutase, não há estudos que avaliem os efeitos da suplementação desse micronutriente em modelos de hepatocarcinogênese (Zhou *et al.*, 2005).

3. Referências

Aggett PJ, Aspects of neonatal metabolism of trace metals. *Acta Paediatr Suppl.* 402:75–82, 1994.

Aguilar F, Harris CC, Sun T, Hollstein M, Cerutti P. Geographic variation of p53 mutational profile in nonmalignant human liver. *Science (New York, NY)*. 1994;264(5163):1317–9.

Aguilar F, Hussain SP, Cerutti P. Aflatoxin B1 induces the transversion of G-->T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 15;90(18):8586-90.

Alder H, Taccioli C, Chen H, Jiang Y, Smalley KJ, Fadda P, et al. Dysregulation of miR-31 and miR-21 induced by zinc deficiency promotes esophageal cancer. *Carcinogenesis*. 2012;33(9):1736–44.

Alloway BJ. Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. *Environ Geochem Health* [Internet]. 2009;31(5):537–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19291414>

American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2015*. Atlanta: American Cancer Society; 2015.

Ananthakrishnan A, Gogineni V, Saeian K. Epidemiology of primary and secondary liver cancers. *Seminars in interventional radiology* [Internet]. 2006;23(1):47–63. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3036307&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A. Zinc through the three domains of life. *Journal of Proteome Research*. 2006;5(11):3173–8.

Apte U, Zeng G, Thompson MD, Muller P, Micsenyi A, Ciepely B, et al. beta-Catenin is critical for early postnatal liver growth. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* [Internet]. 2007;292(6):G1578–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17332475>

Arzumanyan A, Reis HMGP V., Feitelson M a. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Cancer* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013;13(2):123–35. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc3449>

Aydemir TB, Sitren HS, Cousins RJ. The zinc transporter Zip14 influences c-Met phosphorylation and hepatocyte proliferation during liver regeneration in mice. *Gastroenterology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;142(7):1536–46.e5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3635537&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Babinet C, Farza H, Morello D, Badkey, Pourcel C. Specific expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in transgenic mice. *Science*. 1985;230(4730):1160–3.

Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: An emerging menace. *Journal of Hepatology*. 2012;56(6):1384–91.

Bagnyukova T V, Tryndyak VP, Montgomery B, Churchwell MI, Karpf AR, James SR, et al. Genetic and epigenetic changes in rat preneoplastic liver tissue induced by 2-acetylaminofluorene. *Carcinogenesis* [Internet]. 2008;29(3):638–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18204080>

Bakiri L, Wagner EF. Mouse models for liver cancer. *Molecular Oncology* [Internet]. Elsevier B.V; 2013;7(2):206–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2013.01.005>

Banudevi S, Elumalai P, Arunkumar R, Senthilkumar K, Gunadharini DN, Sharmila G, et al. Chemopreventive effects of zinc on prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea and testosterone in adult male Sprague-Dawley rats. *Journal of cancer research and clinical oncology* [Internet]. 2011;137(4):677–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20552224> (a)

Banudevi S1, Elumalai P, Sharmila G, Arunkumar R, Senthilkumar K, Arunakaran J. Protective effect of zinc on N-methyl-N-nitrosourea and testosterone-induced prostatic intraepithelial neoplasia in the dorsolateral prostate of Sprague Dawley rats. *Exp Biol Med* (Maywood). 2011;236(9):1012–21.(b)

- Bao B, Prasad AS, Beck FWJ, Sarkar FH. Zinc up-regulates NF-kappaB activation via phosphorylation of IkappaB in HUT-78 (Th0) cells. *FEBS letters* [Internet]. 2007;581(23):4507–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17765898>
- Befeler AS, di Bisceglie AM. Hepatocellular carcinoma: Diagnosis and treatment. *Gastroenterology* [Internet]. 2002;122(6):1609–19. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508502130071>
- Bomar MG, Pai M-T, Tzeng S-R, Li SS-C, Zhou P. Structure of the ubiquitin-binding zinc finger domain of human DNA Y-polymerase η . *EMBO reports* [Internet]. 2007;8(3):247–51. Available from: <http://embor.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.embor.7400901>
- Brandt EG, Hellgren M, Brinck T, Bergman T, Edholm O. Molecular dynamics study of zinc binding to cysteines in a peptide mimic of the alcohol dehydrogenase structural zinc site. *Phys Chem Chem Phys* [Internet]. 2009;11(6):975–83. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B815482A>
- Bravi F, Bosetti C, Tavani A, Gallus S, La Vecchia C. Coffee reduces risk for hepatocellular carcinoma: an updated meta-analysis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* [Internet]. Elsevier, Inc; 2013;11(11):1413–21.e1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23660416>
- Bressac B, Kew M, Wand J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* [Internet]. 1991;350: 429-31.
- Brown KH, Rivera J a, Bhutta Z, Gibson RS, King JC, Lönnerdal B, et al. International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) technical document #1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food and nutrition bulletin*. 2004;25:S94–203.
- Callén E, Surrallés J. Telomere dysfunction in genome instability syndromes. *Mutation research* [Internet]. 2004;567(1):85–104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15341904>
- Carmichael PL, Hewer a, Osborne MR, Strain a J, Phillips DH. Detection of bulky DNA lesions in the liver of patients with Wilson's disease and primary haemochromatosis. *Mutation research* [Internet]. 1995;326(2):235–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7529889>
- Chang CY, Hernandez-prera JC, Roayaie S, Schwartz M, Thung SN, Miller R, et al. Changing epidemiology of hepatocellular adenoma in the United States: review of the literature. *Int J Hepatol* [Internet]. 2013;2013:604860. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23509632>
- Chang M-H, You S-L, Chen C-J, Liu C-J, Lee C-M, Lin S-M, et al. Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study. *Journal of the National Cancer Institute* [Internet]. 2009;101(19):1348–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19759364>

Chen L, Zeng Y, Yang H, Lee TD, French SW, Corrales FJ, et al. Impaired liver regeneration in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(7):914–6.

Cho LY, Yang JJ, Ko K-P, Park B, Shin A, Lim MK, et al. Coinfection of hepatitis B and C viruses and risk of hepatocellular carcinoma: Systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer* [Internet]. 2011;128(1):176–84. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.25321>

Christudoss P, Selvakumar R, Pulimood AB, Fleming JJ, Mathew G. Tissue zinc levels in precancerous tissue in the gastrointestinal tract of azoxymethane (AOM)-treated rats. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie* [Internet]. 2008;59(5):313–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18032001>

Christudoss P, Selvakumar R, Pulimood AB, Fleming JJ, Mathew G. Zinc and zinc related enzymes in precancerous and cancerous tissue in the colon of dimethyl hydrazine treated rats. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* [Internet]. 2012;13(2):487–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22524812>

Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* [Internet]. 2006;127(3):469–80. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=3D2-s2.0-33746808398&part=nerID=3D40&md5=3Da91eb8c26afe665b40a55042df2d97fa>

Cohen SB, Graham ME, Lovreacs GO, Bache N, Robinson PJ, Reddel RR. Protein Composition of Catalytically Active Human Telomerase from Immortal Cells. *Science*. 2007;315(5820):1850–3.

Coleman WB. Mechanisms of human hepatocarcinogenesis. *Curr Mol Med*. 2003;3(6):573–88.

Cooksey RC, Jouihan H a, Ajioka RS, Hazel MW, Jones DL, Kushner JP, et al. Oxidative stress, beta-cell apoptosis, and decreased insulin secretory capacity in mouse models of hemochromatosis. *Endocrinology* [Internet]. 2004;145(11):5305–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15308612>

Costello LC, Franklin RB. The status of zinc in the development of hepatocellular cancer: An important, but neglected, clinically established relationship. *Cancer Biology and Therapy*. 2014;15(4):353–60.

Dani V, Goel A, Vaiphei K, Dhawan DK. Chemopreventive potential of zinc in experimentally induced colon carcinogenesis. *Toxicol Lett*. 2007;171(1-2):10–8.

Dardenne M, Savino W, Berrih S, Bach JF. A zinc-dependent epitope on the molecule of thymulin, a thymic hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1985;82(20):7035–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2413455

de La Coste a, Romagnolo B, Billuart P, Renard C a, Buendia M a, Soubrane O, et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 1998;95(15):8847–51. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=21165&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), Schweizerische Gesellschaft für Ernährung (SGE), Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, Bonn, 2ª edição, 2015.

Dhawan DK, Chadha VD. Zinc: a promising agent in dietary chemoprevention of cancer. *Indian J Med Res.* 2010 Dec;132:676-82.

Dieck HT, Doring F, Roth HP, Daniel H. Changes in rat hepatic gene expression in response to zinc deficiency as assessed by DNA arrays. *Journal of Nutrition.* 2003;133(January):1004–10.

Dilger K, Metzler J, Bode JC, Klotz U. CYP2E1 activity in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol.* 1997;27(6):1009-14. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8278\(97\)80144-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8278(97)80144-4)

Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A. Alcohol and Hepatocellular Carcinoma: The Effect of Lifetime Intake and Hepatitis Virus Infections in Men and Women. *American Journal of Epidemiology.* 2002;155:323–31.

Doyle MBM, Vachharajani N, Maynard E, Shenoy S, Anderson C, Wellen JR, et al. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: Long-Term Results Suggest Excellent Outcomes. *Journal of the American College of Surgeons* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;215(1):19–28. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1072751512002463>

Dufner-Beattie J, Kuo YM, Gitschier J, Andrews GK. The adaptive response to dietary zinc in mice involves the differential cellular localization and zinc regulation of the zinc transporters ZIP4 and ZIP5. *Journal of Biological Chemistry.* 2004;279(47):49082–90.

Dufner-Beattie J, Wang F, Kuo Y-M, Gitschier J, Eide D, Andrews GK. The acrodermatitis enteropathica gene ZIP4 encodes a tissue-specific, zinc-regulated zinc transporter in mice. *The Journal of biological chemistry* [Internet]. 2003;278(35):33474–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12801924>

Dupont I, Lucas D, Clot P, Ménez C, Albano E. Cytochrome P450E1 inducibility and hydroxyethyl radical formation among alcoholics. *Journal of Hepatology* [Internet]. 1998;28(4):564–71. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827898802791>

El-Serag HB. Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;142(6):1264–73.e1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.061> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001650851200220X>

Emerson RO, Thomas JH. Adaptive evolution in zinc finger transcription factors. *PLoS genetics* [Internet]. 2009;5(1):e1000325. Available from: <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1000325>

Environmental Health Criteria: ZINC, Organização Mundial da Saúde (OMS), 2001.

Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer* [Internet]. 2010;127(12):2893–917. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.25516>

Finamore A, Massimi M, Conti Devirgiliis L, Mengheri E. Zinc deficiency induces membrane barrier damage and increases neutrophil transmigration in Caco-2 cells. *The Journal of nutrition* [Internet]. 2008;138(9):1664–70. Available from: <http://jn.nutrition.org/content/138/9/1664.full.pdf+html>

Fong LYY, Jiang Y, Farber JL. Zinc deficiency potentiates induction and progression of lingual and esophageal tumors in p53-deficient mice. *Carcinogenesis* [Internet]. 2006;27(7):1489–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16543248>

Fong LYY, Jiang Y, Rawahneh ML, Smalley KJ, Croce CM, Farber JL, et al. Zinc supplementation suppresses 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis. *Carcinogenesis* [Internet]. 2011;32(4):554–60. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3066417&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Food and Nutrition Board, Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, The National Academic Press, Washington, DC, 2001.

Foote JW, Delves HT. Albumin bound and alpha 2-macroglobulin bound zinc concentrations in the sera of healthy adults. *Journal of clinical pathology*. 1984;37(9):1050–4.

Forrester LM, Nealt GE, Judaht DJ, Glancey MJ, Wolf CR. Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B1. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 1990;87:8306–10.

Foster M, Chu A, Petocz P, Samman S. Effect of vegetarian diets on zinc status: a systematic review and meta-analysis of studies in humans. *J Sci Food Agric*.93(10):2362-71, 2015.

Franco E. Hepatitis B: Epidemiology and prevention in developing countries. *World Journal of Hepatology* [Internet]. 2012;4(3):74. Available from: <http://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v4/i3/74.htm>

Friedman SC. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7(8):425-36.

Gaetke LM, McClain CJ, Talwalkar RT, Shedlofsky SI. Effects of endotoxin on zinc metabolism in human volunteers. *The American journal of physiology*. 1997;272:E952–6.

Gallaher DD, Johnson PE, Hunt JR, Lykken GI, Marchello MJ. Bioavailability in humans of zinc from beef: intrinsic vs extrinsic labels. *Am J Clin Nutr.* 1988;48(2):350-4.

Geiser J, De Lisle RC, Andrews GK. The Zinc Transporter Zip5 (Slc39a5) Regulates Intestinal Zinc Excretion and Protects the Pancreas against Zinc Toxicity. *PLoS ONE* [Internet]. 2013;8(11):e82149. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0082149>

Ghebranious N, Sell S. The mouse equivalent of the human p53ser249 mutation p53ser246 enhances aflatoxin hepatocarcinogenesis in hepatitis B surface antigen transgenic and p53 heterozygous null mice. *Hepatology (Baltimore, Md)* [Internet]. 1998;27(4):967-73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9537435>

GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 8/October/2015.

Goldfarb S, Pugh TD, Koen H, He Y. Preneoplastic and neoplastic progression during hepatocarcinogenesis in mice injected with diethylnitrosamine in infancy. *Environmental health perspectives* [Internet]. 1983;50:149-61. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1569251&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Greten TF, Papendorf F, Bleck JS, Kirchhoff T, Wohlberedt T, Kubicka S, et al. Survival rate in patients with hepatocellular carcinoma: a retrospective analysis of 389 patients. *British journal of cancer* [Internet]. 2005;92(10):1862-8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2361778&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Grüngreiff K, Reinhold D. Zinc: a complementary factor in the treatment of chronic hepatitis C. *Mol Med Report.* 2010;3(3):371-375.

Guia alimentar para a população brasileira / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília : Ministério da Saúde, 2ª edição, 2014.

Gumulec J, Masarik M, Adam V, Eckschlager T, Provaznik I, Kizek R. Serum and Tissue Zinc in Epithelial Malignancies: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* [Internet]. 2014;9(6):e99790. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0099790>

Gursoy-Yuzugullu O, Yuzugullu H, Yilmaz M, Ozturk M. Aflatoxin genotoxicity is associated with a defective DNA damage response bypassing p53 activation. *Liver Int.* 2011 Apr;31(4):561-71

Hacisalihoglu G, Ozturk L, Cakmak I, Welch RM, Kochian L. Genotypic variation in common bean in response to zinc deficiency in calcareous soil. *Plant and Soil.* 2004;259:71-83.

Halsted JA, Prasad, AS. Syndrome of Iron Deficiency Anemia, Hepatosplenomegaly, Hypogonadism, Dwarfism and Geophagia. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 1961; 72: 130-149.

Hanahan D, Weinberg R a. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;144(5):646–74. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867411001279/fulltext>

Hanas JS, Hazuda DJ, Bogenhagen DF, Wu FYH, Wu CW. Xenopus Transcription Factor-a Requires Zinc for Specific Binding to the 5s-Rna Gene. Federation Proceedings [Internet]. 1983;42(7):1881. Available from: <Go to ISI>://A1983QM89400733

Harada N, Oshima H, Katoh M, Tamai Y, Oshima M, Taketo MM. Hepatocarcinogenesis in mice with beta-catenin and Ha-ras gene mutations. Cancer research. 2004;64(1):48–54.

Hedler L, Marquardt P. Occurrence of diethylnitrosamine in some samples of food. Food Cosmet Toxicol. 1968;6(3):341-8.

Heindryckx F, Colle I, Van Vlierberghe H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. International journal of experimental pathology [Internet]. 2009 Aug [cited 2014 Apr 7];90(4):367–86. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2741148&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. British Journal of Cancer [Internet]. 2007;96(7):1020–4. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.bjc.6603671>

Ho E, Ames BN. Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFkappa B, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002;99(26):16770–5.

Ho E, Courtmanche C, Ames BN. Zinc deficiency induces oxidative DNA damage and increases p53 expression in human lung fibroblasts. J Nutr 2003;133(8):2543-8.

Holme J a., Trygg B, Soderlund E. Species differences in the metabolism of 2-acetylaminofluorene by hepatocytes in primary monolayer culture. Cancer Research. 1986;46(4):1627–32.

Houglum K, Ramm G a, Crawford DH, Witztum JL, Powell LW, Chojkier M. Excess iron induces hepatic oxidative stress and transforming growth factor beta1 in genetic hemochromatosis. Hepatology (Baltimore, Md) [Internet]. 1997;26(3):605–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9303489>

Hsia CY, Huo TI, Chiang SY, Lu MF, Sun CL, Wu JC, Lee PC, Chi CW, Lui WY, Lee SD. Evaluation of interleukin-6, interleukin-10 and human hepatocyte growth factor as tumor markers for hepatocellular carcinoma. Eur J Surg Oncol. 2007;33(2):208-12.

Huang L, Tapaamorndech S. The SLC30 family of zinc transporters - a review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. Molecular aspects of medicine [Internet]. 2013;34(2-3):548–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23506888>

Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* [Internet]. 2007;26(15):2166–76. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.onc.1210279>

Ibs KH, Rink L. Zinc-altered immune function. *J Nutr*. 2003;133(5 Suppl 1):1452S-6S.

Instituto do Câncer (INCA), Estimativa 1999: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 1999.

Instituto do Câncer (INCA), Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

International Union of Pure and Applied Chemistry. IUPAC Periodic Table of the Elements. 2013;(May):2013. Available from: http://www.iupac.org/fileadmin/user_upload/news/IUPAC_Periodic_Table-1May13.pdf

Jablkowski M, Bocian a, Bialkowska J, Bartkowiak J. A comparative study of P53/MDM2 genes alterations and P53/MDM2 proteins immunoreactivity in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* [Internet]. 2005;24(1):117–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15943041>

Jeong J, Eide DJ. The SLC39 family of zinc transporters. *Molecular Aspects of Medicine* [Internet]. 2013;34(2-3):612–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.011>

Jenkins GJ, Parry JM. Restriction site mutation (RSM) analysis of 2-acetylaminofluorene (2-AAF)-induced mouse liver mutations and comparison with the measurement of in vivo micronucleus induction in the bone marrows of (2-AAF)-treated mice. *Teratog Carcinog Mutagen*. 2000;20(3):107–17.

Jin SK, Wanibuchi H, Morimura K, Gonzalez FJ, Fukushima S. Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in vivo. *Cancer Research*. 2007;67(23):11141–6.

Kambe T, Hashimoto A, Fujimoto S. Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences* [Internet]. 2014;71(17):3281–95. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-014-1617-0>

Kang YJ. Metallothionein redox cycle and function. *Exp Biol Med* (Maywood). 2006;231(9):1459-67.

Katyal S, Oliver JH, Peterson MS, Ferris J V, Carr BS, Baron RL. Extrahepatic metastases of hepatocellular carcinoma. *Radiology* [Internet]. 2000;216(3):698–703. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966697>

Kawase T, Kato S, Lieber CS. Lipid peroxidation and antioxidant defense systems in rat liver after chronic ethanol feeding. *Hepatology*. 1989;10(5):815-21.

Kayani M a., Parry JM. The in vitro genotoxicity of ethanol and acetaldehyde. *Toxicology in Vitro* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;24(1):56–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2009.09.003>

Kloubert V, Rink L. Zinc as a micronutrient and its preventive role of oxidative damage in cells. *Food Funct* [Internet]. Royal Society of Chemistry; 2015;(Table 1). Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5FO00630A>

Knutson H a., Benneke B, Deming D, Homeier D. A featureless transmission spectrum for the Neptune-mass exoplanet GJ 436b. *Nature* [Internet]. 2014;505(7481):66–8. Available from: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nature12887>

Ko WS, Guo CH, Hsu GS, Chiou YL, Yeh MS, Yaun SR. The effect of zinc supplementation on the treatment of chronic hepatitis C patients with interferon and ribavirin. *Clinical Biochemistry* [Internet]. 2005;38(7):614–20. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed7&NEWS=N&AN=2005309688>

Kojima H, Sakurai S, Uemura M, Fukui H, Morimoto H, Tamagawa Y. Mitochondrial abnormality and oxidative stress in nonalcoholic steatohepatitis. *Alcoholism, clinical and experimental research* [Internet]. 2007;31(1 Suppl):S61–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17331168>

Krebs NF. Overview of Zinc Absorption and Excretion in the Human Gastrointestinal Tract. *The Journal of Nutrition* [Internet]. 2000;130(5):1374S – 1377S. Available from: <http://jn.nutrition.org/content/130/5/1374S.abstract>

Kreidberg L, Bean JL, Désert J-M, Benneke B, Deming D, Stevenson KB, et al. Clouds in the atmosphere of the super-Earth exoplanet GJ 1214b. *Nature* [Internet]. 2014;505(7481):69–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24380954>

Kremsdorf D, Soussan P, Paterlini-Brechot P, Brechot C. Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: paradigms for viral-related human carcinogenesis. *Oncogene* [Internet]. 2006;25(27):3823–33. Available from: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/sj.onc.1209559>

Lam C-M, Chan OO, Ho P, Ng IO-L, Lo CM, Liu CL, et al. Different presentation of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma in a cohort of 1863 young and old patients - implications for screening. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2004;19(7):771–7.

Lee J-S, Chu I-S, Mikaelyan A, Calvisi DF, Heo J, Reddy JK, et al. Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer. *Nature genetics*. 2004;36(12):1306–11.

- Lee SJ, Yum YN, Kim SC, Kim Y, Lim J, Lee WJ, et al. Distinguishing between genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens by gene expression profiling and bioinformatic pathway analysis. *Scientific reports* [Internet]. 2013;3:2783. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24089152>
- Lerat H, Honda M, Beard MR, Loesch K, Sun J, Yang Y, et al. Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology*. 2002;122:352–65.
- Li J, Lau G, Chen L, Yuan Y-F, Huang J, Luk JM, et al. Interleukin 23 Promotes Hepatocellular Carcinoma Metastasis via NF-Kappa B Induced Matrix Metalloproteinase 9 Expression. *PLoS ONE* [Internet]. 2012;7(9):e46264. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0046264>
- Li J, Lau GK-K, Chen L, Dong S, Lan H-Y, Huang X-R, et al. Interleukin 17A Promotes Hepatocellular Carcinoma Metastasis via NF-kB Induced Matrix Metalloproteinases 2 and 9 Expression. *PLoS ONE* [Internet]. 2011;6(7):e21816. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0021816> (a)
- Li Y, Tang Z-Y, Hou J-X. Hepatocellular carcinoma: insight from animal models. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;9(1):32–43. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrgastro.2011.196> (b)
- Li Y, Tang ZY, Ye SL, Liu YK, Chen J, Xue Q, et al. Establishment of cell clones with different metastatic potential from the metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2001;7(5):630–6.
- Li Y, Tian B, Yang J, Zhao L, Wu X, Ye S-L, et al. Stepwise metastatic human hepatocellular carcinoma cell model system with multiple metastatic potentials established through consecutive in vivo selection and studies on metastatic characteristics. *Journal of cancer research and clinical oncology* [Internet]. 2004;130(8):460–8. Available from: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00432-004-0564-9/fulltext.html>
- Libbrecht L, Desmet V, Roskams T. Preneoplastic lesions in human hepatocarcinogenesis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2005;25(1):16–27.
- Lin SM, Yu ML, Lee CM, Chien RN, Sheen IS, Chu CM, et al. Interferon therapy in HBeAg positive chronic hepatitis reduces progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 2007;46(1):45–52.
- Lindblad D, Blomenkamp K, Teckman J. Alpha-1-antitrypsin mutant Z protein content in individual hepatocytes correlates with cell death in a mouse model. *Hepatology (Baltimore, Md)* [Internet]. 2007;46(4):1228–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17886264>
- Liu G, Jiang S, Wang C, Jiang W, Liu Z, Liu C, et al. Zinc finger transcription factor 191, directly binding to β -catenin promoter, promotes cell proliferation of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2012;55(6):1830–9.

Liu M, Jiang L, Guan X-Y. The genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma: a recent update. *Protein & cell* [Internet]. 2014;5(9):673–91. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4145080&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Liu MJ, Bao S, Gálvez-Peralta M, Pyle CJ, Rudawsky AC, Pavlovicz RE, et al. ZIP8 Regulates Host Defense through Zinc-Mediated Inhibition of NF- κ B. *Cell Reports*. 2013;3(2):386–400.

Liu P, Kimmoun E, Legrand A, Sauvanet A, Degott C, Lardeux B, et al. Activation of NF-kappa B, AP-1 and STAT transcription factors is a frequent and early event in human hepatocellular carcinomas. *Journal of hepatology*. 2002;37(1):63–71.

Liu Y, Wu F. Global Burden of Aflatoxin-Induced Hepatocellular Carcinoma: A Risk Assessment. *Environmental Health Perspectives* [Internet]. 2010;118(6):818–24. Available from: <http://ehp.niehs.nih.gov/0901388>

Liuzzi J, Blanchard R, Cousins R. Regulation of Zinc Transporter 1, 2, and 4 mRNA Expression by Dietary Zinc in Rats 1. *Journal of Nutrition* [Internet]. 2000;81(September 2000):74–81. Available from: <http://jn.nutrition.org/cgi/content/abstract/131/1/46>

Liuzzi JP, Lichten L a, Rivera S, Blanchard RK, Aydemir TB, Knutson MD, et al. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2005;102(19):6843–8. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0502257102>

Loh SN. The missing zinc: p53 misfolding and cancer. *Metallomics : integrated biometal science*. 2010;2(7):442–9.

Lönnerdal B. Zinc and Health : Current Status and Future Directions Dietary Factors Influencing Zinc Absorption. *Journal of Nutrition*. 2000;1378–83.

Loomba R, Abraham M, Unalp a. Association between diabetes, family history of diabetes and risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis. *Hepatology* [Internet]. 2012;56(3):943–51. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.25772/full>

Lu SC, Huang ZZ, Yang H, Mato JM, Avila M a, Tsukamoto H. Changes in methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine homeostasis in alcoholic rat liver. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2000;279(1):G178–85.

Luedde T, Schwabe RF. NF- κ B in the liver—linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nature Publishing Group* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;8(2):108–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2010.213>

Luo Z, Li L, Ruan B. Impact of the implementation of a vaccination strategy on hepatitis B virus infections in China over a 20-year period. *International Journal of Infectious Diseases* [Internet]. International Society for Infectious Diseases; 2012;16(2):e82–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2011.10.009>

Macdonald RS. Zinc and Health : Current Status and Future Directions The Role of Zinc in Growth and Cell Proliferation J. Nutr. 130: 1500-8, 2000.

Mao X, Kim B-E, Wang F, Eide DJ, Petris MJ. A Histidine-rich Cluster Mediates the Ubiquitination and Degradation of the Human Zinc Transporter, hZIP4, and Protects against Zinc Cytotoxicity. The Journal of Biological Chemistry [Internet]. 2007;282(10):6992–7000. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M610552200>

Margalit O, Simon AJ, Yakubov E, Puca R, Yosepovich A, Avivi C, et al. Zinc supplementation augments in vivo antitumor effect of chemotherapy by restoring p53 function. International journal of cancer Journal international du cancer [Internet]. 2012;131(4):E562–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21932419>

Matsumura H, Nirei K, Nakamura H, Arakawa Y, Higuchi T, Hayashi J, Yamagami H, Matsuoka S, Ogawa M, Nakajima N, Tanaka N, Moriyama M. Zinc supplementation therapy improves the outcome of patients with chronic hepatitis C. J Clin Biochem Nutr. 2012;51(3):178-84.

McGivern DR, Lemon SM. Virus-specific mechanisms of carcinogenesis in hepatitis C virus associated liver cancer. Oncogene [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;30(17):1969–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2010.594>

McMahon M, Lamont DJ, Beattie K a, Hayes JD. Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [Internet]. 2010;107(44):18838–43. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2973898&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> \n<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20956331>

McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. Hepatology. 2009;49(5 Suppl):S45-55.

McMahon RJ, Cousins RJ. Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998;95(9):4841–6.

Méplan C, Richard MJ, Hainaut P. Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells. Oncogene. 2000;19(46):5227–36.

Messina DN, Glasscock J, Gish W, Lovett M. An ORFeome-based Analysis of Human Transcription Factor Genes and the Construction of a Microarray to Interrogate Their Expression. Genome Research. 2004;2041–7.

Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. Hepatology [Internet]. 2015;61(1):77–87. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.27259>

Micsenyi A, Tan X, Sneddon T, Luo J-H, Michalopoulos GK, Monga SPS. β -Catenin is temporally regulated during normal liver development. *Gastroenterology* [Internet]. 2004;126(4):1134–46. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508503021474>

Mohamed AE, Kew MC, Groeneveld HT. Alcohol consumption as a risk factor for hepatocellular carcinoma in urban southern African blacks. *Int J Cancer*. 1992 19;51(4):537-41.

Monga SPS. Role of Wnt/ β -catenin signaling in liver metabolism and cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [Internet]. 2011;43(7):1021–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272509002441>

Morgan MJ, Liu Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Research* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;21(1):103–15. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/cr.2010.178>

Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* [Internet]. 2004;127(5):S87–96. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508504015999>

Morris ER, Ellis R. Usefulness of the dietary phytic acid/zinc molar ratio as an index of zinc bioavailability to rats and humans. *Biological trace element research* [Internet]. 1989;19(1-2):107–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02925452>

Mufti AR, Burstein E, Csomos R a, Graf PCF, Wilkinson JC, Dick RD, et al. XIAP Is a copper binding protein deregulated in Wilson's disease and other copper toxicosis disorders. *Molecular cell* [Internet]. 2006;21(6):775–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16543147>

Murata M, Fukuhara K, Miyata N, Kawanishi S. Oxidative DNA damage by a metabolite of carcinogenic 1-nitropyrene. *Biochemical and biophysical research communications* [Internet]. 2002;280(1):48–52. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X00940956>

Narayan V a., Kriwacki RW, Caradonna JP. Structures of zinc finger domains from transcription factor Sp1. Insights into sequence-specific protein-DNA recognition. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(12):7801–9.

Narimatsu T, Tamori A, Koh N, Kubo S, Hirohashi K, Yano Y, et al. P16 Promoter Hypermethylation in Human Hepatocellular Carcinoma With or Without Hepatitis Virus Infection. *Intervirology* [Internet]. 2004;47(1):26–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15044833>

National Academy of Sciences (U.S.). Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*. Washington, DC: National Academy Press, 2001. National Research Council (U.S.). Washington, DC, 11-79.

Natsuizaka M, Omura T, Akaike T, Kuwata Y, Yamazaki K, Sato T, et al. Clinical features of hepatocellular carcinoma with extrahepatic metastases. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* [Internet]. 2005;20(11):1781–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1746.2005.03919.x>

Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* (New York, NY) [Internet]. 2007;317(5834):121–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17615358>

Nault JC, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Laurent C, et al. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nature Communications* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013;4(May):1–6. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms3218>

Neumann HG, Bitsch A, Klöhn PC. The dual role of 2-acetylaminofluorene in hepatocarcinogenesis: Specific targets for initiation and promotion. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1997;376(1-2):169–76.

Neuveut C, Wei Y, Buendia MA. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. *Journal of Hepatology* [Internet]. European Association for the Study of the Liver; 2010;52(4):594–604. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827809008186>

Ogawa K, Solt DB, Farber E. Phenotypic diversity as an early property of putative preneoplastic hepatocyte populations in liver carcinogenesis. *Cancer Research* [Internet]. 1980;40(3):725–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6110477>

Ogawa K. Molecular pathology of early stage chemically induced hepatocarcinogenesis. *Pathology international* [Internet]. 2009;59(9):605–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19712128>

Ogura T, Tong KI, Mio K, Maruyama Y, Kurokawa H, Sato C, et al. Keap1 is a forked-stem dimer structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 2010;107(7):2842–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20133743> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2840362&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

op den Winkel M, Nagel D, Sappl J, op den Winkel P, Lamerz R, Zech CJ, et al. Prognosis of Patients with Hepatocellular Carcinoma. Validation and Ranking of Established Staging-Systems in a Large Western HCC-Cohort. *PLoS ONE* [Internet]. 2012;7(10):e45066. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0045066>

Organização Mundial da Saúde (OMS). *World risk report 2002: Reducing Risks, promoting Healthy Life*, 2002. Available from: http://www.who.int/whr/2002/en/whr02_en.pdf

Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999;18(49):6853–66.

Park JY, Park WS, Nam SW, Kim SY, Lee SH, Yoo NJ, et al. Mutations of beta-catenin and AXIN 1 genes are a late event in human hepatocellular carcinogenesis. *Liver International* [Internet]. 2005;25(1):70–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1478-3231.2004.0995.x>

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [Internet]. 2005;55(2):74-108. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/canjclin.49.1.33>

Parzefall W, Freiler C, Lorenz O, Koudelka H, Riegler T, Nejabat M, et al. Superoxide deficiency attenuates promotion of hepatocarcinogenesis by cytotoxicity in NADPH oxidase knockout mice. *Archives of toxicology* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2015;1383–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25182417>

Pasquinelli C, Shoenberger JM, Chung J, Chang KM, Guidotti LG, Selby M, et al. Hepatitis C virus core and E2 protein expression in transgenic mice. *Hepatology (Baltimore, Md)* [Internet]. 1997;25(3):719–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9049225>

Petrucco S, Percudani R. Structural recognition of DNA by poly(ADP-ribose)polymerase-like zinc finger families. *FEBS Journal*. 2008;275(5):883–93.

Pietrangelo A. Hereditary Hemochromatosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Gastroenterology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;139(2):393–408.e2. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508510008723>

Pitot C, Dragan P. Facts the mechanisms of carcinogenesis. *The FASEB Journal*. 1991;(5):2280–6.

Pitot HC. Altered hepatic foci: their role in murine hepatocarcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* [Internet]. 1990;30(4):465–500. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2188576>

Pogribny IP, Muskhelishvili L, Tryndyak VP, Beland F a. The role of epigenetic events in genotoxic hepatocarcinogenesis induced by 2-acetylaminofluorene. *Mutation research* [Internet]. 2011;722(2):106–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20188851>

Prasad AS, Bao B, Beck FWJ, Sarkar FH. Zinc enhances the expression of interleukin-2 and interleukin-2 receptors in HUT-78 cells by way of NF-kappaB activation. *The Journal of laboratory and clinical medicine* [Internet]. 2002;140(4):272–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12389026>

Prasad AS, Miale AJ, Farid Z, Sandstead HH, Schulert AR. Zinc metabolism in patients with the symptoms of iron deficiency, anaemia, hepatosplenomegaly, dwarfism and hypogonadism. *J. Lab. Clin. Med.* 1963, 61, 537-549.

Prasad AS. Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. *The American journal of clinical nutrition*. 1991;53(2):403–12.

- Prasad AS. Zinc deficiency in humans: a neglected problem. *J Am Coll Nutr.* 1998;17(6):542-3.
- Prives C, Hall P. The p53 pathway. *Journal of Pathology* [Internet]. 1999;187(1):112–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10341712> \n<http://toxicology.usu.edu/endnote/P53-pathway.pdf>
- Puca R, Nardinocchi L, Bossi G, Sacchi A, Rechavi G, Givol D, et al. Restoring wtp53 activity in HIPK2 depleted MCF7 cells by modulating metallothionein and zinc. *Experimental cell research* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;315(1):67–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18996371>
- Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X. Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation. *Cell Metabolism* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;9(4):327–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2009.02.006>
- Qi Y, Chen X, Chan CY, Li D, Yuan C, Yu F, et al., 2008. Two-dimensional differential gel electrophoresis/analysis of diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma. *Int.J. Cancer.* 2008;122: 2682-8.
- Rajewsky MF, Dauber W, Frankenberg H. Liver carcinogenesis by diethylnitrosamine in the rat. *Science (New York, NY)* [Internet]. 1966;152(3718):83–5. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5910014 \n<http://www.sciencemag.org/content/152/3718/83.long>
- Ramm GA, Crawford DH, Powell LW, Walker NI, Fletcher LM, Halliday JW. Hepatic stellate cell activation in genetic haemochromatosis. Lobular distribution, effect of increasing hepatic iron and response to phlebotomy. *J Hepatol.* 1997;26(3):584-92.
- Razin S V., Borunova V V., Maksimenko OG, Kantidze OL. Cys2His2 zinc finger protein family: Classification, functions, and major members. *Biochemistry (Moscow).* 2012;77(3):217–26.
- Reaves SK, Fanzo JC, Arima K, Wu JYJ, Wang YR, Lei KY. Expression of the p53 Tumor Suppressor Gene Is Up-Regulated by Depletion of Intracellular Zinc in HepG2 Cells. *J Nutr* [Internet]. 2000;130(7):1688–94. Available from: <http://jn.nutrition.org/content/130/7/1688.long>
- Rebouissou S, Couchy G, Libbrecht L, Balabaud C, Imbeaud S, Auffray C, et al. The β -catenin pathway is activated in focal nodular hyperplasia but not in cirrhotic FNH-like nodules. *Journal of Hepatology* [Internet]. 2008;49(1):61–71. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016827808002249>
- Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2008;9(5):402–12.
- Rink L, Haase H. Zinc homeostasis and immunity. *Trends in immunology* [Internet]. 2007;28(1):1–4. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490606003279>

Rodier F, Kim S-H, Nijjar T, Yaswen P, Campisi J. Cancer and aging: the importance of telomeres in genome maintenance. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [Internet]. 2005;37(5):977–90. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272504003802>

Rolinson GN. Zinc Requirements of *Aspergillus niger*. *Nature*. 1951;168:210.

Rongrui L, Na H, Zongfang L, Fanpu J, Shiwen J. Epigenetic mechanism involved in the HBV/HCV-related hepatocellular carcinoma tumorigenesis. *Current pharmaceutical design* [Internet]. 2014;20(11):1715–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23888939>

Rosencrantz R, Schilsky M. Wilson disease: Pathogenesis and clinical considerations in diagnosis and treatment. *Seminars in Liver Disease* [Internet]. 2011;31(212):245–59. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emed10&AN=2011508856>

Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, French SW, Morimoto M, Nordmann R. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1997;25(2):351–5.

Rückgauer M, Klein J, Jd K-J. Reference Values for the Trace Elements Copper, Manganese, Selenium, and Zinc in the Serum / Plasma of Children, Adolescents, and Adults. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 1997;11(I):92–8.

Ruttkay-Nedecky B, Nejdil L, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Eckschlager T, et al. The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2013;14(3):6044–66. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/14/3/6044/>

Saha AR, Hadden EM, Hadden JW. Zinc induces thymulin secretion from human thymic epithelial cells in vitro and augments splenocyte and thymocyte responses in vivo. *Int J Immunopharmacol*. 1995;17(9):729–33.

Santos NP, Colaço A, da Costa RMG, Oliveira MM, Peixoto F, Oliveira PA. N-diethylnitrosamine mouse hepatotoxicity: Time-related effects on histology and oxidative stress. *Experimental and Toxicologic Pathology* [Internet]. 2014;66(9-10):429–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25097018> \n<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094029931400092X>

Sanyal a. J, Yoon SK, Lencioni R. The Etiology of Hepatocellular Carcinoma and Consequences for Treatment. *The Oncologist* [Internet]. 2010;15(Supplement 4):14–22. Available from: <http://theoncologist.alphamedpress.org/cgi/doi/10.1634/theoncologist.2010-S4-14>

Sawada N, Inoue M, Iwasaki M, Sasazuki S, Shimazu T, Yamaji T, et al. Consumption of n-3 fatty acids and fish reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;142(7):1468–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.018>

Saydam N, Adams TK, Steiner F, Schaffner W, Freedman JH. Regulation of Metallothionein Transcription by the Metal-responsive Transcription Factor MTF-1: Identification of signal transduction cascades that control metal-inducible transcription. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2002;277(23):20438–45. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M110631200>

Scorsone K a, Zhou Y-Z, Butel JS, Slagle BL. p53 mutations cluster at codon 249 in hepatitis B virus-positive hepatocellular carcinomas from China. *Cancer Res.* 1992;52:1635–8.

Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer* [Internet]. 2007;7(8):599–612. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc2191>

Selimovic D, El-Khattouti A, Ghozlan H, Haikel Y, Abdelkader O, Hassan M. Hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: An insight into molecular mechanisms and therapeutic strategies. *World Journal of Hepatology.* 2012;4(12):342–55.

Shibata T, Aburatani H. Exploration of liver cancer genomes. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;11(6):340–9. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrgastro.2014.6>

Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol.* 1994;10:405-55.

Silvestre J, Regenhardt RW, Herrlinger-Garcia KA, Cousins RJ, Langkamp-Henken B. BALB/c mice provide a unique model for the study of zinc deficiency in the absence of weight loss and stress. *FASEB Jour.* 2007;21:361.4.

Singh NP, Khan A. Acetaldehyde: genotoxicity and cytotoxicity in human lymphocytes. *Mutation research.* 1995;337:9–17.

Sommer AL, Lipman SB. Evidence on the indispensable nature of zinc and boron for higher green plants. *Plant Physiol.* (3):231–49, 1926.

Song Y, Leonard SW, Traber MG, Ho E. Zinc Deficiency Affects DNA Damage , Oxidative Stress , Antioxidant Defenses , and DNA Repair. *J Nutr.* 2009;139:1626–31.(a)

Song Y. et al. Zinc status affects DNA damage and oxidative stress in healthy adult men. *FASEB J* 2009; 23 (b)

Stahl S, Itrich C, Marx-Stoelting P, Köhle C, Altug-Teber O, Riess O, et al. Genotype-phenotype relationships in hepatocellular tumors from mice and man. *Hepatology* (Baltimore, Md) [Internet]. 2005;42(2):353–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15965925>

Stefanidou M, Maravelias C, Dona A., Spiliopoulou C. Zinc: A multipurpose trace element. *Archives of Toxicology.* 2006;80(1):1–9.

Stefanson AL, Bakovic M. Dietary regulation of Keap1/Nrf2/ARE pathway: focus on plant-derived compounds and trace minerals. *Nutrients* [Internet]. 2014;6(9):3777–801. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4179188&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Su Q, Bannasch P. Relevance of hepatic preneoplasia for human hepatocarcinogenesis. *Toxicologic pathology*. 2003;31(1):126–33.

Sun J, Liu J, Pan X, Quimby D, Zanesi N, Druck T, et al. Effect of zinc supplementation on N-nitrosomethylbenzylamine-induced forestomach tumor development and progression in tumor suppressor-deficient mouse strains. *Carcinogenesis*. 2011;32(3):351–8.

Sun Q, Li Q, Zhong W, Zhang J, Sun X, Tan X, et al. Dysregulation of hepatic zinc transporters in a mouse model of alcoholic liver disease. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* [Internet]. 2014;307(3):G313–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24924749>

Szczurek EI, Bjornsson CS, Taylor CG. Dietary zinc deficiency and repletion modulate metallothionein immunolocalization and concentration in small intestine and liver of rats. *The Journal of nutrition* [Internet]. 2001;131(8):2132–8. Available from: <http://jn.nutrition.org/content/131/8/2132.short> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11481407>

Taccioli C, Chen H, Jiang Y, Liu XP, Huang K, Smalley KJ, et al. Dietary zinc deficiency fuels esophageal cancer development by inducing a distinct inflammatory signature. *Oncogene*. 2012; 31(42):4550–8.

Tainer JA, Getzoff ED, Richardson JS, Richardson JC. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature*. 1983;306:284–7.

Takeda, Yoichi; Parthasarathy, Mudumba; Aoki, Wako; Ita, Yoshifusa; Nakada, Yoshikazu; Izumiura, Hideyuki; Noguchi, Kunio; Takada-Hidai, Masahide; Sato, Bun'ei; Tajitsu, Akito; Honda, Satoshi; Kawanomoto, Satoshi; Ando, Hiroyasu; Karoji H. Detection of Zinc in the Very Metal-Poor Post-AGB Star HR 4049. *Publications of the Astronomical Society of Japan*. 2002;54(5):765–73.

Tabela brasileira de composição de alimentos (TACO). NEPAUNICAMP, 2011. 4ª edição, 161 p.

Tan X, Behari J, Cieply B, Michalopoulos GK, Monga SPS. Conditional Deletion of β -Catenin Reveals Its Role in Liver Growth and Regeneration. *Gastroenterology* [Internet]. 2006;131(5):1561–72. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508506018026>

Tanaka S, Adachi E, Matsumata T, Mori R. Tumor progression in hepatocellular carcinoma may be mediated by p53 mutation. *Cancer Res*. 1993;53:2884–8.

Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, Dong X, Qian C, Murphy LM, et al. Mutational spectrum of β -catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene* [Internet]. 2002;21(31):4863–71. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.onc.1205591>

Tarocchi M, Polvani S, Marroncini G, Galli A. Molecular mechanism of hepatitis B virus-induced hepatocarcinogenesis. *World journal of gastroenterology : WJG* [Internet]. 2014;20(33):11630–40. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4155355&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Tate DJ Jr, Miceli MV, Newsome DA. Zinc induces catalase expression in cultured fetal human retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res*. 1997;16(10):1017-23.

Thiers RE, Vallee BL. Distribution of metals in subcellular fractions of rat liver. *J Biol Chem*. 1957;226:911–20.

Thirumoorthy N, Shyam Sunder a, Manisenthil Kumar K, Senthil Kumar M, Ganesh G, Chatterjee M. A review of Metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World journal of surgical oncology* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011;9(1):54. Available from: <http://www.wjso.com/content/9/1/54>

Todd WR, Elvehjem CA, Hart EB. ZINC IN THE NUTRITION OF THE RAT. *Am J Physiol*. 1934; 107:146-56.

Torbenson M, Lee J-H, Choti M, Gage W, Abraham SC, Montgomery E, et al. Hepatic adenomas: analysis of sex steroid receptor status and the Wnt signaling pathway. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* [Internet]. 2002;15(3):189–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11904335>

Trevisani F, D'Intino PE, Caraceni P, Pizzo M, Stefanini GF, Mazziotti a, et al. Etiologic factors and clinical presentation of hepatocellular carcinoma. Differences between cirrhotic and noncirrhotic Italian patients. *Cancer*. 1995;75(9):2220–32.

Trevisani F, Frigerio M, Santi V, Grignaschi A, Bernardi M. Hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: A reappraisal. *Digestive and Liver Disease* [Internet]. Editrice Gastroenterologica Italiana; 2010;42(5):341–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1590865809003703>

Turner PC, Sylla A, Gong YY, Diallo MS, Sutcliffe AE, Hall AJ, et al. Reduction in exposure to carcinogenic aflatoxins by postharvest intervention measures in west Africa : a community-based intervention study. *Lancet* 2005; 365: 1950–56.

Turnlund JR, King JC, Keyes WR, Gong B, Michel MC. A stable isotope study of zinc absorption in young men: effects of phytate and alpha-cellulose. *The American journal of clinical nutrition*. 1984;40(5):1071–7.

US Department of Agriculture; Agricultural Research Service. 2009–2010 What We Eat In America, NHANES Tables 1–40, 2010. Available online: http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12355000/pdf/0910/tables_1-40_2009-2010.pdf

van Egmond HP. Third joint FAO/WHO/UNEP international conference on mycotoxins. Rome: FAO, 1999. Internet: www.foa.org/es/esn/food/pdf/mycotoxins_report_en.pdf.

van Rensburg SJ. Epidemiologic and dietary evidence for a specific nutritional predisposition to esophageal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1981;67(2):243-51.

van Steveninck RMF, Babare A, Fernando DR, van Steveninck ME. The binding of zinc, but not cadmium, by phytic acid in roots of crop plants. *Plant and Soil.*1994; 167(1):157-64.

Verna L, Whysner J, Williams GM. 2-Acetylaminofluorene mechanistic data and risk assessment: DNA reactivity, enhanced cell proliferation and tumor initiation. *Pharmacology & therapeutics* [Internet]. 1996;71(1-2):83–105. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8910950> (b)

Verna L, Whysner J, Williams GM. N-Nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: Bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacology and Therapeutics.* 1996;71(1-2):57–81. (a)

Vesselinovitch SD, Koka M, Mihailovich N, Rao K V. Carcinogenicity of diethylnitrosamine in newborn, infant, and adult mice. *Journal of cancer research and clinical oncology* [Internet]. 1984;108(1):60–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6746718>

Vesselinovitch SD, Mihailovich N. Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse. *Cancer Research.* 1983;43(9):4253–9.

Vesselinovitch SD. Certain aspects of hepatocarcinogenesis in the infant mouse model. *Toxicol Pathol.* 1987;15(2):221–8.

Wagner D, Maser J, Lai B, Cai Z, Barry CE, Höner Zu Bentrup K, et al. Elemental analysis of Mycobacterium avium-, Mycobacterium tuberculosis-, and Mycobacterium smegmatis-containing phagosomes indicates pathogen-induced microenvironments within the host cell's endosomal system. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 2005;174(3):1491–500.

Wang F, Li Y, Cao Y, Li C. Zinc Might Prevent Heat-Induced Hepatic Injury by Activating the Nrf2-Antioxidant in Mice. *Biological trace element research* [Internet]. 2015;86–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25586622>

Wang K, Zhou B, Kuo YM, Zemansky J, Gitschier J. A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am J Hum Genet.* 2002;71(1):66-73.

Wang X, Valenzano MC, Mercado JM, Zurbach EP, Mullin JM. Zinc supplementation modifies tight junctions and alters barrier function of CACO-2 human intestinal epithelial layers. *Digestive Diseases and Sciences.* 2013;58(1):77–87.

Wang X, Zhou B. Dietary zinc absorption: A play of Zips and ZnTs in the gut. *IUBMB Life* [Internet]. 2010;62(3):176–82. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/iub.291>

Wang Y, Wimmer U, Lichtlen P, Inderbitzin D, Stieger B, Meier PJ, et al. Metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) is essential for embryonic liver development and heavy metal detoxification in the adult liver. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(10):1071–9.

Wapnir R a. Zinc deficiency, malnutrition and the gastrointestinal tract. *The Journal of nutrition*. 2000;130(5S Suppl):1388S – 92S.

Wastney ME, Aamodt RL, Rumble WF, Henkin RI. Kinetic analysis of zinc metabolism and its regulation in normal humans. *Am J Physiol*.. 251:398–408, 1986.

Wessells KR, Brown KH. Estimating the Global Prevalence of Zinc Deficiency: Results Based on Zinc Availability in National Food Supplies and the Prevalence of Stunting. *PLoS ONE* [Internet]. 2012;7(11):e50568. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0050568>

Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *Journal of Hepatology* [Internet]. European Association for the Study of the Liver; 2014;61(1):S58–68. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827814004814>

Williams RJP. Zinc in evolution. *Journal of Inorganic Biochemistry* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;111:104–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162013412000050>

Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human aflatoxin in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *American Society for Clinical Nutrition*. 2004;80(June 2015):1106–22.

Williams RJP. Zinc in evolution. *Journal of Inorganic Biochemistry* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;111:104–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162013412000050>

Wilson RH, Ph D, Deeds F, Ph D, Cox AJ. The Toxicity and Carcinogenic Activity of 2-Acetaminofluorene *Cancer Res*.1941;1:595-608.

Wong SHK, Zhao Y, Schoene NW, Han C-T, Shih RSM, Lei KY. Zinc deficiency depresses p21 gene expression: inhibition of cell cycle progression is independent of the decrease in p21 protein level in HepG2 cells. *American journal of physiology Cell physiology* [Internet]. 2007;292:C2175–84. Available from: <http://ajpcell.physiology.org/content/ajpcell/292/6/C2175.full.pdf>

Xia H, Ooi LLPJ, Hui KM. MiR-214 Targets β -Catenin Pathway to Suppress Invasion, Stem-Like Traits and Recurrence of Human Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE* [Internet]. 2012;7(9):e44206. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0044206>

Yakoob MY, Theodoratou E, Jabeen A, Imdad A, Eisele TP, Ferguson J, et al. Preventive zinc supplementation in developing countries: impact on mortality and morbidity due to diarrhea, pneumonia and malaria. *BMC Public Health* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011;11(Suppl 3):S23. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2458/11/S3/S23>

Yan M, Song Y, Wong CP, Hardin K, Ho E. Zinc deficiency alters DNA damage response genes in normal human prostate epithelial cells. *J Nutr* 2008;138 (4): 667-73.

Yang B, Guo M, Herman JG, Clark DP. Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *The American journal of pathology*. 2003;163(3):1101–7.

Yang JD, Kim WR, Coelho R, Mettler T a., Benson JT, Sanderson SO, et al. Cirrhosis Is Present in Most Patients With Hepatitis B and Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;9(1):64–70. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542356510008487>

Youssef W, McCullough AJ. Diabetes mellitus, obesity, and hepatic steatosis. *Semin Gastrointest Dis*. 2002;13(1):17-30.

Yu YY, Kirschke CP, Huang L. Immunohistochemical analysis of ZnT1, 4, 5, 6, and 7 in the mouse gastrointestinal tract. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* [Internet]. 2007;55(3):223–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17101726>

Zhang C-H, Xu G-L, Jia W-D, Li J-S, Ma J-L, Ge Y-S. Effects of interferon treatment on development and progression of hepatocellular carcinoma in patients with chronic virus infection: a meta-analysis of randomized controlled trials. *International journal of cancer Journal international du cancer* [Internet]. 2011;129(5):1254–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21710498>

Zhang W, Shu XO, Li H, Yang G, Cai H, Ji BT, et al. Vitamin intake and liver cancer risk: A report from two cohort studies in China. *Journal of the National Cancer Institute*. 2012;104(15):1173–81.

Zhao J, Han J, Jiang J, Shi S, Ma X, Liu X, et al. The downregulation of Wnt/beta-catenin signaling pathway is associated with zinc deficiency-induced proliferative deficit of C17.2 neural stem cells. *Brain research* [Internet]. Elsevier; 2015;1615:61–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2015.04.028>

Zhao N, Wang X, Zhang Y, Gu Q, Huang F, Zheng W, et al. Gestational zinc deficiency impairs humoral and cellular immune responses to hepatitis B vaccination in offspring mice. *PLoS one* [Internet]. 2013;8(9):e73461. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3775768&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Zheng J, Zhang Y, Xu W, Luo Y, Hao J, Shen XL, et al. Zinc protects HepG2 cells against the oxidative damage and DNA damage induced by ochratoxin A. *Toxicology and Applied Pharmacology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;268(2):123–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.021>

Zhong W, Zhao Y, Sun X, Song Z, McClain CJ, Zhou Z. Dietary zinc deficiency exaggerates ethanol-induced liver injury in mice: involvement of intrahepatic and extrahepatic factors. *PloS one* [Internet]. 2013;8(10):e76522. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3796541&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Zhou W-C. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology* [Internet]. 2014;20(23):7312. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i23/7312.htm>

Zhou Z, Wang L, Song Z, Saari JT, McClain CJ, Kang YJ. Zinc supplementation prevents alcoholic liver injury in mice through attenuation of oxidative stress. *Am J Pathol*. 2005;166(6):1681-90.

Zucman-Rossi J, Jeannot E, Van Nhieu JT, Scoazec J-Y, Guettier C, Rebouissou S, et al. Genotype–phenotype correlation in hepatocellular adenoma: New classification and relationship with HCC. *Hepatology* [Internet]. 2006;43(3):515–24. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.21068>

Zn

Zn

Capítulo II – Artigo Científico

Zn



Capítulo II – Artigo Científico***Original Article*****Zinc deficiency promotes early hepatocarcinogenesis while supplementation enhances hepatic antioxidant defense**

Guilherme Ribeiro Romualdo^a; Renata Leme Goto^b; Ana Angélica Henrique Fernandes^c,

Luis Fernando Barbisan^{b*}

^aUNESP – Univ. Estadual Paulista Botucatu Medical School, Department of Pathology, Botucatu, São Paulo State, Brazil.

^bUNESP – Univ. Estadual Paulista, Institute of Biosciences of Botucatu, Department of Morphology, Botucatu, São Paulo State, Brazil.

^cUNESP - Univ. Estadual Paulista, Institute of Biosciences of Botucatu, Department of Chemistry and Biochemistry, Botucatu, São Paulo State, Brazil.

*Corresponding author

Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rua Prof. Dr. Antonio Celso Wagner Zanin s/n, 18618-689, Botucatu, SP, Brazil.

Tel/Fax: +55 14 38800469.

E-mail address: barbisan@ibb.unesp.br (L.F. Barbisan).

Key Words: Zinc deficiency, zinc supplementation, preneoplasia, antioxidant, mouse hepatocarcinogenesis.

Abstract

Zinc is required for a wide range of enzymes and transcription factors involved in DNA repair, antioxidant defense and cell proliferation. Inadequate zinc intake could impair these functions, predisposing to the development of human diseases. This study evaluated whether dietary zinc deficiency or supplementation alter early chemically-induced mouse hepatocarcinogenesis. Male Balb/C mice received a single dose of diethylnitrosamine (DEN, 50 mg/Kg) at postnatal day (PND) 15 as an initiating agent for hepatocarcinogenesis. At PND 28, animals were allocated into three groups (n=13/group) and were fed AIN-93G diet containing different concentrations of zinc: adequate zinc (35 mg/Kg diet), zinc deficiency (3 mg/Kg diet) or zinc supplementation (180 mg/Kg diet). Also, 2-acetylaminofluorene (2-AAF, 0.02%) was incorporated in all experimental diets as a promoting agent for hepatocarcinogenesis. Mice were euthanized at 12 or 24 weeks after introducing the experimental diets. Blood and liver samples were collected to perform Comet Assay. Other liver fragments were sampled for histopathological, morphometrical and immunohistochemical analyses, western blotting and antioxidant profiling. Zinc deficiency decreased Nrf2 expression and reduced glutathione (GSH) levels and increased NF κ B, p53 expression and the number of preneoplastic altered hepatocyte foci (AHF) per cm² at week 12. In addition, zinc deficiency decreased GSH levels and increased 2-AAF-induced genotoxicity (peripheral blood and liver), cell proliferation into AHF and AHF size at week 24. In contrast, zinc supplementation increased GSH levels and Glutathione Peroxidase (GPx) activity and decreased 2-AAF-induced genotoxicity (blood) and β -catenin expression at week 12. Besides, zinc supplementation increased GSH levels and GPx, superoxide dismutase, and catalase activity at week 24. Our findings indicate that zinc deficiency promotes early chemically-induced mouse hepatocarcinogenesis while zinc supplementation enhances hepatic antioxidant defense.

1. Introduction

Hepatocellular Carcinoma (HCC) is the sixth most common cancer and the second cause of cancer-related deaths worldwide (GLOBOCAN 2012). The highest incidence and mortality rates due to this malignant neoplasm are found in Asia and Africa (GLOBOCAN, 2012). HCC development is considered a complex, multistep and multifactorial process, involving several risk factors, including chronic Hepatitis B and C virus infections, aflatoxin and chronic ethanol intake and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) (Sanyal et al. 2010).

Mouse models of hepatocarcinogenesis are widely applied in translational research due to morphological and molecular similarities to human HCC (Zucman-Rossi 2008; Thoolen et al. 2012). Particularly, chemically-induced models provide suitable tools to study several aspects of hepatocarcinogenesis, including risk factors, molecular pathogenesis, prevention and treatment (Bakiri and Wagner, 2013). Diethylnitrosamine (DEN) and 2-acetylaminofluorene (2-AAF) are classical genotoxic and mutagenic chemical agents commonly applied in initiation-promotion models of hepatocarcinogenesis (Park et al. 2011; Santos et al. 2014). Notably, the neonatal mouse model is usually established due to the intrinsic susceptibility of neonatal liver to chemical carcinogen exposure, particularly to DEN (Vesselinovitch et al. 1984, Vesselinovitch 1987). Besides, high cell proliferation rates in the liver of juvenile mice favor the clonal expansion of initiated hepatocytes, resulting in earlier occurrence of preneoplastic and neoplastic lesions when compared to chemically-induced adult mouse models of hepatocarcinogenesis (Vesselinovitch et al. 1984; Vesselinovitch 1987). In these short- or medium-term bioassays, altered hepatocellular foci (AHF) have been used as putative preneoplastic lesions (Pitot 1990). AHF can be easily identified in liver sections stained by hematoxylin & eosin, which enables the screening of potential causative or preventive

factors on early hepatocarcinogenesis, including dietary factors (Pitot 1990; Fukumasu et al. 2006; Palmeira et al. 2015).

Zinc, an important trace element, is required as a cofactor for approximately 10% of total proteins encoded by the human genome, including enzymes (>200) and transcription factors (>3000) related to basic cellular functions as proper antioxidant defense and immune response, DNA repair, cell proliferation and other (Andreini et al. 2006; Roohani et al. 2013). According to the US Food and Nutrition Board (2001), human Recommended Dietary Allowance (RDA) for zinc is 11 mg and 8 mg/day for adult men and women, respectively. Animal products, mainly sea food and red meat are the most important dietary sources of readily bioavailable zinc while plant products are considered poor ones (Ma and Betts 2000).

Globally, an estimated 17.3% of the human population is at risk of inadequate zinc intake and subsequent zinc deficiency, mainly in Sub-Saharan Africa and South Asia (Wessells and Brown 2012). Zinc deficiency, firstly documented in humans by Halsted and Prasad (1961), adversely affects the immune system, increases oxidative stress and DNA damage, predisposing to the development of chronic diseases (Ibs and Rink 2003; Song et al. 2009a,b). Experimentally, dietary zinc deficiency showed to induce and/or promote chemically-induced esophagus, tongue and colon rodent carcinogenesis (Fong et al. 2006; Alder et al. 2012; Taccioli et al. 2012; Christudoss et al., 2012). In addition, a recent meta-analysis revealed low zinc levels in serum and tumor tissue of patients with lung, head and neck, liver, stomach, prostate and thyroid malignant neoplasms (Gumulec et al., 2014). These studies indicate a possible underlying role of zinc deficiency on carcinogenesis process. In contrast, zinc supplementation, usually applied to reverse and/or prevent the adverse effects of zinc deficiency on human populations (Brooks et al. 2005; Yakoob et al. 2011), showed to inhibit or attenuate chemically-induced colon, forestomach, oral and prostate rodent carcinogenesis (Dani et al. 2007; Banudevi et al.

2011; Fong et al. 2011; Sun et al. 2011). Furthermore, zinc supplementation augmented the antitumor effect of chemotherapy on a transgenic mouse model of mammary carcinogenesis (Margalit et al. 2012). These studies also suggest a possible role of zinc supplementation on cancer prevention and treatment.

Despite the overlapping of zinc deficiency and high incidence and mortality for HCC in certain human populations, there is a lack of experimental studies on the modifying effects of zinc deficiency or supplementation on hepatocarcinogenesis process. Thus, this study evaluated whether dietary zinc deficiency or supplementation alter early chemically-induced mouse hepatocarcinogenesis.

2. Materials and Methods

2.1 Experimental Design

Pregnant Balb/C mice were obtained from Multidisciplinary Center for Biological Investigation on Laboratory Animal Science (CEMIB, UNICAMP, Campinas – SP, Brazil). According to the model described by Vesselinovitch and Mihailovich (1983), neonatal male mice received a single intraperitoneal (i.p.) injection of diethylnitrosamine [DEN, 50 mg/Kg body weight (b.wt.) in 0.9% saline, Sigma-Aldrich, USA] at postnatal day 15 (PND 15) (Figure 1), as an initiating agent of hepatocarcinogenesis (Klaunig et al. 1988, Santos et al. 2014). At PND 28, mice were randomly allocated into three groups (n=13 mice each). Animals were fed AIN-93G semipurified diet (Reeves et al. 1993) containing different concentrations of elemental zinc (Zn) by adding zinc sulphate salt: adequate zinc diet (GZnA, 35 mg/Kg diet), zinc deficiency (GZnD, 3 mg/Kg diet) or zinc supplementation (GZnS, 180 mg/Kg diet) (Figure 1). Also, 2-acetylaminofluorene (2-AAF, Sigma-Aldrich, USA) was incorporated at 0.02% in all experimental diets, as a promoting agent of hepatocarcinogenesis (Bitsch et al. 2000) (Figure 1). Food and

deionized water were provided *ad libitum*. Body weight, food and water consumption were recorded twice a week during the experimental period. Also, estimated zinc consumption was calculated for each group according to the food intake and zinc levels in each experimental diet.

Animals were euthanized by exsanguination under ketamine/xylazine anesthesia (100/16 mg/Kg b.wt. i.p.) at 12 (n=6 mice/group) or 24 weeks (n=7 mice/group) after introducing experimental diets (Figure 1). Peripheral blood samples were collected from the venous orbital plexus a day before euthanasia to perform Single Cell Gel Electrophoresis Assay (SCGE) for genotoxicity analysis. At necropsy, liver was removed, weighted, washed in saline solution (0.9% NaCl) and samples from all lobes were collected and processed for histopathological, morphometrical and immunohistochemical analyses. Additional liver samples were collected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C to further perform SCGE, western blot, antioxidant profiling and to determine zinc levels. Moreover, blood samples were collected by cardiac puncture and serum samples were stored at -20°C to further determine Alanine Aminotransferase (ALT) activity. The animal experiment was carried out under protocols approved by Botucatu Medical School/UNESP Ethics Committee on Use of Animals (CEUA) (Protocol number 1073/14).

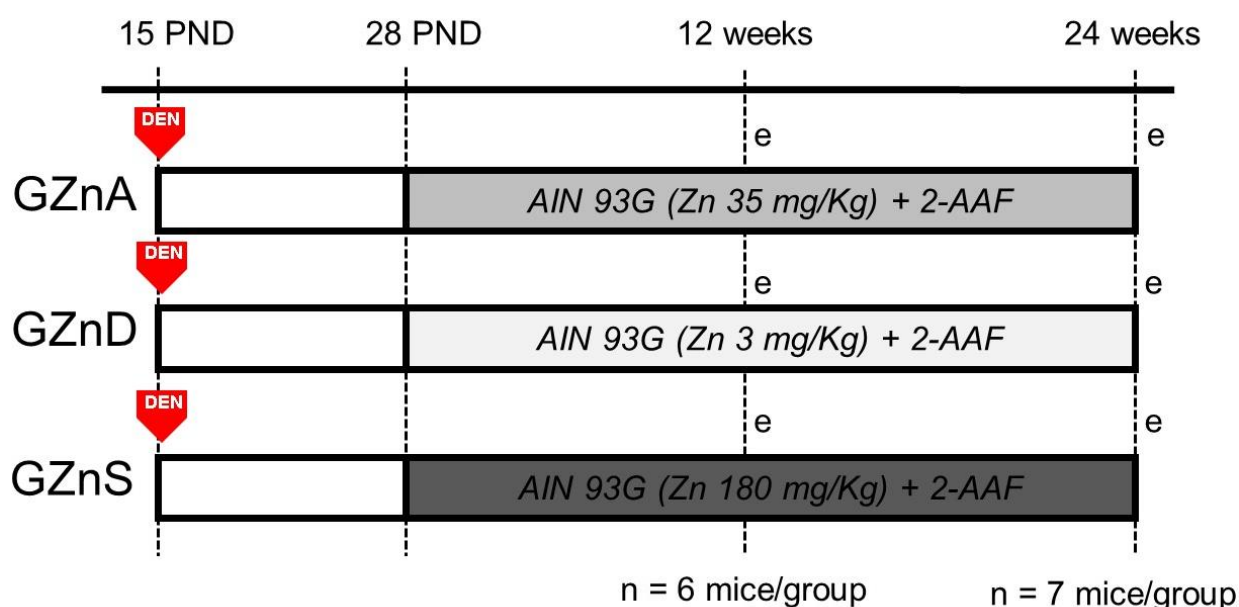


Figure 1. Experimental design (for details, see Materials and Methods section). PND: postnatal day; Zn: 35, 3 or 180 mg/Kg of elemental zinc in AIN-93G diet. DEN: diethylnitrosamine (50 mg/Kg b.w., i.p. single dose); 2-AAF: 2-acetylaminefluorene (0.02%); e: euthanasia; n: number of mice in each group.

2.2 Histopathological and Morphometrical Evaluations

Liver samples were fixed in 10% buffered formalin for 24h at room temperature, stored in 70% ethanol and embedded in paraffin. Five-micron thick liver sections from paraffin embedded blocks were stained with Haematoxylin and Eosin (HE). AHF were identified using well-established morphological criteria (Thoolen et al. 2010). The incidence of these lesions was calculated for each group. Besides, AHF were quantified and AHF total number was divided by the section area analyzed (cm²). Each liver section area (cm²) and AHF size (mm²) were measured using KS300 image analysis system (Carl Zeiss, Germany).

2.3 Immunohistochemistry and Semi-quantitative Analysis

Immunoreactivity for Ki-67 and β -catenin was detected using a universal labeled Streptavidin-Biotin system (LSAB System-HRP, Dako Cytomation, Denmark). Briefly, deparaffinated 5 μ m liver sections on silanized slides were treated sequentially with citrate buffer (120°C, 5 min) in a Pascal Pressure Chamber (Dako Cytomation, Denmark), 3% H₂O₂ in phosphate-buffered saline (PBS) (10 min), nonfat milk (60 min), rabbit monoclonal anti-Ki-67 (ab16667, 1:100 dilution, Abcam, UK) or anti- β -catenin (ab32572, 1:400 dilution, Abcam, UK) antibodies overnight (4°C) and biotinylated universal link and streptavidin HRP (20 min each). Chromogen color development was accomplished with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich, USA). The slides were counterstained with Harris's hematoxylin.

For Ki-67 semi-quantitative analysis in normal-appearing liver tissue, 40 random fields (40x objective) were assessed *per* section, comprising all liver lobes. Ki-67-positive hepatocytes were counted and divided by the analyzed area (mm²). In AHF, Ki-67-positive hepatocytes were counted and divided by AHF area (mm²). For β -catenin, the expression pattern (membranous, cytoplasmic and/or nuclear staining) was evaluated in normal-appearing liver and AHF. All semi-quantitative analyses were performed in an Olympus cellSens software (Olympus Corporation, Japan).

2.4 Single Cell Gel Electrophoresis

SCGE was performed on peripheral blood and liver samples by following the well-established protocol by Tice et al. (2000). Peripheral blood samples were collected from the venous orbital plexus a day before euthanasia. Liver samples from the left lobe (~50 mg) were gently minced in ice-cold Ca²⁺ and Mg²⁺ free PBS solution to obtain a cell suspension. Peripheral blood (5 μ L) or liver cell suspension (20 μ L) were mixed with

100-140 μ L low melting point agarose (Invitrogen, USA) dissolved in Ca^{2+} and Mg^{2+} free PBS. The mixture was spread onto microscope slides precoated with normal melting point agarose (Invitrogen, USA). The slides were covered with a coverslip and maintained at 4°C (5 min). The coverslip was removed and slides were immersed in freshly cold lysis solution containing 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% N-lauroyl-sarcosine, 1% Triton X-100 and 10 % DMSO (all reagents from Sigma-Aldrich, USA) (4°C , 60 min). After lysis, prior to electrophoresis, slides were placed in a horizontal electrophoresis unit and left in alkaline buffer containing 0.3 mM NaOH and 1 mM EDTA ($\text{pH}>13$, 20 min) and electrophoresed 30 volts (0.86 V/cm) and 300 mA (20 min). Finally, the slides were neutralized in 0.4 M Tris-HCl (pH 7.5), fixed in absolute ethanol and stored at room temperature until blind analysis in a fluorescence microscope (Olympus, Japan) at 20x magnification.

Each slide was stained with 80 μ L of SYBR® Gold Stain solution (1:10.000 solution, Life Technologies, USA) and immediately analyzed. To minimize extraneous DNA damage from ambient ultraviolet radiation, all steps were performed with reduced illumination. Genotoxicity analysis was performed in Comet Assay IV (Perceptive Instruments, UK). Tail intensity (percentage of DNA in the comet tail) was used as a reliable parameter to evaluate genotoxicity in 50 nucleoids *per* slide/two slides *per* animal (Kumaravel and Jha 2006).

2.5 Hepatic Antioxidant Profiling and Serum ALT

Liver samples were homogenized in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) with auxiliary of the motor-driven teflon glass Potter Elvehjem (100xg/min). The tissue homogenate was centrifuged (12000xg, -4°C , 15 min). The supernatant was used to determine total protein and reduced glutathione (GSH) levels and to evaluate superoxide

dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase (GPx) activities. GSH was measured in the liver by a kinetic assay in reaction medium containing 2 mM 5,5'-DTNB acid (Sigma-Aldrich, USA), 0.2mM NADPH and 2U of glutathione reductase in phosphate buffer (Sedlak and Lindsay 1968). SOD activity was determined based on the ability of the enzyme to inhibit the reduction of nitro blue tetrazolium (NBT), which was generated by hydroxylamine in a medium containing phosphate buffer, 0.1 mM EDTA, 50 μ M NTB, 78 μ M NADH and 33 μ M phenazine methosulfate (Ewing & Janero, 1995). Catalase activity was determined in phosphate buffer containing 10 mM hydrogen peroxide (Bergmeyer, 1974). GPx activity was assayed by following the oxidation of 0.16 mM NADPH in the presence of glutathione reductase which catalyzed the reduction of GSSG formed by the GPx (Nakamura et al. 1974).

Finally, serum ALT activity was determined by a conventional kinetic assay according to the manufacturer's instructions (Liquiform – Labtest Diagnóstica, Brazil). All determinations were performed using a microplate reader (25°C) (μ Quant-Gen5 2.0 software, Bio-Tec Instruments, USA).

2.6 Zinc determination

Liver samples were mineralized in a 16-N nitric acid solution by microwave irradiation (Model DGT 100, Provecto, Brazil). Zinc concentration was determined from the mineralized materials by flameless atomic absorption spectroscopy (AAS) (GBC, Model 932 AA). Samples of each AIN-93G formulation (in triplicate) were also submitted to AAS analysis to confirm adequate, deficient and supplemental zinc levels.

2.7 Western Blot

Liver samples were homogenized in lysis buffer (500 nM Tris-HCl, 0.2 M NaCl, 1% Triton X-100, 10 nM CaCl₂, and 2 µl/100 mL protease inhibitor cocktail [Sigma-Aldrich, USA]) in the proportion of 30 mg of tissue/100 µl of buffer (4°C, 2 h). After this procedure, the extracted material was centrifuged (4000 rpm, 4°C, 20 min) and the supernatant collected for protein quantification by Bradford method. Aliquots of liver homogenates containing 70 µg of total protein were heated (95°C, 5 min) in sample-loading buffer and then electrophoretically separated in a 12% SDS-PAGE gel under reducing conditions and transferred to nitrocellulose membranes (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo, USA). Membranes were blocked with non-fat milk in TBS-T (0.05 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.2, 1% Tween-20) (1 h).

Membranes were subsequently incubated with rabbit polyclonal anti-NFκB p65 (sc-372, 65 KDa, 1:1000 dilution, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-p53 (sc-6243, 53 KDa, 1:500 dilution, Santa Cruz Biotechnology, USA) or anti-Nrf2 (ab31163, 68 KDa, 1:1000 dilution, Abcam, UK), rabbit monoclonal anti-β-Catenin (ab32572, 92-86 KDa, 1:5000 dilution, Abcam, UK) or goat polyclonal anti-actin (sc1815, 43 KDa, 1:1000 dilution, Santa Cruz Biotechnology, USA) primary antibodies in 5% BSA solution overnight. After 5 wash steps with PBS-T, membranes were incubated with specific horseradish conjugated secondary antibodies, according to the primary antibodies used (2 h). Finally, after 5 wash steps, the membranes were submitted to immunoreactive protein signals detected using an Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences, UK). Signals were captured by a G:BOX Chemi system (Syngene, UK) controlled by an automatic software (GeneSys, Syngene, UK). Band intensities were quantified using densitometry analysis software (Image J software,

Austria). Finally, p53, NF κ B p65, Nrf2 and β -catenin protein expression was reported as fold change according to β -actin protein expression used as a normalizer.

2.8 Statistical Analysis

Data were analyzed by One-Way ANOVA and *post hoc* Tukey's test or Kruskal-Wallis test and *post hoc* Dunn's test. The incidence of histopathological findings was analyzed by Fisher's Exact Test. The differences were considered significant at $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using 3.5 Jandel Sigma Stat software (Jandel Corporation, USA).

3. Results

3.1 General Findings and Hepatic zinc levels

During the experimental period, no death or specific clinical signs were observed. Moreover, final body weight, body weight gain, food intake and relative liver weight (liver absolute weight/body weight) values were similar among the experimental groups at weeks 12 and 24 (Table 1).

The AAS analysis confirmed zinc levels in experimental diets before introducing them to mice (adequate zinc diet [GZnA]: 34.30 ± 4.60 ; dietary zinc deficiency [GZnD]: 3.40 ± 0.30 ; dietary zinc supplementation [GZnS]: 174.50 ± 15.80 , in mg Zn /Kg diet, values are Mean \pm S.D.). As expected, zinc estimated consumption was ~ 10 fold lower and ~ 5 fold higher in GZnD and GZnS groups, respectively, in comparison to GZnA group in both moments ($p < 0.001$) (Table 1). In fact, dietary zinc deficiency lead to decreased hepatic zinc levels in comparison to adequate zinc diet at week 24 ($p = 0.006$) (Table 1). However, dietary zinc supplementation did not alter hepatic zinc levels compared to adequate zinc in both moments (Table 1).

Table 1. Effects of dietary zinc deficiency or supplementation on experimental period parameters and hepatic zinc levels at weeks 12 and 24.

Week/Parameters	Groups ^a		
	GZnA	GZnD	GZnS
<i>Week 12 (n=6 mice/group)</i>			
Final body weight (g)	26.7 ± 1.36	29.6 ± 1.50	26.6 ± 1.36
Body weight gain (g)	11.6 ± 2.06	12.6 ± 2.51	13.0 ± 1.89
Liver relative weight (%)	4.15 ± 0.30	4.43 ± 0.21	4.67 ± 0.11
Food consumption (g/mouse/day)	3.31 ± 0.16	3.35 ± 0.43	3.29 ± 0.30
Zinc consumption (µg/mouse/day)	115 (113-121)b	10.4 (9.15-10.1)c	591 (564-605)a
Liver Zinc (µg/g)	25.1 ± 0.47	26.3 ± 3.02	24.0 ± 0.87
<i>Week 24 (n=7 mice/group)</i>			
Final body weight (g)	31.0 ± 2.16	32.8 ± 4.77	29.8 ± 0.89
Body weight gain (g)	17.0 ± 3.26	15.0 ± 4.65	15.0 ± 2.58
Liver relative weight (%)	4.95 ± 0.95	4.27 ± 0.78	4.24 ± 0.89
Food consumption (g/mouse/day)	3.52 ± 0.32	3.78 ± 1.33	3.41 ± 0.31
Zinc consumption (µg/mouse/day)	119 (117-131)b	10.6 (10.1-10.9)c	629 (576-647)a
Liver Zinc (µg/g)	26.8 ± 1.08 a	22.5 ± 1.43 b	25.3 ± 4.75 ab

Values are Mean ± S.D or Median (q25-q75). ^aGZnA (adequate zinc, 35 mg/Kg diet), GZnD (zinc deficiency, 3 mg/Kg diet) or GZnS (zinc supplementation, 180 mg/Kg diet) from postnatal day 28 until week 12 or 24. All mice were submitted to DEN/2-AAF treatment (see Material and Methods section). Different letters correspond to statistical difference among groups by Kruskal Wallis and *post hoc* Dunn's test or ANOVA and *post hoc* Tukey's test (p<0.05).

3.2 Western Blot

At week 12, Zinc deficiency increased NFκB (p65) and p53 expression compared to zinc supplementation and adequate zinc diet (p=0.007 and p=0.002, respectively) (Figure 2). In addition, zinc deficiency decreased Nrf2 expression compared to adequate

zinc ($p=0.026$) (Figure 2). In contrast, zinc supplementation decreased β -catenin expression compared to adequate zinc diet ($p=0.033$) (Figure 2).

3.3 Antioxidant Profiling and SCGE

Zinc deficiency decreased GSH levels compared to adequate zinc and zinc deficiency at week 12 and 24 ($p<0.001$, for both) (Table 2). Moreover, zinc deficiency increased 2-AAF-induced genotoxicity in peripheral blood and liver cells compared the other groups at week 24 ($p=0.037$ and $p=0.023$, respectively) (Figure 3).

On the other hand, zinc supplementation increased GSH levels and GPx activity compared to adequate zinc and zinc deficiency at week 12 ($p<0.001$, for both) and 24 ($p<0.001$, for both) (Table 2). Zinc supplementation also increased SOD, catalase activity compared to the other groups only at week 24 ($p<0.001$ and $p=0.038$, respectively). Additionally, zinc supplementation reduced 2-AAF-induced genotoxicity in peripheral blood cells compared to adequate zinc at week 12 ($p=0.032$) (Figure 3).

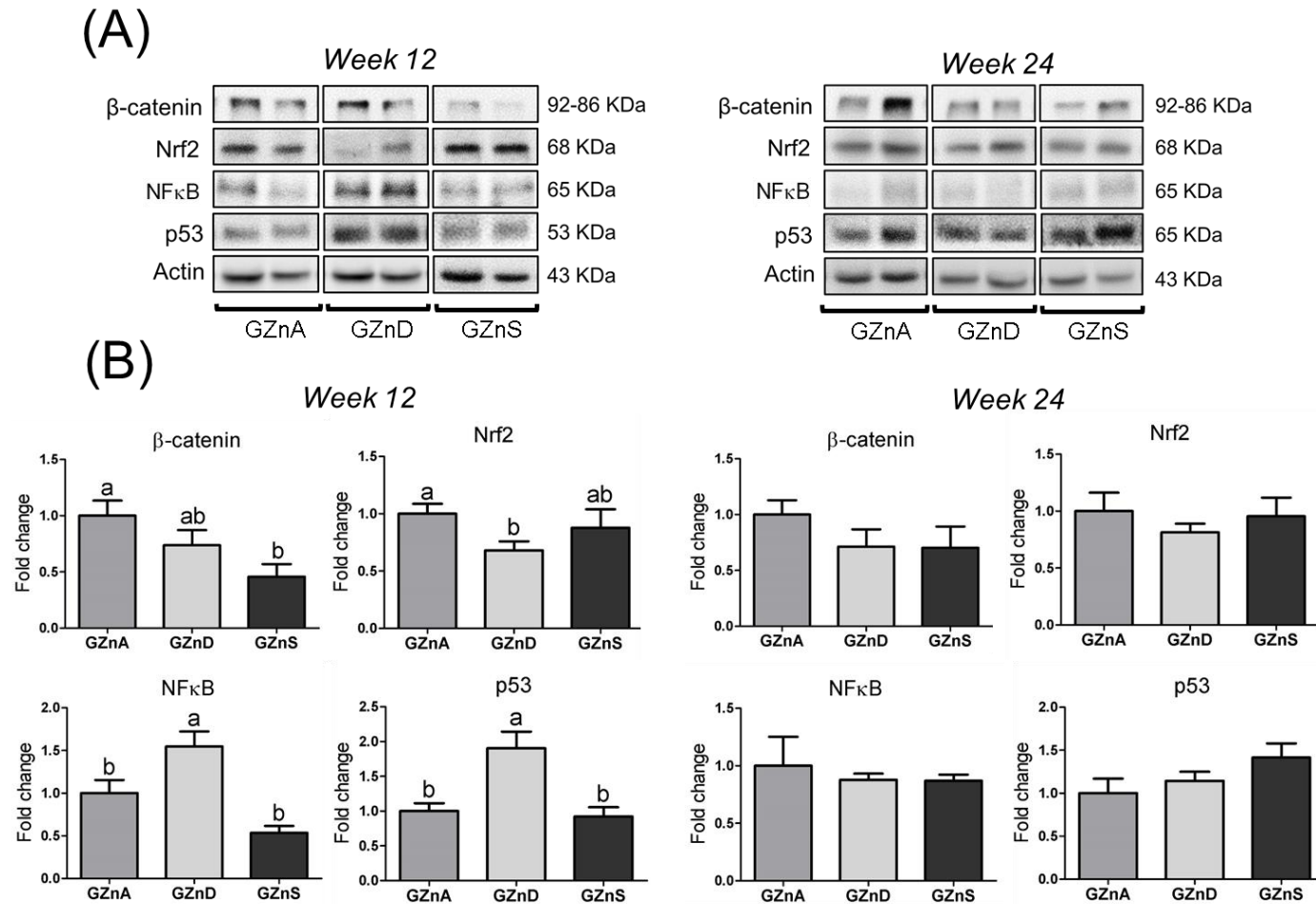


Figure 2. Effects of zinc deficiency or supplementation on β -catenin, Nrf2, NF κ B, p53 and actin protein expression at week 12 and 24. **(A)** Representative western blot and **(B)** semi-quantitative analysis. Values are Mean \pm S.D. GZnA (adequate zinc, 35 mg/Kg diet), GZnD (zinc deficiency, 3 mg/Kg diet) or GZnS (zinc supplementation, 180 mg/Kg diet) from postnatal day 28 until week 12 (n=6 mice/group) or 24 (n=7 mice/group). All mice were submitted to DEN/2-AAF treatment (see Material and Methods section). Different letters correspond to statistical difference among groups by ANOVA and *post hoc* Tukey's test (p<0.05).

Table 2. Effects of dietary zinc deficiency or supplementation on liver antioxidant profiling at weeks 12 and 24.

Week/Parameters	Groups ^a		
	GZnA	GZnD	GZnS
<i>Week 12 (n=6 mice/group)</i>			
GSH (nmol/g tissue)	8.03 ± 0.72 b	6.15 ± 0.64 c	10.8 ± 1.25 a
SOD (nmol/mg protein)	40.7 ± 5.12	42.4 ± 6.01	45.5 ± 9.25
Catalase (µmol/g tissue)	19.5 ± 1.59	17.6 ± 2.77	19.9 ± 1.85
GPx (nmol/mg tissue)	11.6 ± 1.57 b	10.7 ± 1.48 b	15.1 ± 1.48 a
<i>Week 24 (n=7 mice/group)</i>			
GSH (nmol/g tissue)	7.49 ± 1.17 b	5.22 ± 0.68 c	8.86 ± 0.52 a
SOD (nmol/mg protein)	41.9 ± 5.86 b	37.3 ± 3.24 b	51.5 ± 7.26 a
Catalase (µmol/g tissue)	23.8 ± 7.83 b	23.4 ± 10.5 b	32.6 ± 7.75 a
GPx (nmol/mg tissue)	8.93 ± 1.44 b	10.6 ± 1.09 b	20.5 ± 2.16 a

^aGZnA (adequate zinc, 35 mg/Kg diet), GZnD (zinc deficiency, 3 mg/Kg diet) or GZnS (zinc supplementation, 180 mg/Kg diet) from postnatal day 28 until week 12 or 24. All mice were submitted to DEN/2-AAF treatment (see Material and Methods section). Different letters correspond to statistical difference among groups by ANOVA and *post hoc* Tukey's test (p<0.05).

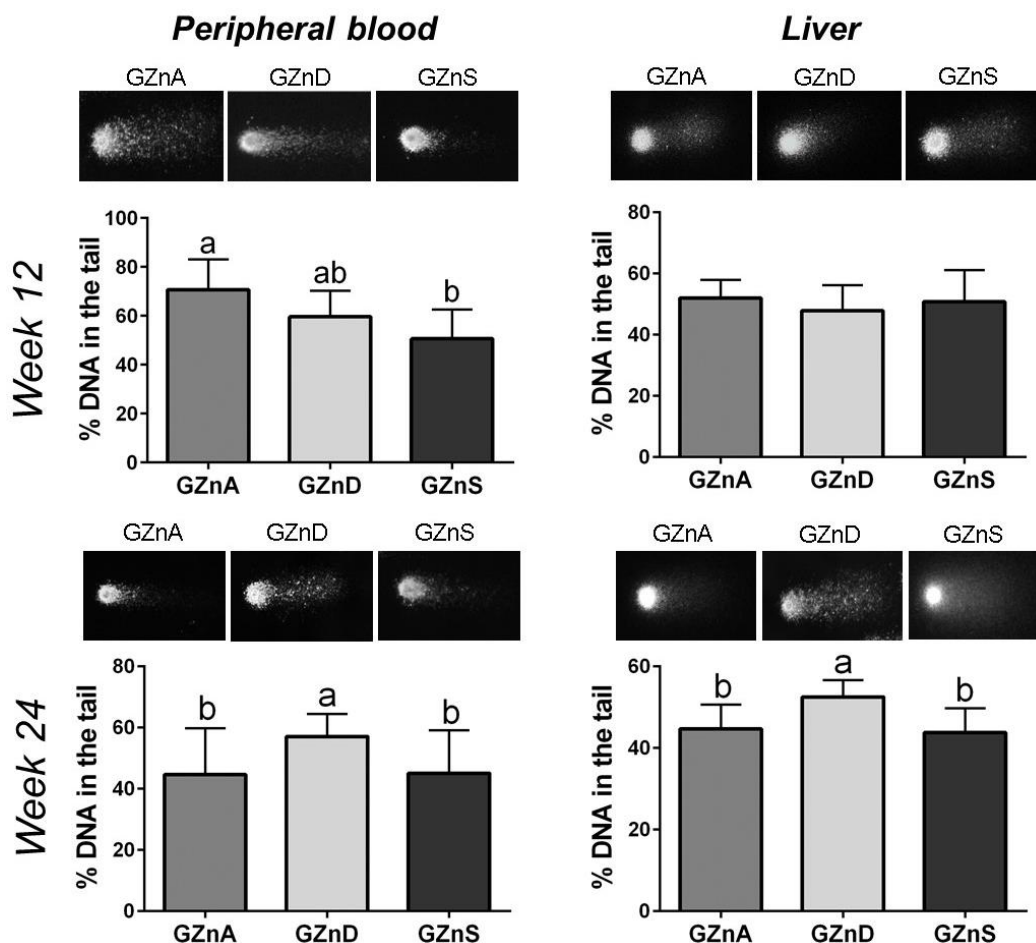


Figure 3. Effects of zinc deficiency or supplementation on 2-AAF-induced genotoxicity in peripheral blood and liver at week 12 and 24. Representative photomicrographs of “comet” patterns are also presented (40x objective). Values are Mean \pm S.D. GZnA (adequate zinc, 35 mg/Kg diet), GZnD (zinc deficiency, 3 mg/Kg diet) or GZnS (zinc supplementation, 180 mg/Kg diet) from postnatal day 28 until week 12 (n=6 mice/group) or 24 (n=7 mice/group). All mice were submitted to DEN/2-AAF treatment (see Material and Methods section). Different letters correspond to statistical difference among groups by ANOVA and *post hoc* Tukey’s test (p<0.05).

3.4 Histopathological and Morphometrical analyses

Histopathological examination revealed preneoplastic AHF showing basophilic eosinophilic or clear cells (Figure 4A). The groups did not differ in the incidence of AHF in both moments (Table 3). However, dietary zinc deficiency increased number of AHF *per* area (cm²) at week 12 and AHF size (mm²) at week 24 (p=0.004 and p<0.001, respectively) (Figure 4B and 4C).

ALT serum levels was similar among the groups at week 12 (ZnA: 52.83 ± 11.14 ; ZnD: 59.89 ± 13.26 ; ZnS: 61.63 ± 9.65 , in U/L, values are Mean \pm S.D.) and 24 (ZnA: 64.57 ± 14.38 ; ZnD: 57.86 ± 13.31 ; ZnS: 59.87 ± 9.65 , in U/L, values are Mean \pm S.D.).

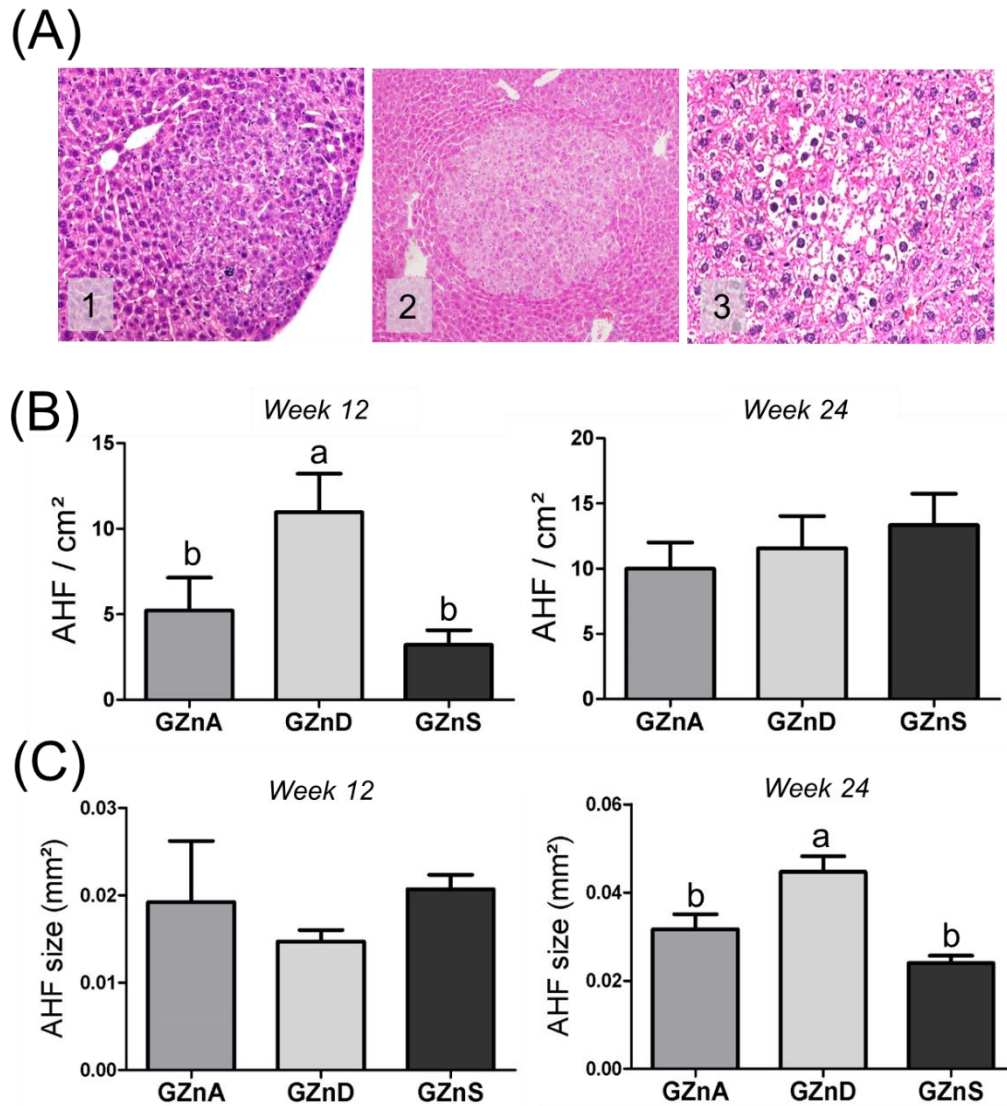


Figure 4. (A) Representative photomicrographs of AHF showing (1) basophilic (20x objective), (2) eosinophilic (20x objective) and (3) clear cells (40x objective) (H&E). Effects of zinc deficiency or supplementation on (B) AHF number *per* cm² and (C) AHF size (mm²). Values are Mean \pm S.D. GZnA (adequate zinc, 35 mg/Kg diet), GZnD (zinc deficiency, 3 mg/Kg diet) or GZnS (zinc supplementation, 180 mg/Kg diet) from postnatal day 28 until week 12 (n=6 mice/group) or 24 (n=7 mice/group). All groups were submitted to DEN/2-AAF treatment (see Material and Methods section). AHF = altered hepatocyte foci. Different letters correspond to statistical difference among groups by ANOVA and *post hoc* Tukey's test ($p < 0.05$).

Table 3. Effects of dietary zinc deficiency or supplementation on the incidence of preneoplastic AHF at weeks 12 and 24.

Week/AHF type	Groups ^a		
	GZnA	GZnD	GZnS
<i>Week 12 (n=6 mice/group)</i>			
Basophilic cell foci	5/6 (83.3%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)
Eosinophilic cell foci	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)
Clear cell foci	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)
<i>Week 24 (n=7 mice/group)</i>			
Basophilic cell foci	4/7 (57.1%)	4/7 (57.1%)	4/7 (57.1%)
Eosinophilic cell foci	7/7 (100%)	6/7 (85.7%)	7/7 (100%)
Clear cell foci	1/7 (14.3%)	0/7 (0)	1/7 (14.3%)

^aGZnA (adequate zinc, 35 mg/Kg diet), GZnD (zinc deficiency, 3 mg/Kg diet) or GZnS (zinc supplementation, 180 mg/Kg diet) from postnatal day 28 until week 12 or 24. All groups were submitted to DEN/2-AAF treatment (see Material and Methods section).

3.5 Immunohistochemistry

Ki-67 immunoreactivity revealed typical nuclear staining in hepatocytes of normal-appearing liver tissue and AHF (Figure 5A). Ki-67 positive cells were only observed into AHF at week 24. Ki-67 semiquantitative analysis in normal-appearing liver areas was similar among the groups at weeks 12 and 24 (Figure 5B). Nonetheless, zinc deficiency increased cellular proliferation in preneoplastic AHF in comparison with adequate zinc and zinc supplementation at week 24 ($p=0.016$) (Figure 5B). Lastly, β -catenin analysis showed typical membranous staining in normal-appearing liver areas and AHF (Figure 5A).

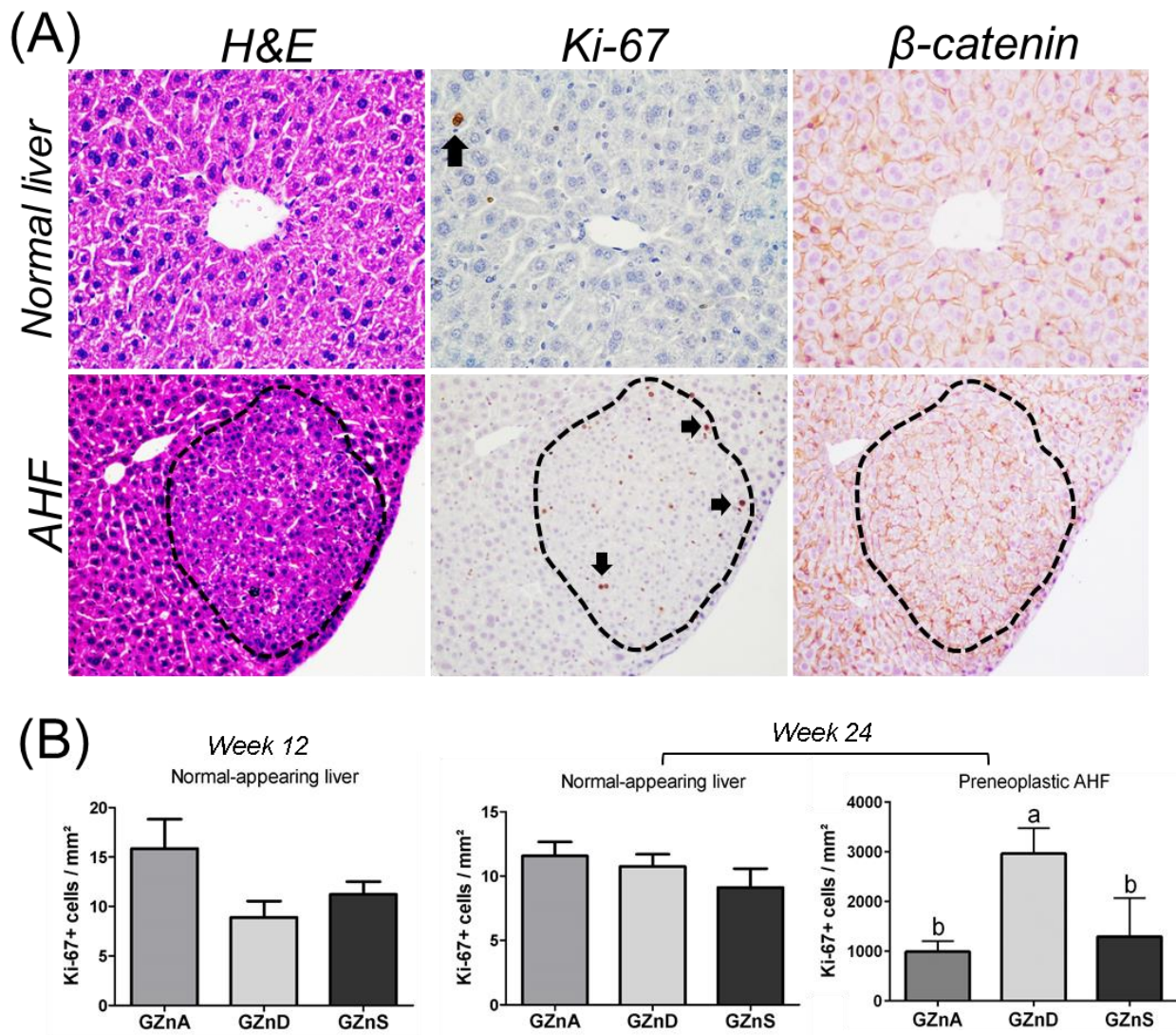


Figure 5. (A) Representative photomicrographs of liver H&E staining and respective nuclear Ki-67 (arrows) and membranous β -catenin staining in normal-appearing liver (40x objective) and basophilic AHF (20x objective). (B) Effects of zinc deficiency or supplementation on cell proliferation (Ki-67) at weeks 12 and 24. Values are Mean \pm S.D. GZnA (adequate zinc, 35 mg/Kg diet), GZnD (zinc deficiency, 3 mg/Kg diet) or GZnS (zinc supplementation, 180 mg/Kg diet) from postnatal day 28 until week 12 (n=6 mice/group) or 24 (n=7 mice/group). All groups were submitted to DEN/2-AAF treatment (see Material and Methods section). AHF = Altered hepatocyte foci. Different letters correspond to statistical difference among groups by ANOVA and *post hoc* Tukey's test ($p < 0.05$).

4. Discussion

Both human and rodents require adequate zinc intake for optimal cellular function and health (Food & Nutrition Board 2001; National Academy of Sciences 2011). According to the National Academy of Sciences (U.S.) (2001), zinc requirement for rodent (mice and rats) is 30-35 mg/Kg diet. Adequate zinc diet (GZnA, 35 mg/Kg diet) was designed herein to meet the recommended dietary zinc intake for mice (National Academy of Sciences 2001). Deficient zinc diet (GZnD, 3 mg/Kg diet) was designed to contain ~10-fold lower zinc than adequate diet and to induce low zinc status, similarly to human dietary zinc deficiency, as previously established in chemically-induced carcinogenesis bioassays (Lee et al. 2004; Alder et al. 2012). In fact, dietary zinc deficiency reduced hepatic zinc levels (week 24), as previously reported (Alder et al., 2012; Zhong et al. 2013).

The medium-term bioassay of mouse hepatocarcinogenesis induced by DEN/2-AAF protocol used herein was effective to induce AHF development. Briefly, DEN and 2-AAF undergo liver metabolism by cytochrome P450 (CYP450), mainly by CYP1A1, 1A2 and 2E1 (Liu et al. 2005; Jin et al. 2007), resulting in reactive oxygen species (ROS) and nucleophilic ions, which can induce DNA damage and implicate in genomic instability, mutation and ultimately, contribute to the development of hepatic preneoplastic lesions (Santos et al. 2014; Kraynak et al. 2015). In addition, 2-AAF also demonstrates non-genotoxic effects on altering mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation (Neumann et al. 1997). This altered hepatic environment in short and medium-term carcinogen exposure is similar to human hepatocarcinogenesis (Cichoż-Lach and Michalak 2014).

There is body of evidences that zinc can participate in many antioxidant pathways (Kloubert and Rink 2015). Although this micronutrient does not function as an antioxidant *per se*, zinc is structurally essential for multiple transcription factors and

enzymes participating in neutralization of ROS, which are normally produced by cellular metabolism or xenobiotics (Kloubert and Rink, 2015). Notably, the Keap1/Nrf2/ARE pathway is the main regulator of antioxidant/cytoprotective responses to endogenous and exogenous stresses caused by ROS and electrophiles (Nguyen et al. 2009). Under basal conditions, Nrf2 protein is sequestered in the cytosol by the Keap1 dimer which facilitates the ubiquitination and proteasomal degradation of Nrf2 (Nguyen et al. 2009). Under stressful conditions Keap1 is inhibited, allowing Nrf2 protein to accumulate and to bind the antioxidant response element (ARE) (Nguyen et al. 2009). Finally, the Nrf2/ARE complex activates the expression of many target genes related to GSH synthesis, as glutamate–cysteine ligase enzyme modifier (GCLM) and catalytic (GCLC) subunits (Lu 2013). GSH, a potent electron-donor, can directly interact with ROS and electrophiles, providing protection against electrophilic DNA-damaging agents (Ballatori et al. 2009), such as DEN and 2-AAF.

Although the mechanism is not fully understood, the Keap1/Nrf2/ARE pathway perceives stress partly by zinc signaling (McMahon et al. 2010). Stressful conditions lead to increased intracellular free zinc (Zn^{2+}) levels by the oxidation and degradation of zinc-containing proteins (Kröncke 2007). Keap1 holds domains that can act as “zinc sensors”: enhanced intracellular zinc levels may act as negative regulators of Keap1, releasing and allowing Nrf2 to accumulate in cell (McMahon et al. 2010). In the present study, considering the importance of zinc on Keap1/Nrf2/ARE pathway activation, dietary zinc deficiency decreased Nrf2 protein expression (week 12), leading to reduced GSH levels (week 12 and 24) and, ultimately, contributing to enhanced carcinogen-induced oxidative stress and genotoxicity, mainly in the liver (week 24) (Figure 6). Similar findings were reported by recent *in vitro* studies (Omata et al. 2013; Li et al. 2014).

In addition to antioxidant function, zinc is also related to proper DNA repair. The DNA-binding domains of p53 and PARP, proteins that play important roles in

coordinating DNA repair, exhibit a complex tertiary structures stabilized by zinc atoms (Méplan et al. 2000; Petrucco and Percudani 2008; Loh 2010). The p53 pathway can be activated by endogenous and exogenous stressful conditions (Prives and Hall 1999; Riley et al. 2008). Under hypoxia and/or oxidative stress, p53 degradation by MDM2 protein is inhibited and p53 accumulates in cell, leading to the expression of genes linked to DNA repair, as *GADD45* (Prives and Hall 1999; Riley et al. 2008). Alterations in p53 pathway, as mutations in human *TP53* and murine *Tp53* genes, are frequently observed in human HCC and murine 2-AAF induced hepatocarcinogenesis (Jenkins and Perry 2000; Hussain et al. 2007). Genetic alterations in these tumor suppressor genes may give rise to misfolded mutant p53 protein, lacking the ability of DNA-binding and DNA repair downstream signaling (Wright and Lim. 2007).

Here, dietary zinc deficiency increased hepatic wild-type p53 protein expression (week 12). In previous *in vitro* studies, zinc depletion also enhanced p53 protein expression in human lung fibroblasts and glioma cells, however, the p53 ability to bind target DNA sequences was reduced (Ho and Ames 2002; Ho et al. 2003). Decreased intracellular zinc levels induce structural changes in p53 DNA-binding domain, impairing p53 DNA-binding and proper DNA repair (Verhaegh et al. 1998; Méplan et al. 2000). Therefore, as highlighted by Ho & Ames (2003), p53 protein can be structurally changed and functionally impaired by mutations found in hepatocarcinogenesis as well as by dietary zinc deficiency.

Although there is an increase in p53 expression (week 12), as a result of enhanced carcinogen-induced oxidative stress caused by zinc deficiency, this protein may be structurally changed, and hence DNA repair is impaired. Consequently, dietary zinc deficiency not only impair antioxidant mechanisms as Nrf2/GSH, but also repair mechanisms as p53 pathway, leading to augmented carcinogen induced-DNA damage (week 24) (Figure 6).

As briefly discussed before, oxidative stress and DNA damage plays key roles in different steps of chemically-induced hepatocarcinogenesis (Klaunig and Kamendulis 1999; Santos et al. 2014). Mainly in the early stage of chemically-induced hepatocarcinogenesis, the drastically modified hepatic environment favors the emerging of AHF, possibly from the clonal expansion of initiated hepatocytes (Ogawa 2009). AHF exhibit several morphological and biochemical alterations due to extensively altered gene expression compared to the normal surrounding liver tissue (Suzuki et al. 2004). Under stimuli, these lesions accumulate genetic and epigenetic alterations and acquire phenotypic characteristics as genomic instability and a high proliferation potential, which may contribute to AHF development and ultimately, to AHF progression to HCC (Klaunig and Kamendulis 1999; Ogawa 2009). For these reasons, AHF are considered putative liver preneoplastic lesions and suitable biomarkers for the evaluation of potential modifying factors on early murine hepatocarcinogenesis (Pitot 1990; Ogawa 2009). Here, an hepatic environment of defective antioxidant defense (Nrf2/GSH), DNA repair (p53) and enhanced DNA damage provided by zinc deficiency contributed to preneoplastic AHF development, resulting in enhanced number of AHF *per cm*² (week 12) (Figure 6).

The NFκB pathway activation is often linked to mouse and human hepatocarcinogenesis (Liu et al. 2002; Majumder et al. 2010; Luedde and Schwabe 2011). The nuclear factor κB (NFκB) is known to be a redox-sensitive transcription factor present in the cytoplasm as an inactive heterotrimer consisting of p50, p65, and IκB subunits (Bubici et al. 2006; Morgan and Liu 2011). Under oxidative stress and other stimuli, IκB is phosphorylated by IκB kinase (IKKβ), leading to nuclear translocation of p50 and p65 subunits and enhancing the expression of downstream genes involved in cell proliferation (as *COX-2* and *cyclin D1*) and others (Pahl et al. 1999). Additionally, studies already reported a crosstalk between Nrf2 and NFκB pathways, usually inversely

correlated: when Nrf2 pathway is activated, Keap1 acts as a negative regulator of NF κ B signaling through the inhibition and degradation of IKK β (Lee et al. 2009; Kim et al. 2010). Thus, dietary zinc deficiency, reducing Nrf2 protein expression (week 12), provided stimuli to NF κ B pathway activation and increased p65 protein expression (week 12). When activated, the NF κ B (p65) transcription factor augmented cell proliferation into preneoplastic AHF (week 24) and, as a result, AHF mean size (week 24) (Figure 6). In agreement, Majumder et al. (2010) observed that the zinc-dependent metallothioneins knockout induced oxidative stress, NF- κ B pathway activation, followed by increased cell proliferation and increased hepatocellular adenoma/carcinoma incidence in a DEN-induced mouse model. Increased cellular proliferation into AHF benefits the clonal expansion of DEN/2-AAF initiated hepatocytes and favors the accumulation of epigenetic and genetic alterations that predispose to AHF growth and progression to tumors (Ogawa 2009). Then, both increases in the number of AHF *per* cm² and AHF proliferation and size are considered direct promoting effects of zinc deficiency on early chemically-induced hepatocarcinogenesis.

In contrast, the zinc supplemented diet (180 mg/Kg diet) was produced to contain ~5-fold higher zinc than adequate diet, similarly to usually applied human zinc supplementation regimens and rodent studies (Ko et al. 2005; Huang et al. 2007). However, dietary zinc supplementation did not alter hepatic zinc levels. In fact, as recently reported, increased hepatic zinc concentrations are only observed in higher dietary zinc supplementation regimens (300 mg/Kg) (Jing et al. 2015).

Nonetheless, dietary zinc supplementation enhanced the activity of SOD (week 24), catalase (week 24) and GPx (week 12 and 24) and the levels of GSH (week 12 and 24), zinc-dependent antioxidant agents, as previously reported (Zhou et al. 2005; Galażyn-Sidorczuk et al. 2012). As discussed, zinc has important roles in antioxidant defense (Kloubert and Rink 2015). This metal is an essential structural component of

copper and zinc-dependent Superoxide Dismutase enzyme (CuZnSOD) (Tainer et al. 1993; Zelko et al. 2002). Also, zinc atoms are part of zinc finger proteins responsible for DNA-binding activity of Sp1 transcription factor which induces the expression of catalase, another important antioxidant enzyme (Narayan et al. 1997; Lee et al. 2005). Increased levels or activity of these antioxidant agents protected peripheral blood cells against ROS and nucleophilic ions produced by DEN/2-AAF metabolism, resulting in decreased DNA damage in peripheral blood (week 12) (Figure 6). Although zinc supplementation (75 mg/L) attenuated mouse alcoholic hepatic injury by inhibiting the generation of ROS and enhancing antioxidant pathways (Zhou et al. 2005), dietary zinc supplementation did not alter the incidence or the number of preneoplastic AHF *per mm*² in the present study.

On the other hand, zinc supplementation reduced β -catenin protein expression (week 12) (Figure 6). The Wnt/ β -catenin pathway plays important roles in growth, regeneration and proliferation in the liver (Micsenyi et al. 2004; Tan et al. 2006). In contrast, Wnt/ β -catenin pathway aberrant activation is frequently related to liver tumorigenesis (Anna et al. 2003; Park et al. 2005; Stahl et al. 2005). Increased Wnt/ β -catenin signaling, as a result of mutations in β -catenin gene, is frequently found in human and chemically-induced HCC, including DEN-induced models (Anna et al. 2003; Park et al. 2005; Stahl et al. 2005). Therefore, it is hypothesized that increased antioxidant defense as well as sustained reduction of β -catenin protein expression could provide a hepatoprotective environment against HCC development (Figure 6). However, further long-term studies are necessary.

Taken together, the findings demonstrate that dietary zinc deficiency promotes early chemically-induced mouse hepatocarcinogenesis. The present study could also indicate an underlying role of this nutritional imbalance as a risk cofactor of human hepatocarcinogenesis. In contrast, despite of conferring a hepatoprotective environment

by enhancing antioxidant defense, dietary zinc supplementation does not alter early chemically-induced murine hepatocarcinogenesis.

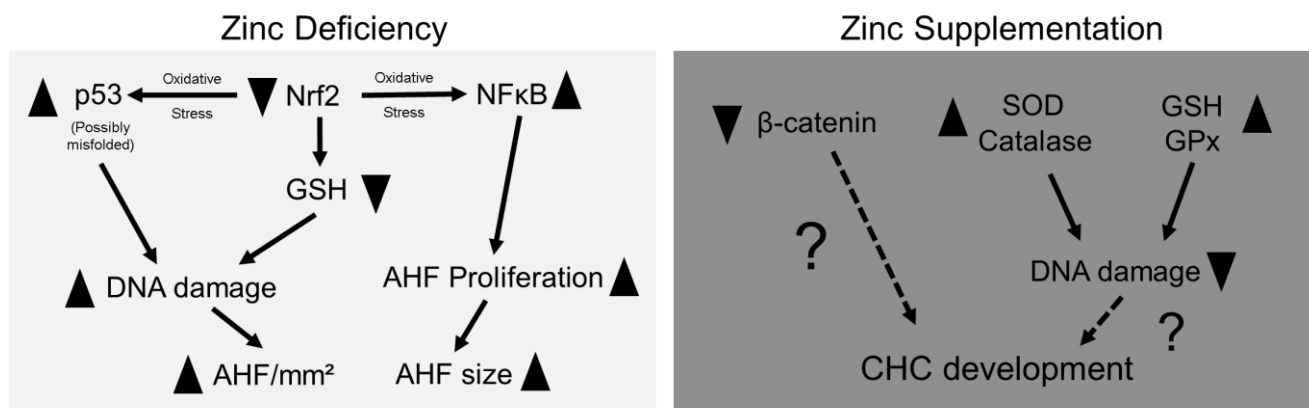


Figure 6. Effects of Zinc deficiency or Supplementation on early chemically-induced hepatocarcinogenesis. AHF = Altered Hepatocyte Foci; HCC = Hepatocellular Carcinoma.

5. References

Alder H, Taccioli C, Chen H, et al (2012) Dysregulation of miR-31 and miR-21 induced by zinc deficiency promotes esophageal cancer. *Carcinogenesis* 33:1736–1744. doi: 10.1093/carcin/bgs204

Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A (2006) Zinc through the three domains of life. *Journal of Proteome Research* 5:3173–3178. doi: 10.1021/pr0603699

Anna CH, Iida M, Sills RC, Devereux TR (2003) Expression of potential β -catenin targets, cyclin D1, c-Jun, c-Myc, E-cadherin, and EGFR in chemically induced hepatocellular neoplasms from B6C3F1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 190:135–145. doi: 10.1016/S0041-008X(03)00170-4

Bakiri L, Wagner EF (2013) Mouse models for liver cancer. *Molecular Oncology* 7:206–223. doi: 10.1016/j.molonc.2013.01.005

Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, et al (2009) Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biological chemistry* 390:191–214. doi: 10.1515/BC.2009.033

Banudevi S, Elumalai P, Arunkumar R, et al (2011) Chemopreventive effects of zinc on prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea and testosterone in adult male Sprague-Dawley rats. *Journal of cancer research and clinical oncology* 137:677–86. doi: 10.1007/s00432-010-0926-4

Bergmeyer HU (1974). *Methods of enzymatic analysis* Academic. Academic Press, New York.

Bitsch A, Hadjiolov N, Klo P, et al (2000) Dose Response of Early Effects Related to Tumor Promotion of 2-Acetylaminofluorene. *October* 51:44–51.

Brooks WA, Santosham M, Naheed A, et al (2005) Effect of weekly zinc supplements on incidence of pneumonia and diarrhoea in children younger than 2 years in an urban, low-income population in Bangladesh: randomised controlled trial. *The Lancet* 366:999–1004. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67109-7

Bubici C, Papa S, Dean K, Franzoso G (2006) Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance. *Oncogene* 25:6731–6748. doi: 10.1038/sj.onc.1209936

Christudoss P, Selvakumar R, Pulimood AB, et al (2012) Zinc and zinc related enzymes in precancerous and cancerous tissue in the colon of dimethyl hydrazine treated rats. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* 13:487–92. doi: 10.7314/APJCP.2012.13.2.487

Cichoż-Lach H (2014) Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World Journal of Gastroenterology* 20:8082. doi: 10.3748/wjg.v20.i25.8082

Dani V, Goel A, Vaiphei K, Dhawan DK (2007) Chemopreventive potential of zinc in experimentally induced colon carcinogenesis. *Toxicol Lett* 171:10–8. doi: 10.1016/j.toxlet.2007.02.002

Ewing JF, Janero DR (1995) Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Analytical Biochemistry* 232:243–48.

Food and Nutrition Board (2001) *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*, The National Academic Press, Washington.

Fong LYY, Jiang Y, Farber JL (2006) Zinc deficiency potentiates induction and progression of lingual and esophageal tumors in p53-deficient mice. *Carcinogenesis* 27:1489–96. doi: 10.1093/carcin/bgl012

Fong LYY, Jiang Y, Rawahneh ML, et al (2011) Zinc supplementation suppresses 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis. *Carcinogenesis* 32:554–60. doi: 10.1093/carcin/bgr004

Fukumasu H, Silva TC Da, Avanzo JL, et al (2006) Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett* 233:158–164. doi: 10.1016/j.canlet.2005.03.007

Galażyn-Sidorczuk M, Brzóška MM, Rogalska J, et al (2012) Effect of zinc supplementation on glutathione peroxidase activity and selenium concentration in the serum, liver and kidney of rats chronically exposed to cadmium. *J Trace Elem Med Biol* 26:46–52. doi: 10.1016/j.jtemb.2011.10.002

GLOBOCAN 2012 v1.0 Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 (2013). International Agency for Research on Cancer. <http://globocan.iarc.fr>, Accessed 8 October 2015.

Gumulec J, Masarik M, Adam V, et al (2014) Serum and Tissue Zinc in Epithelial Malignancies: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 9:e99790. doi: 10.1371/journal.pone.0099790

Halsted JA, Prasad, AS (1961). Syndrome of Iron Deficiency Anemia, Hepatosplenomegaly, Hypogonadism, Dwarfism and Geophagia. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 72: 130–149.

Ho E, Ames BN (2002) Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFkappa B, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:16770–5. doi: 10.1073/pnas.222679399

Ho E, Courtemanche C, Ames BN (2003) Zinc deficiency induces oxidative DNA damage and increases p53 expression in human lung fibroblasts. *J Nutr* 133:2543–8.

Huang L, Yu YY, Kirschke CP, et al (2007) Znt7 (Slc30a7)-deficient mice display reduced body zinc status and body fat accumulation. *The Journal of biological chemistry* 282:37053–63. doi: 10.1074/jbc.M706631200

Hussain SP, Schwank J, Staib F, et al (2007) TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* 26:2166–2176. doi: 10.1038/sj.onc.1210279

Ibs K-H, Function ZI, Rink L (2003) Immunity Enhanced by Trace Elements. *Sciences-New York* 133:1452S–6S.

Jenkins GJ, Parry JM (2000) Restriction site mutation (RSM) analysis of 2-acetylaminofluorene (2-AAF)-induced mouse liver mutations and comparison with the measurement of in vivo micronucleus induction in the bone marrows of (2-AAF)-treated mice. *Teratog Carcinog Mutagen* 20:107–17.

Jin SK, Wanibuchi H, Morimura K, et al (2007) Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in vivo. *Cancer Research* 67:11141–11146. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1369

Jing M, Rech L, Wu Y, et al (2015) Effects of zinc deficiency and zinc supplementation on homocysteine levels and related enzyme expression in rats. *J Trace Elem Med Biol* 30:77–82. doi: 10.1016/j.jtemb.2014.10.013

Kim JE, You DJ, Lee C, et al (2010) Suppression of NF-κB signaling by KEAP1 regulation of IKKβ activity through autophagic degradation and inhibition of phosphorylation. *Cell Signal* 22:1645–1654. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.06.004

Klaunig JE, Pereira M a., Ruch RJ, Weghorst CM (1988) Dose-Response Relationship of Diethylnitrosamine-Initiated Tumors in Neonatal Balb/c Mice: Effect of Phenobarbital Promotion. *Toxicologic Pathology* 16:381–385. doi: 10.1177/019262338801600310

Klaunig JE, Kamendulis LM (1999) Mechanisms of cancer chemoprevention in hepatic carcinogenesis: modulation of focal lesion growth in mice. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 52:101–6.

Kloubert V, Rink L (2015) Zinc as a micronutrient and its preventive role of oxidative damage in cells. *Food Funct.* doi: 10.1039/C5FO00630A

Ko WS. K, Guo CH, Hsu GSW, et al (2005) The effect of zinc supplementation on the treatment of chronic hepatitis C patients with interferon and ribavirin. *Clinical Biochemistry* 38:614–620. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2005.04.003

Kraynak a. R, Barnum JE, Cunningham CL, et al (2015) Alkaline comet assay in liver and stomach, and micronucleus assay in bone marrow, from rats treated with 2-acetylaminofluorene, azidothymidine, cisplatin, or isobutyraldehyde. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 786-788:77–86. doi: 10.1016/j.mrgentox.2015.03.005

Kröncke KD (2007) Cellular stress and intracellular zinc dyshomeostasis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 463:183–187. doi: 10.1016/j.abb.2007.03.008

Kumaravel TS, Jha AN (2006) Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutation research* 605:7–16. doi: 10.1016/j.mrgentox.2006.03.002

Lee D-F, Kuo H-P, Liu M, et al (2009) KEAP1 E3 ligase-mediated downregulation of NF-kappaB signaling by targeting IKKbeta. *Mol Cell* 36:131–40. doi: 10.1016/j.molcel.2009.07.025

Lee JA, Suh DC, Kang JE, et al (2005) Transcriptional activity of Sp1 is regulated by molecular interactions between the zinc finger DNA binding domain and the inhibitory domain with corepressors, and this interaction is modulated by MEK. *Journal of Biological Chemistry* 280:28061–28071. doi: 10.1074/jbc.M414134200

Lee S, Simpson M, Nimmo M, Xu Z (2004) Low zinc intake suppressed N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* 25:1879–1885. doi: 10.1093/carcin/bgh214

Li B, Cui W, Tan Y, et al (2014) Zinc is essential for the transcription function of Nrf2 in human renal tubule cells in vitro and mouse kidney in vivo under the diabetic condition. *Journal of cellular and molecular medicine* 18:895–906. doi: 10.1111/jcmm.12239

Liu LL, Gong LK, Qi XM, et al (2005) Altered expression of cytochrome P450 and possible correlation with preneoplastic changes in early stage of rat hepatocarcinogenesis. *Acta Pharmacologica Sinica* 2:737-744. doi: 10.1111/j.1745-7254.2005.00120.x

Liu P, Kimmoun E, Legrand A, et al (2002) Activation of NF-kappa B, AP-1 and STAT transcription factors is a frequent and early event in human hepatocellular carcinomas. *J Hepatol* 37:63–71. doi: 10.1016/S0168-8278(02)00064-8

Loh SN (2010) The missing zinc: p53 misfolding and cancer. *Metallomics : integrated biometal science* 2:442–449. doi: 10.1039/c003915b

Lu SC (2013) Glutathione synthesis. *Biochimica et biophysica acta* 1830:3143–53. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008

Luedde T, Schwabe RF (2011) NF- κ B in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8:108–118. doi: 10.1038/nrgastro.2010.213

Ma J, Betts NM (2000) Zinc and Copper Intakes and Their Major Food Sources for Older Adults in the 1994-96 Continuing Survey of Food Intakes by Individuals (CSFII). *J Nutr* 130:2838–2843.

Margalit O, Simon AJ, Yakubov E, et al (2012) Zinc supplementation augments in vivo antitumor effect of chemotherapy by restoring p53 function. *International journal of cancer Journal international du cancer* 131:E562–8. doi: 10.1002/ijc.26441

Majumder S, Roy S, Kaffenberger T, et al (2010) Loss of metallothionein predisposes mice to diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by activating NF- κ B target genes. *Cancer Res* 70:10265–10276. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2839

McMahon M, Lamont DJ, Beattie K a, Hayes JD (2010) Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:18838–43. doi: 10.1073/pnas.1007387107

Méplan C, Richard MJ, Hainaut P (2000) Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells. *Oncogene* 19:5227–5236. doi: 10.1038/sj.onc.1203907

Micsenyi A, Tan X, Sneddon T, et al (2004) β -Catenin is temporally regulated during normal liver development. *Gastroenterology* 126:1134–1146. doi: 10.1053/j.gastro.2003.12.047

Morgan MJ, Liu Z (2011) Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res* 21:103–115. doi: 10.1038/cr.2010.178

Nakamura W, Hojoda S, Hayashi K (1974) Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 358:251–261. doi:10.1016/0005-2744(74)90455-0

Narayan V a., Kriwacki RW, Caradonna JP (1997) Structures of zinc finger domains from transcription factor Sp1. Insights into sequence-specific protein-DNA recognition. *Journal of Biological Chemistry* 272:7801–7809. doi: 10.1074/jbc.272.12.7801

National Academy of Sciences (U.S.) (2001) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. National Academy Press, Washington.

Neumann HG, Bitsch A, Klöhn PC (1997) The dual role of 2-acetylaminofluorene in hepatocarcinogenesis: Specific targets for initiation and promotion. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 376:169–176. doi: 10.1016/S0027-5107(97)00040-7

Nguyen T, Nioi P, Pickett CB (2009) The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry* 284:13291–13295. doi:10.1074/jbc.R900010200.

Ogawa K (2009) Molecular pathology of early stage chemically induced hepatocarcinogenesis. *Pathology International* 59:605–622. doi: 10.1111/j.1440-1827.2009.02416.x

Omata Y, Salvador G a., Supasai S, et al (2013) Decreased zinc availability affects glutathione metabolism in neuronal cells and in the developing brain. *Toxicological Sciences* 133:90–100. doi: 10.1093/toxsci/kft022

Pahl HL (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18:6853–6866. doi: 10.1038/sj.onc.1203239

Palmeira SM, Silva PRP, Ferrão JSP, et al (2015) Chemopreventive effects of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) on preneoplastic lesions in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *European Journal of Cancer Prevention* 1. doi: 10.1097/CEJ.0000000000000187

Park HJ, Oh JH, Park SM, et al (2011) Identification of biomarkers of chemically induced hepatocarcinogenesis in rasH2 mice by toxicogenomic analysis. *Archives of Toxicology* 85:1627–1640. doi: 10.1007/s00204-011-0715-0

Park JY, Park WS, Nam SW, et al (2005) Mutations of beta-catenin and AXIN I genes are a late event in human hepatocellular carcinogenesis. *Liver Int* 25:70–76. doi: 10.1111/j.1478-3231.2004.0995.x

Petrucchio S, Percudani R (2008) Structural recognition of DNA by poly(ADP-ribose)polymerase-like zinc finger families. *FEBS Journal* 275:883–893. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06259.x

Pitot HC (1990) Altered hepatic foci: their role in murine hepatocarcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 30:465–500. doi: 10.1146/annurev.pa.30.040190.002341

Prives C, Hall P (1999) The p53 pathway. *Journal of Pathology* 187:112–26. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199901)187:1<112::AID-PATH250>3.0.CO;2-3

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of nutrition* 123:1939–1951.

Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A (2008) Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature reviews Molecular cell biology* 9:402–412. doi: 10.1038/nrm2395

Roohani N, Hurrell R, Kelishadi R, Schulin R (2013) Zinc and its importance for human health: An integrative review. *J Res Med Sci* 18:144–157.

Santos NP, Colaço A, da Costa RMG, et al (2014) N-diethylnitrosamine mouse hepatotoxicity: Time-related effects on histology and oxidative stress. *Experimental and Toxicologic Pathology* 66:429–436. doi: 10.1016/j.etp.2014.07.002

Sanyal AJ, Yoon SK, Lencioni R (2010) The etiology of hepatocellular carcinoma and consequences for treatment. *The oncologist* 15 Suppl 4:14–22. doi: 10.1634/theoncologist.2010-S4-14

Sedlak J, Lindsay RH (1968) Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry* 25:192–205.

Song Y, Chung CS, Bruno RS, et al (2009) Dietary zinc restriction and repletion affects DNA integrity in healthy men. *The American journal of clinical nutrition* 90:321–8. doi: 10.3945/ajcn.2008.27300 (a)

Song Y, Leonard SW, Traber MG, Ho E (2009) Zinc Deficiency Affects DNA Damage, Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and DNA Repair. 0–5. doi: 10.3945/jn.109.106369.human (b)

Stahl S, Itrich C, Marx-Stoelting P, et al (2005) Genotype-phenotype relationships in hepatocellular tumors from mice and man. *Hepatology* 42:353–61. doi: 10.1002/hep.20768

Sun J, Liu J, Pan X, et al (2011) Effect of zinc supplementation on N-nitrosomethylbenzylamine-induced forestomach tumor development and progression in tumor suppressor-deficient mouse strains. *Carcinogenesis* 32:351–358. doi: 10.1093/carcin/bgq251

Suzuki S, Asamoto M, Tsujimura K, Shirai T (2004) Specific differences in gene expression profile revealed by cDNA microarray analysis of glutathione S-transferase placental form (GST-P) immunohistochemically positive rat liver foci and surrounding tissue. *Carcinogenesis* 25:439–443. doi: 10.1093/carcin/bgh030

Taccioli C, Chen H, Jiang Y, et al (2012) Dietary zinc deficiency fuels esophageal cancer development by inducing a distinct inflammatory signature. *Oncogene* 31:4550–4558.

Tainer JA, Getzoff ED, Richardson JS et al (1983) Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* 306:284–287.

Tan X, Behari J, Cieply B, et al (2006) Conditional Deletion of β -Catenin Reveals Its Role in Liver Growth and Regeneration. *Gastroenterology* 131:1561–1572. doi: 10.1053/j.gastro.2006.08.042

Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, et al (2010) Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicologic pathology* 38:5S–81S. doi: 10.1177/0192623310386499

Tice RR, Agurell E, Anderson D, et al (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis* 35:206–21.

Verhaegh GW, Parat MO, Richard MJ, Hainaut P (1998) Modulation of p53 protein conformation and DNA-binding activity by intracellular chelation of zinc. *Molecular carcinogenesis* 21:205–214. doi: 10.1002/(SICI)1098-2744(199803)21:3<205::AID-MC8>3.0.CO;2-K

Vesselinovitch SD, Mihailovich N (1983) Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse. *Cancer Research* 43:4253–4259.

Vesselinovitch SD, Koka M, Mihailovich N, Rao K V (1984) Carcinogenicity of diethylnitrosamine in newborn, infant, and adult mice. *Journal of cancer research and clinical oncology* 108:60–5.

Vesselinovitch SD (1987) Certain aspects of hepatocarcinogenesis in the infant mouse model. *Toxicologic pathology* 15:221–228. doi: 10.1177/019262338701500216

Wessells KR, Brown KH (2012) Estimating the Global Prevalence of Zinc Deficiency: Results Based on Zinc Availability in National Food Supplies and the Prevalence of Stunting. *PLoS ONE* 7:e50568. doi: 10.1371/journal.pone.0050568

Wright JD, Lim C (2007) Mechanism of DNA-binding loss upon single-point mutation in p53. *J Biosci* 32:827–39.

Yakoob MY, Theodoratou E, Jabeen A, et al (2011) Preventive zinc supplementation in developing countries: impact on mortality and morbidity due to diarrhea, pneumonia and malaria. *BMC Public Health* 11:S23. doi: 10.1186/1471-2458-11-S3-S23Yeiser EC,

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002) Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine* 33:337–349. doi: 10.1016/S0891-5849(02)00905-X

Zhong W, Zhao Y, Sun X, et al (2013) Dietary zinc deficiency exaggerates ethanol-induced liver injury in mice: involvement of intrahepatic and extrahepatic factors. *PloS one* 8:e76522. doi: 10.1371/journal.pone.0076522

Zhou Z, Wang L, Song Z, et al (2005) Zinc supplementation prevents alcoholic liver injury in mice through attenuation of oxidative stress. *Am J Pathol* 166:1681–90. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62478-9

Zucman-Rossi J (2008) Human and mouse hepatocellular adenoma and carcinoma display similar tumorigenesis pathway alterations. *Journal of Hepatology* 48:884–886. doi: 10.1016/j.jhep.2008.02.001